



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

***Musca domestica* (Diptera:Muscidae) como vector  
mecánico de *Salmonella* spp. en la comunidad agrícola de La  
Colonia Tovar, Edo. Aragua**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Arianna Thomas Cbianca como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Blas Dorta

Caracas, Venezuela  
Octubre - 2009

*I know Jah would never let us down...  
They made their world so hard every day we got to keep on fighting  
They made their world so hard every day the people are dying  
It dread, dread for hunger and starvation dread dread, dread on  
dread Lamentation dread dread But read it in Revelation dread dread  
You'll find your redemption*

Bob Marley

*I can change the world with my own two hands  
Make a better place with my own two hands  
Make a kinder place with my own two hands  
I can make peace on earth with my own two hands  
I can clean up the earth with my own two hands  
I can reach out to you with my own two hands  
I'm gonna make it a brighter place  
I'm gonna make it a safer place  
I'm gonna help the human race  
With my own two hands  
I can hold you with my own two hands  
I can comfort you with my own two hands  
But you got to use your own two hands  
Use your own two hands  
With our own two hands  
With my own two hands*

Ben Harper

## **AGRADECIMIENTOS:**

A todos los que han estado presentes en este proceso de formación...

A las primeras personas que quiero agradecer son a mi madre y a mi padre por darme la vida... gracias a ellos estoy aquí, hoy en día, y si no hubiera tenido su apoyo y ayuda no podría ser lo que soy hoy. A mi madre en especial por estar ahí siempre sin importar el lugar o la hora y siempre confiar en mí ciegamente. A mi padre por mostrarme que no importa la edad que uno tenga, la juventud se lleva por dentro y que uno siempre tiene que ir tras de lo que le gusta hacer, por eso el arte y la biología van de la mano conmigo.

También le agradezco a mis abuelos, mi nonno Walter y su gran carácter súper fuerte que con el paso de los días me doy cuenta de cuanto ese carácter se refleja en mí. A mi nonno Carlos por heredarme ese amor por la naturaleza, el campo y los cultivos (se mantuvo la agronomía en la familia), a mi nonna Odilda que hoy entiendo porque nos mandaba a lavar las manos cada 5 minutos y las frutas y vegetales como 10 veces, es verdad, las bacterias están en todos lados y nos enferman, en esos tiempos me fastidiaba, pero hoy lo entiendo, y por último a mi nonna Clara que está la mayoría de los días a mi lado y a pesar de que chocamos en el carácter y no entiende lo que hago, ni mis tatuajes o piercings o el cabello de colores, entre muchísimas cosas, sé que me quiere tal y como soy, porque lo siento.

A mi hermano, porque aunque no lo crea, lo quiero y ha tenido un gran papel en este proceso. También a mis tíos y primos.

A mi madrina Mercedes por sus buenos consejos y apoyos con todo lo que hago, desde la biología hasta las artesanías.

Le doy un súper agradecimiento a Daniel, a mi Daniel, que siempre ha estado a mi lado en los malos y buenos ratos, quien ha vivido todo el proceso de la tesis, todos los momentos de estrés que he tenido y ha vivido con las moscas al igual que yo. Quien ha tenido que aguantar mis malas y buenas caras, y sin importar nada ha estado allí apoyándome, aunque también a veces él las puso, pero siempre estaba ahí apoyándome. A quien ha sido mi mejor amigo y mi amor, quien sin importar nada me ayudo en todo lo que necesitaba, como subir a la Colonia y calarse 10 horas de cola bajando (momento de mala cara), pero luego con un mate en casa se pasaba todo el mal rato y volvía a sonreír a mi lado.

A mi Isa, mi gran y super Isa, mi hermana, que siempre ha estado y sé que siempre va a estar a mi lado, quien me ha apoyado en todas mis decisiones y me ha reprochado las incorrectas para no equivocarme, con quien he pasado varios de los mejores momentos de mi vida y sé que pasare muchos más, a quien sin importar las malas caras de ambas o que un día nos caigamos a golpes, se que al día siguiente siempre todo va a estar bien, como las hermanas... a quien me ha enseñado, y bueno reafirmado que la vida es sólo una y que cada momento de ella es preciado, por lo cual cada día debe vivirse como el primero... te adoro.. disculpa porque tu carro se llenara de larvas de moscas.

A Miguel por ser un gran amigo, por sus grandes ocurrencias cuando estudiábamos como “las escobas de fantasía y la replicación del DNA”, y sobre todo por siempre reírnos juntos.

También quiero agradecer a Sandi, el profe Ayesta, Pavel, Alejandra y Daniel, que siempre me brindaron su apoyo en los buenos y malos momentos, quienes supieron sacar una sonrisa de mi rostro en los peores momentos y con quienes he trabajado y me han hecho sentir que el Laboratorio de Foto es la segunda casa. En especial a Sandi por su súper buen humor, implacable paciencia y gran apoyo, siempre actuando como el segundo papá de Isa y mío. Al profe Ayesta por enseñarme el camino de la fotografía y ser un gran ejemplo a seguir. A Pavel por su gran apoyo con todas las cosas que hago, su simpleza y grandes consejos. A Alejandra por su energía y alegría y a Daniel porque siempre me hace reír con sus ocurrencias.

A Aurelio, porque siempre nos tuvimos el uno al otro en el laboratorio y sabemos qué si no hubiera sido así, no hubiéramos sobrevivido, por ayudarme en todo momento que lo necesité y como he dicho varias veces estamos juntos en esto hasta el final, y siempre tendrá mi apoyo.

Un agradecimiento especial al Profesor Blas por aceptarme como tesista y proponerme este gran proyecto el cual ayuda a hacer el mundo mejor. Por su apoyo en cada momento, por sus conversaciones y sobre todo por su “relájate, por qué el apuro”, en resumen gracias.

Gracias a Roxana por recomendarme al profesor Blas, por ayudarme siempre que lo necesité y estar dispuesta a aclarar siempre cualquier duda que tuve, gracias por ser un ejemplo para mí con tu trabajo y por recomendarme la asignatura Manejo y control de Plagas con la cual encontré mi vocación en la Biología.

Gracias a Dayanara por toda su ayuda en el laboratorio y a pesar que al principio fue un poco fuerte, luego fluyó todo y logramos entendernos. Un agradecimiento especial también a Mayri por siempre recordarme el tener paciencia con el profesor y el “no te preocupes porque al final todo va salir bien” y bueno así fue.

Un gran agradecimiento a la señora Juanita por ayudarme siempre en todo lo relacionada con las bacterias, por responder todas las miles de preguntas que tuve así fueran sumamente tontas, y siempre me explicó con su máxima paciencia y todo el tiempo estuvo pendiente de que aprendiera el por qué de todo, lo cual se lo agradezco mucho. Gracias a Indira también por enseñarme a trabajar con las bacterias y a hacer los aislamientos que quedaran de foto y enseñarme muchísimas cosas sobre las mismas y siempre tener la disposición y paciencia para ello.

A Ivan quien me ha demostrado que no importa cuán diferente sean las persona, siempre se puede lograr un gran amistad... además para quien desde hace mucho tiempo siempre vio el éxito en mí y me lo recordaba y remarcaba.

A mis amigos que me han acompañado y acompañan hoy en día en la universidad: Sandrita, Ifigenia, Johnny, Iskya, Verónica, Gabo, Ana, Maíz, Nelson y Andrés.

A mis chicas: Harina, Mariaja y Anís, por estos casi 14 años de amistad, en los que no importa cuánto tiempo pasemos sin vernos o sin hablarnos, pero cuando nos volvemos a encontrar es como si el tiempo no hubiera pasado y aun estuviéramos en los recreos, sentadas en la curvita día tras día y luego los fines de semanas juntas, porque esta amistad tan grande y conexión que tenemos es mágica y nos une y seguirá uniendo por muchos y muchos años.

Al profesor Renato por ayudarme con la estadística.

A Gianna Martiradonna, la Profesora Darjaniva Molina y el Señor Julio González de instituto de Malariología y la escuela de Agronomía quienes me enseñaron todo sobre las moscas, además me ayudaron en la cría de ellas y me trataron como uno más cuando estuve haciendo las pasantías en el instituto.

Al señor Edgar Mujica por llevarme a la Colonia.

A la Hacienda La Milagrosa.

Y el más especial agradecimiento a Frank, Alix y sus niñas, quienes en todo momento de las colectas de las moscas en la finca que tienen a cargo me dieron todo su apoyo, preguntaban todo lo que hacía y el por qué, también por sus niñas que siempre me dieron sonrisas cuando hacia las colectas y me acompañaron siempre en ellas y me enseñaron mucho sobre los cultivos y las moscas, aquí es donde uno ve que los niños nos enseñan muchas cosas. Gracias a ellos, siento la

gran importancia de este proyecto y de terminarlo porque vi en la situación en que viven día a día con las moscas y no es posible que no sepan nada y no hagan nada por ellos.

Gracias a todos...





## INDICE GENERAL.

INDICE GENERAL.....	ii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	vi
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Biología de <i>Musca domestica</i> .....	3
2.2. Importancia de <i>Musca domestica</i> en la salud pública.....	6
2.3. Gallinaza o estiércol de pollo.....	8
2.4. Características del género <i>Salmonella</i> .....	9
2.4.1. Salmonelosis. Síntomas, diagnóstico y patogénesis.....	10
3. ANTECEDENTES.....	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1. General.....	18
5.2. Específicos.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1. Zona de estudio.....	19
6.2. Material biológico.....	19
6.3. Medios de cultivo.....	20
6.3.1. Medios de cultivo para enriquecimiento bacteriano.....	20
6.3.1.1 Agar nutritivo (AN).....	20
6.3.1.2. Caldo Luria Bertrami (LB).....	20
6.3.1.3. Solución salina.....	21
6.3.2. Medios específicos para aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> .....	21
6.3.2.1. Medio mínimo agarizado suplementado con Histidina y Triptófano.....	21
6.3.2.2. Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD).....	22
6.3.2.3. Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV).....	23
6.3.2.4.- Agar Salmonella-Shigella (SS).....	23
6.3.3.- Medios para pruebas bioquímicas.....	24
6.3.3.1. Agar con Hierro de Kligler.....	24

6.3.3.2. Agar para Motilidad-indol-ornitina (MIO).	25
6.3.3.3.- Medio de Citrato Simmons.	26
6.3.3.4. Agar de lisina y hierro (LIA).	26
6.4. Soluciones para la técnica de Tinción Gram.	27
6.5. Cría de <i>M. domestica</i> en condiciones de laboratorio.	28
6.5.1. Colecta de ejemplares adultos de <i>M. domestica</i> .	28
6.5.2. Condiciones ambientales en el Laboratorio para el mantenimiento de los ejemplares colectados.	29
6.5.3. Alimentación de las moscas en condiciones de laboratorio.	29
6.5.4. Obtención de individuos Homogéneos (F <sub>1</sub> ).	29
6.5.5. Medio de cría para larvas de <i>M. domestica</i> en condiciones de laboratorio.	30
6.6. Manipulación de <i>M. domestica</i> para trabajos en el laboratorio.	31
6.7. Desinfección de <i>M. domestica</i> .	32
6.8. Inoculación de estiércol con <i>S. typhimurium</i> LT2.	33
6.9. Contaminación de moscas con <i>S. typhimurium</i> LT2 presente en estiércol de pollo.	33
6.9.1. Caracterización de bacterias crecidas en placas de agar XLD.	34
6.10. Aislamiento y caracterización de <i>Salmonella entérica</i> .	34
6.10.1. Aislamientos de <i>Salmonella</i> en el cuerpo de <i>M. domestica</i> , gallinaza y heces de humanos en muestras recolectadas en la Colonia Tovar.	34
6.10.2. Titulación bacteriana de muestras aisladas.	36
6.10.3. Identificación de <i>Salmonella</i> por medios específicos.	37
6.10.4. Técnica de Tinción Gram.	37
6.10.5. Identificación de <i>Salmonella</i> mediante pruebas bioquímicas.	37
6.11. Métodos estadísticos.	38
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
7.1. Establecimiento de la cría de <i>M. domestica</i> .	39
7.2. Manipulación de <i>M. domestica</i> para trabajos en el laboratorio.	40
7.3. Desinfección de <i>M. domestica</i> :	43

7.4.- Contaminación de <i>M. domestica</i> con <i>S. typhimurium</i> LT2 presente en estiércol de pollo.....	49
7.5.- Aislamiento y caracterización de <i>Salmonella spp.</i> .....	51
7.5.1.- Aislamiento e identificación por medios de específicos de <i>Salmonella</i> en el cuerpo de <i>M. domestica</i> recolectadas en diferentes zonas del Municipio Tovar...	51
7.5.2.- Aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp.</i> por medios de específicos de muestras de gallinaza del sector agrícola de La Colonia Tovar y estiércol de pollo de un Gallinero del Estado Aragua.....	58
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	64
<b>9. RECOMENDACIONES.</b> .....	65
<b>10. APENDICE.</b> .....	66
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	68
11.1. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.....	74

## INDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Morfología y clasificación de <i>Musca domestica</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de la mosca. ....	4
<b>Figura 3.</b> Ciclo de infección causa-efecto de la <i>M. domestica</i> .....	8
<b>Figura 4.</b> Mapa político del Estado Aragua.....	19
<b>Figura 5.</b> Efecto del tiempo de exposición de los adultos a la hipotermia, sobre el tiempo de inactividad. ....	42
<b>Figura 6.</b> Desinfección con Hipoclorito de Sodio 5%.....	46
<b>Figura 7.</b> Desinfección con Amonio Cuaternario 10%.....	48
<b>Figura 8.-</b> Zonas de colecta en el Municipio Tovar de ejemplares de Moscas domésticas. 1) Finca en el sector Gabante El Peñon II, 2) Centro Clínico Colonia Tovar, 3) Centro del pueblo y lugar turístico de La Colonia Tovar.....	52
<b>Figura 9.</b> Fenotipo de las colonias de <i>Salmonella</i> en placas de agar XLD Y SS. Las salmonellas en las placas de AXLD se observan con el centro negro y un halo rosa y en las de ASS con el centro negro y un halo transparentoso.....	55

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Composición del medio AN.....	20
<b>Tabla 2.</b> Composición del Caldo LB.....	21
<b>Tabla 3.</b> Composición de la solución de Sales 2X.....	21
<b>Tabla 4.</b> Tabla de suplementos para los medios minerales y nutritivos.....	22
<b>Tabla 5.</b> Composición del agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD).....	22
<b>Tabla 6.</b> Composición del medio Rappaport-Vassiliadis (RV).....	23
<b>Tabla 7.</b> Composición del medio Salmonella-Shigella.....	24
<b>Tabla 8.</b> Componente para preparar prueba Kligler.....	24
<b>Tabla 9.</b> Composición para la Prueba MIO.....	25
<b>Tabla 10.</b> Ingredientes para la prueba de Citrato.....	26
<b>Tabla 11.</b> Ingredientes para la preparación del medio LIA.....	27
<b>Tabla 12.</b> Soluciones para la tinción Gram.....	27
<b>Tabla 13.</b> Valores de tiempo de inmovilidad de adultos de <i>M. domestica</i> , sometidas a 0° C en función del tiempo de exposición.....	41
<b>Tabla 15.</b> Abundancia bacteriana en ejemplares de <i>M. domestica</i> silvestres luego de aplicar tres desinfectantes comerciales.....	45
<b>Tabla 16.</b> Relación entre el tiempo de exposición de la mosca al estiércol contaminado con <i>S. Typhimurium</i> LT2 y la cantidad de bacterias transportadas.....	51
<b>Tabla 17.</b> Resultados de análisis con placas de Agar SS y XLD de las patas de las moscas en el campo.....	52
<b>Tabla 18.</b> Número de moscas infectadas con bacterias del género <i>Salmonella</i> colectadas en diferentes regiones de La Colonia Tovar.....	55
<b>Tabla 19.</b> Pruebas realizadas para la confirmación del género <i>Salmonella</i> de las bacterias aisladas de las moscas.....	57
<b>Tabla 20.</b> Muestras de estiércol de pollo y gallinaza analizadas para el aislamiento de <i>Salmonella</i> .....	59

<b>Tabla 21.</b> Prueba realizadas para la confirmación del género Salmonella de las bacterias aisladas de muestras de heces de pollo y gallinaza.....	60
<b>Tabla 22.</b> Morbilidad 2008-Agosto 2009 de enfermedades diarreicas, D.M.S. Centro Clínico Colonia Tovar.....	61
<b>Tabla 23.-</b> Pruebas bioquímicas aplicadas y reacción esperada.....	66
<b>Tabla 24.-</b> Análisis de varianza para la prueba de comparación por pares de Tukey.....	67





## 1. RESUMEN.

La mosca doméstica es considerada una plaga común y abundante en las granjas avícolas. Su densidad es proporcional a la acumulación de estiércol de ave, el cual constituye un excelente medio de cultivo para las larvas de estos insectos. *M. domestica* puede actuar como vector mecánico y/o biológico de diferentes microorganismos patógenos, presentes en las heces de pollo y causantes de enfermedades gastrointestinales en humanos, convirtiéndose así en un problema de salud pública. Entre estos microorganismos se encuentran algunas especies del género *Salmonella*, en su mayoría capaces de colonizar el aparato gastrointestinal de los pollos y dispersarse en el ambiente a través de sus heces.

