



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“SEROTIPOS DE *Salmonella* spp IDENTIFICADOS POR
PCR MULTIPLEX EN MATERIA FECAL DE NIÑOS
CLINICAMENTE SANOS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
B E T S A B É F L O R E S S U Á R E Z

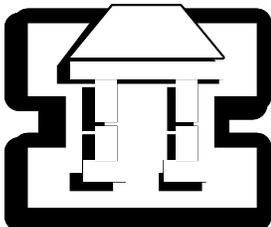
ASESORA:

M. EN C. GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS

PROYECTO FINANCIADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS
DEL
PERSONAL ACADÉMICO (PROYECTO PAPIME PE200705)

LOS REYES IZTACALA, ESTADO. DE MEXICO

2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A mi *Mami* por la parte de tu vida que con tanto cariño me has dedicado para que pudiera llegar a hacer lo que hasta hoy he logrado, por tu perseverancia sacrificio y esfuerzo. Gracias por todo el amor que me has tenido siempre, el cual ha sido mi principal impulso para haber alcanzado mis metas, te amo mucho y nunca terminare de agradarte lo que haces por mí.

A *Omar* por ser el mejor amigo, por los extraordinarios momentos que he tenido a tu lado, por el gran apoyo que me has brindado sin condición y el inmenso amor que me has demostrado, por ser siempre tan tolerante, y por que todo eso me ha ayudado a levantarme y saber que no estoy sola. Gracias por ser la persona que eres, te amo demasiado.

A mis hermanos *Erás Yussel* y *Roberto* por las tristezas y alegrías que hemos compartido, por sus consejos, su compañía y su cariño, y ser también parte fundamental de mi vida, los quiero muchísimo.

A mi abuelita *Ernestina Gimex*, mis tíos *José Campos*, *Rafaela Suárez*, *Fidel Suárez*, por el apoyo que nos han brindado a mí y mi familia y a mis primas *Erica Guerrero Suárez* y *Stephanie Campos Suárez* quienes están siempre conmigo.

A mis amigas *Melara*, *Miriam* y *Alon*, por ser las mejores e incondicionales amigas, por su cariño y consejos, y por los buenos ratos y años que pasamos juntas.

*A mis amigas Pae Vero Duarte Vero Alia Alejandra Teresa Alicia Nicolás
Miguel (Luche) Rubén Cintya Guadalupe Abigail Angeles Carolina Viter
Nancy Z., Nancy O., Ana Mariana Nieves, por su amistad a lo largo de la carrera, las
inolvidables practicas de campo y las buenas fiestas.*

*A mis amigas del laboratorio Mayra Paloma Zulaida Pita y Floren
por ofrecerme su amistad por su apoyo durante este último año de la carrera.*

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis, **M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras** por los conocimientos que con su ayuda obtuve durante la realización de mi tesis, por su apoyo y dirección en el desarrollo de este trabajo.

Al **M. en C. Eric Monroy Pérez** por su colaboración y asesoría para la realización del trabajo dentro del laboratorio, así mismo por la crítica y revisión para el término de mi tesis.

Al **Dr. Sergio Vaca Pacheco, Dr. Sergio Chazaro Olvera y Biol. Susana Esther González Almazán** por su revisión y observaciones para la redacción de mi tesis.

ÍNDICE

1	Resumen.....	1
2	Introducción.....	2
2.1	Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).....	2
2.2	Características del género <i>Salmonella</i>	3
2.3	Patología.....	5
2.4	Mecanismo de variación de fases.....	6
2.5	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	7
3	Antecedentes.....	9
4	Objetivos.....	10
5	Material y métodos.....	11
5.1	Muestras clínicas.....	11
5.2	Cepas bacterianas.....	11
5.3	DNA templado para PCR.....	11
5.4	Detección de la Fase I.....	12
5.5	Detección de la Fase II.....	12
5.6	Electroforesis.....	13
5.7	Detección de parásitos.....	15
5.8	Susceptibilidad a antibióticos en los serotipos identificados.....	15
6	Resultados.....	17
7	Discusión.....	25
8	Conclusiones.....	31
	Bibliografía.....	32

RESUMEN

Las enfermedades gastrointestinales ocasionadas por *Salmonella* spp en infantes, continúan siendo un serio problema de salud por resolver. La mayoría de las cepas de *Salmonella* pueden expresar de manera excluyente uno de dos antígenos flagelares en Fase 1 ó Fase 2, codificados por los genes *fliC* y *fljB*, respectivamente.

