



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

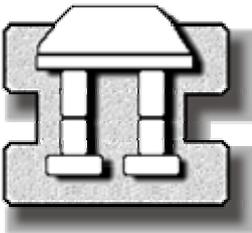
---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. POR PCR EN DIARREA DE  
PACIENTES CON GASTROENTERITIS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A:  
MÓNICA ALCÁZAR CAMPOS

ASESOR: M EN C. ERIC MONROY PEREZ



LOS REYES IZTACALACA EDO. DE MEX. 2006  
Dedicatorias



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedico esta tesis especialmente a mis padres, por su amor incondicional, por todos los sacrificios que realizaron para educarme y guiarme, por sus desvelos, por apoyarme siempre y de una manera que una vida no me bastaría para devolver parte de todo lo que han hecho por mi y por enseñarme, mediante el ejemplo, a no rendirme jamás. Es mucha la paciencia que han tenido para ver llegar este momento, pero finalmente aquí está, con todo mi corazón...

A mis hermanos Edmundo y Hugo gracias por su apoyo, son un pilar insustituible en mi vida.

A Miguel por ser mi amor, mi amigo y mi cómplice de todo momento, por aguantar mis malos ratos, entregarme tanto cariño, y comprensión cuando más lo he necesitado, sin ti nada sería igual.

A cada uno de mis amigos de la facultad en especial a Vania Villanueva Sousa, gracias mujer por ser esa amiga incondicional.

## Agradecimientos

Agradezco a los M en C. Gloria Luz Paniagua Contreras y Eric Monroy Pérez por la asesoría y dirección en la realización de este trabajo.

A si mismo agradezco las observaciones y sugerencias del Dr. Sergio Vaca Pacheco.

Al laboratorio de Genética de la unidad de Morfofisiología por las atenciones brindadas.

Muy en especial a las Biólogas: Susana Esther González e Imelda Juárez Avelar por compartir sus conocimientos en esta área de la biología.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. RESUMEN.....                                    | 5  |
| 2. INTRODUCCIÓN.....                               | 6  |
| 2.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....   | 6  |
| 2.2 PATOLOGÍA.....                                 | 10 |
| 2.3 MORFOLOGÍA DE <i>Salmonella</i> .....          | 11 |
| 2.4 MECANISMO DE VARIACIÓN DE FASES.....           | 13 |
| 2.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 15 |
| 3. ANTECEDENTES.....                               | 18 |
| 4. OBJETIVOS.....                                  | 19 |
| 5. METODOLOGÍA.....                                | 20 |
| 6. RESULTADOS.....                                 | 25 |
| 7. DISCUSIÓN.....                                  | 39 |
| 8. CONCLUSIONES.....                               | 49 |
| 9. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....                     | 50 |

## RESUMEN

En México las infecciones gastrointestinales son consideradas como un grave problema de salud a resolver. La Secretaría de Salud informó que en el período de 1993 a 1997 más de 2 millones de personas sufrieron enfermedades gastrointestinales, con un promedio anual de 10,300 defunciones. Entre las bacterias que ocasionan problemas gastrointestinales, principalmente en niños, se encuentra *Salmonella* spp. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* expresan alternativamente los antígenos flagelares Fase I y Fase II, codificados por los genes *fliC* y *fljB* respectivamente.

Por lo cual los objetivos de este trabajo fueron: Identificar por PCR multiplex los serotipos más comunes de *Salmonella* spp. en diarrea de pacientes con gastroenteritis, establecer la probable existencia de parásitos intestinales en la muestra fecal. Se recolectaron 134 muestras diarreicas de diferentes Centros de Salud del Distrito Federal y del Estado de México y se transportaron en hielo al Laboratorio Clínico de la CUSI-Iztacala, FESI, UNAM. Para la detección de los serotipos de *Salmonella* spp que expresan el flagelo Fase I y Fase II se utilizaron oligonucleótidos complementarios a distintas secuencias de DNA específicas. La identificación de los parásitos se realizó por el método de flotación de Faust.

El 72% (96) de las muestras fue positivo para algún serotipo de *Salmonella* spp. De los 96 casos positivos, el 53% (51) correspondió a *S. ohio*, 41% (39) *S. typhimurium* y 14 % (14) *S. infantis* y el 1% (1) a *S. anatum*. En el 95% (111) de las muestras se identificó a *Entamoeba histolytica*, 44% (52) a *Giardia lamblia* y 7% (8) a *Iodamoeba bütschlii*. La asociación *S. ohio/E. histolytica* ocurrió en un 86% (44), *S. ohio/G. lamblia* 43% (22) *S. ohio/Iodamoeba butschlii* 4% (2).

Los resultados reflejaron que la mayoría de las infecciones diarreicas de los infantes analizados fue ocasionada probablemente por alguno de los serotipos de *Salmonella* detectados. La asociación de *S. typhimurium*, *S. infantis* o *S. ohio* con *E. histolytica* o *G. lamblia* mostró la complicación de las infecciones, por lo que fue urgente iniciar el tratamiento médico necesario.

## INTRODUCCIÓN

### **Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).**

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan un serio problema de salud mundial, principalmente en los países en vías de desarrollo como México (Molina, 1997). Las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas. De tal manera que el alimento actúa como un vehículo de transmisión de organismos patógenos o de sus toxinas (Molina, 1997).

Un brote de ETAs ocurre cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento.

Se ha reportado que las enfermedades transmitidas por alimentos pueden agruparse en tres tipos (Gutiérrez, 1994):

- a)** Infecciones Transmitidas por alimentos: Son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos patógenos por ejemplo: Salmonelosis, hepatitis viral tipo A y toxoplasmosis.
- b)** Intoxicación causada por alimentos: Ocurre cuando la toxinas de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido, estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado.
- c)** Toxi-infección causada por alimentos: Es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de

microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas que una vez que son ingeridos pueden ocasionar enfermedades como por ejemplo el cólera.

Se ha descrito que las manifestaciones de las infecciones alimentarias pueden ser de tipo gastrointestinal (amibiasis, salmonelosis, shigelosis, teniasis, giardiasis, ascariasis, cólera, e intoxicaciones alimentarias) o de tipo extraintestinal (brucelosis, cisticercosis, fiebre tifoidea, hepatitis, botulismo etc.) (Parilla y Cols, 1993). También se ha reportado que la transmisión de organismos patógenos puede ocasionar síndromes tóxicos, respiratorios y enfermedades crónicas (Riley y Cols, 1983).

Se han estimado que las enfermedades de origen alimentario causan de 6 a 81 millones de enfermos y hasta 9 000 muertos a nivel mundial (Coria, 2001). En México la Secretaría de Salud informó que en el período de los años 1993 a 1997, 2.95 millones de personas sufrieron infecciones transmitidas por alimentos con un promedio anual de 10 300 defunciones, además de cuantiosos gastos en atención médica y pérdidas económicas y laborales (Gutiérrez, 1994).

En los países en desarrollo las enfermedades Gastrointestinales representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político (Gutiérrez, 1994). México es una de las naciones que registran a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos (Kumate e Isibasi, 1986; Kumate,

1988), siendo muy elevado el costo tanto en vidas humanas y recursos médicos destinados a la atención de los enfermos, como en pérdidas de tiempo laborable, ya que constituyen una de las primeras causas de ausentismo laboral (Olarte, 1986).

En los años de 1980-1989, las diferentes instituciones de salud en México, notificaron 3,419 casos de brucelosis, 9,790 de shigelosis, 10,939 de tifoidea, 30,899 intoxicaciones alimentarias no especificadas, 72,754 de salmonelosis y 1, 948,542 de otras infecciones intestinales, lo que da un total de 2, 076,343 episodios relacionados con transmisión alimentaria (Secretaría de Salubridad y asistencia, 1990).

Durante este periodo se reportaron 79 brotes (58 de origen microbiano) en el Distrito Federal y 16 estados de la República. En este reporte se confirmó a *Staphylococcus aureus* como principal agente con 792 casos y 5 defunciones, seguido por *Salmonella enterica* (596 casos y 4 defunciones), *Escherichia coli* (68 casos y 1 defunción), *Salmonella typhi* (68 casos y 1 defunción), *Clostridium perfringes* (177 casos) y *Klebsiella pneumonie* (85 casos y 28 defunciones).

En México la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, la tasa promedio de mortalidad asociada a enfermedad diarreica aguda en países en vías de desarrollo es muy elevada. En México en el 2003 ocurrieron 4 556 casos por infecciones gastrointestinales (Salud Pública México 2005).

En los países en desarrollo las enfermedades gastrointestinales representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político. México es una de las naciones que registran a nivel mundial las tasas de mortalidad más elevadas por estos padecimientos (Kumate e Isibasi, 1986; Kumate, 1988), siendo muy elevado el costo tanto en vidas humanas y recursos médicos destinados a la atención de los enfermos, como en pérdidas de tiempo laborable, ya que constituyen una de las primeras causas de ausentismo laboral (Olarate, 1986).

Dentro de las bacterias que ocasionan infecciones intestinales encontramos a *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, etc.

La etiología de las enfermedades Gastrointestinales es múltiple. Sin embargo, en México la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, siendo los factores más importantes aquellos de carácter sanitario, socioeconómico y cultural.

## Patología

Dentro de las enfermedades gastrointestinales ocasionadas por alimentos contaminados, se encuentran las producidas por *Salmonella*. El género *Salmonella* se encuentra de manera habitual en el hombre y en animales. Algunos solo son específicos del ser humano, las especies del género *Salmonella* son patógenos importantes, colonizan el tracto intestinal en el hombre. Las enfermedades producidas por *Salmonella* son de dos tipos, las fiebres entéricas y la gastroenteritis. En ambas infecciones, las bacterias se ingieren con la comida y al beber agua contaminada e inicia la infección mediante la adherencia y la colonización del tracto intestinal (Freeman, 1985).

La gastroenteritis inducida por *Salmonella* spp presenta síntomas que aparecen de seis a veinticuatro horas después de la ingestión del alimento o agua contaminada y su evolución es de un semana. Se caracteriza por náuseas y vómito con cese de éstos en unas pocas horas, seguidos por cólicos abdominales y diarrea que puede llegar a ser sanguinolenta y varía en volumen e intensidad. Después de que los síntomas cesan, las personas infectadas pueden excretar la bacteria por un periodo de tres meses. En un pequeño número de casos (1-3 %), una persona infectada puede continuar eliminando la bacteria por más de un año (Fernández, 2001).

La fiebre tifoidea en humanos es causada por *S. typhi*, esta enfermedad prevalece principalmente en países en vías de desarrollo, hay aproximadamente 17 millones de casos anuales con casi 600,000 muertes, la enfermedad se caracteriza por la presencia de bacterias en la sangre, provocan diarrea, vómitos y

fiebre. La duración y entidad es variable, dependiendo del estado general del hospedero, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas (Fernández, 2001).

## Morfología de *Salmonella*

El género *Salmonella* se encuentra dentro de la familia de las Enterobacterias, son bacilos gramnegativos, anaerobios y facultativos, crecen a pH de 6.6-8.2, miden entre 2 a 3 x 0.4 a 0.6 micras. El género *Salmonella* consta de dos especies, *Salmonella enterica* que esta formada por seis subespecies, las cuales se identifican mediante pruebas bioquímicas y la especie de *Salmonella bongori* (Tabla 1). Esta subdivisión ha sido apoyada por varios métodos de hibridación de DNA y métodos serológicos. Mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo se determina la formula antigénica de un cepa y, a partir de dicha formula, se clasifican serovar o serotipo siguiendo el esquema propuesto por Kauffman y White (que agrupa todas las serovariedades conocidas, mas de dos mil quinientos) (Popoff, 2001).

|   |
|---|
| <i>Salmonella enterica</i> , con seis subespecies |
| Subespecie I: <i>enterica</i> .                   |
| Subespecie II: <i>salamae</i> .                   |
| Subespecie IIIa: <i>arizonae</i> .                |
| Subespecie IIIb: <i>diarizonae</i> .              |
| Subespecie IV: <i>houtenae</i> .                  |
| Subespecie VI: <i>indica</i> .                    |
| <i>Salmonella bongori</i>                         |

TABLA 1. Especies y subespecies del género *Salmonella* (POPOFF 2001).

Cada subespecie, a su vez, esta subdividida en serotipos de acuerdo al tipo de antígeno. Estos antígenos pertenecen a tres

clases principales: antígenos O somáticos; antígenos H flagelares y antígenos K o Vi capsulares.