Se busca demostrar que la *M. domestica* puede actuar como vector mecánico para la transmisión de bacterias entéricas potencialmente patógenas, principalmente serotipos de *Salmonella* presentes en la gallinaza.

Se colectaron moscas en el municipio Tovar, Edo. Aragua. Se estableció la cría de *M. domestica* según la metodología de Martiradonna y Soto (2006). Los insectos fueron expuestos a bajas temperaturas a fin de producir aletargo. Se midió el tiempo requerido para que la mosca recobrara su actividad. Para eliminar la carga microbiana en la cutícula de las moscas, fueron sumergidas en desinfectantes comerciales a base de: hipoclorito de sodio al 5%, amonio cuaternario al 10% y polimetilendiurea al 5%, con posteriores baños en agua destilada estéril. Luego del tratamiento, la eliminación bacteriana era comprobada haciendo caminar las moscas sobre agar nutritivo estéril, con la consecuente ausencia de crecimiento microbiano.

Las moscas libres de microorganismos eran infectadas selectivamente con *Salmonella typhimurium* LT2 presente en estiércol de pollo. Se colectaron moscas, muestras de heces de pollo y gallinaza en diferentes lugares del Municipio Tovar, de las cuales se aisló *Salmonella* spp. utilizando los medios específicos Agar SS y XLD, y la posterior confirmación de las bacterias aisladas con tinción Gram y pruebas bioquímicas.

El tiempo de exposición ideal de las moscas al frío fue de 150 seg, obteniendo un aletargo de alrededor de 5 minutos. El desinfectante como componente activo, amonio cuaternario eliminó toda la carga microbiana de la cutícula de las moscas en 4 de las réplicas. Las moscas desinfectadas colocadas en presencia de gallinaza contaminada con *S. typhimurium* LT2 presentaron esta bacteria en su cuerpo; lo cual se comprobó mediante la transferencia de cada mosca a placas de agar XLD. En el 16,4% de las moscas colectadas en campo se encontró en su cuerpo *Salmonella* spp. En 4 de 6 muestras de heces de pollo se encontró *Salmonella* spp. y en 4 de 6 muestras de gallinaza también.

Ya que *M. domestica* desarrolla gran parte de su ciclo de vida en heces de pollo y gallinaza, se puede considerar una relación directa entre la *Salmonella* spp. aislada de la gallinaza y heces y la *Salmonella* spp. aislada del cuerpo de las moscas en El Municipio Tovar. Relacionando esto con la alta densidad de *M. domestica* en esta zona y que los habitantes sufren constantes disenterías provocadas por bacterias entéricas.

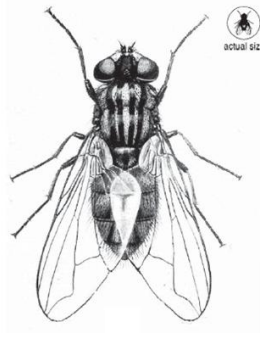
**Palabras Clave:** *Musca domestica*, *Salmonella* spp., gallinaza, vector mecánico.

## 2. INTRODUCCIÓN.

La mosca doméstica (*Musca domestica* Linnaeus, 1758) es considerada una plaga común y abundante en las granjas avícolas (Axtell y Arens, 1990) y su densidad es proporcional a la acumulación de estiércol de ave, debido a que las heces fecales constituyen un excelente medio de cultivo para las larvas de estos insectos (Avancini y Silveira, 2000; Cova y Scorza-Dagert, 2006). Por otra parte, *M. domestica* puede actuar como vector mecánico y/o biológico de diferentes microorganismos patógenos contenidos en el estiércol de pollo que pueden causar enfermedades gastrointestinales en humanos (WHO, 2001; Keiding, 1986). Entre los microorganismos dispersados por *M. domestica* se encuentran algunas especies del género *Salmonella* pertenecientes al grupo de las enterobacterias. La mayoría de los serotipos de *Salmonella*, colonizan el aparato gastrointestinal de los pollos y se diseminan en el ambiente a través de sus heces (Del Pozo y col., 2001), lo que conlleva a considerar a *M. domestica* como un problema de salud pública.

### 2.1. Biología de *Musca domestica*.

*Musca domestica* (Figura 1) es una típica mosca sinantrópica a diferencia de otras especies de moscas, ya que se encuentra universalmente asociada al hombre. Parte de su ciclo de vida lo puede efectuar en desperdicios orgánicos de humanos y animales domésticos. (Montada, 2001; World Health Organization [WHO], 1991)



Clase: Insecta.  
Orden: Diptera.  
Familia: Muscidae.  
Género: *Musca*.  
Especie: *Musca domestica*  
(Carvalho y Couri, 2005).

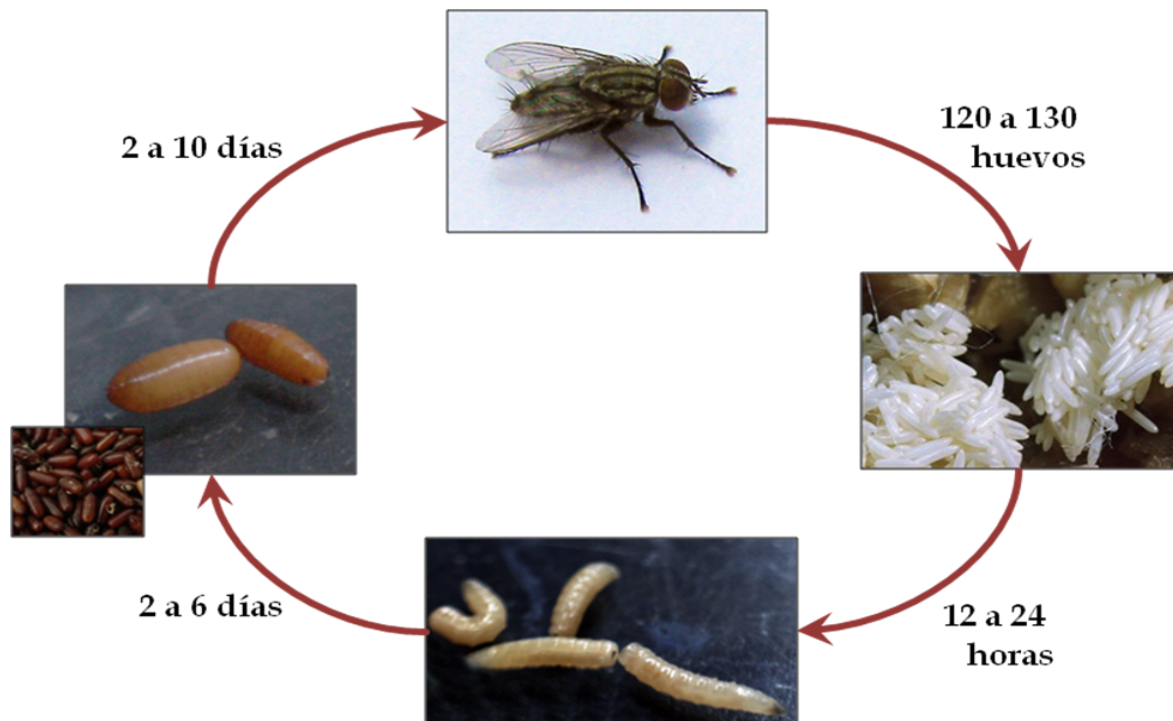
**Figura 1. Morfología y clasificación de *Musca domestica*.** Tomado y modificado de WHO (1991), Carvalho y Couri, (2005).

Las especies del Orden *Musca*, generalmente son de tamaño mediano y en el tórax presentan bandas grises y negras metálicas con diferentes proporciones y distribución dependiendo de la especie (Montada, 2001). Poseen ojos compuestos, antenas receptoras y aparato bucal chupador. En las alas presentan un ángulo agudo en la cuarta vena longitudinal como carácter autopomórfico de este género (WHO, 1991).

En cuanto a sus hábitos alimenticios, las moscas consumen casi cualquier tipo de alimento, entre los que se encuentran principalmente: desechos orgánicos, sudor, excretas de humanos y animales. En establecimientos humanos, las principales fuentes nutricionales son leche, azúcar, jarabe, sangre, entre otros (WHO, 1991). Generalmente, la presencia de estos insectos en los diferentes ambientes es reflejo de condiciones sanitarias inapropiadas, lo que a su vez les permite a las moscas recoger y transportar agentes infecciosos de diferente índole (Bonney y col., 2008).

Las moscas domésticas son insectos holometábolos con cuatro diferentes etapas en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto, cumpliendo así una metamorfosis completa (Figura 2). El desarrollo de los huevos hasta el adulto dura

entre 6 y 42 días, dependiendo este tiempo de la temperatura ambiental (WHO, 1991; Montada, 2001). Mientras mayor sea la temperatura ambiental la duración del ciclo será menor. En condiciones de laboratorio (temperatura entre 28 - 32° C, humedad relativa entre 70-80% y fotoperíodo con 12 horas de luz), el ciclo biológico de *M. domestica*, tiene una duración aproximada de 9 días en completarse (Martiradonna, 2006). Así, las moscas adultas pueden vivir en condiciones de laboratorio alrededor de 30 días.



**Figura 2. Ciclo de vida de *Musca domestica*.**

Generalmente, las hembras colocan entre 120 y 130 huevos en aglomeraciones de desechos orgánicos tales como basura y excremento, siendo este último sustrato el más importante por la alta cantidad de nutrientes que contiene para el desarrollo de las larvas (Montada, 2001).

La mosca puede permanecer en el estadio pupal de 2 a 10 días, dependiendo de las condiciones ambientales. Cualquier cambio drástico en el ambiente inhibe el paso a adulto ocasionando la muerte (WHO, 1991; Montada, 2001).

## **2.2. Importancia de *Musca domestica* en la salud pública.**

Las moscas domésticas pueden actuar como vectores mecánicos y/o biológicos de diferentes microorganismos patógenos para los humanos, entendiéndose como vector mecánico, cualquier animal, principalmente artrópodos que pueden transportar agentes infecciosos tanto sobre como dentro de su cuerpo (alojándose en el aparato bucal o tubo digestivo); pero estos agentes pueden vivir y desarrollarse sin que intervengan en los procesos fisiológicos y metabólicos del insecto, puesto que lo único que el insecto le brinda es protección y transporte (Hernández-Chavarría, 2002).

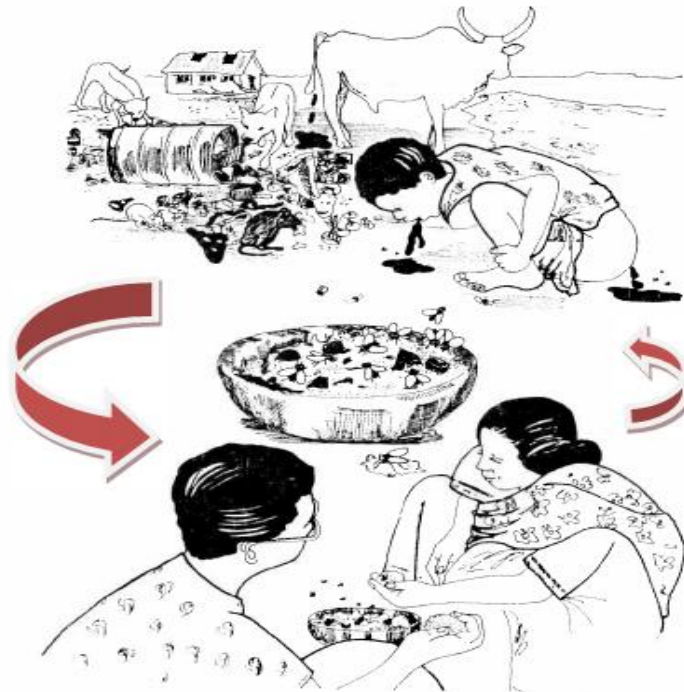
Estas moscas pueden dispersar distintas enfermedades, ya que frecuentemente se posan sobre alimentos para humanos luego de haberse posado en los diferentes desperdicios (WHO, 2001; Keiding, 1986). Por ejemplo, el estiércol puede actuar como un excelente medio de cultivo en donde se desarrollan tanto las larvas de las moscas como los microorganismos transportados por ellas. La cantidad de microorganismos transportados por *M. domestica* a partir de las heces depende de la densidad de los mismos y el tiempo que tengan las excretas en el ambiente (Greenberg, 1964).

Entre las bacterias patógenas asociadas al estiércol se encuentran especies de los géneros: *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, estos patógenos pueden ser

transmitidos de tres formas: i) a través de la superficie corporal, ya que la presencia de espinas y cerdas pueden atrapar material contaminado, ii) por regurgitación encima de la comida como prelude a su alimentación y iii) por la defecación de los patógenos (Béjar y col., 2006). Generalmente, los agentes infecciosos se adhieren a las estructuras pilosas del abdomen y patas del mscido, logrando ser dispersados a cualquier lugar donde el mscido se pose nuevamente.

Se han encontrado muchos problemas relacionados con la salud pblica en regiones agrcolas donde es utilizado el estiércol de pollo como fertilizante ya que su alto contenido en materia orgnica propicia la proliferación de las moscas.

Las enfermedades que las moscas domsticas pueden transmitir, incluyen las infecciones entricas, tales como: la disentería, la diarrea, la fiebre tifoidea, el cólera y ciertas infecciones transmitidas por helmintos; de igual forma pueden transmitir infecciones en los ojos, poliomieltis e infecciones en la piel (WHO, 2001). En la figura 3 se observa el ciclo de infección causa-efecto de la *M. domstica* sobre el humano.



**Figura 3. Ciclo de infección causa-efecto de la *M. domestica*.** Tomado y modificado de Keiding (1986). Las moscas pueden estar en contacto con sustratos que posiblemente estén contaminados con diferentes patógenos. Los múscidos contaminados pueden depositar suficientes microorganismos encima de alimentos, piel y/o utensilios de uso humano, causando las diferentes infecciones mencionadas anteriormente (Greenberg, 1964).

### 2.3. Gallinaza o estiércol de pollo.

Las unidades de producción avícola industrial generan grandes cantidades de desechos sólidos que incluyen excretas, residuos de alimentos, y animales muertos, que posteriormente son utilizados como abono orgánico en el sector agrícola de baja producción.

Las excretas de pollos pueden ser utilizadas como fertilizante orgánico, generalmente en zonas rurales, donde es conocido como gallinaza. Casi siempre está constituida por residuos de alimentos y plumas además de las excretas (Palacios, 2005; Ríos y col., 2005).

Por otra parte cuando se trata de gallinas ponedoras o cría de pollos para engorde, el suelo de los galpones se encuentra frecuentemente cubierto con cáscara



de arroz (Palacios, 2005; Ríos y col., 2005). Las excretas, así como los residuos de alimentos y plumas son mezclados con la cáscara de arroz, constituyendo una especie de lecho o cama, conocido como yacija. Estas camas son descartadas luego de varias generaciones de pollos, generando un residuo rico en nutrientes (minerales), pero con muy alto contenido de materia orgánica.

El empleo de gallinaza y yacijas como abono orgánico, es una práctica común entre los productores agrícolas. Sin embargo, la aplicación directa de estos materiales a los suelos, sin previo tratamiento, genera una serie de problemas, entre los que se encuentran los malos olores y la proliferación de moscas, además de la dispersión de los microorganismos patógenos que pudiesen estar presentes en este tipo de fertilizante (Palacios, 2005; Ríos y col., 2005).

En zonas rurales se ha encontrado que tanto la yacija como la gallinaza no poseen diferencias en cuanto a preferencia de uso como fertilizante por los agricultores, todo depende de la práctica avícola que se realice en dicha región. En general, el fertilizante se puede identificar con cualquiera de los dos nombres.

#### **2.4. Características del género *Salmonella*.**

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*. Estas bacterias son bacilos Gram negativos que suelen ser móviles a excepción de la *Salmonella entérica* serotipo Gallinarum y las mutantes inmóviles. La mayoría utilizan citrato como única fuente de carbono y pueden producir gases como CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> por la fermentación de carbohidratos, en especial de la glucosa. *S. entérica* serotipo Typhi representa una excepción muy importante, ya que no produce gas (Perea y Corral,

1996). Las colonias son generalmente blancas, redondas, con bordes uniformes, pequeñas y cóncavas. Por lo general las bacterias de este género tienen la capacidad de producir compuestos sulfurados, descarboxilar la lisina y la ornitina, y estas cualidades son utilizadas para la identificación de estas bacterias a partir de pruebas bioquímicas, asimismo, estas bacterias tienen la capacidad de sobrevivir a presiones osmóticas relativamente elevadas y multiplicarse a valores relativamente bajos de pH (HiMedia®, 1998 y Oxoid®, 1995).

Casi todos los serotipos de *Salmonella* colonizan el aparato gastrointestinal de los pollos y se diseminan a través de la vía fecal-oral hasta el ambiente. Los serotipos Enteritidis y Typhimurium presentan afinidad por las aves de corral y casi invariablemente son invasoras de su tracto digestivo. Estos serotipos pueden infectar el aparato reproductivo y transmitirse verticalmente al huevo del ave (Del Pozo y col., 2001). Rojas y col. (2002) aislaron de la cama de pollos utilizada en avicultura, varios serotipos de *Salmonella* y además, hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

#### **2.4.1. Salmonelosis. Síntomas, diagnóstico y patogénesis.**

El nombre de salmonelosis es dado al conjunto de enfermedades del hombre y de los animales producidas por diferentes microorganismos del género *Salmonella* (Perea y Corral, 1996). El tipo de enfermedad causada por estas bacterias no depende sólo del serotipo de la bacteria, sino también de la especie y estado inmunológico del individuo infectado (Galán, 1996). La especie *S. entérica* serotipos

Typhimurium y Entéritidis son la causa más común de la salmonelosis en humanos (Sánchez y Cardona, 2003; Madigan y col. 2004).