El objetivo de este trabajo fue detectar por PCR multiplex los serotipos de *Salmonella* spp en materia fecal de niños sanos así como la prevalencia de los parásitos existentes. Se analizaron 155 muestras fecales de niños clínicamente sanos. Para identificar por PCR multiplex los distintos serotipos de *Salmonella* spp que expresan los antígenos flagelares de Fase I y Fase II, se utilizaron 23 oligonucleótidos. La detección de los parásitos se realizó por el método de flotación de Faust. El 57% (88) de las muestras fueron positivas para algún serotipo de *Salmonella*: el 98% (86) correspondió a *S. ohio*, el 1% (1) a *S. newport* y 1% (1) a *S. typhimurium*. Se identificó a *Entamoeba histolytica* en el 62% (147) de las muestras, a *Giardia lamblia* en el 36% (86) y a *Iodamoeba butschlii* en el 2% (4). La asociación de *S. ohio/Entamoeba histolytica* ocurrió en 61% (81), *S. ohio/Giardia lamblia* se presentó en el 38% (50), *S. ohio/Iodamoeba butschlii* en el 1% (1), *S. newport/Entamoeba histolytica* en el 50% (1), *S. newport/Giardia lamblia* 50% (1), *S. typhimurium/Entamoeba histolytica* 50% (1) y *S typhimurium/Giardia lamblia* 50% (1). La técnica de PCR resultó ser una técnica rápida y efectiva para el diagnóstico de la salmonelosis. Los resultados encontrados mostraron la elevada frecuencia de *Salmonella ohio* y de los parásitos *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, por lo que fue necesario iniciar de inmediato el tratamiento médico más adecuado.

INTRODUCCIÓN.

Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).

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, por lo que estas enfermedades representan un serio problema de Salud mundial, principalmente en países en vías de desarrollo como México.¹

Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden ser de 3 tipos (Gutiérrez, 1994)²:

1. 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.
2. Intoxicación causada por alimentos: Ocurre cuando las 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.
3. 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.

Las manifestaciones de las infecciones por alimentos pueden ser gastrointestinales (amibiasis, salmonelosis, shigelosis, teniasis, giardiasis, sacaríais, cólera, e intoxicaciones alimentarias) o de tipo extraintestinal (brucelosis, cisticercosis, fiebre tifoidea, hepatitis, etc.).³

La salmonelosis es una de las enfermedades gastrointestinales más comunes que afecta a la población mundial, principalmente de países en vías de desarrollo.

Características del género *Salmonella*.

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gramnegativos, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, presentan motilidad debida a flagelos peritricos, son anaerobias facultativas, fermentan la glucosa y manosa, sin producción de gas, no fermentan la lactosa o sacarosa, la mayor parte de serotipos de *Salmonella* producen H₂S, reducen los nitratos, son catalasa positivos y oxidasa negativos.⁴

El género *Salmonella* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentran en el tracto gastrointestinal de los mamíferos domésticos y salvajes, los reptiles, las aves y los insectos. Se trata de comensales eficaces y también patógenos que producen un espectro de enfermedades en el hombre y los animales. Algunos serotipos de *Salmonella*, tales como *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. sendai*, están muy adaptados a su huésped y no tienen otros huéspedes naturales conocidos.⁵

Salmonella se comporta como patógeno intracelular facultativo, se divide en dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, tomando en cuenta sus características bioquímicas generales. Esta última se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* y *houtenae*, las salmonelas de mayor importancia médica pertenecen a las subespecies *enterica* y *arizonae* y son consideradas serovars. Por lo que la nomenclatura que se está manejando actualmente es *Salmonella enterica* serovar *typhi*, *S. enterica* serovar *paratyphi*, *S. enterica* serovar *typhimurium*.^{6,7,8}

Actualmente se han identificado 2,501 serotipos diferentes de *Salmonella*.⁹ Esta subdivisión ha sido apoyada por varios métodos de hibridación de DNA y métodos serológicos. Mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo se ha determinado la fórmula antigénica de una cepa y, a partir de dicha fórmula, se clasifican en serovar o serotipo siguiendo el esquema propuesto por Kauffman y White.⁹

Existen varios métodos para la identificación del género *Salmonella*, uno de ellos son los métodos bacteriológicos para los cuales se utilizan medios de cultivo diferenciales, selectivos y enriquecidos. Las muestras de las cuales se puede aislar la bacteria son sangre, orina y generalmente de heces, que son inoculadas en los medios de cultivo.¹⁰

Algunos serotipos patógenos, como *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. ohio*, *S. typhi*, *S. newport* y *S. choleraesuis* son causantes de infecciones humanas y se adquieren como resultado de la ingestión de alimentos contaminados, carne de pollo, ternera, carne de cerdo, huevos, leche, mariscos, y productos frescos.¹¹ El contacto directo con animales también causa la transmisión de *Salmonella*.¹²

Patología.

La salmonelosis humana puede ser dividida en cuatro síndromes:

A) Fiebre entérica. Sólo unos cuantos tipos de *Salmonella* producen este síndrome, entre ellos la *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea) es el más importante. Las salmonelas ingeridas alcanzan el intestino delgado, desde el cual penetran por las placas de Peyer al tejido linfático y posteriormente al torrente sanguíneo transportándose así a muchos otros órganos.¹⁰ Los organismos se multiplican en el tejido linfoide intestinal y se excretan por heces. Después de un periodo de incubación de 10 a 14 días, se presentan fiebre, malestar, cefalea, estreñimiento y bradicardia. La fiebre se eleva y el bazo e hígado se hipertrofian. Las principales lesiones son hiperplasia y necrosis del tejido linfoide (placas de Peyer), hepatitis, necrosis focal del hígado e inflamación de la vesícula biliar.