Los antígenos O son lipopolisacáridos termoestables comunes en este tipo de bacterias, están presentes en la membrana externa y son responsables de la actividad endotóxica.

Los antígenos H se encuentran en los flagelos de las bacterias móviles, poseen proteínas específicas serológicamente, llamadas flagelinas, que son termolábiles.

Los antígenos K son la tercera clase de antígenos, éstos se encuentran en la familia Enterobacteriaceae como cápsulas, o como antígenos de la envoltura que cubre los antígenos O de superficie. Generalmente los antígenos de esta clase son polisacáridos y su capacidad de reacción suele ser alterada por el calor. La terminología del antígeno K varía un poco en los distintos géneros. En las pocas *Salmonellas* que poseen antígenos K se denomina antígeno Vi.

### **Mecanismo de variación de fases**

Actualmente se han identificado 2,501 serotipos diferentes de *Salmonella* spp. El género *Salmonella* es único entre los miembros de la familia Enterobacteriaceae, debido a que comúnmente posee dos tipos de antígenos flagelares (Fase I y Fase II), los cuales son coordinadamente regulados por un mecanismo de variación de fases. Los genes responsables son *FljC* (antígenos flagelares fase I) y *FljB* (antígenos flagelares fase II). De esta manera solo un

antígeno flagelar es expresado en un tiempo. Las cepas que poseen ambos tipos de antígenos flagelares son bifásicas y las que poseen un solo tipo son monofásicas (Tabla 2). El operón *fljBA* incluye al gen *hin* que codifica la Hin recombinasa; el gene *fljB* que codifica el flagelo fase II y el gene *fljA* que codifica un represor para el gene *fliC*. La Hin recombinasa cataliza la inversión reversible de un segmento de 933 pb de el cromosoma que contiene un promotor para el operón *fljBA*. En una orientación el promotor dirige la transcripción de los genes *fljB* y *fljA*, que inducen la represión del gen *fliC*. En la otra orientación de *hin*, *fljB* y *fljA* no son expresados, por lo que el antígeno flagelar fase II es apagado, y *fliC* es expresado nuevamente, seguido por la expresión del antígeno flagelar fase I. Algunos de estos alelos son definidos por un solo factor (antígeno i, d, ó r): otros son definidos por varios subfactores (e.g., antígenos l,v,g,m y e,n,x). Comparaciones entre la secuencia de aminoácidos de las flagelinas de *Salmonella* ha determinado la existencia de 8 regiones variables. Las secuencias amino y carboxilo terminal (regiones I, II y VIII) son conservadas y se piensa son importantes para la polimerización y transportación. La región central que comprende las regiones IV, V y VI es altamente variable en ambas secuencias y longitud entre los genes de los antígenos flagelares y se creó determina los epítopes de los antígenos H.

| Serotipo              | Serogrupo | Antígenos Flagelares Fase I | Antígenos Flagelares Fase II |
|-----------------------|-----------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>S. paratyphi A</i> | A         | a                           | [1,5] puede estar ausente    |
| <i>S. paratyphi B</i> | B         | b                           | 1,2                          |
| <i>S. typhimurium</i> | B         | i                           | 1,2                          |
| <i>S. heidelberg</i>  | B         | r                           | 1,2                          |
| <i>S. paratyphi C</i> | C1        | c                           | 1,5                          |
| <i>S. virchow</i>     | C1        | r                           | 1,2                          |
| <i>S. hadar</i>       | C2        | z10                         | e, n, x                      |
| <i>S. newport</i>     | C2        | e,h                         | 1,2                          |
| <i>S. typhi</i>       | D1        | d                           | -                            |
| <i>S. enteritidis</i> | D1        | g, m                        | [1,7] puede estar ausente    |

TABLA 2. Serotipos de *Salmonella* de mayor importancia en patología humana según el esquema de Kauffman – White que expresan los antígenos flagelares de Fase I y Fase II (POPOFF 2001)

En el 2002 el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella-Shigella* (LNRSS) desarrollo un nuevo método de PCR múltiple para identificar los antígenos flagelares de Fase II (complejos HI, H:l,w, H:e,n,x y H:e,n,z<sub>15</sub>) comprendidos en los más comunes serotipos aislados en España (Herrera y Cols, 2004).

Recientemente se desarrollo un método de PCR multiplex, parecido al desarrollado para Fase II, con el que se puede detectar alelos flagelares de Fase I más comunes (Echeita y Cols, 2002).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

En los últimos años las técnicas microbiológicas han evolucionado hacia una mejor metodología en la microbiología Clínica, esto con el propósito de dar una mayor rapidez en la detección de *Salmonella* spp en pacientes infectados. En la actualidad se utilizan Metodologías por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La técnica de la PCR permite producir millones de copias de un segmento de DNA con alta fidelidad en aproximadamente 3 horas.

El procedimiento requiere de un molde de DNA (que puede estar presente en la muestra en muy pequeña cantidad), dos oligonucleótidos que flanquean la secuencia a ser amplificada (definiendo los puntos de partida para la actividad polimerasa), y una DNA polimerasa termoestable. Un ensayo de PCR típicamente requiere de unas 3 horas para completar 30 ciclos, cada uno de los cuales consiste en una fase de desnaturalización (en donde las dos hebras de DNA se separan), una fase de hibridación (en la que los oligonucleótidos se hibridan con las secuencias complementarias en el molde) y una fase de extensión (en donde la polimerasa sintetiza nuevas hebras de DNA a partir de las secuencias determinadas por los oligonucleótidos). En cada ciclo se generan dos nuevas copias de DNA doble cadena a partir del molde original por lo cual luego de 30 ciclos pueden sintetizarse teóricamente un billón de copias (Méndez, 2004).

En los últimos años el desarrollo de la PCR múltiple ha permitido detectar y amplificar simultáneamente distintos genes de interés, lo cual permite obtener un diagnóstico rápido, sensible y eficaz, que se ve reflejado en el tratamiento adecuado para los pacientes infectados por microorganismos (Méndez, 2004). El método que utilizamos en este estudio para el diagnóstico de *Salmonella* spp fue desarrollado por el Instituto Sueco para la Prevención de Enfermedades Infecciosas (Smittskyddsinstitutet), que a su vez es el laboratorio de referencia de *E. coli* y *Salmonella* en Suecia y uno de los principales en la Unión Europea en cuanto a desarrollo de métodos y manejo de información epidemiológica. Para el caso de *Salmonella*, se utilizan 23 oligonucleótidos (primers) complementarios a regiones internas variables de los genes *fliC* y *fliB* (fase flagelar 1 y 2 respectivamente) presentes en los serotipos

más comunes de *Salmonella* spp., a fin de detectar amplicones de tamaños característicos que permiten identificar los alelos de los antígenos H de los serotipos más frecuentes de *Salmonella* spp causantes de diarrea (García, 2005) (tabla 3 y 4).

| Oligonucleótidos | Secuencia                | 5' Posicion en el gen fliC |
|------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1. Antisense-i   | ATAGCCATCTTTACCAGTTCC    | 714-734                    |
| 2. Antisense-iv  | CCTGTCACCTTTCTGTGTTAT    | 790-809                    |
| 3. Forward G     | GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG  | 547-569                    |
| 4. Reverse-G     | AAGTTTCCGCACTCTCGTTTTTGG | 1055-178                   |
| 5. Antisense-z10 | CGTCGCAGCTTCTGCAACC      | 911-929                    |
| 6. Reverse-sdf-1 | CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC |                            |
| 7. forward-sdf1  | TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG  |                            |
| 8. Antisense-r   | AAGTGACTTTTTCCATCGGCTG   | 741-761                    |
| 9. Sense 60      | GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG | 481-504                    |
| 10. Antisense-eh | AACGAAAGCGTAGCAGACAAG    | 658-678                    |
| 11. Antisense-b  | CGCACCAGTCYWACCTAAGGCGG  | 628-650                    |
| 12. Forward-d    | CCCGAAAGAACTGCTGTAACCG   | 539-561                    |
| 13. Reverse-d    | TGGATATCAGTATTGCTCTGGGC  | 625-647                    |

Tabla 3. Ubicación de los sitios específicos de los alelos en el gen fliC con respecto a los oligonucleótidos en la fase flagelar I.

| Oligonucleótidos    | Secuencia                  | 5' Posición en el gen fliB |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| 14. Sense-f1mod     | CTTATGCCRATAATGGTACTACACTG | 568-594                    |
| 15. Antisense R5mod | GGTTACAGVAGCCGTACCAG       | 666-647                    |
| 16. Antisense-R6    | CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA  | 858-834                    |
| 17. Antisense-R7    | TAATCGCCATTTTTGTCGAG       | 758-739                    |
| 18. Antisense-R1mod | TTTGACCAAYKYMGCSCSCAT      | 957-938                    |
| 19. Sense-fw        | GTGGGGCAACMCTCAATACTG      | 569-589                    |
| 20. Antisense-RW    | CCTGCCACTTTCGTGGTTGC       | 809-790                    |
| 21. Sense-fe        | GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC | 631-656                    |
| 22. Antisense-Rx    | CCATCCTTAAAGGATACGGC       | 685-667                    |
| 23. Antisense-Rz15  | ATCAACGGTAACTTCATATTTG     | 765-744                    |

Tabla 4. Ubicación de los sitios específicos de los alelos en el gen fliB con respecto a los oligonucleótidos en la fase flagelar II.

## ANTECEDENTES

- Gutiérrez y cols, (2000) en un estudio realizado en el Laboratorio de Bacteriología Entérica del INDRE, donde se analizaron 24, 394 cepas de *Salmonella* aisladas de pacientes mexicanos, durante el periodo de 1972 a 1999, identificaron 199 serotipos diferentes entre los que se encontraron: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. Derby*, *S. anatum* entre otros.

- En un estudio realizado en la ciudad de Ohio, EEUU, en el periodo de 1999 al 2003, y en donde se analizaron un total de 7 018 cepas de *Salmonella*, se detectaron un total de 155 serotipos distintos, entre los que destacan; *S. agona*, *S. anatum*, *S. derby*, *S. Dublín*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. ohio*, *S typhimurium*.

- Heredia y cols en el 2004 identificaron en niños con y sin diarrea 170 cepas de *Salmonella* spp. En este trabajo encontraron cerca de 30 serotipos de *Salmonella* spp diferentes, entre los que destacaron: *S. agona*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. anatum*, *S. poona*, *S. enteritidis*, *S. ohio*, *S. cerro*, entre otras.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detección de *Salmonella* spp por PCR multiplex en muestras aisladas de diarrea de pacientes con gastroenteritis.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Implementar en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI la técnica de PCR multiplex como un sistema de detección e identificación de *Salmonella* spp en muestras de pacientes con diarrea.
2. Identificar por PCR multiplex los principales serotipos de *Salmonella* que expresan el flagelo en Fase I.
3. Detectar los principales serotipos de *Salmonella* que expresan el flagelo en Fase II por PCR multiplex.
4. Detectar los principales parásitos que ocasionan gastroenteritis.

## **METODOLOGÍA**

### Obtención de las muestras

Las muestras diarreicas de los pacientes con gastroenteritis se colectaron a partir de Clínicas del ISSTE y el Hospital Valle Ceylan del sector salud. Las muestras fueron transportadas en hielo al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM.

### Siembra de las muestras de Materia Fecal

Una vez en el laboratorio, las muestras fueron inspeccionadas visualmente, con la finalidad de detectar sangre oculta, aspecto, color, etc. Posteriormente por medio de asas estériles calibradas (1/100) se tomó una muestra de la materia fecal y se sembró por estría cruzada en el medio de agar MacConkey, la muestra se incubó a 37° C por 24 horas.

### Extracción del DNA bacteriano

Obtenido el crecimiento visible de las colonias en el agar MacConkey, y por medio de un asa estéril se tomó una muestra bacteriana y se depositó en un tubo de rosca de 16 x 150 que contenía 2 ml de agua desionizada estéril. La muestra fue mezclada en un vortex por 20 segundos y hervida a baño maría por 20 minutos. Al terminó la muestra se depositó en contenedores con hielo por 10 minutos y se centrifugó en tubos eppendorff a 12,000 rpm por 10 minutos. Finalmente se separó el sobrenadante (contenía el DNA templado) y se guardó a – 20° C para su posterior utilización.