La ingestión de alimentos que contienen alta densidad de *Salmonella*, deriva en la colonización del intestino delgado y grueso por parte de la bacteria. La manifestación de la enfermedad ocurre de 8 a 48 horas después de la ingesta. Las expresiones clínicas varían desde severas infecciones sistémicas, hasta gastroenteritis leve, donde los síntomas principales son repentino dolor de cabeza, escalofríos, deshidratación, anorexia, vómitos y diarreas líquidas sin sangre o moco, seguido de fiebre durante varios días. Generalmente, la enfermedad desaparece sin intervención a los 3 días, pero incluso después de la recuperación, el paciente tendrá *Salmonella* en sus heces por varias semanas (Galán, 1996; Parra y col., 2002; Madigan y col., 2004; Figueroa, y Verdugo, 2005).

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza mediante la observación clínica de los síntomas, la historia del consumo reciente de alimentos y por el cultivo del microorganismo a partir de las heces (Madigan y col., 2004). Generalmente, para el tratamiento de la enfermedad se utilizan diferentes tipos de antibióticos como ampicilina, gentamicina, trimetoprima/sulfametoazol o ciprofloxacina, además de una rehidratación con fluidos intravenosos ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov); consulta: Noviembre, 2008).

Después de la ingestión, la bacteria puede resistir el pH ácido del estómago hasta llegar al intestino delgado donde coloniza las células del epitelio intestinal. Antes de invadir, la bacteria debe adherirse a las células del tejido intestinal. Para

ello utiliza el mecanismo de las adhesinas que poseen una estructura que les permite reconocer los receptores presentes en las células del hospedero. Generalmente, las adhesinas de las bacterias Gram negativas son: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS) y cápsula (Parra y col., 2002; Sánchez y Cardona, 2003; Figueroa, y Verdugo, 2005).

El patógeno interactúa compleja e íntimamente con las células que no son normalmente fagocíticas como las células epiteliales que poseen en la superficie una capa mucosa. Las bacterias penetran hasta llegar a la lámina propia de la región ileocecal y se multiplican en los folículos de la región linfoide presentándose hiperplasia reticuloendotelial. Se considera que la *Salmonella* puede activar más de un camino de transducción de señales para promover su entrada a las células del hospedero (Galán, 1996; Parra y col., 2002; Sánchez y Cardona, 2003; Figueroa, y Verdugo, 2005).

Los mecanismos de patogenicidad con que *Salmonella* induce la diarrea y septicemia no han sido descritos detalladamente. Pero parece ser un fenómeno complejo que involucra diferentes factores de virulencia. Se ha encontrado la presencia de una enterotoxina en *S. entérica* serotipos Typhimurium y Typhi, similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* y la toxina termolábil de *E. coli* (Parra y col., 2002).

### 3. ANTECEDENTES.

En los Andes de Venezuela, Cedeño y Añez (2001) han advertido que es inapropiado el uso excesivo de estiércol de pollo o gallinaza como abono de horticultura, debido a la proliferación de moscas que genera esta práctica. A la vez, se ha recomendado la aplicación de sanciones para los usuarios de gallinaza que no cumplan con las exigencias sanitarias, tales como su almacenamiento en seco, compost o su mezcla con cal. En la localidad hortícola de Timotes, Estado Mérida, el Concejo Municipal ha prohibido el transporte, almacenamiento y uso de la gallinaza por los múltiples problemas de salud pública que derivan de su utilización (Gaceta Municipal de Timotes, Estado Mérida, Venezuela, Año XI, N°2: ver Scorza y Cova, 2006).

La *M. domestica* constituye un serio problema de salud pública, ya que mientras mayor sea la densidad de éstas en un ambiente, mayor será el número de pacientes que presenten enfermedades diarreicas (Cavaceppi, 1951; Greenberg y col., 1962; Greenberg, 1964; Greenberg y col., 1970; Keiding, 1986; Oo, K y col., 1989; WHO, 1991; Manrique-Saide y Delfín-González, 1997; Iwasa y col., 1999; Kobayashi y col., 1999; Cedeño y Añez, 2001; Del Pozo y col., 2001; Montada Dorta, 2001; Moissant y col., 2004; Scorza-Dagert y Cova, 2006; Ugbogu y col., 2006; Host y col., 2007; Bonnefoy y col., 2008). Los ambientes que presentan condiciones sanitarias inadecuadas atraen a las moscas con mayor facilidad, provocando que los alimentos y agua presentes en estos sean más susceptibles a la contaminación por organismos patógenos. Esto tiene como resultado una mayor cantidad de personas con

infecciones bacterianas causadas por el consumo de alimentos contaminados en estos ambientes (Ugbogu y col., 2006).

Greenberg y col. (1962) propusieron que la presencia de moscas en los mataderos de reses y cerdos es uno de los principales indicativos de la presencia de *Salmonella*.

Greenberg (1964) demostró que *Salmonella entérica* serotipo Typhimurium puede ser transmitida a seres humanos por *M. domestica* a partir de heces de perro infectadas con la bacteria.

*M. domestica* se encuentra asociada a muchos microorganismos y la densidad de ellos varía a lo largo de la metamorfosis, siendo la fase larval la que presenta mayor número de microorganismos asociados (Greenberg, 1964). De igual forma, la densidad de microorganismos presentes en el cuerpo de las moscas adultas sigue siendo muy elevada.

Oo y col. (1989) y Aksakal y Ozcel (1993), detectaron en el exterior e interior del cuerpo de adultos de *M. domestica* diferentes tipos de enterobacterias como: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* spp. A su vez, Calisir y Polat (1993), Iwasa y col. (1999), Kobayashi y col. (1999), aislaron *E. coli* en las patas e intestino de *M. domestica* capturadas en granjas de pollo, vacas y cerdos, y en zonas rurales de Japón. Por otra parte, Moissant y col. (2004) señalaron a *M. domestica* como un vector mecánico eficiente de quistes de protozoarios, huevos de helmintos, bacterias, virus y hongos. Estos investigadores aislaron bacterias de ejemplares adultos y determinaron que la mayoría eran bacilos Gram negativos

aerobios, que correspondían a la bacteria *Escherichia coli* y en menor número a los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*. Por su parte Ugbogu y col. (2006) aislaron especies de los géneros *Shigella* y *Salmonella* sobre *M. domestica* capturadas en diferentes lugares urbanos y domésticos de la ciudad de Uturu en Nigeria.

Castellanos y Murguía. (1999) alegan que en ambientes tropicales la producción avícola se ve afectada por las elevadas temperaturas, humedad y la presencia eventual de *Salmonella*, que puede ser patógena tanto para las aves como para los humanos. Estos mismos investigadores realizaron tratamientos con dietas experimentales a base de azúcar de caña y un producto probiótico comercializado como Meitio Healthy Friend® (MHF) que posee una combinación de Oligosacáridos y dextrano. Los oligosacáridos no son hidrolizados en el intestino de las aves y sirven como sustrato para el desarrollo y proliferación de bacterias benéficas. Las bacterias benéficas reducen el pH intestinal debido a la producción de ácidos, lo cual impide el desarrollo de *E. coli* y *Salmonella*, entre otros patógenos. En los pollos alimentados con azúcar de caña encontraron en muestreos del tubo digestivo y sangre a la quinta semana la presencia de especies del género *Salmonella* en un 87%, en cambio los pollos alimentados con MHF sólo un 25% estaban infectados con esta bacteria.

Del Pozo (2001) encontró que el 13,6% de 140 muestras analizadas de pienso para gallinas y las materias primas utilizadas para su fabricación se encontraban contaminadas con *Salmonella*. Este investigador, demostró que la existencia de

diferentes serotipos de *Salmonella* en los gallineros está asociada a la falta de higiene en la preparación de los alimentos para las gallinas.

La humedad en las camas de pollos proporciona las condiciones óptimas para el desarrollo y proliferación de microorganismos que pueden causar infecciones bacterianas de gran importancia médica como la salmonelosis (Rojas y col., 2002). Generalmente, las camas de pollos se contaminan por medio de la deposición de las heces de aves infectadas, provocando a su vez la propagación de las bacterias en ambientes limpios donde se encuentran los pollos sanos. A su vez Rojas y col. (2002) encontraron que el 7,28% de las muestras analizadas de cama de pollos se encontraban contaminadas con especies del género *Salmonella*.

Recientemente, Holt y col. (2007) demuestran con su estudio que la mosca doméstica puede contaminarse rápidamente de diferentes serotipos del género *Salmonella* ya que se desarrollan y residen en un entorno donde esta bacteria abunda y prolifera.

Tomando como referencia todos estos estudios previos, se propone la existencia de una correlación directa entre el crecimiento descontrolado de moscas domésticas en comunidades agrícolas, donde utilizan constantemente las excretas de pollo como fertilizante sin haber sido tratado previamente y la proliferación de enfermedades gastrointestinales producidas por bacterias del género *Salmonella*.



#### 4. JUSTIFICACIÓN.

Diversos estudios sugieren que el estiércol de pollo posee gran diversidad de microorganismos patógenos asociados y que *M. domestica* puede actuar como vector mecánico de estos microorganismos, ya que gran parte de su ciclo de vida lo puede desarrollar en este tipo de sustratos. Sin embargo, con estos estudios no queda claro que en zonas rurales el incremento de casos de salmonelosis está relacionado con *M. domestica* como vector mecánico. De allí la importancia de determinar que las especies de *Salmonella* presentes en el estiércol de pollo usado como fertilizante y las presentes en las moscas que en él se desarrollan, a su vez, son los mismos serotipos causantes de enfermedades entéricas. La solución de este gran problema de salud pública, requiere la concientización de los productores agrícolas, sobre los efectos que tiene en su comunidad el uso de excretas de pollo como fertilizante sin tratamientos previos a su uso.

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. General.

Demostrar que la *Musca domestica* puede actuar como vector mecánico para la transmisión de bacterias entéricas, principalmente del género *Salmonella*, en comunidades agrícolas donde se emplean fertilizantes orgánicos constituidos principalmente por excretas de aves de corral.

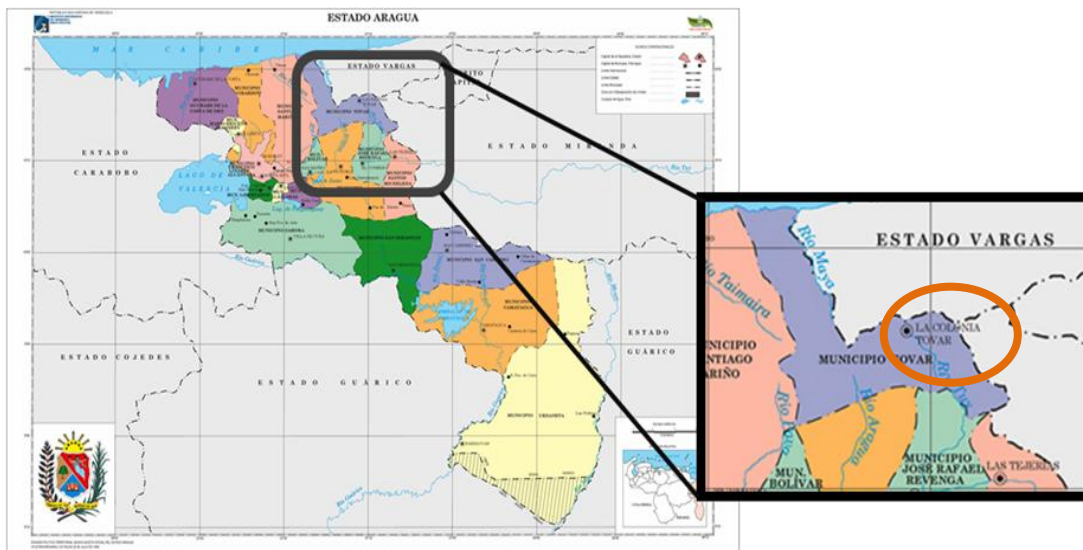
### 5.2. Específicos.

- Establecer una cría de *Musca domestica* en condiciones de laboratorio.
- Establecer y estandarizar un método para manipulación y desinfección de las moscas.
- Demostrar que las moscas domésticas desinfectadas pueden contaminar sus patas con serotipos de *Salmonella* luego de caminar por un sustrato contaminado.
- Caracterizar los aislados bacterianos provenientes de gallinaza y moscas en la comunidad agrícola de La Colonia Tovar utilizando técnicas convencionales de microbiología y técnicas bioquímicas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Zona de estudio.

El estudio se realizó en la región agrícola de La Colonia Tovar, capital del Municipio Tovar del Estado Aragua (Figura 4). Se encuentra ubicada en la ladera Sur el Picacho Codazzi en la cordillera de la costa, en la cuenca alta del río Tuy a 1.700 m.s.n.m. Está comprendida entre los 10°22' y 10°26' de latitud Norte y los 66°15' y 67°21' de longitud Oeste. Esta región se caracteriza por temperaturas que varían entre los 10° y 20° C con un régimen de precipitación de 6 a 7 meses que va desde Mayo hasta Noviembre y el período seco desde Diciembre hasta Abril. La vegetación suele ser típica de bosque nublado (Peñalver, 2001).



**Figura 4.** Mapa político del Estado Aragua. Tomado y modificado de: [www.igvsb.gov.ve](http://www.igvsb.gov.ve), Consultad: Noviembre, 2008.

### 6.2. Material biológico.

Se utilizó la bacteria entérica *Salmonella typhimurium* LT2 (ST1) – CVCM37 la cual posee los marcadores genéticos Histidina negativo y Triptofano negativo. Esta fue suministrada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos

(CVCM). Además, se utilizaron los diferentes serotipos de *Salmonella* aislados en los trabajos de campo. Así mismo, se utilizó la mosca doméstica (*Musca domestica L.*).

### **6.3. Medios de cultivo.**

Se emplearon diferentes medios de cultivo en los diferentes ensayos a realizar.

#### **6.3.1. Medios de cultivo para enriquecimiento bacteriano.**

##### **6.3.1.1 Agar nutritivo (AN).**

Este medio es de composición indefinida y nutritivamente rico; puede utilizarse para el cultivo de una amplia variedad de bacterias (Coello y col., 2003).

**Tabla 1. Composición del medio AN.** Tomado de Difco<sup>®</sup>, 1953.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración.</b>
Bacto-peptona.	5,0 g/L
Extracto de carne.	3,0 g/L
Bacto agar	15,0 g/L

Los componentes descritos en la tabla 1 fueron mezclados con agua destilada y llevados a ebullición, agitando continuamente hasta que se completó la disolución del agar. La preparación fue distribuida en botellas de 400 mL, llenas hasta 300 mL y seguidamente esterilizadas en autoclave por 15 minutos, a 121° C. Posteriormente se transfirió a cápsulas de Petri en condiciones de asepsia, las cuales fueron almacenadas en un lugar fresco (Difco<sup>®</sup>, 1953).

##### **6.3.1.2. Caldo Luria Bertrami (LB).**

El caldo LB es un medio de composición indefinida utilizado para el cultivo y reproducción en masa de bacterias. Puede utilizarse para casi cualquier variedad bacteriana.

**Tabla 2. Composición del Caldo LB.** Tomado de Coello y col., 2003.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Bacto Triptona.	10,0 g/L
Extracto de levadura.	5,0 g/L
Cloruro de sodio.	5,0 g/L

Los componentes señalados en la tabla 2 se disolvieron en agua destilada y se llevaron a ebullición agitando constantemente. El medio fue distribuido en botellas con tapa de rosca de 100 mL de capacidad y seguidamente fue esterilizado en autoclave por 15 minutos, a 121° C.

#### **6.3.1.3. Solución salina.**

Se preparó una solución de cloruro de Sodio al 0,85% (p/v) en agua destilada la cual fue distribuida en frascos pequeños o tubos con tapa de rosca. Seguidamente se procedió a su esterilización en autoclave a 121° C.

#### **6.3.2. Medios específicos para aislamiento e identificación de *Salmonella*.**

##### **6.3.2.1. Medio mínimo agarizado suplementado con Histidina y Triptófano.**

Se prepararon dos soluciones por separado, el Agar 2X y las Sales 2X (Tabla 3).

Para preparar 500 mL de medio se procedió:

Para la solución agar 2X se agregaron 7,5 g de bacto agar y se disolvieron en 250 mL de agua destilada. La preparación se esterilizó a 121° C por 15 minutos.

**Tabla 3. Composición de la solución de Sales 2X.** Tomado de Coello y col., 2003.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,80 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9 g/L

Para la solución de las Sales 2X se mezclaron los componentes de la Tabla 3 y se esterilizaron a 121° C por 15 minutos.

A la solución de sales 2X ya estéril, se le agregó 1,0 mL de MgSO<sub>4</sub> estéril; 5,0 mL de fuente de carbono estéril; 2,5 mL de vitamina B<sub>1</sub>; y los otros requerimientos necesarios como los aminoácidos, tales como histidina y triptófano. En la tabla 4 se muestran los requerimientos de los suplementos, tal como la concentración del stock, volumen por litro de medio y concentración final del suplemento en el medio.