B) Septicemia. Esta asociada con *Salmonella choleraesuis*, aunque puede ser causa de por cualquier otro serotipo. Posterior a la infección bucal, hay una invasión temprana de la circulación, pero las manifestaciones intestinales están a menudo ausentes.¹⁰

C) Gastroenteritis. Es la manifestación más común de infección por *Salmonella*. *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* son de los microorganismos causales más sobresalientes. En 8 a 48 horas después de la ingestión de las salmonelas aparecen náuseas, cefalea, vómitos y diarrea profusa, con pocos leucocitos en las heces; es común la fiebre de poca intensidad, pero por lo general los síntomas desaparecen en 2 a 3 días.¹⁰

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que cada año hay cerca de 17 millones de casos de fiebre de tifoidea, con casi 600,000 muertes y 1.3 mil millones de casos de gastroenteritis aguda o diarrea debido a la salmonelosis no tifoidea, con 3 millones de muertes.^{13, 14, 15}

Mecanismo de variación de fases

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 *fliC* (antígenos flagelares fase I) y *fljB* (antígenos flagelares fase II). De esta manera solo un antígeno flagelar es expresado en un tiempo.^{26, 27} Las cepas que poseen ambos tipos de antígenos flagelares son bifásicas y las que poseen un solo tipo son monofásicas (Tabla 2).¹⁶ 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.^{17, 18} Algunos de estos alelos son definidos por un solo factor (antígeno i, d, ó r): otros son definidos por varios subfactores (e.g., antígenos I,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 cree determina los epítopes de los antígenos H.^{19, 20}

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction) es una de las técnicas de biología molecular que más se utiliza actualmente. Constituye una forma rápida, segura y relativamente barata de obtener microgramos de DNA a partir de nanogramos de un DNA molde (o de RNA en el caso de la RT-PCR). Esta técnica fue concebida por Kary Mullis y cols. en 1985^{21, 22, 23} quienes la utilizaron inicialmente para obtener suficiente DNA de un segmento del gen de la beta-globina humana con el propósito de realizar el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme mediante análisis de restricción.

La PCR es una técnica que nos permite amplificar una 'secuencia blanco', la cual puede ser un gen o un segmento de DNA. En cuestión de horas, esta secuencia blanco puede amplificarse un millón de veces. Las cadenas complementarias de la molécula de DNA de doble cadena se separan por calentamiento. Dos segmentos pequeños de DNA sintético, cada uno complementario a una secuencia específica de un extremo de la secuencia blanco, sirven como primeros. Cada primero se une a su secuencia complementaria. La polimerasa comienza en cada primero y copia la secuencia de esa cadena. En un tiempo corto se producen réplicas exactas de

la secuencia blanco. En ciclos subsecuentes, las moléculas de doble cadena, del DNA original y de las copias, se separan, los primeros se unen nuevamente a las secuencias complementarias y la polimerasa las replica. Al término de muchos ciclos se han incrementado los pequeños segmentos de DNA que tienen la secuencia blanco, y esta información genética amplificada queda disponible para un análisis posterior”.²⁴

Las ventajas de esta técnica es que presenta una gran sensibilidad y alta especificidad²⁵, lo que permite dar diagnósticos certeros sobre infecciones que son producidas por microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y de cultivo.

ANTECEDENTES.

 Gutierrez-Cogco y cols. en el 2000 realizaron un trabajo para serotipificar un total de 24,394 cepas de *Salmonella* aisladas de pacientes infectados en diferentes laboratorios públicos y privados de la República Mexicana, así como en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). Los serotipos más frecuentes fueron *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.²⁶

 En el 2002 el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella-Shigella* (LNRSS) desarrollo un nuevo método de PCR múltiplex para identificar los antígenos flagelares de Fase II (complejos HI, H:I,w, H:e,n,x y H:e,n,z₁₅) comprendidos en los más comunes serotipos aislados en España (Herrera y cols. 2004). En este trabajo se analizaron un total de 161 cepas de *Salmonella* y se identificaron 72 serotipos diferentes, siendo el más frecuente fue *S. enteritidis*.²⁷

 Recientemente se desarrollo un método de de PCR multiplex, parecido al desarrollado para Fase II, con el que se logró detectar los alelos flagelares de Fase I más comunes (Echeita y cols. 2002). En este trabajo se analizaron un total de 140 cepas de *Salmonella* asociadas con 49 serotipos diferentes.²⁸

 Álvarez y cols. en el 2004 realizaron un estudio para la detección e identificación epidemiológica de *Salmonella* en muestras clínicas de humanos en España, por medio PCR multiplex, para lo cual utilizaron 14 primers y un total de 138 cepas microbianas de las cuales las más frecuentes fueron los serotipos *S. enteritidis* y *S. typhimurium*.²⁹

OBJETIVO GENERAL.