PCR Múltiplex para identificar los diferentes serotipos de *Salmonella* spp que expresan los antígenos flagelares en Fase I y Fase II.

Para la detección de los diferentes serotipos de *Salmonella* spp que expresan el antígeno flagelar en Fase I y el antígeno en Fase II se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (tabla 5).

| Oligonucleótidos    | Secuencia 5' a 3'           | Concentración |
|---------------------|-----------------------------|---------------|
| 1. Antisense-i      | ATAGCCATCTTTACCAGTTCC       | 5 pmol        |
| 2. Antisense-iv     | CCTGTCACCTTTCTGTGTTAT       | 5 pmol        |
| 3. Forward G        | GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG     | 5 pmol        |
| 4. Reverse-G        | AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG     | 5 pmol        |
| 5. Antisense-z10    | CGTCGCAGCTTCTGCAACC         | 5 pmol        |
| 6. Reverse-sdf-1    | CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC    | 5 pmol        |
| 7. forward-sdf1     | TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG     | 5 pmol        |
| 8. Antisense-r      | AAGTGACTTTTCCATCGGCTG       | 5 pmol        |
| 9. Sense 60         | GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG    | 5 pmol        |
| 10. Antisense-eh    | AACGAAAGCGTAGCAGACAAG       | 7 pmol        |
| 11. Antisense-b     | CGCACCAGTCTAAACCTAAGGCGG    | 7 pmol        |
| 12. Forward-d       | CCCGAAAGAACTGCTGTAACCG      | 7 pmol        |
| 13. Reverse-d       | TGGATATCAGTATTGCTCTGGGC     | 7 pmol        |
| 14. Sense-f1mod     | CTTATGCCGATAATGGTACTACTACTG | 5 pmol        |
| 15. Antisense R5mod | GGTTACAGAAGCCGTACCAG        | 5 pmol        |
| 16. Antisense-R6    | CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA   | 5 pmol        |
| 17. Antisense-R7    | TAATCGCCATTTTTGTCGAG        | 5 pmol        |
| 18. Antisense-R1mod | TTTGACCAATGTAAGCGCCAT       | 5 pmol        |
| 19. Sense-fw        | GTGGGGCAACAACCTCAATACTG     | 5 pmol        |
| 20. Antisense-RW    | CCTGCCACTTTTCGTGGTTGC       | 5 pmol        |
| 21. Sense-fe        | GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC  | 5 pmol        |
| 22. Antisense-Rx    | CCATCCTTAAAGGATACGGC        | 5 pmol        |
| 23. Antisense-Rz15  | ATCAACGGTAACTTCATATTTG      | 5 pmol        |

Tabla 5. Secuencia y concentraciones de las soluciones stocks de los oligonucleótidos utilizados para detectar los Serotipos de *Salmonella* spp que expresan el flagelo en Fase I y Fase II

### Preparación de la mezcla reactiva (Fase I)

El volumen final para cada mezcla de reacción para detectar los Serotipos de *Salmonella* spp que expresan el flagelo en Fase I fue de 22  $\mu$ l, para lo cual se tomó 1  $\mu$ l (a una concentración final de 5 pmol) de cada uno de los 8 primeros oligonucleótidos (1-9, tabla 5) y 1.4  $\mu$ l (7 pmol) de los 4 oligonucleótidos restantes (10-13, tabla 5) y se depositaron en un tubo eppendorff nuevo y estéril. Al término se adicionaron 6.9  $\mu$ l de agua desionizada estéril y 1.5  $\mu$ l de Buffer.

### Amplificación de DNA por PCR para Fase I

Para realizar la amplificación del DNA, se tomaron 22  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se adicionaron a cada uno de los tubos que contenía 1.5 mMolar de  $MgCl_2$ , 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mMolar de los dNTPs (marca comercial puretaq). Finalmente se adicionarán 3  $\mu$ l de DNA templado (obtenido de las cepas de las de las muestras diarreicas de los pacientes).

La amplificación del DNA se realizó en un Termociclador modelo CGI-96, bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 40 segundos a 95° C, posteriormente 20 segundos a 58° C y 20 segundos a 72° C. Finalmente la extensión se prolongó a 72° C por 7 minutos.

### Preparación de la mezcla reactiva (Fase II)

El volumen final para cada mezcla de reacción fue de 20  $\mu$ l, para lo cual se tomó 1  $\mu$ l (5 pmol) de cada uno los 10 oligonucleótidos (14-23, tabla 5), 10  $\mu$ l de agua desionizada estéril y se depositaron en un tubo eppendorff nuevo y estéril.

### Amplificación de DNA por PCR para Fase II

Al término se tomaron 20 µl de la mezcla reactiva y se adicionarán a tubos de la marca puretaq que contenían 1.5 mMolar de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U de Ampli Taq polimerasa y 100 mMolar de dNTP. Finalmente se adicionaron 5 µl de DNA templado. La amplificación de DNA se realizó bajo las mismas condiciones que para la Fase I.

### Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa

Después de la amplificación, los productos de PCR obtenidos para la Fase I y II fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2.5 % (TBE 1X), bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miniampers en un tiempo de 60-120 minutos. Los tamaños de los fragmentos fueron determinados por la comparación de un marcador escalera de 50 pb. Al término de la electroforesis los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (BrEt) (50 µl en 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada) por 5 minutos y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta

### Detección de Parásitos

La detección de los parásitos se realizó por medio de la técnica de Faust (técnica de Flotación en sulfato de zinc). Para lo cual la muestra fecal fue homogeneizada con agua potable. Posteriormente se tomó una muestra de 10 ml y se depositó en un tubo de ensaye. El tubo se centrifugó por 3 minutos a 3000 rpm, se decantó el

sobrenadante y se centrifugó de nueva cuenta por 3 minutos a 3000 rpm. Al término el sobrenadante fue desechado, se agregó la solución de sulfato de zin (densidad= 1.190) hasta formar un menisco y se colocó sobre la superficie un cubreobjetos. Al término de 10 minutos se colocó el cubreobjetos sobre un portaobjetos que contenía una gota de lugol. Los parásitos se observaron a 40X en un microscopio óptico.

## Resultados

### *Pacientes analizados*

Se colectaron y analizaron 134 muestras diarreicas de pacientes con gastroenteritis crónica que acudieron a Clínicas y Hospitales del sector salud del Distrito Federal y del Edo. de México. La edad de los pacientes se encontró comprendida entre 1 y 60 años (Figura 1). El 59 % (79) de los pacientes correspondió al sexo femenino y el 41 % (55) masculino (Figura 2).

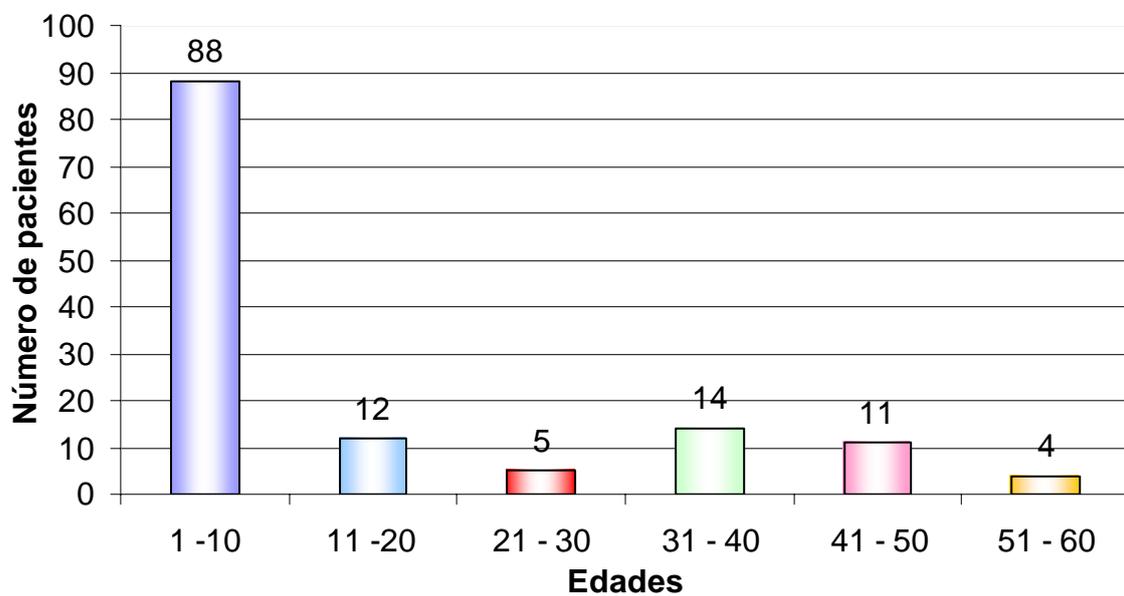


Figura 1. Distribución de los pacientes de acuerdo a la edad

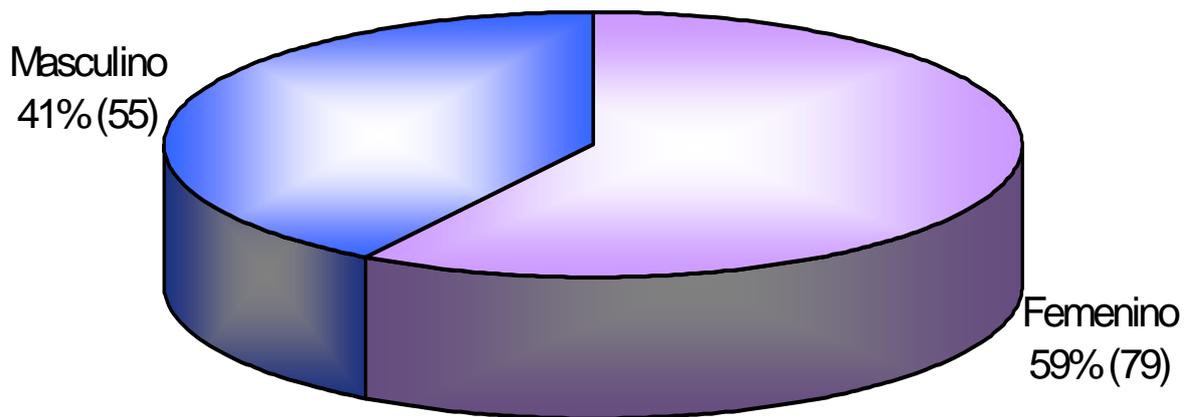


Figura 2. Distribución de los pacientes analizados de acuerdo al sexo.

### **Casos positivos**

En este trabajo se encontró que el 72 % (96) de las muestras analizadas fue positivo para algún serotipo de *Salmonella*, mientras que el 28 % (38) fue negativo (Figura 3).

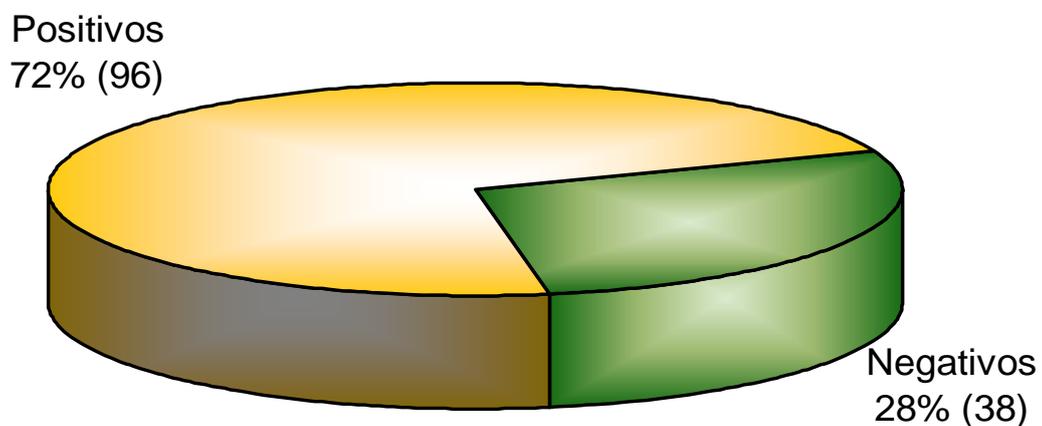


Figura 3. Porcentaje de casos positivos y negativos para algún serotipo de *Salmonella*.