**Tabla 4. Tabla de suplementos para los medios minerales y nutritivos.** Tomado de Coello y col. 2003.

Sustancia	Concentración del stock	Concentración final
Glucosa	20% (p/v)	0,2%
Lactosa	20% (p/v)	0,2%
Vitamina B <sub>1</sub>	1,0 mg/ml	5,0 µg/ml
Aminoácidos	4,0 mg/ml	20,0 µg/ml

Se mezclaron las sales 2X suplementadas, con el agar 2X fundido a una temperatura no mayor de 70° C, se agitó bien y se sirvió en placas de Petri estériles.

### 6.3.2.2. Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD).

El agar XLD es un medio específico para la identificación de patógenos entéricos, principalmente especies del género *Salmonella* y *Shigella*.

**Tabla 5. Composición del agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD).** Tomado de MacFaddin, 2003.

Componentes	Concentración
Extracto de levadura	3 g/L
Xilosa	3,75 g/L
L-Lisina · HCl	5 g/L
Lactosa	7,5 g/L
Sacarosa	7,5 g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g/L
Desoxicolato de sodio	1 g/L
Tiosulfato de sodio	6,8 g/L
Citrato de amonio férrico	0,8 g/L
R rojo fenol	0,08 g/L
Agar	12,5 g/L

Se mezclaron cuidadosamente los componentes indicados en la Tabla 5 junto con el agua destilada en presencia de calor agitando constantemente hasta completar la disolución del agar sin sobrecalentarlo. Al obtener una solución homogénea se transfirió inmediatamente a un baño de María a 50° C donde se mantuvo hasta ser servido en placas de Petri. Es recomendable no preparar grandes cantidades de este medio. Este medio no se autoclavó (Oxoid®, 1995).

### 6.3.2.3. Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV).

El caldo RV es un medio específico para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* en alimentos y muestras ambientales para su posterior aislamiento ([www.oxoid.com](http://www.oxoid.com), 2008).

**Tabla 6.- Composición del Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV).** Tomado del Manual HiMedia®, 1998.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Peptona de caseína	4,50 g/L
Cloruro de sodio	7,20 g/L
Fosfato monopotásico	1,44 g/L
Cloruro de magnesio	36,00 g/L
Malachita verde	0,036 g/L

Se disolvieron todos los componentes indicados en la Tabla 6 en un litro de agua destilada en presencia de calor. La preparación se sirvió en tubos de ensayo o en frascos de vidrio para su almacenamiento de no más de 100 mL. Seguidamente se esterilizó en autoclave a 115° C durante 15 minutos. El medio se almacenó en lugar fresco (HiMedia®, 1998).

### 6.3.2.4.- Agar Salmonella-Shigella (SS).

El medio SS es un medio específico para el aislamiento de especies del género *Salmonella* y *Shigella* de muestras de heces generalmente (HiMedia®, 1998).

**Tabla 7.- Composición del medio Salmonella-Shigella.** Tomado de MacFaddin, 2003.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>
Peptona de caseína/carne (50/50)	5 g/L
Extracto de carne (de vaca)	5 g/L
Lactosa	10 g/L
Citrato de sodio	10 g/L
Mezcla de sales biliares	5,5 g/L
Tiosulfato de sodio	8,5 g/L
Citrato férrico	1 g/L
Rojo neutro	0,025 g/L
Verde brillante	0,33 mg/L
Agar	12 g/L

Se disolvieron los componentes referidos en la tabla 7 con agitación frecuente en presencia de calor. Este medio no se autoclavó ni se sobrecalentó. Se mantuvo a 50° C luego de su preparación y se sirvió en placas de Petri estéril las cuales se almacenaron en un lugar fresco (HiMedia®, 1998).

### **6.3.3.- Medios para pruebas bioquímicas.**

#### **6.3.3.1. Agar con Hierro de Kligler.**

El medio de agar con hierro de Kligler es utilizado frecuentemente en microbiología de alimentos para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa y lactosa, y a la producción de ácido sulfhídrico (MacFaddin, 2003).

**Tabla 8. Componente para preparas prueba Kligler.** Tomado de MacFaddin, 2003).

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Extracto de carne (vaca)	3 g/L
Extracto de levadura	15 g/L
Peptona	5 g/L
Peptona proteosa	10 g/L
Lactosa	1 g/L
Glucosa (dextrosa)	0,2 g/L
Sulfato Ferroso	0,5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Tiosulfato de sodio	0,3 g/L
Rojo fenol	0,024 g/L
Agar	12 g/L



Se mezclaron todos los componentes indicados en la Tabla 8 en un litro de agua destilada, se calentó suavemente la solución hasta disolver completamente el agar y se distribuyó en 5 mL por tubo de ensayo. Se esterilizó en autoclave a 121° C durante 15 min. Se dejó enfriar en posición inclinada con fondos profundos y superficie en cuña (Macfaddin, 2003). Este medio se inoculó con el cultivo puro y con 24 horas de crecimiento, se tocó con una aguja de platino, se realizó una punción hasta el fondo del tubo y luego se estrió sobre la cuña hasta el pico de flauta. Se incubó a 35° C de 18 a 24 h, ni menos ni más tiempo.

#### 6.3.3.2. Agar para Motilidad-indol-ornitina (MIO).

La prueba motilidad-indol-ornitina permite identificar integrantes de la familia Enterobacteriaceae, en especial especies de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Las *Salmonellas* fueron identificadas con este medio por la incapacidad de producir indol, así como por la presencia de motilidad en la mayoría de los serotipos y la descarboxilación de la ornitina.

**Tabla 9. Composición para ala Prueba MIO.** Tomado de Macfaddin, 2003.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Bacto peptona	10 g/L
Bacto extracto de levadura	3,0 g/L
Bacto triptona	10 g/L
Bacto dextrosa	1,0 g/L
Bacto L-ornitina HCl	5,0 g/L
Bacto Bromo cresol purpura	0,02 g/L
Bacto Agar	2,0 g/L

Se mezclaron todos los componentes indicados en la Tabla 9 en un litro de agua destilada, se calentó suavemente la solución hasta disolver completamente el

agar y se distribuyó en 2 mL por tubo pequeños de ensayo. Se esterilizó en autoclave a 121° C durante 15 min y se dejó enfriar (Macfaddin, 2003). Este medio se inoculó con el cultivo puro y con 24 horas de crecimiento con una aguja de platino, realizando una punción hasta el fondo del tubo. Se incubó a 35° C de 18 a 24 h, ni menos ni más tiempo.

#### 6.3.3.3.- Medio de Citrato Simmons.

Este medio se utilizó para determinar el uso del citrato como fuente de carbono, para su metabolismo y crecimiento (Macfaddin, 2003). La *Salmonella* spp. suele utilizar el citrato como única fuente de carbono

**Tabla 10.- Ingredientes para la prueba de Citrato.** Tomado de Macfaddin, 2003.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Sulfato de magnesio	0,2 g/L
Fosfato monoamónico	1 g/L
Fosfato dipotásico	1 g/L
Citrato de sodio	2 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Agar	15-20 g/L
Azul de bromotimol	0,08 g/L

La preparación de este medio, se realizó como se indicó en la sección 6.3.3.1., Se inoculó por estrías sobre la superficie del bisel y se incubó de 24 a 48 h con la tapa floja (Macfaddin, 2003).

#### 6.3.3.4. Agar de lisina y hierro (LIA).

El agar de lisina y hierro es un medio diferencial que permite la identificación de microorganismos entéricos Gram negativos, en especial microorganismos del género *Salmonella* (Oxoid®, 1995).

**Tabla 11.- Ingredientes para la preparación del medio LIA.** Tomado de Oxoid®, 1995.

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Peptona de gelatina	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Glucosa (dextrosa)	1 g/L
L- Lisina – HCl	10 g/L
Citrato de amonio férrico	0,5 g/L
Tiosulfato de sodio	0,04 g/L
Purpura de bromocresol	0,02 g/L
Agar	15 g/L

La preparación, inoculación e incubación del medio, se realizó de la misma forma como se indicó en la sección 6.3.3.1. (Macfaddin, 2003). En el proceso de preparación de este medio es importante tener un pH  $6,7 \pm 0,2$ , ya que puede afectar la lectura de la prueba por no producir el color esperado.

#### **6.4. Soluciones para la técnica de Tinción Gram.**

Soluciones para el Gram:

**Tabla 12. Soluciones para la tinción Gram.**

<b>Solución A:</b>	Cristal Violeta (90%) Agua destilada	1,0 g 100,0 mL
<b>Solución B:</b>	Bicarbonato de sodio Agua destilada	1,0 g 100,0 mL
<b>Solución mordiente:</b>	Yodo Yoduro de potasio Agua destilada	1,0 g 2,0 g 100,0 mL
<b>Solución decolorante:</b>	Éter etílico Acetona	100,0mL 300,0 mL
<b>Solución contraste:</b>	Safranina (85%, desecada) Agua destilada	2,0 g 100,0 mL

Se preparó un frotis bacteriano, se cubrió con solución A y se añadieron de 2 a 3 gotas de solución B; se dejó actuar por 10 minutos. Se inclinó la lámina y se dejó gotear agua por un extremo. Se cubrió con solución mordiente por 2 minutos. Se inclinó nuevamente la lámina y se dejó gotear agua por un extremo. Se aplicó la

solución decolorante por 20 seg. La misma se dejó secar al aire libre y se cubrió con solución contraste por 15 segundos exactamente. Se lavó para eliminar el colorante de contraste y se secó colocándolo sobre papel absorbente. Se observó en el microscopio con una magnificación de 1000X utilizando aceite de inmersión.

Las bacterias Gram positivas se tiñeron de azul por el cristal violeta, mientras que las Gram negativas perdieron la coloración inicial del cristal violeta y se tiñeron de rosa debido a la safranina.

#### **6.5. Cría de *M. domestica* en condiciones de laboratorio.**

Para establecer la una cría de *M. domestica* en condiciones de Laboratorio se utilizó el protocolo de Martiradonna y col. (2007) con algunas modificaciones.

##### **6.5.1. Colecta de ejemplares adultos de *M. domestica*.**

Se realizó una colecta diurna a las 10:30 am efectuando varios pases de malla entomológica por encima de las superficies donde se observó gran abundancia de moscas. Estas se introdujeron en el interior de una jaula (25 cm ancho X 25 cm alto X 35 cm largo) de tela color blanco (dopio velo) debidamente identificada con el día de la colecta, hora y lugar. La jaula se colocó dentro de una cava de anime con tapa, sellada con cinta adhesiva (Martiradonna y col., 2007) para su transporte inmediato hasta el laboratorio de Procesos Fermentativos en el Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela. Ya en el laboratorio se tomó una muestra representativa de la población y se procedió a su identificación taxonómica con la clave para múscidos neotropicales de Carvalho y Couri (2005) y

la guía de adiestramiento para el saneamiento del medio en relación a las moscas de la OPS (1964).

#### **6.5.2. Condiciones ambientales en el Laboratorio para el mantenimiento de los ejemplares colectados.**

La jaula se mantuvo a una temperatura entre 26° y 30° C, humedad relativa entre 65-80% y fotoperíodo con 12 horas de luz (Martiradonna y col., 2007). Para cumplir estas condiciones, la jaula se introdujo en una cava junto con bandejas en el fondo de la cava que contenían agua para mantener la humedad. La cava se mantuvo ligeramente abierta para permitir la entrada de oxígeno. Posteriormente para mejorar las condiciones de temperatura, las jaulas fueron transportadas al insectario del Laboratorio de procesos fermentativos donde se logró tener una temperatura entre 28° y 32° C.

#### **6.5.3. Alimentación de las moscas en condiciones de laboratorio.**

A cada jaula, como fuente de alimento, se le suministraron aproximadamente 20 g de azúcar blanca comercial en una cápsula de Petri por cada 100 individuos. Se adicionaron dos cápsulas más, la primera de ellas con algodón embebido con agua filtrada (aproximadamente 40 mL) y la otra con algodón embebido en leche pasteurizada (aproximadamente 40 mL). Las cápsulas con agua y leche fueron cambiadas cada 2 días y la cápsula con azúcar cada semana.

#### **6.5.4. Obtención de individuos Homogéneos (F<sub>1</sub>).**

Para optimizar las condiciones de cría en laboratorio y obtener una colonia homogénea de la misma edad y misma generación filial, se seleccionó una de las jaulas con por lo menos 3 días en el laboratorio. A la jaula seleccionada se le retiró la

cápsula con leche por toda una noche. Al día siguiente en la mañana se le introdujo nuevamente la cápsula con algodón embebido en leche para ser utilizada por las hembras para oviponer. La cápsula se retiró nuevamente a la mañana del día siguiente para recolectar los huevos. Inmediatamente, se tomó una pequeña cantidad de huevos de la superficie y se colocó en el medio de cría para larvas (ver sección 4.5.5.) (Martiradonna y col., 2007). Los huevos que no se utilizaron se descartaron en autoclave a 120° C durante 15 min.

#### **6.5.5. Medio de cría para larvas de *M. domestica* en condiciones de laboratorio.**

Se preparó una solución con 200 mL de leche pasteurizada y 2 g de levadura granulada (*Saccharomyces cerevisiae*). La mezcla se colocó en agitación por aproximadamente 30 min o hasta que se disolvió el granulado completamente. Luego esta solución se transfirió a una pizeta para facilitar su aplicación (Martiradonna y col., 2007).

Se tomaron 25 servilletas sin procesamientos químicos para decoloración y se rasgaron en tiras. Se tomó un frasco de vidrio de boca ancha de tres litros de capacidad y se colocó en el fondo una capa de tiras de papel. Por cada capa de papel que se colocó, se aplicó una capa de la solución de leche y levadura con la pizeta, asegurando que el papel quedara uniformemente humedecido. Cuando se completaron las 3/4 partes del frasco se colocaron los huevos cuidadosamente extraídos anteriormente con la espátula, y sobre ellos se colocó nuevamente una capa de tiras de papel secas. Se cubrió la boca del frasco de vidrio con un trozo de

tela de franela (20 x 20 cm) asegurado con una banda de goma gruesa. Se identificó el envase con fecha, origen y generación filial (Martiradonna y col. 2007).

En este frasco eclosionaron los huevos, emergieron las larvas que se alimentaron hasta pasar a la fase de pupa. Transcurridos 5 días se procedió a sacar las pupas del medio de cría. Se contaron y se colocaron en una jaula limpia. A los 4 días emergieron los adultos se les suministró agua y alimento como fue indicado anteriormente en la sección 6.5.3 (Martiradonna y col., 2007). El material restante de la cría y las larvas que no pasaron a fase de pupa a los 5 días, se introdujeron nuevamente en el frasco y se colocaron en la autoclave a 121° C durante 15 minutos para su descarte.

#### **6.6. Manipulación de *M. domestica* para trabajos en el laboratorio.**

Para la manipulación de las moscas en el laboratorio, éstas se adormecieron exponiéndolas a bajas temperaturas (Martiradonna, 2006). Para ello, se tomaron 50 ejemplares de *M. domestica* de la F<sub>1</sub> y se introdujeron individualmente en tubos de ensayo de 1 cm de diámetro por 10 de largo, se colocó en la parte superior del tubo un tapón de algodón para evitar que las moscas escaparan. Los tubos de ensayo conteniendo las moscas se colocaron en hielo a intervalos que fueron desde 30 a 300 segundos. Se hicieron 5 repeticiones para cada intervalo de forma aleatoria.

Luego de realizado cada tratamiento las moscas se llevaron a temperatura ambiente hasta que se despertaron, procediéndose a registrar el tiempo requerido para ello.

### **6.7. Desinfección de *M. domestica*.**

Se realizaron diferentes ensayos para eliminar la carga microbiana asociada al insecto principalmente en patas, cutícula y alas. Se utilizaron desinfectantes comerciales a base de hipoclorito de sodio al 5%, amonio cuaternario al 10% y polimetilendiurea al 5%, con posteriores lavados con agua destilada estéril.

Las moscas adormecidas (10 ejemplares por ensayo) se tomaron cuidadosamente con una pinza entomológica y se colocaron en una bolsa de tulle de 2 x 3 cm individualmente. En un Beacker de 100 mL de capacidad se colocaron 75 mL de Hipoclorito de sodio al 5 %. Las moscas se introdujeron en el desinfectante de forma consecutiva por 10 segundos aproximadamente con leve agitación para asegurar que toda la superficie del cuerpo estuviera en contacto con el líquido. Seguidamente las moscas se introdujeron en forma consecutiva en 3 envases con 150 mL de agua destilada estéril para eliminar el hipoclorito de sodio del cuerpo y evitar la muerte del ejemplar por intoxicación. Al despertarse las moscas fueron colocadas individualmente dentro de una placa de agar nutritivo, se dejaron aproximadamente por un minuto para asegurar que se desplazaran y sus patas tuvieran suficiente contacto con la superficie agarizada. Pasado el minuto, las placas junto con las moscas se introdujeron en una cava con hielo por un tiempo mayor que el estandarizado en la sección 6.6. para asegurar que las moscas se volvieran a adormecer y pudieran ser retiradas con facilidad de las placas. Se incubaron las placas a 37° C por 24 h. Toda esta experiencia se realizó en campana de flujo laminar. Luego de incubar las placas, se cuantificó en c/u de ellas las colonias bacterianas crecidas.