- ⦿ Identificar los diferentes serotipos de *Salmonella* spp por PCR multiplex en niños clínicamente sanos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- ⦿ Conocer la frecuencia de los serotipos de *Salmonella* spp en niños sanos.
- ⦿ Identificar los serotipos de *Salmonella* spp en fase 1 por PCR multiplex en materia fecal de niños asintomáticos.
- ⦿ Identificar los serotipos de *Salmonella* spp en fase 2 por PCR multiplex en materia fecal de los infantes.
- ⦿ Identificar los parásitos más frecuentes presentes en las muestras fecales de niños.
- ⦿ Conocer la asociación de los serotipos de *Salmonella* spp con algunos parásitos presentes en las muestras de los infantes.
- ⦿ Determinar la susceptibilidad a los antibióticos en los serotipos de *Salmonella* detectados.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Muestras clínicas.

Durante el periodo de septiembre del 2006 a junio del 2007 las muestras fecales de 155 niños clínicamente sanos pertenecientes a escuelas primarias aledañas a la comunidad de los Reyes Iztacala fueron recolectadas y transportadas en hielo al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI Iztacala, FESI. Para la selección *Salmonella* spp. las muestras fueron sembradas en el medio de agar MacConkey (DIBICO) e incubadas a 37° C por 24 horas.

Cepas bacterianas.

Las cepas de referencia de *Salmonella* utilizadas como control para la PCR fueron: *Salmonella typhimurium* y *Salmonella infantis*.

DNA templado para PCR.

Después de la incubación de las muestras en agar MacConkey a 37° C/24 h. las bacterias del cultivo primario fueron colectadas y suspendidas en 5 ml de PBS (pH, 7.2) a una densidad aproximada de 10⁹ bacterias. El DNA templado fue preparado por ebullición por 20 minutos, seguido por centrifugación por 10 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante fue utilizado para PCR.

Detección por PCR Multiplex de los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase I.

Los primers (tabla 1) y el ensayo de PCR multiplex utilizado para detectar los distintos serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase I fue el descrito por Herrera y cols. en el 2004. El volumen final de la mezcla de reacción para PCR fue de 25 μ l, la cual contenía 3 μ l de DNA templado, 5.9 μ l de nuclease free water estéril, 1 μ l de cada primer (5 pmol); Sense 60, Antisense-i, Antisense-z₁₀, Antisense-iv, Antisense-r, Forward G, Reverse-G, Forward-Sdf-1, Reverse-Sdf-1, 1.4 μ l (7 pmol) de los primers Reverse-eh, Reverse-b, Forward-d y Reverse-d (todos los primers fueron de Sigma-Genosys), 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerasa y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads) y 1.5 μ l de buffer. La amplificación del DNA fue realizado bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 40 segundos a 95° C, 20 segundos a 58° C y 20 segundos a 72° C. Finalmente la extensión se prolongó a 72° C por 7 minutos.

Detección por PCR Multiplex de los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase II.

El método de PCR y los primers utilizados (tabla 2) para identificar los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase II fue el descrito por Echeita y cols. 2002 para lo cual el volumen final por mezcla de reacción para PCR fue de 25 μ l, la cual contenía 5 μ l de DNA templado, 10 μ l de nuclease free water estéril, 1 μ l de cada primer (5 pmol); Sense-f1mod, Antisense-R5mod, Antisense-R6, Antisense-R7, Antisense-R1mod, Sense-Fw,

Antisense-Rw, Sense-Fe, Antisense-Rx y Antisense-Rz15, 1.5 mmol de MgCl₂, 0.5 U de AmpliTaq polimerase y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads). La amplificación del DNA fue realizado bajo las mismas condiciones que para la Fase I.

Electroforesis

Después de la amplificación, 10 µl de cada muestra fue analizada por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% bajo las siguientes condiciones: 120 volts, 94 miniampers por 120 minutos. Los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) y fotografiados bajo luz UV utilizando el sistema de fotodocumentación modelo GEL LOGIC 100 (KODAK). La PCR fue considerada como positiva cuando una banda o bandas de tamaño igual al de nuestras cepas controles de referencia fueron observadas y no extra bandas. Para los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase I, se identificaron regiones internas variables del gene *fliC* que codifica los antígenos H:i, H:r, H:I,v, H:e,h, H:z₁₀, H:b y H:d, mientras que para los serotipos que expresan el antígeno flagelar de Fase II se identificaron las regiones internas variables del gene *fljB* que expresa los antígenos H:1,2, H:1,5, H:1,6, H:1,7, H:I,w, H:e,n,x y H:e,n,z₁₅.

Primers	Secuencia (5' a 3')	5' posición dentro del gene <i>fliC</i>
Sense 60	GCAGATCAACTCTCAGACCCTGGG	481-504
Antisense-i	ATAGCCATCTTTACCAGTTCC	714-734
Antisense-z ₁₀	CGTCGCAGCTTCTGCAACC	911-929
Antisense-b	CGCACCAGTCYWACCTAAGGCGG	628-650
Antisense-eh	AACGAAAGCGTAGCAGACAAG	658-678
Antisense-lv	CCTGTCACTTTTCGTGGTTAT	790-809
Antisense-r	AAGTGACTTTTCCATCGGCTG	741-761
Forward-d	CCCGAAAGAAACTGCTGTAACCG	539-561
Reverse-d	TGGATATCAGTATTGCTCTGGGC	625-647
Forward G	GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG	547-569
Reverse-G	AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG	1055-1078
Forward-Sdf-1	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG	-
Reverse-Sdf-1	CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC	-

TABLA 1. Primers utilizados en la detección del antígeno flagelar de fase I por PCR multiplex.