### **Identificación de los distintos serotipos de *Salmonella* spp.**

A partir de las 134 muestras diarreicas de los pacientes con gastroenteritis, se detectaron cuatro serotipos de *Salmonella* spp mediante PCR multiplex (Figura 4). Entre los serotipos detectados se encontraron los siguientes: *S. ohio* 53 % (51), *S. typhimurium* 41% (39), *S. infantis* 14% (14), y *S. anatum* 1% (1), cabe mencionar que en algunos pacientes se detectó uno ó mas serotipos (Figura 5).

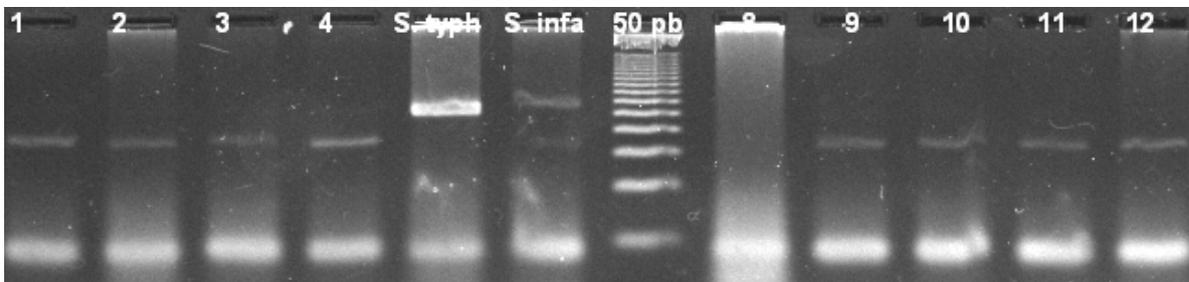


Figura 4. PCR multiplex. Carril 1-4 muestras de pacientes con *Salmonella ohio*; carril 5; *S. typhimurium*; Carril 6; *S. infantis*; Carril 7; marcador escalera de 50 pb Carril 8; control negativo; Carril 9-11 muestras de pacientes con *Salmonella ohio*.

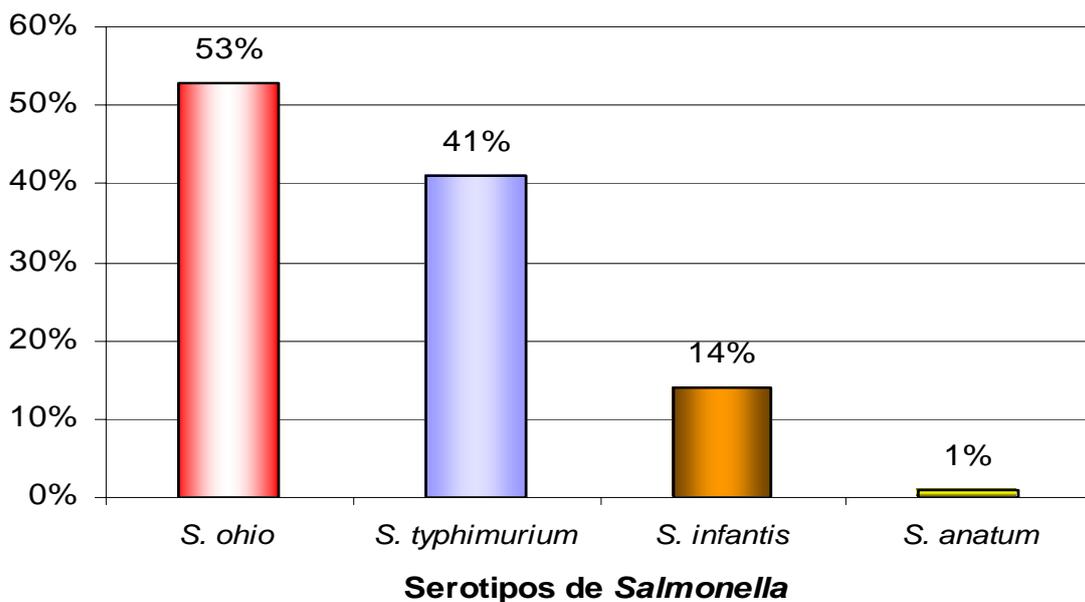


Figura 5. Serotipos de *Salmonella* identificados

**Prevalencia de los serotipos de *Salmonella* spp detectados con relación a la edad de los pacientes.**

*Salmonella ohio*

En la figura 6 podemos apreciar que *S. ohio* se detectó en el 61% (31) de los pacientes infantiles menores a los diez años, seguido por el rango de 11-20 años con un 14% (7), 31-40 años con 10% (5), 21-30 y 51-60 con 6% (3), en cada caso, y finalmente el de 51-60 años con 4 % (2).

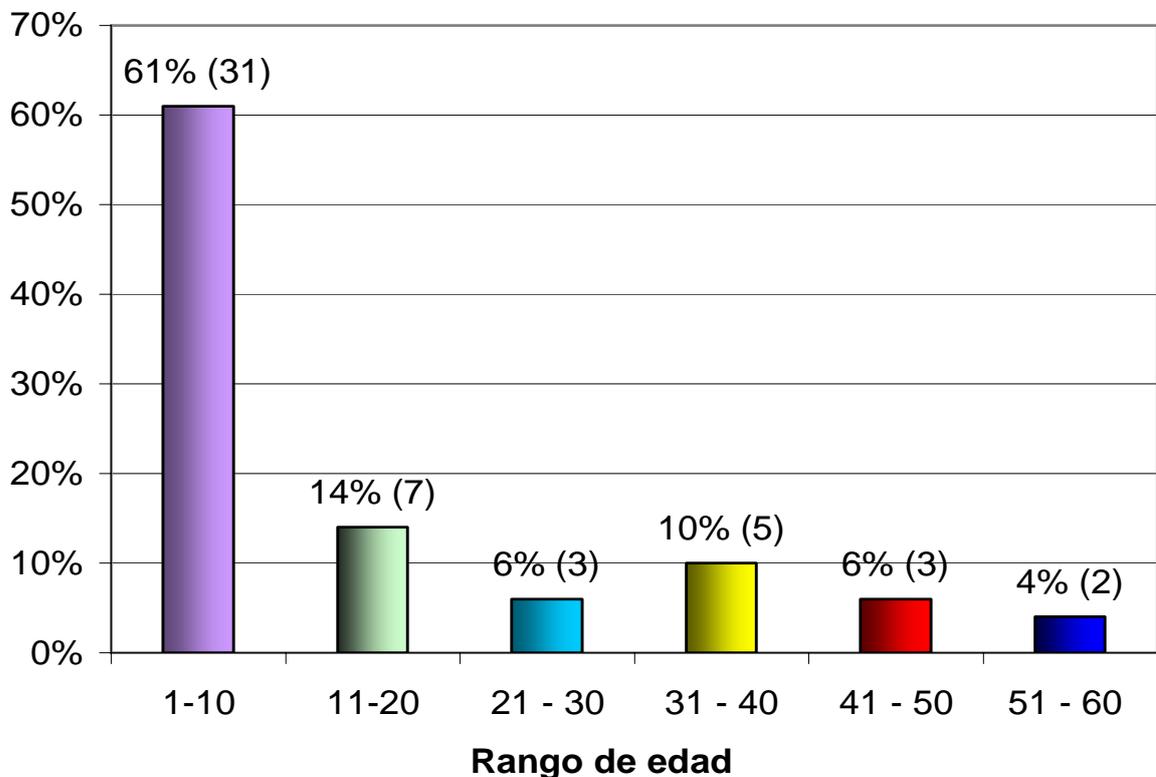


Figura 6. Frecuencia de *S. ohio* de acuerdo a la edad de los pacientes

### *Salmonella typhimurium*

En la figura 7 se observa que *S. typhimurium* se detectó en el 88 % (34) de los infantes menores a los diez años, seguido por el rango de 11-20 y 31-40 años con 5% (2), en cada caso, y finalmente el de 41-50 con 2% (1).

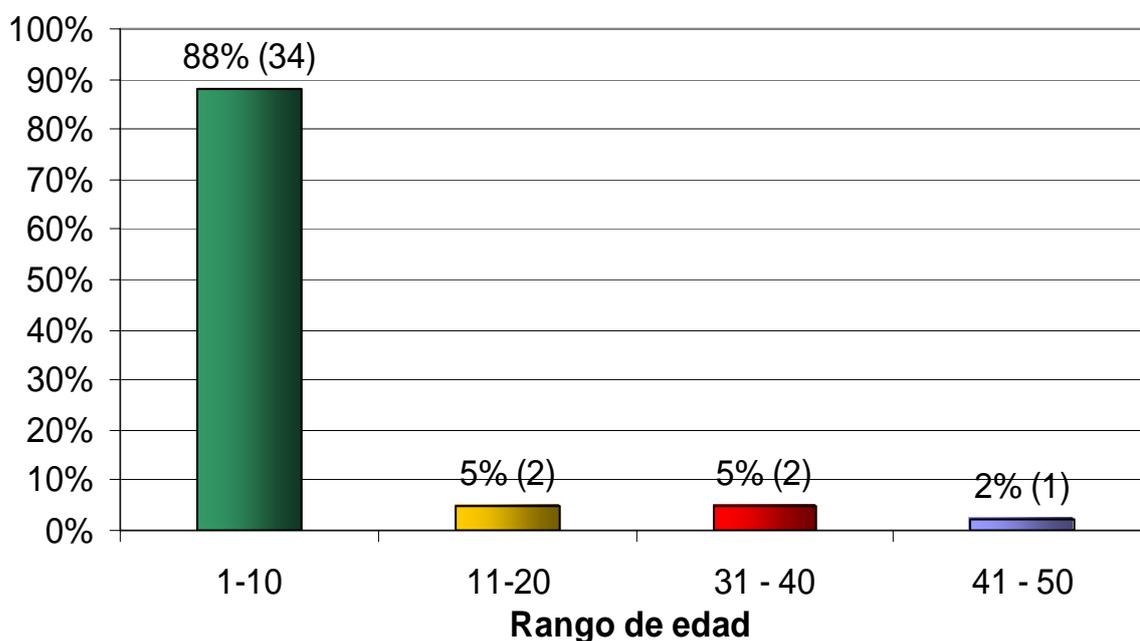


Figura 7. Distribución de *S. typhimurium* de acuerdo a la edad de los pacientes

### *Salmonella infantis*

En la figura 8 se aprecia que el serotipo *S. infantis* se detectó en el 100 % (14) de los infantes menores a los diez años de edad.

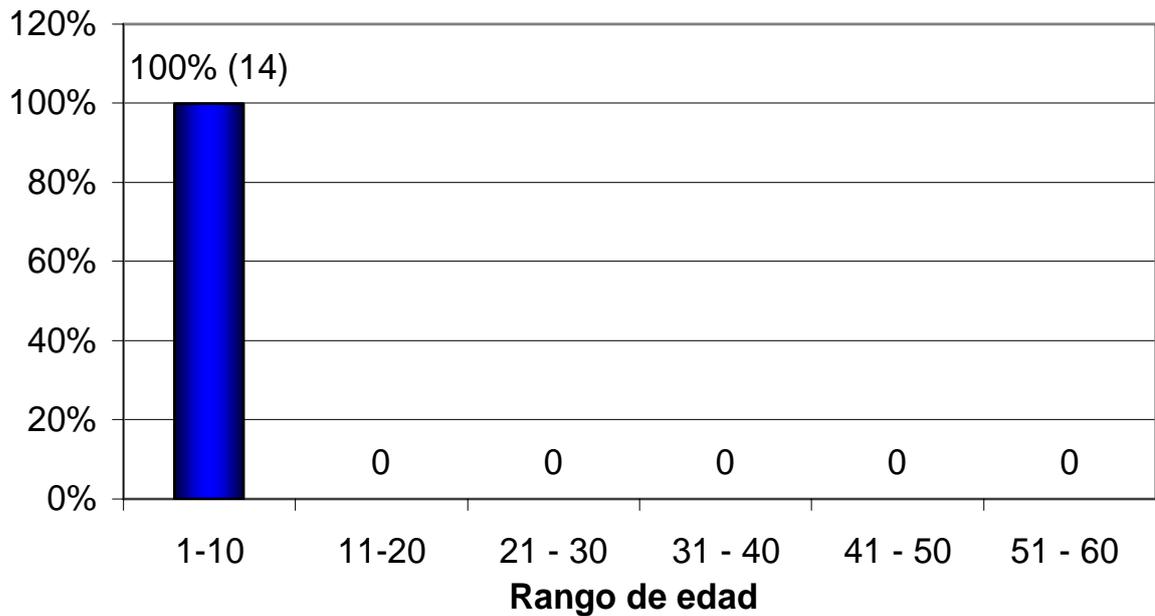


Figura 8. Distribución de *S. infantis* de acuerdo a la edad de los pacientes

### *Salmonella anatum*

En la figura 9 se aprecia que *S. anatum* se detectó solamente en los pacientes cuyo rango de edad se encontró entre 21-30 años 100 %.