El procedimiento se repitió de igual forma con desinfectantes comerciales a base de amonio cuaternario 10% y polimetilendiurea 5%

#### **6.8. Inoculación de estiércol con *S. typhimurium* LT2.**

Se colocaron 20 g de estiércol de pollos en recipientes pequeños de vidrio tapados con aluminio y se esterilizaron en autoclave a 120° C durante 2 h. Seguidamente, una vez fríos, se inocularon con *S. typhimurium* LT2 a razón de  $3 \times 10^7$  UFC/g aproximadas, crecidas en caldo LB.

#### **6.9. Contaminación de moscas con *S. typhimurium* LT2 presente en estiércol de pollo.**

Con el fin de comprobar que *M. domestica* puede actuar como vector mecánico de *Salmonella* presente en sustratos como la gallinaza, se tomaron 12 frascos contaminados (sección 6.8.) y se rotularon del 1 al 12. En cada frasco se colocaron 7 moscas previamente tratadas con el desinfectante comercial más eficiente tal como se indica la experiencia 6.7. Los múscidos estuvieron en el envase 1 por 1 min, en el 2 por 3, en el 3 por 5, en el 4 por 10 y así sucesivamente hasta completar los 12 frascos, hasta un tiempo máximo de 50 minutos.

Transcurrido el tiempo de cada frasco, se retiraron 5 moscas de éstos, se introdujeron en placas agar XLD independientemente (una por placa) y se dejaron por aproximadamente un minuto luego de incorporarse para asegurar que hayan tenido suficiente contacto con la superficie agarizada. Pasado el minuto, las placas se introdujeron en una cava con hielo por un tiempo mayor que el estandarizado y se retiraron las moscas de las placas. Las moscas retiradas se colocaron en un envase con cloro para su posterior descarte. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Se

cuantificaron las colonias bacterianas de *Salmonella* crecidas en el agar que se caracterizaban por ser de color rojo, uniformes y centro negro. Toda la experiencia se realizó en campana de flujo laminar.

#### **6.9.1. Caracterización de bacterias crecidas en placas de agar XLD.**

Las colonias de color rojo con centro negro son características de serotipos de *Salmonella*, estas se aislaron de las placas de agar XLD, se sembraron con un palillo por agotamiento en placas de medio mínimo sólido suplementado con triptófano e histidina y en medio mínimo sólido sin suplementos, para comprobar el fenotipo de la especie.

#### **6.10. Aislamiento y caracterización de *Salmonella entérica*.**

##### **6.10.1. Aislamientos de *Salmonella* en el cuerpo de *M. domestica*, muestras de gallinaza recolectadas en la Colonia Tovar y en un gallinero del Estado Aragua.**

Se recolectaron moscas domésticas en una parcela fertilizada con gallinaza; un gallinero y dos zonas domésticas. La recolecta se realizó como fue indicado en la sección 6.5.1. Los ejemplares recolectados se introdujeron en frascos de vidrio de 3 litros de capacidad, esterilizados previamente por 15 minutos, a 121° C, a 15 libras de presión, estos se cubrieron con un cuadro de tela de franela (20 x 20 cm) esterilizada en las mismas condiciones que los frascos, y se ajustaron con una goma elástica gruesa. Cada frasco se identificó con fecha, hora, lugar de recolección siendo colocados en una cava sellada con cinta adhesiva para su transporte al laboratorio. En el campo, a su vez, en cada zona de colecta se tomaron moscas independientes y se pusieron a caminar por placas de agar XLD y agar SS.

De un gallinero del Edo. Aragua, se tomaron muestras de estiércol de pollo y de una granja agrícola en Colonia Tovar se tomaron las muestras de gallinaza. Se tomó con una pala de jardinero estéril una pequeña alícuota de cada producto de interés y se introdujo en una bolsa plástica Ziploc® estéril. Se identificaron debidamente, colocándolas posteriormente en una cava sellada con cinta adhesiva para su transporte al laboratorio.

La información del análisis de muestras de heces de humanos con cuadros diarreicos en La Colonia Tovar fue suministrada por el Centro Clínico Colonia Tovar a partir de las historias de los pacientes.

Para aislar *Salmonella* de las moscas recolectadas, se tomaron 20 ejemplares como número máximo y 4 como número mínimo de cada frasco y se aplicó la dinámica de la sección 6.6. para su manipulación, posteriormente se introdujeron 10 de ella en tubos de ensayo con 3 mL de caldo LB estéril y las 10 restantes en tubos de ensayo con 3 mL de caldo RV para el enriquecimiento bacteriano. Se agitó constantemente por 5 minutos para asegurar el total contacto de la cutícula, patas y alas del insecto con los caldos. Las moscas se retiraron con una pinza entomológica estéril de cada tubo de ensayo para su descarte. El caldo LB se incubó a 37° C por 24 horas y el caldo RV a 43° C por 24 horas. Este procedimiento se repitió para cada frasco colectado y el número de moscas analizadas varió según la cantidad de moscas que se recolectó en cada zona.

Para aislar *Salmonella* de las muestras de gallinaza, se extrajeron aproximadamente 0,5 g la misma y se introdujeron en un tubo con tapa de rosca

estéril, en condiciones asépticas. Se agregaron 5 mL de caldo LB estéril a cada tubo, y se repitió el procedimiento con el caldo RV. Se incubó a 37° C por 24 horas el caldo LB y a 43° C por 24 horas el caldo RV para el enriquecimiento bacteriano. Este procedimiento se repitió para cada muestra de gallinaza colectada en los diferentes lugares.

El aislamiento de *Salmonella* de heces de pollo se realizó de igual forma que el de la gallinaza.

#### **6.10.2. Titulación bacteriana de muestras aisladas de la Gallinaza y el estiércol de pollo.**

Para cada una de las preparaciones bacterianas obtenidas en la sección 6.10.1. se realizó la titulación bacteriana, para la cual, se hicieron diluciones seriadas desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-8}$ . Para ello, se tomaron 0,02 mL de la solución recién aislada, se colocó en un tubo de ensayo estéril, se agregaron 1,98 mL de solución salina para obtener la dilución  $10^{-2}$ . Se realizó el mismo proceso hasta llegar a la dilución  $10^{-8}$ .

De las diluciones  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  se tomaron alícuotas de 0,1 mL independientemente con una micropipeta y se sembraron directamente sobre la superficie de placas de agar nutritivo. Con un rastrillo de vidrio esterilizado con alcohol y a la llama del mechero, se distribuyó la muestra sembrada de forma homogénea sobre la superficie del agar, hasta que fue absorbida completamente. Las placas se incubaron por 24 horas a 37° C. para determinar el título bacteriano.

Esta experiencia se realizó para cada muestra colectada.

### **6.10.3. Identificación de *Salmonella* por medios específicos.**

Utilizando la misma dinámica descrita en la sección 6.10.2., pero esta vez con los caldos enriquecidos, se sembraron placas de agar XLD y SS para aislamiento e identificación de *Salmonella*. Las placas de agar XLD y SS fueron incubadas a 37° C por 24 horas. Las colonias de *Salmonella* en las placas de agar XLD se observaron de color rojo con el centro negro y en el agar SS colonias transparentes con el centro negro.

### **6.10.4. Técnica de Tinción Gram.**

Se realizó como primer paso para la identificación la técnica de tinción Gram de las presuntas colonias de *Salmonella* encontradas con los agares específicos, para así determinar si los microorganismos aislados eran bacilos Gram negativos tal como es el caso de las especies del género *Salmonella*.

### **6.10.5. Identificación de *Salmonella* mediante pruebas bioquímicas.**

Se realizaron una serie de pruebas bioquímicas para confirmar que las bacterias anteriormente aisladas, seleccionadas con los medios específicos y Tinción Gram eran serotipos del género *Salmonella*. Estas fueron sometidas a diferentes pruebas bioquímicas que ayudan a la identificación de *Salmonellas*. Las pruebas aplicadas fueron: la Agar con Hierro de Kligler, Agar para Motilidad-Indol-Ornitina (MIO), Agar de Lisina y Hierro (LIA) y Medio de Citrato Simmons. Una vez realizadas las pruebas bioquímicas, aquellas bacterias que resultaron ser presuntivamente *Salmonella*. En el apéndice 1 se muestran los resultados esperados para las pruebas bioquímicas.

### **6.11. Métodos estadísticos**

Para corroborar que estas tendencias que se observen en la sesión 6.6 son independientes una de la otra, se realizó un análisis de varianza “ANOVA” entre el tiempo de exposición y el tiempo de reincorporación y se aplicó la prueba de comparación de pares de Tukey, utilizando el programa estadístico PAlaeontological STatistics “PAST” de licencia libre disponible en la página web: <http://folk.uio.no/ohammer/past/>. Se propuso como hipótesis nula  $H_0$ : el tiempo de inactividad no se ve afectado por el tiempo de exposición y como hipótesis alternativa  $H_1$ : el tiempo de inactividad se ve afectado por el tiempo de exposición.

La prueba de Tukey se ha sugerido para diversos procedimientos para efectuar comparaciones múltiples. Se utiliza con frecuencia para probar la hipótesis nula de todos los pares de medias posibles de cada tratamiento son iguales o no, siempre y cuando todas las muestras sean iguales (Daniel, 2002).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Establecimiento de la cría de *M. domestica*.

Se realizó la colecta de individuos adultos de *M. domestica* en el sector Gabante el Peñon del Municipio Tovar el día 28 de Febrero de 2009 a las 10:30 am en el gallinero y los alrededores de una pequeña finca agrícola ubicada en las coordenadas geográficas N 10° 22' 44,6'' y WO 67° 20' 22,6''. Se colectaron aproximadamente unos 250 ejemplares entre juveniles y adultos que se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Procesos Fermentativos del IBE, donde se les suministró agua, azúcar y leche de acuerdo con el protocolo descrito en los materiales y métodos. Se tomó al azar una pequeña muestra de los individuos colectados (16 ejemplares) y se examinó cada individuo en la lupa para su clasificación taxonómica usando la guía "Key to the Neotropical genera of Muscidae, part I, basal groups" de Carvalho y Couri (2005) y la guía para adiestramiento y saneamiento del medio en relación a las moscas de la OPS (1964). Se encontró que de los 16 individuos observados, 12 pertenecían a la especie *Musca domestica* y los cuatro restantes pertenecían a otras especies de dípteros. La presencia de estos dípteros en la jaula donde se encontraba *M. domestica* no representa ningún problema para el desarrollo de la cría pura, ya que estas son desplazadas con el tiempo por no disponer del alimento adecuado.

Transcurridos 4 días de la cría en el laboratorio, se realizó la obtención de individuos homogéneos utilizando el medio de cría para larvas. Dado a que en el

laboratorio la temperatura ambiental se encontraba entre 24° y 28 °C, el desarrollo de los huevos hasta los adultos tuvo una duración mayor a la reportada por Martiradonna en el 2006, donde la temperatura del insectario donde se realizó el trabajo se encontraba entre los 30° y 35° C. En estas condiciones de temperatura se observó que el paso del huevo al estado pupal tuvo una duración de 7 días y progresivamente al estado adulto 8 días, coincidiendo con Keiding (1986) en que el tiempo que dura el ciclo de vida de *M. domestica* se ve afectado directamente por la temperatura ambiental, la humedad y la nutrición de las larvas. Este autor demostró que mientras la temperatura ambiental disminuye, los diferentes estadios del ciclo de vida eran más prolongados en el tiempo. Por lo tanto, a temperaturas entre 30° y 35° C la fase larval junto a la pupal pueden durar entre 3 y 5 días, y a temperaturas entre 25° y 30° C de 5 a 9 días la fase larval y de 5 a 11 días la fase pupal, ajustándose este rango al obtenido en la experiencia.

## **7.2. Manipulación de *M. domestica* para trabajos en el laboratorio.**

Se realizaron exposiciones de las moscas a temperaturas cercanas a 0° C, con el objeto de aletargarlas para facilitar su manipulación. Las exposiciones variaron entre 30 y 300 segundos, registrándose en cada caso el tiempo que las moscas permanecieron inmóviles. En la tabla 13 se muestra que el mejor tiempo para aletargarlas por efecto del frío es de 150 segundos, ya que con este tiempo los insectos se mantienen inmovilizados por aproximadamente 5 minutos y 12 segundos con una temperatura ambiental de 28° C.



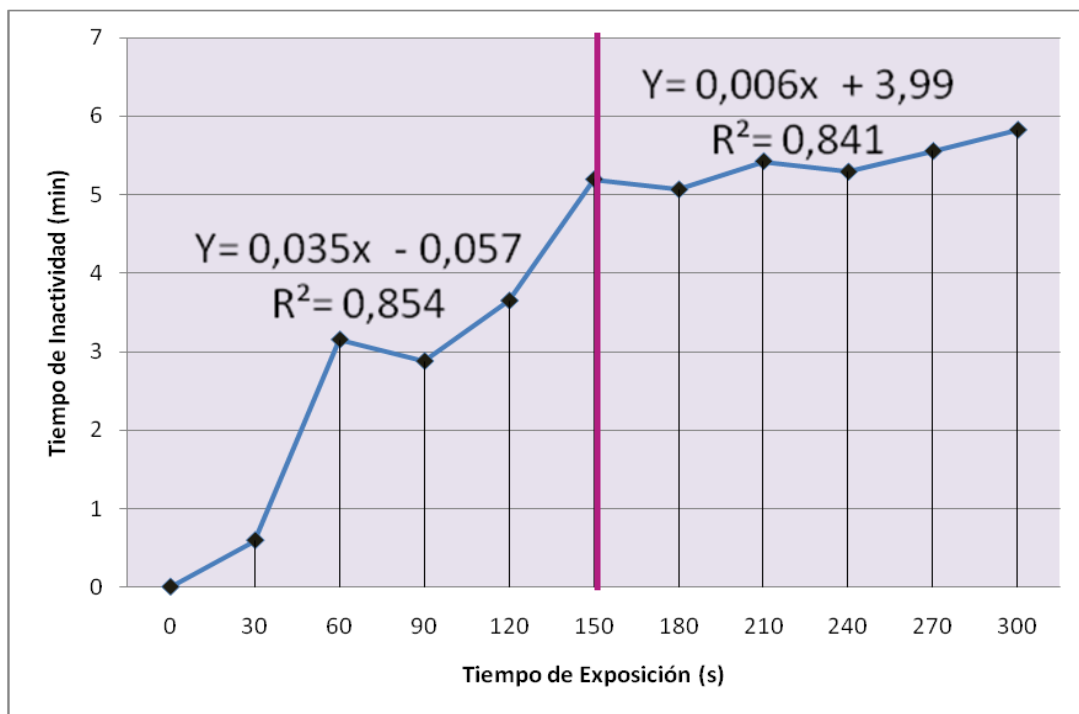
Se observó que los múscidos expuestos se recuperaron sin efectos secundarios a largo plazo, además, se encontró que el tiempo de aletargamiento es suficiente para realizar la desinfección del cuerpo de la mosca, sin tener inconvenientes, como la muerte del insecto por la exposición excesiva al frío o la pérdida del ejemplar por su huida mientras se realizan los ensayos, por no estar inmovilizadas el tiempo suficiente.

Esto conduce a concluir, que además del ciclo de vida, la actividad de las moscas se ve afectada notablemente por la temperatura, tal y como lo reporto Hecht (1970), quien determinó que a temperaturas menores a 10° C las moscas no son capaces de volar; por debajo de 4° C cesan de caminar y a su vez por debajo de 0° C, las moscas permanecen inmóviles y el tiempo que tardarán en recuperar su actividad es dependiente del tiempo que permanezcan a estas temperaturas.

**Tabla.- 13.** Valores de tiempo de inmovilidad de adultos de *M. domestica*, sometidas a 0° C en función del tiempo de exposición.

Tratamiento	N° individuos	Tiempo de exposición (s)	Tiempo de inmovilización (s)	Tiempo de inmovilización (min:seg)
1	5	30	35,6	36"
2	5	60	189	3'09"
3	5	90	173	2'53"
4	5	120	219	3'39"
5	5	150	312	5'12"
6	5	180	304	5'04"
7	5	210	325	5'25"
8	5	240	317	5'17"
9	5	270	333	5'33"
10	5	300	349	5'49"

Se encontró además con esta experiencia, que el tiempo que tardan las moscas en reincorporarse en relación al que estuvieron expuestas a bajas temperaturas, presenta dos tipos de tendencia (Figura 5). La primera de estas desde los 0 a los 150 segundos de exposición, en donde existe una relación directa entre el tiempo de exposición y el tiempo de letargo; y una segunda tendencia luego de los 150 segundos de exposición, donde el tiempo de aletargo se hace independiente del tiempo de exposición, no apreciando una diferencia significativa con el tiempo de aletargo a mayores tiempos, además tiempos superiores podrían provocar la muerte de los ejemplares.



**Figura.- 5. Efecto del tiempo de exposición de los adultos a la hipotermia, sobre el tiempo de inactividad.** Se utilizaron moscas adultas de la misma edad y sin discriminar por sexo. Cada tratamiento empleó 5 adultos.

Con la prueba de comparación de pares de Tukey se obtuvo un valor de  $p$  crítico: 0,03554, con lo cual se puede deducir que valores de  $p$  por encima de este nos llevan a aceptar la hipótesis nula, y valores por debajo a rechazarla y aceptar la hipótesis alternativa. La prueba de Tukey compara por pares los diferentes tratamientos, asignando valores de  $p$ , crítico para cada uno, con esta prueba se puede comprobar las dos tendencias antes mencionadas donde de 0 a 150 segundos de exposición se acepta la hipótesis alternativa ya que el tiempo que tardan las moscas en despertar es proporcional al tiempo de exposición. Para tiempos de exposición superiores a los 150 segundos se acepta la hipótesis nula, ya que el tiempo de exposición a bajas temperaturas no afecta el tiempo de letargo de las moscas.