Primers	Secuencia (5' a 3')	5' posición dentro del gene <i>fliB</i>
Sense-f1mod	CTTATGCCRATAATGGTACTACTG	568-594
Antisense- R5mod	GGTTACAGVAGCCGTACCAG	666-647
Antisense-R6	CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA	858-834
Antisense-R7	TAATCGCCATTTTTGTCGAG	758-739
Antisense-R1mod	TTTGACCAAYKYMGCSCAT	957-938
Sense-Fw	GTGGGGCAACMCTCAATACTG	569-589
Antisense-Rw	CCTGCCACTTTTCGTGGTTGC	809-790
Sensen-Fe	GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC	631-656
Antisense-Rx	CCATCCTTAAAGGATACGGC	685-667
Antisense-Rz15	ATCAACGGTAACTTCATATTTG	765-744

TABLA 2. Primers utilizados en la detección del antígeno flagelar de fase II por PCR multiplex.

Detección de Parásitos.

La detección de los parásitos en las heces se realizó por medio de la técnica de Faust (técnica de Flotación en sulfato de zinc). Para lo cual cada 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, se agregó solución de sulfato de zinc (densidad = 1.190), 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 zinc hasta formar un menisco y se colocó sobre la superficie un cubreobjetos. Al término de 1 h se colocó el cubreobjetos sobre un portaobjetos que contenía una gota de lugol. Los parásitos fueron observados e identificados a 40X en un microscopio óptico.

Susceptibilidad a antibióticos en los serotipos identificados.

Una vez identificados los serotipos de *Salmonella*, se utilizó la técnica de Kirby-Bauer para probar la susceptibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias (de cada cepa) con un asa estéril, se inocularon en 5 ml de caldo Muller Hilton, y se incubaron a 37 ° C durante 3 horas, hasta que apareció una turbidez ligera. La turbidez se ajustó con solución salina estéril hasta obtener una densidad comparable con un estándar de sulfato de bario. El estándar se preparó mezclando 5 ml de BaCl₂ 0.048 M (1.175% peso/ volumen de BaCl₂ 2H₂O) con 99.5 ml de H₂SO₄ al 1% v/v (0.36N), que fue la mitad de la densidad del estándar No. 1 de MacFarland (estándar 0.5 de MacFarland).

Posteriormente se inoculó sobre el agar de Muller Hilton por medio de hisopos estériles, los cuales se humedecieron con la suspensión (crecimiento bacteriano) y se estriaron sobre la totalidad de la superficie del agar. Por último se tomó un sensidisco con los 12 antimicrobianos a determinar, por medio de una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Muller Hinton. El antibiótico se difundió formando un gradiente de concentración que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 horas a 37 ° C. De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del diámetro del halo de inhibición, el cual se midió con un vernier (Tabla 3).

TABLA 3. Antibióticos que se utilizaron contra las cepas encontradas.

ANTIBIOTICO	ABREV	FAMILIA	ACCION ^Y	DIAM.HALO INH. (mm) ^Z		
				^Z R	I	S
Ampicilina	AM	Aminopenicilina	1	<28		>29
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1 ^a Gen.	1	<14	15-17	>18
Cefotaxima	CTX	Cefalosporina de 3 ^a Gen.	1	<14	15-22	>23
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina de 3 ^a Gen.	1	<14	15-17	>18
Cefuroxima	CXM	Cefalosporina de 2 ^a Gen.	1	<14	15-17	>18
Dicloxacilina	DC	Penicilina semisintetica	1	<10	11-123	>13
Eritromicina	E	Macrolido	3	<13	14-17	>18
Gentamicina	GE	Aminoglucosido	3	<12	13-14	>15
Pefloxacina	PEF	Quinolona	4	<14	15-22	>23
Penicilina	PE	Penicilina	1	<28		>29
Tetraciclina	TE	Tetraciclina	3	<14	15-18	>19
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT	Combinacion de diaminopirimidina y sulfonamida	4	<10	11-153	>16