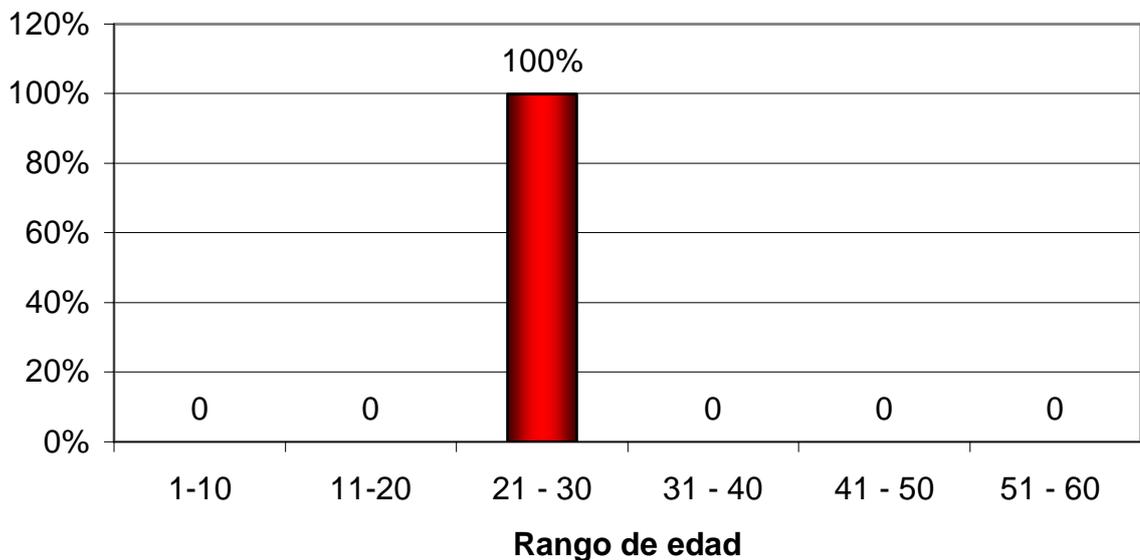


Figura 9. Distribución de *S. anatum* de acuerdo a la edad de los pacientes

## Detección de *Salmonella* spp que expresan el antígeno flagelar Fase I y Fase II.

El 80% (41) de muestras positivas para *S. ohio* expresó solo el flagelo en fase I, el 6% (3) expresó el flagelo en fase II, mientras que el 14% (14) expresó ambos flagelos (Figura 10).

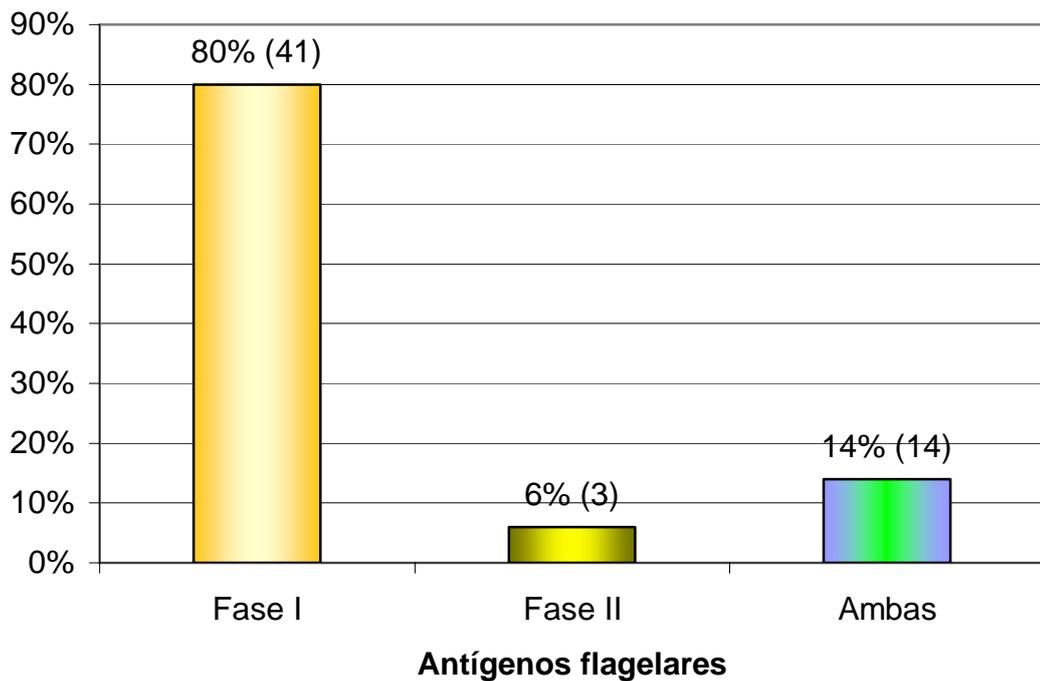


Figura 10. Porcentaje de la expresión de los antígenos flagelares en *S. ohio*

En el caso de *S. typhimurium* encontramos que el 10%(4) de los casos positivos expresó el flagelo en fase I, el 64%(25) en fase II y el 26%(10) restante expresó ambas fases (Figura 11).

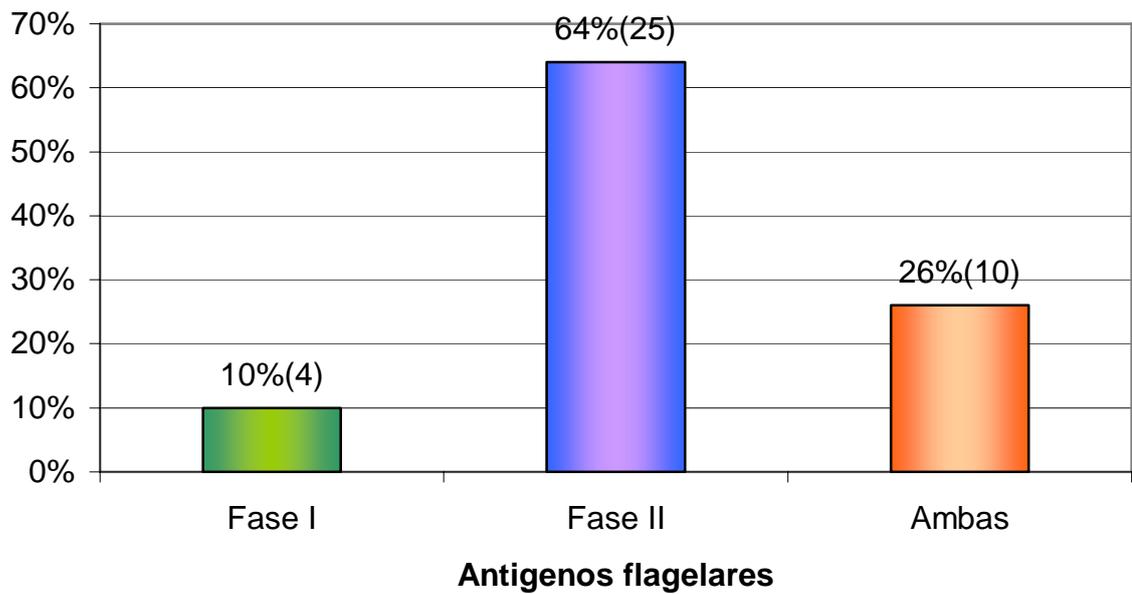


Figura 11. Porcentaje de expresión de las fases Flagelares de *S. typhimurium*

Para el caso de *S. infantis* el 22% (3) solo expresó el flagelo en fase I, el 7% (1) expresó el flagelo en fase II, mientras que el 71% (10) expreso ambas fases (Figura 12).

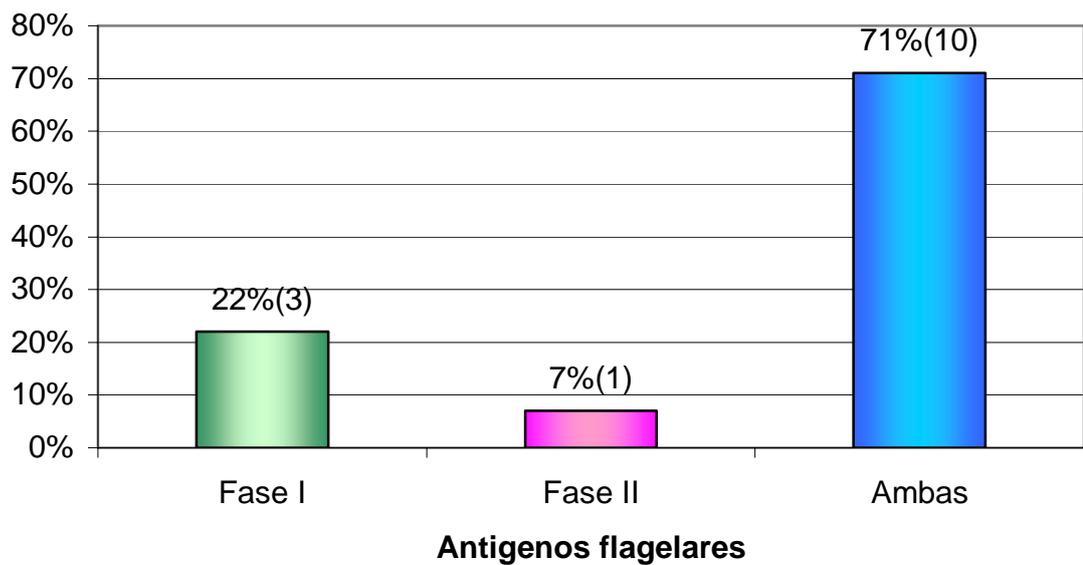


Figura 12. Porcentaje de expresión de las fases flagelares de *S. infantis*.

En la figura 13 se observa a *S. anatum* que expresó ambos antígenos flagelares en un 100%(1) (Figura 13).

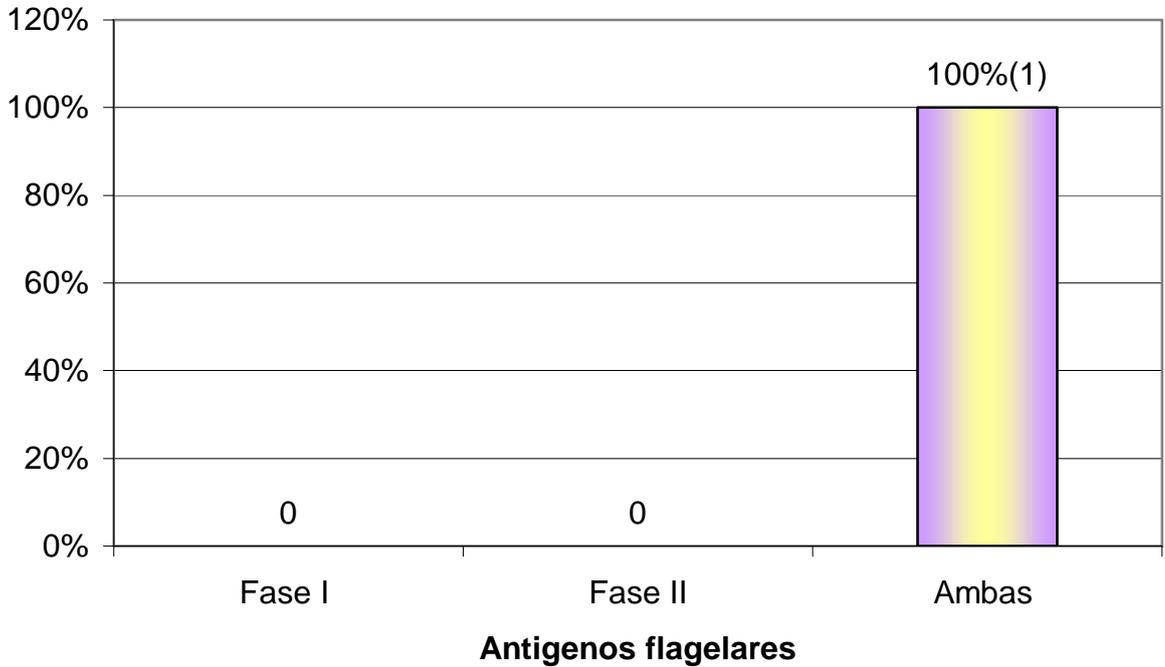


Figura 13. Porcentaje de expresión de las fases Flagelares de *S. anatum*

### Identificación de parásitos

A partir de las 134 muestras diarreicas analizadas, encontramos que en el 87% (117) se identificó algún parásito (Figura 14). Dentro de los parásitos detectados, la amiba *Entamoeba histolytica* se identificó en el 95 % (111) de los pacientes, seguida por *Giardia lamblia* con el 44 % (52), y por la amiba *Iodamoeba butschlii* con un 7%, cabe mencionar que algunos pacientes presentaron uno ó mas parásitos. (Figura 15).