### **7.3. Desinfección de *M. domestica*:**

La desinfección de las moscas se realizó utilizando 10 individuos por cada uno de los tratamientos. Los desinfectantes utilizados tenían como componente activo: hipoclorito de sodio al 5%, amonio cuaternario al 10% y polimetilendiurea al 5%. Las moscas sin desinfectar se hicieron caminar por la superficie de un medio agarizado y posteriormente desinfectadas para comprobar la presencia o ausencia de microorganismos remanentes.

Se realizó en primera instancia el ensayo con un desinfectante comercial a base de hipoclorito de sodio al 5%, debido a que es utilizado con mayor frecuencia por su eficiencia en trabajos de laboratorio para la desinfección de larvas de diferentes insectos (Seymour y col. 1984; Senna-Nunes y col. 2002; Figueroa y col.

2007). Se puede apreciar en la Tabla 15 que la carga bacteriana del exterior del cuerpo de la mosca no pudo ser eliminada en su totalidad, pero se obtuvo una disminución significativa en la diversidad y número de bacterias presentes en las patas, alas y cuerpo de la mosca. En la Figura 6 se muestran las placas de agar nutritivo en las cuales las moscas no desinfectadas (izquierda) se desplazaron. A la derecha se muestran las placas de agar nutritivo por las cuales las moscas desinfectadas con hipoclorito de sodio se desplazaron. Con este tratamiento sobrevivió el 100 % de las moscas expuestas. En contraste con los experimentos realizados por otros autores, el hipoclorito de sodio no logró eliminar por completo la carga bacteriana de la cutícula del insecto. Por ello el ensayo fue repetido, pero usando dos nuevos desinfectantes comerciales: el primero de ellos a base de amonio cuaternario al 10% y el segundo a base de polimetilendiurea al 5%. El ensayo con polimetilendiurea 5% trajo como consecuencia la muerte de los ejemplares en primera instancia (Tabla 15), pero con ensayos posteriores se determinó que este compuesto causa en las moscas domésticas un período de letargo de por lo menos 15 minutos y en algunos casos la muerte, por lo cual fue descartado para ensayos futuros.

**Tabla 15.-** Abundancia bacteriana en ejemplares de *M. domestica* silvestres luego de aplicar tres desinfectantes comerciales.

Moscas; réplicas	Amonio cuaternario 10%		Hipoclorito de Sodio 5% (NaOCl)		Polimetilendiurea 5%	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
1	+++	-	+++	+	+++	*
2	+++	++	+++	+++	+++	*
3	+++	-	+++	++	+++	*
4	+++	-	+++	+++	++	*
5	+++	+	+++	+	+++	*
6	+++	+	+++	+	++	*
7	++	+	+++	+++	++	*
8	+++	+	++	+	+++	*
9	+++	-	+++	+	+++	*
10	+++	+	++	+	++	*

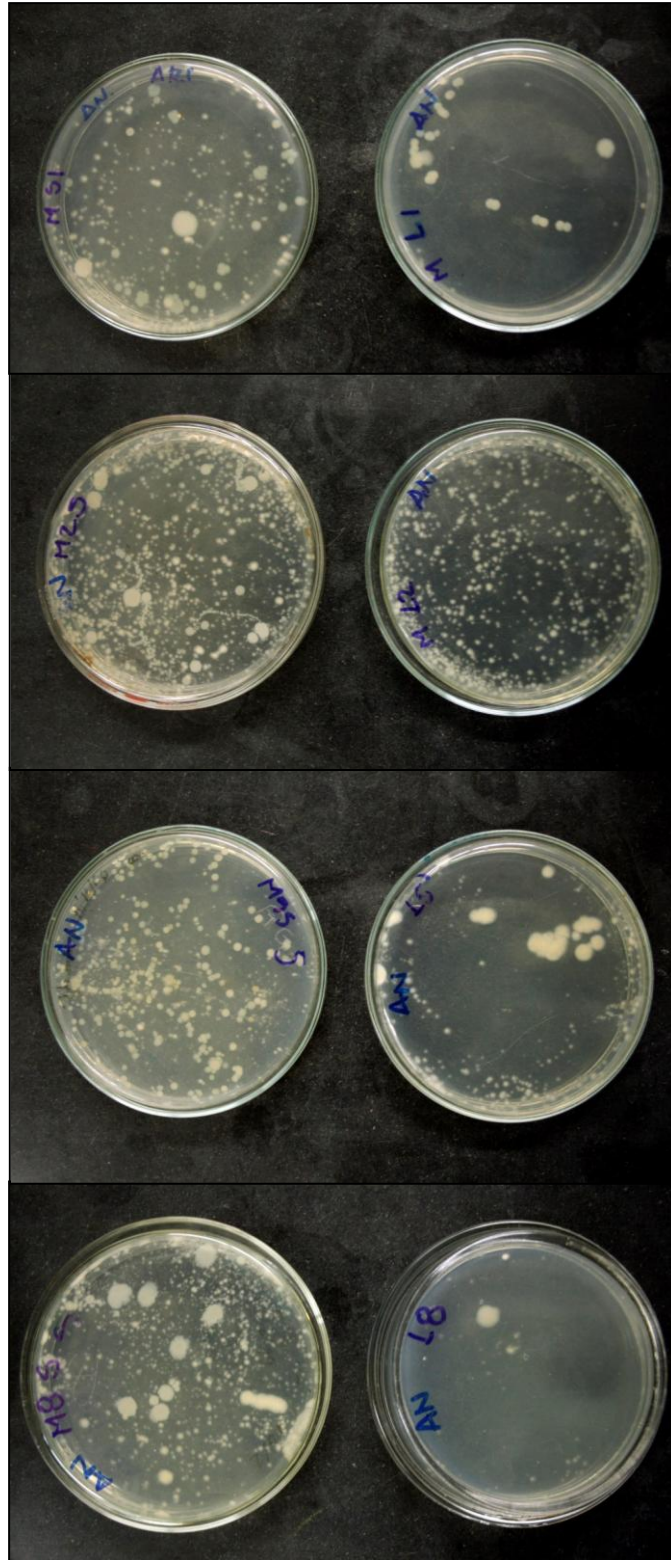
+++ : Crecimiento abundante de bacterias (colonias incontables)

++ : Crecimiento moderado de bacterias (50-500 UFC)

+ : Crecimiento mínimo de bacterias (>50 UFC)

- : Sin crecimiento bacteriano.

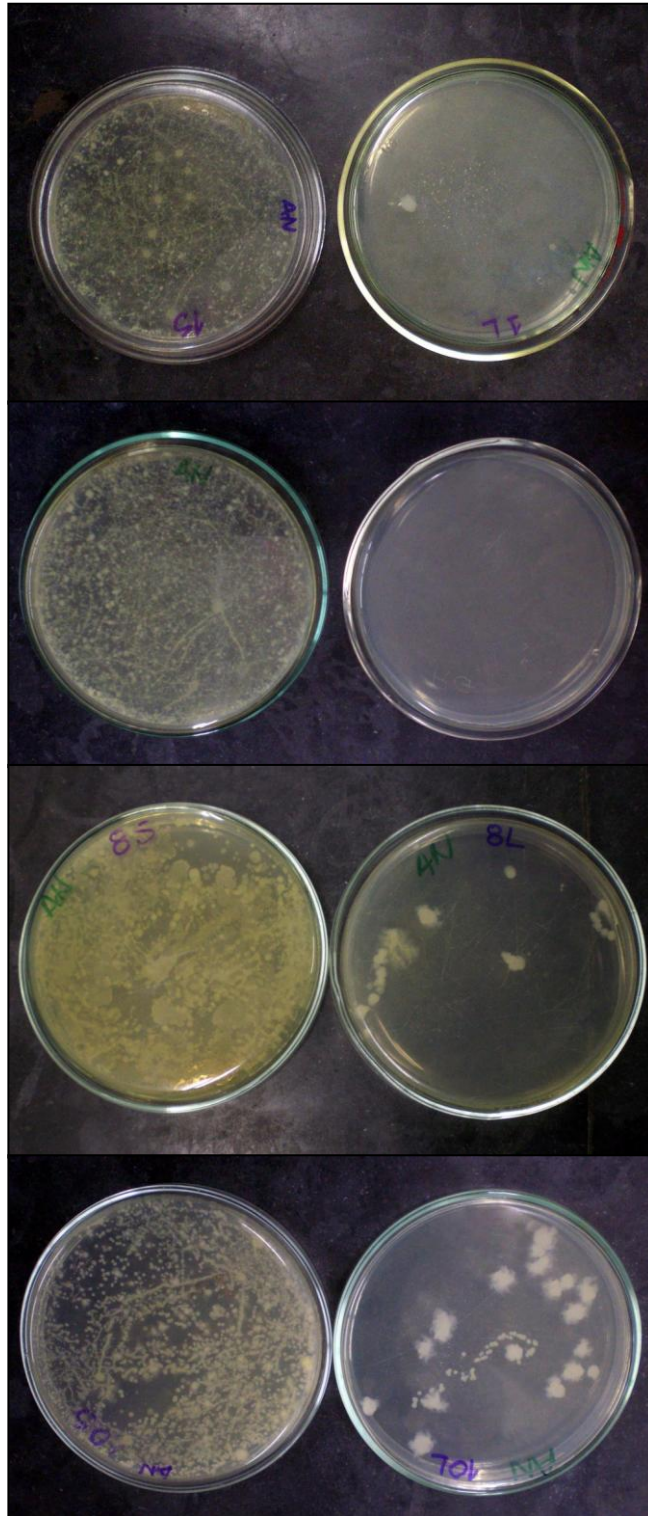
\* : Muerte del ejemplar.



**Figura 6. Desinfección con Hipoclorito de Sodio 5%.** Las placas de la izquierda muestran las UFC en las moscas infectadas, las placas de la derecha muestran las UFC en las moscas luego de aplicar el desinfectante.

El desinfectante a base de amonio cuaternario al 10% resultó ser el más eficiente, logrando eliminar toda la carga bacteriana de los ejemplares en cuatro de las réplicas, tal como se muestra en la Figura 7, en el resto de las réplicas redujo considerablemente el número de UFC, a diferencia de los controles no tratados que presentaban abundancia incontable. Se tomó este desinfectante como el ideal para la realización de los diferentes ensayos donde se requiera la desinfección de la cutícula de las moscas. El 100% de los ejemplares sobrevivió luego de la aplicación del desinfectante. Vale acotar que con este desinfectante se debe trabajar en condición de asepsia, ya que el contacto con el medio ambiente puede provocar su contaminación con diversos hongos o microorganismos presentes en el aire.

Los desinfectantes y germicidas a base de amonio cuaternario o polimetilendiurea, por lo general, son utilizados para la desinfección de equipos quirúrgicos, materiales hospitalarios y/o clínicos. Los desinfectantes a base de amonio cuaternario han sido reportados como desinfectantes muy efectivos, con una mayor eficacia ante bacterias Gram positivas que ante las Gram negativas (Rueda y col. 2003; Taboada y col, 2007). El polimetilendiurea es un compuesto orgánico que posee actividad antiséptica, bactericida, desinfectante, esporicida, fungicida, tuberculicida y viricida. Tiene acción bactericida potente y veloz a temperatura ambiente sobre bacterias Gram positivas y negativas (<http://www.maatglobal.com>, consulta: Junio, 2009).



**Figura 7.- Desinfección con Amonio Cuaternario al 10%.** Las placas de la izquierda muestran las UFC en las moscas infectadas, las placas de la derecha muestran las UFC en las moscas luego de aplicar el desinfectante.



Por lo tanto, se encontró que el desinfectante a base de amonio cuaternario puede ser utilizado para la desinfección de estas moscas, teniendo mucho éxito en la descontaminación y la esperanza de vida. Además se podrían realizar ensayos con larvas de este insecto para probar la eficiencia del desinfectante y así posteriormente utilizarlo con otros géneros de moscas de interés médico.

#### **7.4.- Contaminación de *M. domestica* con *S. typhimurium* LT2 presente en estiércol de pollo.**

Esta experiencia se realizó con el fin de comprobar que *M. domestica* puede actuar como vector mecánico de diferentes bacterias entéricas presentes en el estiércol de aves de corral. Para esto el estiércol estéril se inoculó con *S. typhimurium* LT2 a razón de  $3 \times 10^7$  bacterias totales aproximadamente, colocando moscas desinfectadas con amonio cuaternario al 10% en contacto con el mismo por diferentes tiempos. En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos en esta experiencia. En todos los casos se demostró la capacidad de *M. domestica* de transportar en sus patas y otras partes del cuerpo a *S. typhimurium* LT2, desde el estiércol contaminado hasta las placas de agar. Sin embargo, no se encontró una correlación directa entre el tiempo de permanencia de las moscas en contacto con el estiércol y el número de UFC transferidas. Esto resulta lógico si se considera que la distribución de las bacterias en el estiércol no necesariamente es homogénea y en consecuencia su accesibilidad a las moscas no debe ser igual en todos los casos, además se observó que varias de las moscas permanecieron gran parte del tiempo posadas en un mismo lugar, bien sea sobre el estiércol o las paredes del frasco.

No obstante, queda demostrado en esta primera fase del trabajo, la capacidad de *M. domestica* de actuar como vector mecánico para la transmisión bacteriana a partir de sustratos contaminados, coincidiendo con Greenberg en 1964 quien expuso moscas desinfectadas a la presencia de heces de perro contaminadas con *Salmonella* y demostró la capacidad de estas para transferir las bacterias a humanos. En un trabajo posterior, Greenberg y col. (1970) indican que muchos de los agentes infecciosos pueden sobrevivir y reproducirse en las moscas durante dos semanas después de la exposición. Tomando en cuenta que las heces de los pollos, generalmente contienen diferentes agentes patógenos para el humano, entre los que se pueden encontrar bacterias del género *Salmonella* (Rojas y col., 2002) y que además, las moscas se encuentran en estrecho contacto con los seres humanos, ya que se desarrollan en materia orgánica utilizada y generada por el hombre, y a su vez los adultos de este insecto se pueden alimentar de estos desechos, lo que confiere a la mosca la capacidad de convertirse en un vector potencial de microorganismos patógenos. En consecuencia, *Musca domestica* puede transferir diferentes agentes infecciosos a los humanos a partir de un simple contacto previo con sustratos contaminados.

**Tabla 16.- Relación entre el tiempo de exposición de la mosca al estiércol contaminado con *S. Typhimurium* LT2 y la cantidad de bacterias transportadas.**

Tratamiento	moscas	Tiempo (min)	Promedio UFC
1	5	1	69,4
2	5	3	411,4
3	5	5	483,2
4	5	10	120,8
5	5	15	55,6
6	5	20	33,4
7	5	25	28
8	5	30	10,2
9	5	35	61,8
10	5	40	116,6
11	5	45	37,5
12	5	50	274,25

#### **7.5.- Aislamiento y caracterización de *Salmonella* spp.**

##### **7.5.1.- Aislamiento e identificación por medios de específicos de *Salmonella* en el cuerpo de *M. domestica* recolectadas en diferentes zonas del Municipio Tovar.**

El primer punto de colecta fue en la finca nombrada anteriormente ubicada según coordenadas geográficas N 10°22'44,6'' y WO 10°20'22,6''. Se colectó gran cantidad de individuos según el protocolo descrito en 6.10.1, también se tomaron 10 moscas en campo y se hicieron caminar por placas de Agar XLD y SS para determinar si podían contener *Salmonella* en sus patas. Este mismo proceso se repitió para los otros puntos de colecta, el segundo de estos fue alrededor del Centro Clínico Colonia Tovar ubicado en las coordenadas geográficas N 10°24'13,2'' y WO 67°17'8,1'' donde sólo se pudieron colectar 4 ejemplares para los análisis en el laboratorio y otras 4 que se desplazaron por las placas de agar selectivo en campo. El tercer punto de colecta fue en el centro del pueblo, coordenadas geográficas N 10°24'26,3'' y WO 67°17'12,9'' donde se lograron colectar 12 ejemplares y analizaron 7 en campo. En la figura 8 se muestran las zonas de colecta.



**Figura 8.- Zonas de colecta en el Municipio Tovar de ejemplares de Moscas domèsticas. 1) Finca en el sector Gabante El Peñon II, 2) Centro Clínico Colonia Tovar, 3) Centro del pueblo y lugar turístico de La Colonia Tovar.**

En la región de estudio, donde abunda la mosca doméstica, resultó estar en mayor proporción en las regiones agrícolas y las zonas donde hay puestos de comida los cuales mayoritariamente son de interés turístico; a los alrededores del Centro Clínico la abundancia resultó ser mucho menor. El incremento en la población de *M. domestica* en esta región, resulta ser una incertidumbre para los pobladores, pero puede estar relacionado con el uso excesivo de gallinaza como abono orgánico (atrayerente por excelencia de *M. domestica*), el incremento de

habitantes y en consecuencia el exceso de desperdicios orgánicos como es el caso de verduras y frutas por la industria agrícola y la producción de basura por la industria comercial.