^Y1. Inhibición de la formación de la pared celular

3. Interferencia en la síntesis de proteínas

4. Inhibición del metabolismo de los ácidos nucleicos

^ZR= resistente

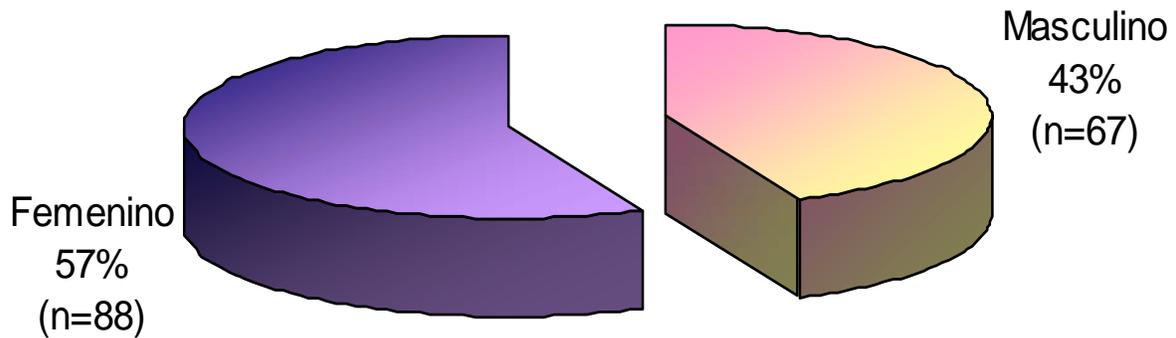
I= intermedia

S= sensible

RESULTADOS.

Pacientes analizados.

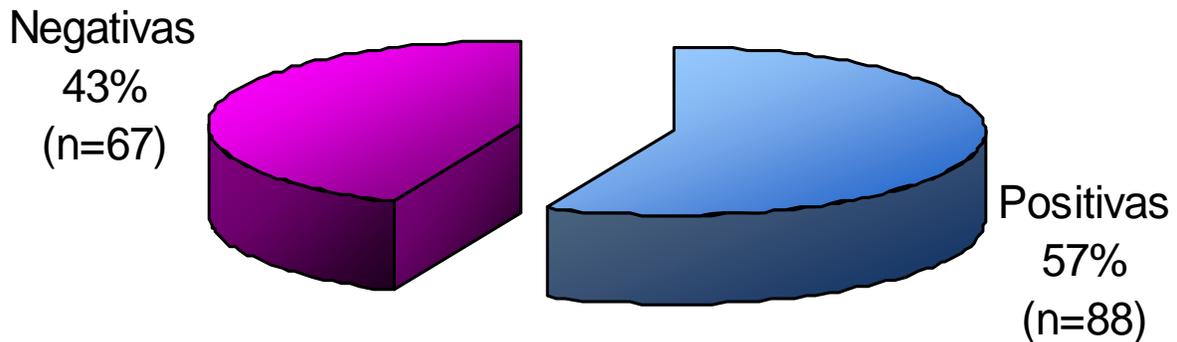
Para el desarrollo de este estudio se analizaron las muestras fecales de 155 niños clinicamente sanos, pertenecientes a escuelas primarias aledañas a Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México. Las edades de los niños estuvieron comprendidas entre 6 a 12 años, de los cuales el 57% (n=88) correspondió al sexo femenino y el 43% (n=67) al sexo masculino (Gráfica 1).



GRÁFICA 1. Distribución de los pacientes por sexo.

Detección de *Salmonella* en os Infantes asintomáticos

En la Gráfica 2 se aprecia que a partir de las 155 muestras fecales analizadas, la frecuencia de *Salmonella* fue del 57% (n = 88)

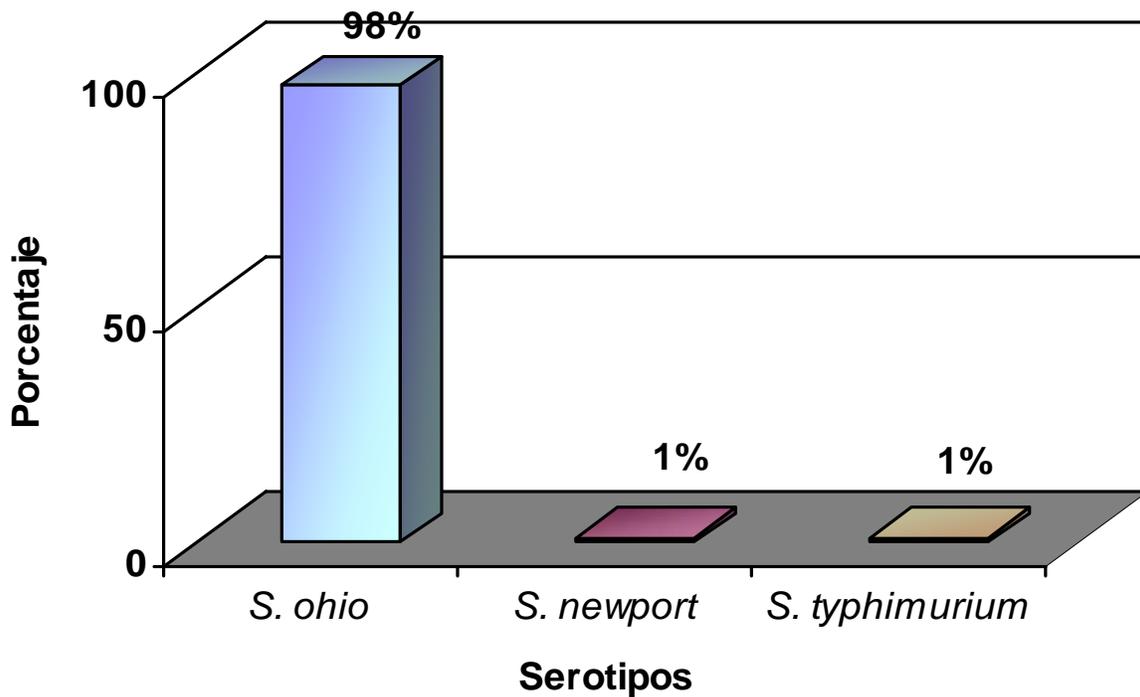


GRÁFICA 2. Prevalencia de *Salmonella* en las muestras fecales de los niños asintomáticos.