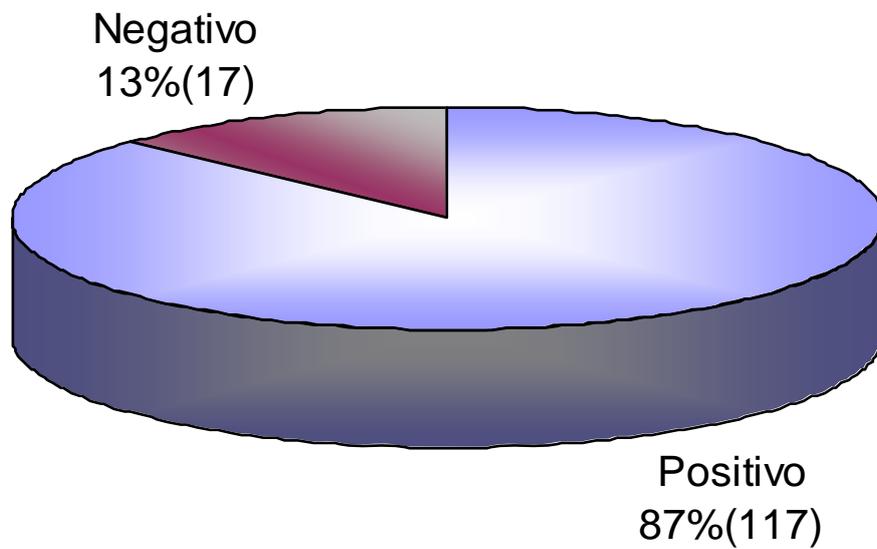


Figura 14. Porcentaje de casos positivos a algún parásito

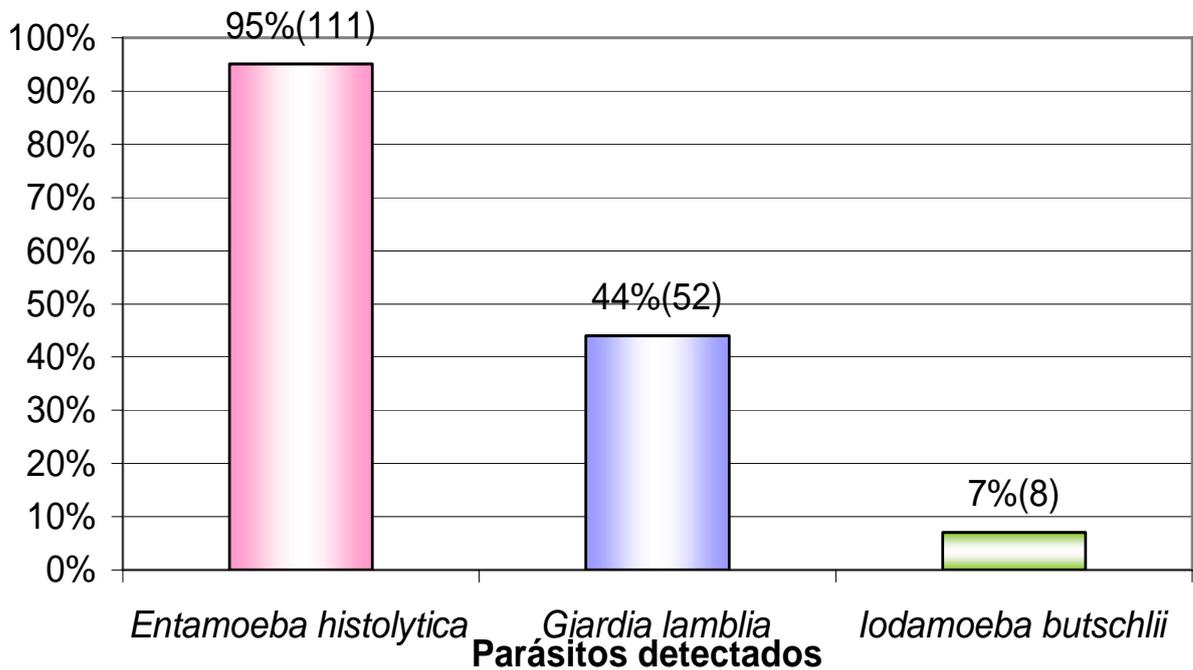


Figura 15. Porcentaje de parásitos detectados

El 63%(70) de los pacientes que presentó *Entamoeba histolytica* se encontró entre 1-10 años de edad, seguido por el grupo de 31-50 años con un 11% (12), el grupo de 11-20 presentó el 9% (10),

posteriormente tenemos a los pacientes que van de los 21-30 años con el 4%(4) y finalmente el grupo de 51-60 con un 3% (3). (Figura 16).

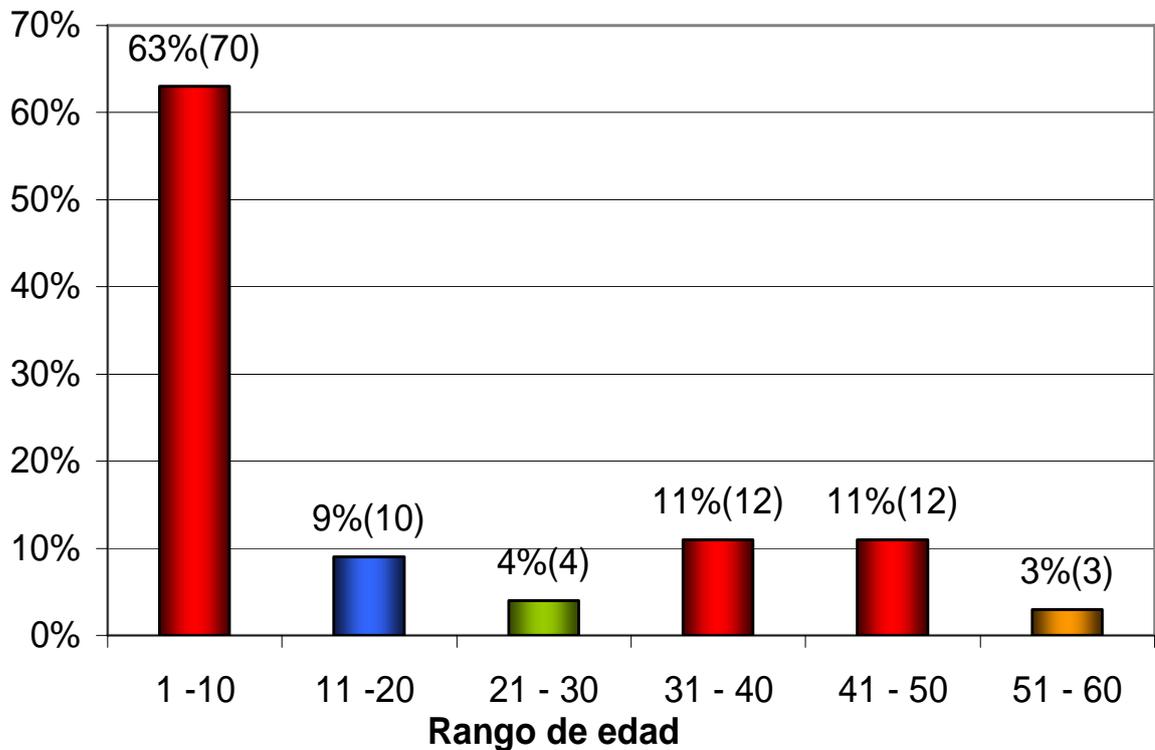


Figura 16. Distribución de *Entamoeba histolytica* de acuerdo a la edad de los pacientes

Para el caso de *Giardia lamblia* se observó que el 56% (29) de los pacientes perteneció al grupo de 1-10 años, el 15%(8) de 41-50 años y el 11%(6) en el intervalo de 31-40 años (Figura 17).

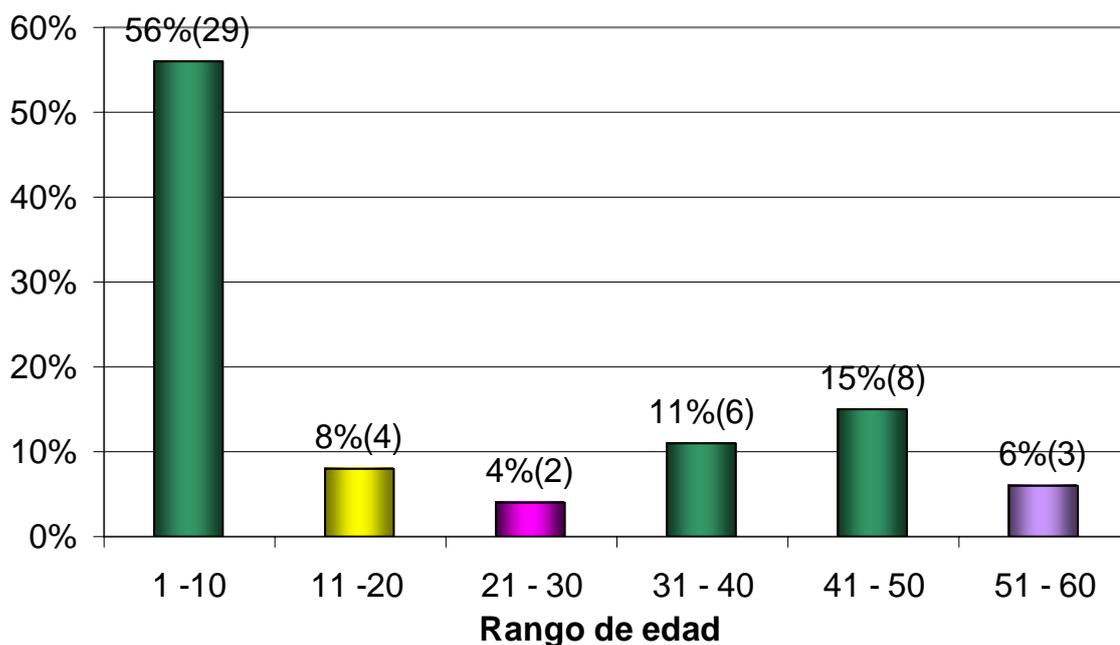


Figura 17. Distribución de *Giardia lamblia* de acuerdo a la edad de los pacientes

En el 62.5 %(5) de los pacientes analizados se identificó a *Iodamoeba butschlii* en el grupo de de 1-10 años, seguidos por los otros grupos con un 12.5%(3) (Figura 18).