De las moscas analizadas en campo se encontró una con *Salmonella* en sus patas en la primera región de colecta y otra en el tercer lugar de colecta. En la tabla 17 se muestran los resultados de análisis en campo.

**Tabla 17.** Resultados de análisis con placas de Agar SS y XLD de las patas de las moscas en el campo.

Zona de colecta	Nº moscas	Moscas con salmonella	Porcentaje
1.- finca	10	1	10%
2.- centro clínico	4	0	0%
3.- centro del pueblo	7	1	14,3%
Total	21	2	9,5%

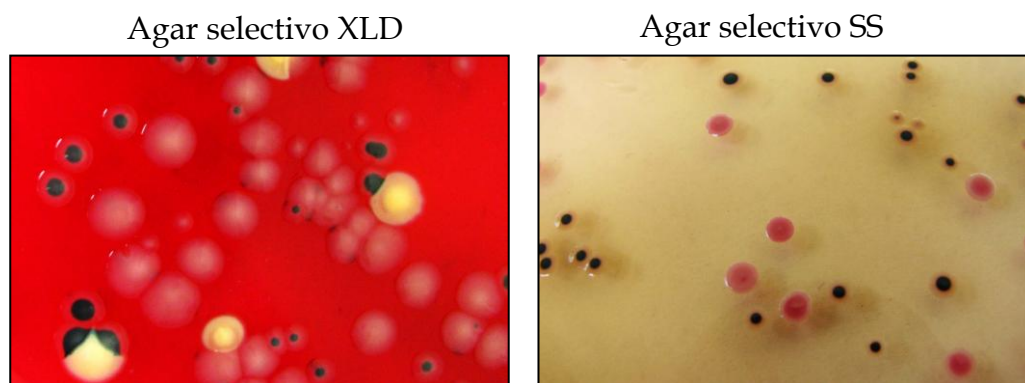
Los resultados con esta experiencia suelen ser muy interesantes ya que el simple contacto de estos insectos con nuestros alimentos, puede transferir varios tipos de agentes patógenos al ser humano, tal como lo es el caso de la *Salmonella*; Esrey en 1991 indica que aunque el número de organismos necesarios para la transmisión de enfermedades es difícil de encontrar en condiciones naturales en las moscas, las bacterias depositadas en los alimentos por el contacto, aun en pequeños números, puede multiplicarse hasta alcanzar la concentración necesaria para producir infección en los humanos. En el 2001 Basualdo y colaboradores,

desarrollaron un índice de infestación dependiendo del número de moscas observadas por hora, en el cual menos de 5 moscas da una infestación baja, entre 5 y 25 infestación media y más de 25 moscas observadas por hora un índice de infestación alto. En el centro del pueblo de La Colonia Tovar se observaron por minuto más de 25 moscas, lo cual lleva a considerar que esta región presenta un grave problema de infestación de *M. domestica*, que puede ser consecuencia de un manejo sanitario inapropiado. Hay que resaltar que en esta región de importancia económica para el Municipio Tovar se encontró que el 14,3% de las moscas analizadas en campo, fueron capaces de transferir *Salmonella* al medio agarizado, es decir de igual forma podría transferir la bacteria a cualquier alimento o utensilio doméstico en el cual se pose en esta zona y considerando la gran abundancia de las moscas, un 14,3% se puede considerar como un porcentaje alto de infestación. Por lo tanto el riesgo de que la mosca doméstica sea vector activo de bacterias entéricas, puede ser más preocupante debido a que podría afectar el turismo y a su vez la economía de la región.

Posteriormente en el laboratorio se realizó el análisis de las moscas colectadas en los diferentes puntos según la metodología descrita (6.10.1). De la primera región se analizaron 20 moscas de las cuales la mitad se sumergieron individualmente en caldo nutritivo por 5 minutos, de forma de extraer las bacterias que se encuentran en el exterior de su cuerpo, esto se hizo de igual forma con las otras diez moscas en caldo RV. Este procedimiento también con las 4 moscas recolectadas en la segunda región y las 10 de la tercera. Se realizaron las diluciones

indicadas y se sembraron en placas de agar SS y XLD, para seleccionar salmonellas.

En la figura 9 se muestran las UFC de *Salmonella* observadas en las placas de agar SS Y XLD.



**Figura 9.** Fenotipo de las colonias de *Salmonella* en placas de agar XLD Y SS. Las salmonellas en las placas de AXLD se observan con el centro negro y un halo rosa y en las de ASS con el centro negro y un halo transparente.

Las bacterias que presentaron el fenotipo esperado se tomaron como presuntas *Salmonella* y se realizó el aislamiento de las colonias. En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos de esta experiencia.

**Tabla 18.-** Número de moscas infectadas con bacterias del género *Salmonella* colectadas en diferentes regiones de La Colonia Tovar.

Zona de colecta	Nº de moscas analizadas	Nº de moscas con presuntas salmonellas	Porcentaje de moscas infectadas
1	20	9	45%
2	4	0	0%
3	10	3	33,33%
Total	34	12	35,3%

Por consiguiente, se encontró que 12 de las 34 moscas analizadas, presentaron bacterias del género *Salmonella* en su cuerpo, siendo la región agrícola la que presentó mayor densidad de la bacteria en los músculos.

Las presuntas bacterias del género *Salmonella* encontradas se aislaron nuevamente de los medios específicos. Ya que en varios casos la densidad microbiana fue muy elevada y se dificultó el aislamiento de las cepas puras, varias de estas fueron nuevamente aisladas sin tener ningún éxito en su crecimiento, o presentando fenotipos muy distintos a los esperados, por lo tanto se descartaron del estudio, quedando sólo 6 muestras de la región 1 y 2 muestras de la región 3. Consecutivamente se realizó la tinción Gram y las pruebas bioquímicas con agar de hierro Kligler, agar motilidad-indol-ornitina, agar lisina-hierro y el citrato Simmons; para asegurar que las bacterias aisladas fueran del género *Salmonella*.

Con estos resultados preliminares se halló que *Musca domestica* puede contener en el exterior de su cuerpo, diferentes bacterias que pueden ser patógenas para el hombre. Hay que acotar que las moscas fueron colocadas en los caldos cuando estaban aletargadas por exposición a bajas temperaturas, por lo cual resulta difícil pero no imposible que el insecto haya defecado o regurjitado en el medio, transfiriendo así los organismos que puede presentar en su sistema digestivo. Varias de las moscas despertaron estando en los caldos, por lo cual es posible que las bacterias del interior de su cuerpo hayan sido transferidas al medio. Además, entre los fenotipos observados en las placas de agares específicos, se encontraban



bacterias del género *Shigella* y *Escherichia Coli* que resultan de igual forma microorganismos nocivos para el hombre.

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos para la aplicación de la tinción de Gram y las pruebas bioquímicas que se les realizó a los aislados bacterianos obtenidos.

**Tabla 19.- Prueba realizadas para la confirmación del género *Salmonella* de las bacterias aisladas de las moscas.**

Origen de muestra	°N	Tinción Gram	Prueba Kliger,				Citrato Simmons	MIO			LIA	
			Fer. Lactosa	Fer. Glucosa	Prod. SH <sub>2</sub>	Prod. Gas	Citrato fuente carbono	Mot	Prod. Indol	Descar. Ornitina	Descar. Lisina	Prod. SH <sub>2</sub>
Región 1, AC.	1	Bacilo; Gram -	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Región 1 AL.	6	Bacilo; Gram -	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Región 3, AC.	1	Bacilo; Gram -	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Región 3, AL.	1	Bacilo; Gram -	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+

Región: región de colecta.

AC: *Salmonella* encontradas en mosca analizada en campo.

AL: *Salmonella* encontradas en mosca analizada en el laboratorio.

Nº: número de moscas con presuntas *Salmonella*

Fer.: Fermentación del carbohidrato.

Prod.: Producción.

Mot: Motilidad.

Descar.: Descarboxilación.

Los resultados de las pruebas bioquímicas son positivos para la identificación de *Salmonella* spp. confirmando que las bacterias aisladas de las moscas son *Salmonella* spp. donde 7 de 34 moscas analizadas en el laboratorio presentaron *Salmonella* spp. en su cuerpo y 2 de 21 en sus patas.

En un estudio realizado en mercados y basurales de Perú se analizaron 780 ejemplares de *M. domestica* de las cuales solamente 5 de ellas presentaron *Salmonella* asociada a su cuerpo (Bejar y col, 2006). Ubugu y col. (2006) analizaron 34 *M. domestica* colectadas en regiones urbanas y domesticas donde en 21 de ellas aislaron especies de *Salmonella*. En el 2007 Bouamama y col., analizaron 70 ejemplares de *M. domestica*, de las cuales el 55,7% presentó *Salmonella*. Todos estos trabajos ayudan a ratificar que *M. domestica* puede actuar como vector mecánico de bacterias entéricas en comunidades donde las necesidades sanitarias no son adecuadas. Es importante considerar que las moscas domésticas se encuentran totalmente relacionadas con las excretas de pollo y a su vez con la gallinaza. En el Municipio Tovar en el estado Aragua es utilizado como abono orgánico por la mayoría de los agricultores y varios estudios (Del Pozo, 2001; Rojas y col., 2002) determinan que las heces de los pollos presentan en la mayoría de los casos diferentes serotipos de *Salmonella* que pueden ser nocivos para el hombre. Ya que las moscas por lo general desarrollan parte de su ciclo de vida en estos materiales y una vez como adulto suelen alimentarse de ellos, se realizó el aislamiento de *Salmonella* spp. de heces de pollo y gallinaza para así correlacionar la presencia de las *Salmonella* spp. encontradas en las moscas de la zona.

#### **7.5.2.- Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. por medios de específicos de muestras de gallinaza del sector agrícola de La Colonia Tovar y estiércol de pollo de un Gallinero del Estado Aragua.**

Para esta experiencia se tomaron un total de 5 muestras de estiércol de pollo provenientes de la Granja de Gallinas La Milagrosa, Cagua, Edo.

Aragua y 6 muestras de gallinaza tomadas del primer punto de colecta de las msocas, se realizó el mismo proceso aplicado con las moscas para aislar salmonellas y se encontró (Tabla 20) en la mayoría de las muestras la presencia de *Salmonella* spp.

**Tabla 20.-** Muestras de estiércol de pollo y gallinaza analizadas para el aislamientos de *Salmonella*.

Origen	Muestra	Presencia de Salmonella	Porcentaje Positivos
Estiércol de pollo	1	+	80% (4/5)
	2	+	
	3	+	
	4	+	
	5	-	
Gallinaza	1	+	66,67% (4/6)
	2	-	
	3	-	
	4	+	
	5	+	
	6	+	

Se observa en la tabla 20 que el 80% de las muestras analizadas del estiércol de pollo y el 66, 67% de las muestras de gallinaza, presentaron presuntas salmonellas en su contenido bacteriano, lo que conduce a considerar en primera instancia que la presencia de estas bacterias indican que está ocurriendo un gran problema de salud pública, principalmente por el hecho de que *M. domestica* suele desarrollar su fase larval en este componente y a su vez alimentarse de él en su etapa adulta, pudiendo contaminarse con estas bacterias y actuar como vector mecánico de ellas.

Para poder corroborar que las bacterias encontradas pertenecen al género *Salmonella*, se realizaron nuevamente las pruebas bioquímicas, cuyos resultados se pueden observar en la tabla 21.

**Tabla 21.-** Prueba realizadas para la confirmación del género *Salmonella* de las bacterias aisladas de muestras de heces de pollo y gallinaza.

Origen de muestra	°N	Tinción Gram	Prueba Kliger,				Citrato Simmons	MIO			LIA	
			Fer. Lactosa	Fer. Glucosa	Prod. SH <sub>2</sub>	Prod. Gas	Citrato fuente carbono	Mot	Prod. Indol	Descar. Ornitina	Descar. Lisina	Prod. SH <sub>2</sub>
Heces de pollo	4	Bacilo; Gram -	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Gallinaza	4	Bacilo; Gram -	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Nº: número de muestras con presunta *Salmonella* spp.

Fer.: Fermentación del carbohidrato.

Prod.: Producción.

Mot: Motilidad.

Descar.: Descarboxilación.

Con los resultados de las pruebas bioquímicas se confirma que las bacterias aisladas con agares específicos pertenecen al género *Salmonella*, ya que cumplen con las principales características diferenciales, como lo son la producción de SH<sub>2</sub>, fermentación de la glucosa y producción de gas a partir de ella, no fermentar la lactosa ni producir inol, descarboxilar la ornitina y la lisina, ser mótils y utilizar el citrato como fuente de carbono (Perea y Corral, 1996).

En la regiones agrícolas de baja producción por lo general, la gallinaza es utilizada como abono orgánico para la mayoría de los cultivos, siendo a la vez la densidad de *M. domestica* muy elevada en estas regiones, por los beneficios ambientales creados para estos múscidos por el hombre (Scorza-Dagert y Cova,

2006), además se puede considerar una relación directa entre las salmonellas contenidas en el estiércol, la gallinaza, en el cuerpo de las moscas y las que causan salmonelosis.

En la tabla 22 se muestra la información suministrada por el Centro Clínico Colonia Tovar sobre los casos de disentería del 2008 hasta la fecha. Los casos de enfermedades diarreicas reportados suelen ser ocasionados por bacterias e ingesta de agua contaminada, según fue explicado por la Directora del Centro, la Lic. Daniella Jaime de la Dirección Municipal de Salud Tovar. No se sabe el porcentaje de la enfermedad que está asociada a bacterias entéricas, pero según los reportes del Centro Clínico los casos de disentería por salmonelosis y los cuales suelen ser muy frecuentes en esta región.

**Tabla 22.-** Morbilidad 2008-Agosto 2009 de enfermedades diarreicas, D.M.S. Centro Clínico Colonia Tovar.

<b>Año</b>	<b>Número de casos totales.</b>	<b>Número de casos de Alarma presentados.</b>	<b>Observaciones</b>
Ene-Dic. Año 2008	460	-	2da enfermedad con mayor número de casos en el Municipio para el 2008.
Ene-Ago. Año 2009	242	112	-

En Venezuela para el año 1999, las diarreas representaban la novena causa de muerte en la población general y la segunda causa de mortalidad en menores de 4 años. En 1998 de los 681.928 casos registrados a nivel nacional, el 30 % ocurrió en

menores de 1 año (Urrestarazu y col, 1999; OPS, 1999). Se estima que ocurren 1,32 millones de episodios anuales de diarrea, con una media de 2,2 episodios por niño/año (OPS, 1999). Rincón y col, en el 2002 determinaron que 13, 38% de los cuadros diarreicos en niños menores de 5 años, resulta positivo para bacterias enteropatógenas, el género *Salmonella* ocupó el cuarto lugar como agente etiológico de diarrea agua en infantes (Maracaibo).

Con el presente estudio, realizado por primera vez en nuestro país, se demuestra que *Musca domestica* actúa como vector mecánico potencial de *Salmonella* spp. en la Colonia Tovar, región en donde se utiliza gallinaza como abono orgánico.

Coincidiendo con muchos autores en el papel potencial de *M. domestica* de contener y transferir diferentes agente patógenos cuando la zona afectada presenta condiciones sanitarias inapropiadas, que permitan la proliferación del insecto (Cavaceppi, 1951; Greenberg y col., 1962; Greenberg, 1964; Greenberg y col., 1970; 1997; Iwasa y col., 1999; Kobayashi y col., 1999; Cedeño y Añez, 2001; Del Pozo y col., 2001; Montada Dorta, 2001; Moissant y col., 2004; Scorza-Dagert y Cova, 2006; Ugbo y col., 2006; Host y col., 2007; Bonnefoy y col., 2008). Además, queda demostrado que las excretas de gallina y sobre todo la gallinaza utilizada como abono orgánico, presenta gran densidad de *Salmonella* spp. y considerando que la mosca domestica por lo general desarrolla su fase larval en este sustrato, se puede considerar que los serotipos de *Salmonella* contenidos en el interior y exterior del

cuerpo de la mosca pueden ser los mismo, y a su vez los mismo que son transferidos a los humanos.

Es importante destacar que los serotipos de *Salmonella* contenidos en el estiércol de pollo (del Pozo y col, 2001; Castellanos y Murgia, 1998) suelen ser considerados como microorganismos nocivos para el humano. Greenberg (1964) demuestra la transmisión de *Salmonella Thyphimurium* a partir de heces de perro contaminadas a los humanos, corroborando así que *M. domestica* actúa como vector mecánico activo, de especies del género *Salmonella* y además tiene la capacidad de transferirlas al hombre.

Como se mostró además en la tabla 22 y nos informo la Lic. Daniella Jaime, en La Colonia Tovar se presentan muchos casos mensuales de enfermedades diarreicas, de las cuales varias son atribuidas a bacterias entéricas, analizando esta situación se puede suponer que parte de los casos de diarrea que se presentan, pueden estar directamente influenciados por la abundancia de *M. domestica* y su estrecha relación con los habitantes de esta zona, especialmente en las regiones agrícolas. El primer punto de colecta se realizó en el sector Gabante, al igual que las muestras de Gallinaza, en esta zona es donde se reporta la mayoría de casos de diarrea anuales, según el Centro Clínico Colonia Tovar, lo que resulta muy interesante, ya que la mayor densidad de *M. domestica* fue observada en esta zona.