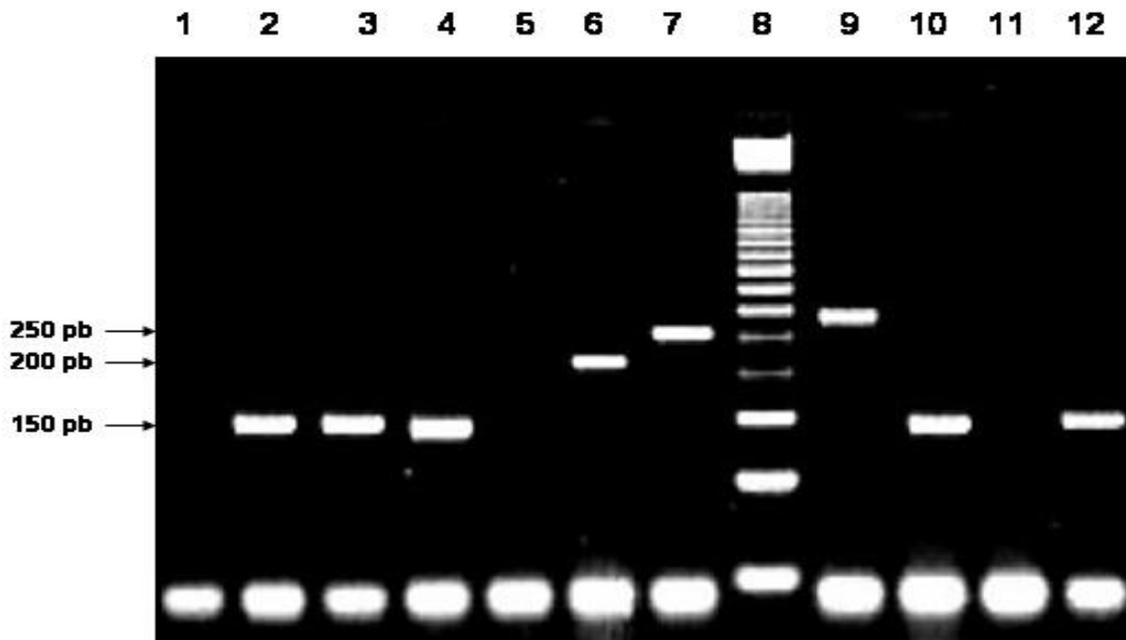
Detección por PCR multiplex de los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de fase I y de Fase II.

En este estudio utilizamos un total de 23 primers (tabla 1 y 2) complementarios a regiones internas variables de los genes *fliC* y *fljB* (Fase flagelar I y II, respectivamente), que nos permitió detectar amplicones de tamaños característicos para identificar los alelos de los antígenos H de los serotipos más frecuentes de *Salmonella* spp.

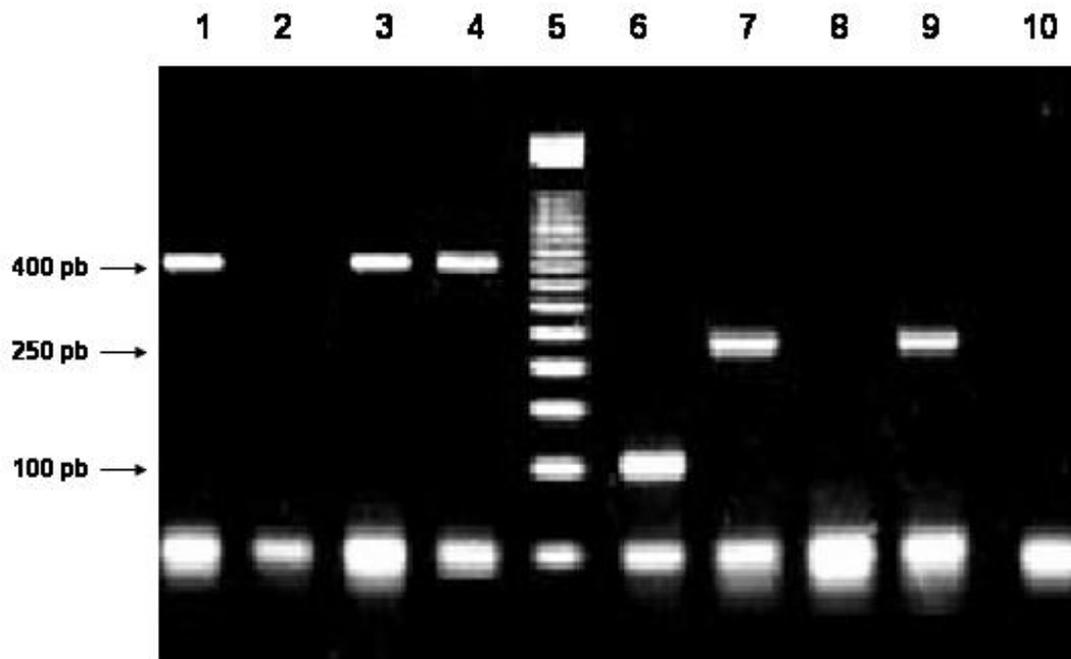
A partir de las muestras diarreicas de los infantes asintomáticos, se detectaron 3 serotipos de *Salmonella* mediante PCR multiplex (Gráfica 3, fotografía 1 y 2). Entre los serotipos detectados se encontraron los siguientes: *S. ohio* 98% (n=86), *S. newport* 1% (n=1) y *S. typhimurium* 1% (n=1).