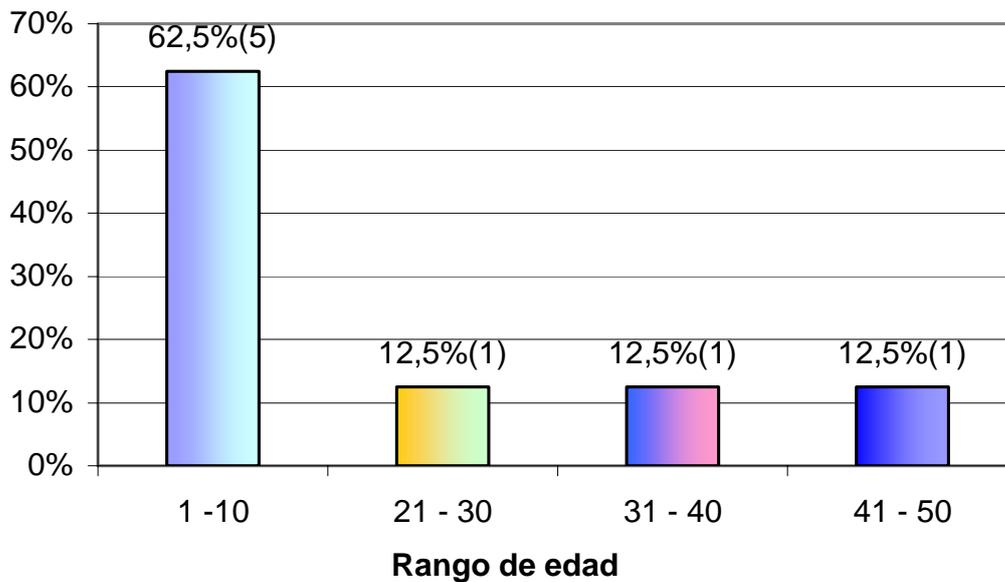


Figura 18. Distribución de *Iodamoeba butschlii* de acuerdo a la edad de los pacientes

### **Asociación entre los serotipos de *Salmonella* detectados con los parásitos identificados**

En este estudio se encontró una asociación de los diferentes serotipos de *Salmonella* con parásitos, en donde se pudo observar que la asociación *S. typhimurium/Entamoeba histolytica* se encontró en el 85% de las muestras, *S. typhimurium/ Giardia lamblia* se observó en el 28 % de las muestras y *S. typhimurium /Iodamoeba butschlii*. Con el 5%. Para el caso se *S. ohio/ Entamoeba histolytica* la asociación fue de 86%, *S. ohio/Giardia lamblia* con, 43% y *S. ohio/ Iodamoeba butschlii* con 4%. *S. infantii/ Entamoeba histolytica* tuvo una asociación del 78%, *S. infantii/ Giardia lamblia* con 43% con y *S. infantii /Iodamoeba butschlii* con el 14% finalmente *S.anatum*

presentó una asociación del 100% con *Entamoeba histolytica*. (Figura 19).

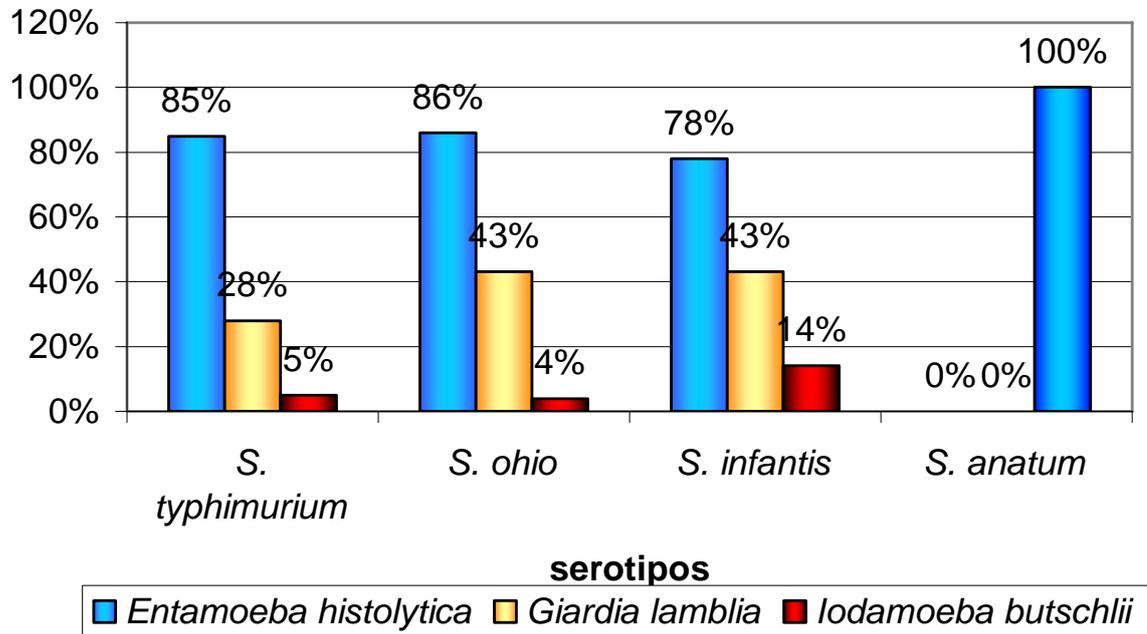


Figura 19. Asociación de los diferentes serotipos de *Salmonella* con los diferentes parásitos

## **Discusión**

### **Pacientes analizados**

En este estudio se analizaron un total de 134 muestras diarreicas de pacientes con gastroenteritis, con una edad que osciló de 1 hasta 60 años (figura 1), dentro de los cuales el 59 % (79) correspondió al sexo Femenino y el 41% al Masculino (55) (Figura 2). Se ha reportado que las enfermedades gastrointestinales representan en la actualidad un problema de salud mundial, que tiene importantes repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político siendo las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo (Rabsch y cols, 2001). Esta enfermedad causa anualmente de 6 a 81 millones de enfermos y hasta 9 000 muertos a nivel mundial (Coria, 2001). La gastroenteritis en los países en vía de desarrollo se asocian en la mayoría de los casos con patógenos bacterianos, en donde frecuentemente se deben a una higiene deficiente, ya sea en la preparación o manipulación de los alimentos, por lo que en un determinado momento los alimentos actúan como vehículos de transmisión de enfermedades (Suárez y cols, 1991).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son causadas por el consumo de alimentos o de agua contaminada con microorganismos patógenos (bacterias, parásitos y virus), estas enfermedades a nivel mundial representan una de las causas más preocupantes en salud pública, debido a que anualmente ocurren de 24 a 81 millones de casos, representando más de diez mil muertes por consumo de alimentos contaminados (Suárez y cols, 1991).

En México la contaminación de los alimentos constituye un problema de salud pública que afecta significativamente a sus habitantes, la cual se ve reflejada en las elevadas cifras reportadas en los casos de gastroenteritis y otras enfermedades diarreicas en el país (Secretaría de Salubridad, 2001).

En México la mayoría de los cuadros diarreicos son de naturaleza infecciosa, la tasa promedio de mortalidad asociada a enfermedad diarreica aguda en países en vías de desarrollo es muy elevada. En México en el 2003 ocurrieron 4 556 casos por infecciones gastrointestinales (Salud Pública México, 2005).

La gastroenteritis es la forma más común de la enfermedad que se presenta después de un brote por infección alimentaria, el género *Salmonella* spp ocasiona infecciones gastrointestinales e intoxicaciones debido a su elevada patogenicidad. Trebejo y cols en el 2003 realizaron un estudio de morbimortalidad en los Estados Unidos entre 1990 y 1999 e informaron un total de 11,112 hospitalizaciones, 56,660 casos y 74 muertes atribuidas a *Salmonella* spp; de estos pacientes 61% presentaron gastroenteritis y 23% septicemia. Los mismos autores estimaron los costos de hospitalización por salmonelosis no tífica en estos diez años en \$200 millones de dólares.

## **Identificación de *Salmonella* spp**

De las 134 muestras diarreicas analizadas, se encontró que el 72% (96) resultó positivo a algún serotipo de *Salmonella* (Figura 3). Se ha reportado que *Salmonella* spp. a nivel mundial se encuentra con frecuencia asociada a las enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos (Mead, 1999). En EEUU, se declaran anualmente alrededor de 40,000 casos de salmonelosis, y anualmente se producen 1.4 millones de casos (Rabsch y cols, 2001). En España de acuerdo con los datos suministrados por el Sistema de Información Microbiológica se han declarado 6,919 casos de salmonelosis al año (B E S, 2000).

En Nuestro estudio describimos que se detectaron mediante PCR multiplex cuatro serotipos diferentes de *Salmonella*: *S. ohio* 53% (51), *S. typhimurium* 41% (41), *S. infantis* 14% (14), y *S. anatum* 1% (1). (Figura 4 y 5). Los serotipos detectados por nosotros coinciden con los reportados por Valdez y col. 2004, en un estudio realizado en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Autónoma de Yucatán, donde se estudiaron 170 cepas de *Salmonella* spp aisladas de niños con y sin diarrea, ellos encontraron cerca de 30 serotipos diferentes, entre los que destacan: *S. agona*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. anatum*, *S. poona*, *S. enteritidis*, *S. ohio*, *S. cerro*, etc.

Nuestros serotipos detectados también coinciden con los encontrados por Gutiérrez y cols, en el 2000 en un estudio realizado en el Laboratorio de Bacteriología Entérica del INDRE, donde se

analizaron 24 394 cepas de *Salmonella* aisladas en México, durante el periodo de 1972 a 1999, ellos identificaron en los servicios de salud en México 199 serotipos diferentes entre los que se encontraron: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. Derby*, *S. anatum* entre otros.

En EEUU en el año 1999 al 2003 se reportaron un total de 155 serotipos entre los que destacan *S. agona*, *anatum*, *derby*, *dublin* *enteritidis*, *infantis*, *ohio*, *typhimurium* en un estudio realizado en la ciudad de Ohio, donde se analizaron un total de 7 018 cepas de *Salmonella*.

En este trabajo se detectó que el 61 % de los casos que presentaron *S. ohio* correspondió a los pacientes que se encuentran en el rango de edad que va de 1 a 10 años (Figura 6), el 88 % que corresponde a *S. typhimurium* (Figura 7) y el 100 % correspondiente a *S. infantis* (Figura 8) se presentó en el mismo rango de edad. Para el caso de *S. anatum* el 100 % se presento en pacientes que van de 21 a 30 años de edad (Figura 9).

Las enfermedades gastrointestinales por *Salmonella* están entre las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo, donde los niños pueden padecer hasta ocho o más episodios de diarrea. La diarrea infantil se asocia con patógenos bacterianos debido al inadecuado lavado de manos, malas condiciones de conservación de los alimentos que favorecen la transmisión de una persona a otra por vía fecal – oral y determinan que la enfermedad se presente, se estima que en todo el mundo

mueren anualmente cerca de 11 millones de niños; 17% de estas muertes se deben a enfermedades por diarrea (OMS, 1999).

En nuestro país los niños pueden estar involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos propiamente dichas como sucede en los países desarrollados. Pero, el mayor problema en la edad pediátrica es que están expuestos en forma permanente a los agentes enteropatógenos potenciales por el elevado nivel de contaminación del agua y alimentos que ingieren. Otras situaciones en que los niños pueden adquirir la enfermedad diarreica es durante la internación hospitalaria o pueden participar en brotes que ocurren en guarderías o instituciones a las que concurren o en las que viven (OMS, 1999).

### **Detección de los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar Fase I**

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* expresan alternativamente los antígenos flagelares Fase I o Fase II codificados por los genes *FljC* y *FljB*, respectivamente. En nuestro estudio nosotros detectamos que el 72% (96) de las muestras fue positivo para algún serotipo de *Salmonella* (figura 3), dentro de los cuales el 80%(41) de las cepas de *S. ohio* expresó el antígeno flagelar en Fase I (figura 10), el 10%(4) se expresó en *S. thyphimurium* (figura 11), el 22%(3) en *S. infantis* (figura 12) y 100%(1) el serotipo *S. anatum* (figura 13). La detección de estos serotipos que expresan el flagelo I por medio de PCR multiplex corrobora lo reportado en un amplio estudio realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de salud Carlos III, en

Majadahonda Madrid, España por Herrera-León y cols (2004). En este estudio se analizaron un total de 161 cepas de *Salmonella* spp donadas por el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* en España, y detectaron un total de 72 diferentes serotipos, cuyos amplicones se encontraron entre 100 a 500 bp.

### **Detección de los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar Fase II**

En nuestro estudio reportamos que el 6%(3) del serotipo *Salmonella ohio* expresó el antígeno Flagelar Fase II (figura 10), el 64%(25) lo expresó *S. thyphimurium* (figura 11), el 7%(1) *S. infantis* (figura 12) y el 100%(1) *S. anatum* (figura 13). La detección de estos serotipos que expresan el flagelo II por medio de PCR multiplex corrobora lo reportado en un amplio estudio realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de salud Carlos III, en Majadahonda Madrid, España por Echeita y cols (2002). Estos autores seleccionaron un total de 190 cepas de *Salmonella* spp donadas por del Laboratorio Nacional de Referencia de España, y detectaron un total de 49 serotipos distintos, cuyos amplicones se encontraron entre 50 a 400 pb.