## 8. CONCLUSIONES

- *Musca domestica* puede contener asociadas a su cuerpo especies del género *Salmonella* comportándose eficientemente como vector mecánico de *Salmonella* spp. en La Colonia Tovar, Edo Aragua.
- La presencia de *Salmonella* spp. en el cuerpo de las moscas confirma que se encuentran en estrecho contacto con materiales contaminados con esta bacteria.
- El uso excesivo de gallinaza como abono orgánico en La Colonia Tovar no sólo colabora en el incremento de la población de *M. domestica* en la región, sino también trae como consecuencia la dispersión de agentes patógenos contenidos en ella a través de las moscas, pudiendo afectar principalmente a los pobladores de las zonas agrícolas de la comunidad de La Colonia Tovar y posteriormente a sus visitantes.
- Se observó que el incremento de *M. domestica* es reflejo de condiciones sanitarias inapropiadas,



## 9. RECOMENDACIONES.

El incremento en la población de *M. domestica* en la Colonia Tovar debe ser considerado como factor de alarma a nivel de salud pública, por lo que sería recomendable y necesario realizar estudios en la zona, a fin de determinar cuáles son las variables implicadas en el acelerado incremento de estos insectos y su proliferación a lo largo de todo el año.

Dados los problemas sanitarios que genera a los habitantes esta situación, se hace inminente realizar el control del insecto en la zona, junto con la instrucción de la población sobre este gran problema de salud pública en el que viven y sobre el cual no tienen la suficiente información.

Otro aspecto de gran importancia a considera es la búsqueda de alternativas al uso de la gallinaza como abono orgánico, en virtud de las consecuencias que este provoca en la salud de la comunidad.

Además, se puede considerar que la proliferación del insecto no sólo trae consecuencias negativas a nivel de salubridad, sino también una posible baja de entradas económicas en la región por la disminución del turismo debido al exceso y proliferación de este insecto.

## 10. APENDICE.

Tabla 23. Pruebas bioquímicas aplicadas y reacción esperada.

Prueba	Determina	Apariencia final del medio y que indica
Tinción de Gram	Gram Positivos	Las bacterias Gram positivas se teñirán de azul. Las bacterias Gram negativas se teñirán de rosa.
	Gram Negativos	
Kliger	Fermentación de glucosa	El pico amarillo indica fermentación de lactosa.
	Fermentación de lactosa	El taco amarillo indica fermentación de glucosa.
	Producción de H <sub>2</sub> S	Desplazamiento completo del medio desde el fondo del tubo dejando una zona libre indica la producción de gas. Diseminación de un color negro en todo el fondo indica producción del H <sub>2</sub> S
	Producción de CO <sub>2</sub> y H <sub>2</sub>	
MIO	Actividad ornitina descarboxilasa	Al agregar el reactivo de Kovac, una coloración roja indica producción de Indol, sino hay cambio de color la prueba es negativa (luego de verificar la presencia o ausencia de motilidad). Para la motilidad se observará un crecimiento difuso que se extiende alrededor del inóculo. La actividad de ornitina descaboxilasa resulta positiva cuando el medio se torna morado y negativa cuando el medio posee un color amarillo o ligeramente violeta en el pico.
	Producción de Indol	
	Motilidad	
Citrato	Uso de citrato como fuente de carbono.	Reacción positiva: crecimiento de un intenso color azul en el pico de la flauta. Reacción negativa: ausencia de crecimiento y ningún cambio de color.
LIA	Actividad de Lisina descarboxilasa.	La producción de lisina descarboxilasa origina un reacción alcalina (color purpura). Los organismos que no descarboxilan producen una pendiente alcalina y fondo ácido (Color amarillo). La producción de H <sub>2</sub> S se observa con un ennegrecimiento intenso del fondo.
	Producción de H <sub>2</sub> S.	

Tabla 24. Análisis de varianza para la prueba de comparación por pares de Tukey.

Prueba de Levene para homogeneidad de la varianza, basada en las medias. $p= 0,03554$										
Comparación por Pares de Tukey										
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
30		0,008342	0,02669	0,0009395	0,0001579	0,0001581	0,0001579	0,0001579	0,0001579	0,0001578
60	5,695		1	0,9985	0,06835	0,1091	0,0278	0,04734	0,01619	0,004981
90	5,086	0,6089		0,9659	0,02327	0,03944	0,008716	0,01552	0,004908	0,00148
120	6,801	1,106	1,715		0,3329	0,4536	0,1717	0,2564	0,1116	0,04103
150	10,25	4,552	5,16	3,445		1	1	1	0,9999	0,9911
180	9,957	4,262	4,671	3,156	0,2896		0,9999	1	0,9987	0,9687
210	10,76	5,064	5,673	3,958	0,5123	0,8019		1	1	0,9997
240	10,46	4,767	5,376	3,661	0,2153	0,5049	0,297		1	0,9974
270	11,05	5,354	5,962	4,247	0,8019	1,091	0,2896	0,5866		1
300	11,65	5,955	6,564	4,849	1,403	1,693	0,891	1,188	0,6014	

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Aksakal, Y. y Ozcel, M.** (1993). An investigation into the protozoa and helminths eggs carried by the legs of house flies (*Musca domestica*). *Turk. Parazitol. Derg.* **17 (3/4)**: 112-118.
2. **Avancini, R. y Silveira, G.** (2000) Age structure and abundance in populations of muscoid flies from a poultry facility in southeast Brazil. *Men. Inst. O. Cruz.* **95**: 259-264.
3. **Axtell, R. y Arens, J.** (1990) Ecology and management of arthropod pest of poultry. *Ann. Rev. Entomol.* **35**: 101-126.
4. **Basualdo, W., Allende, I., Cabrera, T. y Arbo-Sosa, A.** (2001). Estudio de brote de diarrea disintérica por *Shigella* sp. En una comunidad rural. *Arch pediatr Urug.* **72 (1)**: 65-71.
5. **Béjar, V.; Chumpitaz, J.; Pareja, E.; Valencia, E.; Huamán, A.; Sevilla, C.; Tapia, M. y Sáez, G.** (2006). *Musca domestica* como vector mecánico de bacterias enteropatógenas en mercados de basurales de Lima y Callao. *Rev. Peru. Med. Salud Pública* **23 (1)**: 39-43.
6. **Bonnefoy, X.; Kampen, H. y Sweeney, K.** (2008). Public Health significance of Urban Pests. World Health Organization Europe, Copenhagen, Denmark.
7. **Bouamama, L., Lebbadi, M. y Aarab, A.** (2007). Bacteriological analysis of *Periplaneta americana* L. (Dictyoptera; Blattidae) and *Musca domestica* L. (Diptera; Muscidae) in ten districts de Tangier, Morocco. *African Journal of Biotechnology.* **6 (17)**: 2038-2042.
8. **Calisir, B. y Polat, E.** (1993). An investigation into the fly fauna of five refuses tips in Istanbul. *Turk. Parazitol. Derg.* **17 (3/4)**: 119-129.
9. **Carvalho, C.J. y Couri, M.** (2005). Key to the Neotropical genera of Muscidae. Part I. Basal groups. Curso dictado en la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela, 2007.

10. **Castellanos, A. y Murguía, M.** (1999) Evaluación de un probiótico para el control de *Salmonella* en pollos de engorde en Yucatán. *Vet. Mex.* **30(3)**: 243-248.
11. **Cavaceppi, L.** (1951) Knowledge of the ancients on flies in Ulisse Aldrovandi's "De animalibus insectis". *Riv. Parassit.*, **12**: 60-64.
12. **Cedeño, L. y Añez, B.** (2001). Breve reseña sobre beneficios e inconvenientes derivados del uso del estiércol en agricultura. *Bol. Divulg. IIAP.* Mérida **26**: 17-19.
13. **Coello, N.; Guevara, L. y Rojas, V.** (2003). Microbiología general. Guía de trabajos prácticos. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
14. **Cova, L. y Scorza-Dagert, J.** (2006). Control temporal de moscas caseras (*Musca domestica*) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria Bassiana*. *Bol. Mariatol. Salud Ambien.* **46(22)**: 131-136.
15. **Daniel, W.** (2002). Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta edición. Editorial Limusa S.A. de C.V. Grupo Noriega editores. México D.F.
16. **Del Pozo, E.; Saenz, E.; Leyva, V.; Pérez, O.; de los Reyes, M. y Ferrer, Y.** (2001). Serotipos de *Salmonella* aisladas en pienso de gallinas ponedoras. *Rev. Cubana. Aliment. Nutr.* **15(1)**: 26-30.
17. **DIFCO®.** (1953). DIFCO Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology and Clinical Laboratory Procedures. Novena edición. Difco Laboratories. Ditroit, Michigan, EEUU.
18. **Esrey, S. A. (1991).** Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: fly control. World healthd organization. WHO/CDD/**91.37**: 1-19.
19. **Figueroa, I.M. y Verdugo, A.** (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Rev. latinoam. Microbiol.* **47 (1-2)**: 25-42.
20. **Figueroa, L., Flores, J. y Rodríguez, S.** (2007). Métodos de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitol. Latinoam.* **62**: 79-82

21. **Galán, J.E.** (1996) Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry host cells. Bacterial Invasiveness. Current Topics in Microbiology and Immunology. Editado por Muller, V.L. EE.UU.
22. **Greenberg, B.; Varela, G.; Bornstein, A. y Hernandez, O.** (1962). *Salmonella e* from flies in Mexican slaughterhouse. *Am. J. Hyg.* **77**: 177-183.
23. **Greenberg, B.** (1964) Experimental transmission of *Salmonella Typhimurium* by houseflies to man. *Am. J. Hyg.* **80**: 149-156.
24. **Greenberg B.; Kowalski J. y Klowden M.** (1970). Factors affecting the transmission of *Salmonella* by flies: natural resistance to colonization and bacterial interference. *Infect. Immun.* **2(6)**:800-809.
25. **Hecht, O.** (1970). Light and color reactions of *Musca domestica* under different conditions. *Bull. Ent. Soc. Am.* **16**: 94-98.
26. **Hernández-Chavarría, F.** (2002). Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica. Primera edición. La Editorial Universidad. San José, Costa Rica.
27. **HiMedia®.** (1998). The HiMedia Manual for Microbiology Laboratory practice. HiMedia Laboratories.
28. **Host, P.; Geden, C.; Moore, R. y Gast, R.** (2007) Isolation of *Salmonella enteritidis* from houseflies (*Musca domestica*) found rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis-Challenged Hens. *Appl. Environ. Microbiol.* **73(19)**: 6030-6035.
29. **Iwasa, M.; Makimo, S.; Asakura, H.; Kobori, H. y Marimoto, Y.** (1999). Detection of *Escherichia coli* 0157: H7 in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a Cattle farm in Japan. *J. Med. Entomol.* **36**: 108-112.
30. **Keiding, J.** (1986). The house-fly, Biology and control. WHO/VBC/86.937.
31. **Kobayashi, M., Sasaki, T., Saito, N., Tamura, K., Suzuki, K., Watanabe, H. y Agui, N.** (1999). Houseflies are not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 01 57: H7. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 625-629.

32. **Macfaddin.** (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
33. **Madigan, M.; Martinko, J. y, Parker, J.** (2004). Brock, Biología de los Microorganismos. 10ma edición. Pearson Prentice-Hall.
34. **Manrique-Saide, P. y Delfín-González, H.** (1997). Importancia de las moscas como vectores potenciales de enfermedades diarreicas en humanos. *Rev Biomed.* **8**: 163-170.
35. **Martiradonna G.** (2006). Toxicidad de insecticidas organofosforados en *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera:Muscidae). Tesis de Grado, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela.
36. **Martiradonna, G.; Soto, A.; González, J. y Hernández, A.** (2007). Protocolo de cría de moscas en laboratorio. Instituto de altos estudios Dr. Arnoldo Gabaldon.
37. **Moissant E.; Tkachuk O. y Roman R.** (2004). Detección de agentes bacterianos en adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) recolectadas en Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Estudio preliminar. *Entomotrópica.* **19(3): 161-164.**
38. **Montada Dorta, D.** (2001). Mosca doméstica y mosca de establos. pp 469-473. En: Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo III. Hernández, Zuazo y Zuazo Silva editores. Editorial Ciencias Médicas.
39. **Oo, K., Sebastián, A. y Aye T.** (1989). Carriage of enteric bacterial pathogens by house flies in Yagon, Myanmar. *J. Diarrhoeal. Dis. Res.* **7**: 81-84.
40. **[OPS]. Organización Panamericana de la Salud.** (1962). Guías de adiestramiento para el saneamiento del medio. Moscas de importancia para la salud pública y su control. Washington DC. Publicación científica. **61**: 4-12.
41. **[OPS]. Organización Panamericana de la Salud.** (1999). En Venezuela la diarrea es la segunda causa de mortalidad en niños menores de 4 años. Comunicados de prensa.

42. **Oxoid®**. (1995). Manual Casa Comercial Oxoid. UNIPATH, España S.A.
43. **Palacios, O.** (2005). Evaluación de un Sistema Discontinuo de Biodigestión Anaerobia para el tratamiento de desechos avícolas. *Rev. Fac. Ing. UCV.* 20 (4): 105-112.
44. **Parra, M.; Durando, J. y Máttar, S.** (2002). Microbiología, Patogénesis, Epidemiología Clínica y Diagnóstico de las Infecciones Producidas por *Salmonella*. MVZ-CÓRDOBA: **7(2)**: 187-200.
45. **Peñalver, H.** (2001). Estudio Geográfico Urbano de la Colonia Tovar, Municipio Tovar del Estado Aragua. Escuela de Geografía, Facultad de Humanidades. Universidad Central de Venezuela.
46. **Perea, E.J y Corral, J.L.** (1996). Manual de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Doyma. Madrid, España.
47. **Rincón, G., Ginestre, M., Harris, B., Romero, S. y Martínez, A.** (2002). Frecuencia de bacterias enteropatógenas en niños menores de cinco años. *Kasmera.* **30 (1)**
48. **Ríos, L.; Combillas, J. y Álvarez, R.** (2005). Uso de excretas de aves en alimentación de ovinos. *Zootecnia Trop.* **23 (2)**.
49. **Rojas, M.; García, M. y Masdeu, V.** (2002). Resultados de análisis microbiológicos de yacijas de paja de arroz utilizadas en la avicultura. *Rev. cubana cienc. avicul.* **26**: 121-123.
50. **Rueda, J., Amigot Lázaro, J.A. y Ducha, J.** (2003). Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **22 (3)**: 1097-1104
51. **Sánchez, M.M. y Cardona, N.M.** (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. Asociación Colombiana de Infectología. **7(1)**: 22-29.
52. **Scorza-Dagert, J. y Cova, L.** (2006). Acción patógena de una cepa venezolana de *Beauveria bassianana* para *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Bol. Mariatol. Salud Ambien.* **46(2)**: 119-130.



53. **Senna-Nunes S., M., Da Costa, G. L., Elias, V. R. y Bittencourt, P.** (2002). Isolation of fungi in *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) Captured at two Natural breeding grounds in the municipality of Seropédica; Rio de Janeiro, Brazil. *Men. Inst. Oswaldo Cruz.* **97 (8):** 1107-1110.
54. **Seymour, R., Cowgill, M.M., Klecka, G.M., Gersich, F.M. y Mayes, M.A.** (1984). Occurrence of *Aphanomyces daphniae* infection in laboratory cultures of *Daphnia magna*. *J. Invert. Pathol.* **43:** 109-113
55. **Taboada, A., Sánchez, E., Cava, R., Marín, F. y López, A.** (2007). Efectividad de desinfectantes de superficies de los equipos de envasado de productos listo para su consumo. *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones.* 887-892.
56. **Ugbogu, O.C.; Nwachukwu, N.C. y Ogbuagu, U.N.** (2006). Isolation of *Salmonella* and *Shigella* species from house flies (*Musca domestica* l.) in Uturu, Nigeria. *African J. Biotechnol.* **5 (11):** 1090-1091.
57. **Urrestarazu, M., Liprandi, F., Pérez de Suárez, E., González, R. y Pérez-Schael, I.** (1999). Características etiológicas, clínicas y sociodemográficas de la diarrea aguda en Venezuela. *Rev Panam Salud Publica.* **6 (3):** 149-156.
58. **[WHO]. World Health Organization.** (1991). The housefly. Training and information guide (Intermediate level). World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. WHO/VBC/90.987.

## 10.1. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

1. Dehydrated Culture Media. Rappaport Vassiliadis (RV) Enrichement Broth. Oxoid. Disponible en:  
[http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0669yorg=124yc=UKylang=EN](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0669yorg=124yc=UKylang=EN). Consulta: 15 de Noviembre de 2008.
2. Mapa Político del Estado Aragua. Instituto Geográfico de Venezuela Simón Bolívar. Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. Gobierno Bolivariano de Venezuela. Disponible en:  
[www.igvsb.gov.ve/site2007/images/mp/Aragua.jpg](http://www.igvsb.gov.ve/site2007/images/mp/Aragua.jpg), Consulta: 13 de Noviembre de 2008.
3. Productos. Micro plus action (esterilizante en frío de amplio espectro). Disponible en: <http://www.maatglobal.com/productos.html>. Consulta: 20 de Junio de 2009.
4. Salmonelosis. (2005). National Center for Immunization and Respiratory Diseases: Division of Bacterial Diseases. Department of health and human service, centers for diseases control and prevention. Disponible en:  
[http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis\\_g\\_sp.htm#4](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g_sp.htm#4)  
. Consulta: 8 de Noviembre de 2008.