## **Identificación de parásitos**

De las 134 muestras diarreicas analizadas, se encontró que en el 87% (117) de las muestras se detectó algún parásito (Figura 14) siendo *Entamoeba histolytica* el parásito más común al identificarse en el 95% (111) de los pacientes, seguida por *Giardia lamblia* con el 44 % (52), posteriormente se detectó a la amiba *Iodamoeba butschlii* con un 7% (8) (Figura 15).

Para *Entamoeba histolytica* de los 111 casos positivos, el 63% (70) de ellos se presentaron en pacientes que se encuentran en una edad que va de 1 a 10 años (Figura 16). De los 52 casos positivos a *Giardia lamblia* el 56 % (29) se presentaron en pacientes que se encuentran en el mismo rango de edad (Figura 17). *Iodamoeba butschlii* presentó un 62.5 % (5) de pacientes pertenecientes al grupo que va de 1 a 10 años de edad (Figura 18).

Los rangos de edad coinciden con otros reportes como es el de Sánchez y Cols en el 2000 en donde encontraron: Giardiasis (29.98%), entamebiasis por *Entamoeba coli* (14.71%) y por *Entamoeba histolytica* (7.29%), en un estudio realizado en el Laboratorio de Parasitología en la Facultad de Medicina, UNAM donde se analizaron un total de 818 pacientes en edades que van de 0 a 14 años de edad.

La parasitosis intestinal es una enfermedad con alta prevalencia en los países en desarrollo. Su ocurrencia está asociada principalmente a factores socioeconómicos. Al menos siete parasitosis predominan en el continente Americano: ascariasis,

tricocefalosis, uncinariasis, oxiuriasis, estrogiloidosis, amibiasis y giardiasis. Cada una de ellas predomina en ciertas regiones geográficas de un país. En la República Mexicana, las parasitosis intestinales son una de las principales causas de morbilidad. Se calcula que las infecciones intestinales, en donde se incluyen las enteroparasitosis, producen la pérdida de aproximadamente de 1.6 millones de vidas. (Sánchez y Cols, 2000).

Para 1997 se registraron 2, 433,378 casos acumulados de helmintiasis, amibiasis y protozoosis. Estudios realizados en comunidades rurales informan una prevalencia de 68.0%, 70.8% y 93%.4-6 (Epidemiología, 1998).

La Dirección General de epidemiología (1994) reportó un total de 445 189 casos de amibiasis ocurridos en la república mexicana en el año de 1993, y 334 029 casos para 1994, distribuidos en los distintos estados como son: Chiapas, Distrito Federal. Edo. de México, Tabasco, Oaxaca, entre otros

A nivel mundial, la amibiasis está catalogada como la tercera parasitosis causante de muerte. (Instituto Nacional de Salud Pública 1992). Alrededor del 10 a 20 por ciento de la población mundial se considera infectada y el 10 por ciento de esta población sufre de enfermedad, con una letalidad que oscila entre el 0.1 y 0.25 por ciento, en números: 500 millones de infectados, 50 millones de enfermos y entre 40 y 110 mil muertes. (Instituto Nacional de Salud Pública, 1992)

La elevada prevalencia e incidencia en México de la amibiasis intestinal por *Entamoeba histolytica* la convirtió en el último siglo en uno de los principales problemas de salud pública. La infección se extiende en forma endémica en todo el país, relacionada a deficiencias sanitarias (falta de drenaje, agua potable y disposición de heces) y malos hábitos higiénicos (lavado de manos y fecalismo) (Treviño, 1994).

Se ha estimado que existen más de 500 millones de personas infectadas en todo el mundo. El hecho de que este parásito sea el más común en la población con una edad que va de 1 a 10 años se debe posiblemente a que no siempre se consume agua potable, a la inadecuada eliminación de excretas y basura. Es importante recordar que los niños además del tiempo que pasan en su hogar, asisten a la escuela en donde se encuentran con otro tipo de fuentes de infección, tales como los baños que generalmente se encuentran sucios, alimentos preparados con poca higiene que se venden dentro y fuera de la escuela y que posiblemente son el medio de transmisión de los parásitos intestinales.

Otro de los parásitos identificados en este trabajo fue *Giardia lamblia*. Este organismo es cosmopolita y común especialmente en los niños. El hombre se infecta por la ingesta de agua o alimentos contaminados con heces fecales que contengan quistes del parásito o contaminación fecal directa. Como puede ocurrir en guarderías infantiles y escuelas (Sánchez y cols, 1991).

Se sabe que en México este parásito afecta al 20% de la población pediátrica esto coincide con nuestros resultados y con los de otros autores como son: Sánchez y cols en el 2000 en donde

encontraron: giardiasis (29.98%) y amibiasis por *Entamoeba histolytica* (7.29%), este mismo autor en 1991 reportó una frecuencia de 27.4 % de giardiasis en escolares de San Luis Potosí.

El estudio de las enfermedades parasitarias, toma por tanto especial interés por ser consideradas un grave problema de salud pública, dado que estos padecimientos, no sólo son frecuentes como infección y como enfermedad, sino que en ocasiones provocan la muerte o dejan complicaciones y secuelas; además el daño referente en el área social y económica no sólo del individuo que la padece, sino en lo familiar e institucional, así como en la productividad del desarrollo social (Sánchez, 1990).

## Conclusiones

1. En este estudio detectamos que en el 72% de las muestras analizadas se detectó algún serotipo de *Salmonella* spp, principalmente en niñas y mujeres.
2. *S. ohio*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, y *S. anatum* se constituyeron como los principales serotipos detectados en las muestras diarreicas de los pacientes con gastroenteritis.
3. La prevalencia de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Iodamoeba butschlii* fue elevada en los pacientes con gastroenteritis.
4. La asociación de *S. ohio*, *S. typhimurium* y *S. infantis* con *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Iodamoeba*, reflejó lo agudo de las infecciones intestinales en los pacientes analizados, por lo que fue necesario iniciar inmediatamente el tratamiento.
5. En este estudio demostramos que la detección de los distintos serotipos de *Salmonella* spp. por PCR multiplex podría ser un método eficaz en el diagnóstico clínico de las infecciones intestinales, sobre todo si consideramos la elevada sensibilidad y rapidez en la identificación del agente causal, por lo que se sugiere se implemente este nuevo método de identificación en la rutina de los Laboratorios Clínicos.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Ávila Morales Ma. Gabriela. Estudio coproparasitoscopico en seis poblaciones escolares ubicadas en el municipio de Tlanepantla Edo. de México y la Delegación Cuauhtemoc del Distrito Federal. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Tesis de Licenciatura. 1996.
- B.E.S 2000. Resultados de las principales identificaciones bacterianas al sistema de información Microbiológica. *B E S*; 8: 265-276.
- Congo. G. L, Vázquez. M. E, Pérez. A. P, González. A. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Sal. Pub Mex.* 2000; 42:490-495.
- Coria, J.; Villalpando, S.; Gómez, D.; Treviño, A. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Rev. Mex. Ped* 2001; 68 (5): 200-215.
- Echeita. M.A, Herrera. S, Garaizar. J, Usera. M.A. Multiplex PCR based detection and identification of the most common salmonella second-phase flagellar antigens. *Rev Microbiol.* 2002; 153:107113.
- Fernández C. J, Pinedo S. A, Carnero V. M. Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. *Medicina preventiva y Sal. Pub* 2001; 481-490.

- Fierer. J, Eckmann. L, Fang. F, Finby. B.B, Guiney. D. Expression of the *salmonella* virulence plasmid gene *spvB* in cultured macrophagos and non-phagocytic cell. *Infectec Immun* 1993; 61: 5231 5285.
- Freeman. B. A. 1985. Microbiología de Burrows. Vigésima segunda edición. Editorial Mc. Graw Hill
- Glynn MK, Bopp C, Dewitt W, Dabney P, Mokhtar M, Angulo FJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. *N Engl J Med* 1998;338:1333-1338.
- Gutiérrez L. Giono. C. S, Escobar-G. A, Valdespino. G. JL. Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México, D.F.: *INDRE-SSA*, 1994;219-234.
- Hansen. S. J, Jenabian. M.S. Molecular serotyping of salmonella; Identification of the Phase 1 H antigen based partial sequencing of the *flic C* gene. *AMPIS* 2005; 113:340-348.
- Herrera. S, Mc Quiston. R.J, Usera M.A, Fields I. P, Garaizar. J, Echeita. A. M. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *salmonella* spp. *J Clin Microb* 2004; 42:25812586.

- Kumate, J. 1988. *Morbilidad y mortalidad por diarreas en México*. En: *Enfermedades diarreicas en el niño*. Edit. Torregrosa Ferráez L, Olarte J, Rodríguez Suárez RS, Santos Preciado J. I, Velásquez Jones L., Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México «Federico Gómez», 9ª ed., México, D.F. pp.11-19.
- Kumate, J. e Isibasi, A. 1986. Pediatric diarrheal diseases: A global perspective. *Pediatr. Infect. Dis.*, 5: 21-27.
- Linder, E. Toxicología de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España. 1995; p53-65.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig L, Bresee J, Shapiro C, Griffin P, Tauxe R. Food-Related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5:607-25.
- Mendez. A. S, Pérez. R. E. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Emferm Infec Microbiol Clin* 2004; 22(3):183-192.
- Molina J, Ponce-de León S, Guerrero ML, Carvalho A, Romero C, Báez R *et al*. *Salmonella* gastroenteritis outbreak among workers from a tertiary care hospital in Mexico City. *Rev Invest Clin* 1997;49:349-353.

- Murray. R. P, Lawrence. W. Kobayash S.G, Thompson. H. J. 1992. Microbiología Médica. Edición Interamericana para Estudiantes.
- Navarrete S, Santos JI. Gastroenteritis. En: Navarrete S, Muñoz O, Santos Preciado JI, eds. Infecciones intrahospitalarias en pediatría. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana, 1998;137-142.
- Olarte, J. 1986. El problema de las diarreas infecciosas. *Bol. Epidemiol.*, 1: 61-65.
- Parilla CMC, Castellanos JLV, Castañeda EOS and LN Fernández. Brotes de intoxicaciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Sal Púb Mex.* 1993;35:456-463).
- Popoff. M.Y. Le Minor L. 2001 Formules antigeniques des serovars des Salmonella. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. *Institut Pasteur, Paris.*
- Rabsch, W., Tschape, H. and Baumler, A.J. 2001. Non-typhoidal salmonellosis; emerging problems. *Microb. Infection*, 3: 273-247.

- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Willis JC and Davis BR.. Hemorrhagic colitis a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl. J. 1983;308: 681-685; Rose, F.B.; Camp, C.J. & Estes, E.J. 1987. Family outbreak of fatal *Yersinia enterocolitica* pharyngitis. Am J. Med.82:636-637).
- Sánchez, B. Garrocho, S. y Martínez R. 1991. Parasitosis intestinales en escolares del área urbana de San Luis Potosí. *Revista Mexicana de pediatría*. México. pp. 43-46.
- Sánchez-Vega JT. Repercusión en el daño social y económico de las parasitosis. Rev Eficiencia y efectividad. Subdirección General Médica, ISSSTE. Boom-Borges (edit.) 1990; 111-112.
- Secretaría de Salubridad y asistencia. Dirección general de Epidemiología. Boletín. Mensual epidemiológico. Información Estadística sobre enfermedades transmisibles. 1990:3 (6).
- Secretaría de Salubridad y asistencia. Dirección general de Epidemiología. Boletín. Mortalidad en México 1999. *Salud pública de México*; 43, (1), 2001 (67).
- Secretaría de Salubridad y asistencia. Dirección general de Epidemiología. Boletín. Estadísticas de mortalidad en México en el año 2003. *salud pública de México*; 47, (2), 2005.

- Suárez G, Flores JJ, Puc MA, Heredia MR. Excreción de *Salmonella* en las heces durante los primeros meses de vida. *Rev Lat Amer Microbiol* 1991;33:245-7.
- Trevejo RT, Courtney JG, Starr M, Vugia DJ. Epidemiology of salmonellosis in California, 1990-1999: Morbidity, mortality, and hospitalization costs. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 48-57.
- Valdez. C, Flores. J, Franco. M, Heredia. N. M.R. Frecuencia del gen spvB en cepas de *Salmonella* spp. aisladas en niños con y sin diarrea. *Rev. Biomed* 2004; 15: 201-206.
- García. G, O. DNA based typing of *Salmonella* spp. using fljB and fliC gene sequences. Master Thesis Dissertation Manuscript. Swedish Institute for Infection Disease Control (Smittskyddsinstitutet). Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. 2005