GRÁFICA 3. Frecuencia de los serotipos de *Salmonella* identificados en las muestras fecales de los niños asintomáticos.



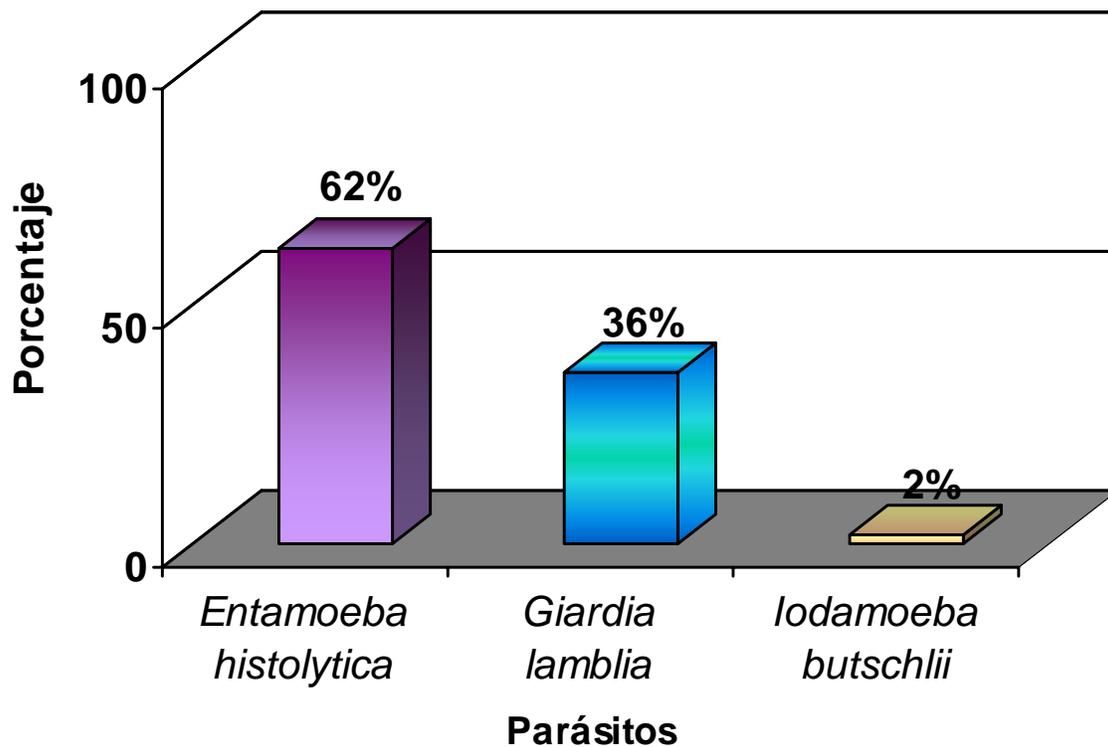
FOTOGRAFÍA 1. Línea 1; Control negativo (sin DNA). Línea 2,3 y 4; *Salmonella ohio* (150 pb) detectadas en muestras de pacientes. Línea 5 y 11; muestras negativas. Línea 6: *Salmonella newport* (200 pb) detectada en muestra de paciente. Línea 7 *Salmonella typhimurium* (250 pb) detectada en muestra de paciente.. Línea 8; 50 pb Ladder. Línea 9; *Salmonella infantis* (control positivo, 275 pb). Línea 10 y 12; *Salmonella ohio* (150 pb) detectadas en muestras de pacientes.



FOTOGRAFÍA 2. Línea 1; *Salmonella newport* (400 pb) detectada en muestra de paciente. Línea 2; Control negativo (sin DNA). Línea 3; *Salmonella typhimurium* (400 pb) detectada en muestra de paciente. Línea 4; *Salmonella typhimurium* (control positivo, 400 pb). Línea 5; 50 pb Ladder. Línea 6; *Salmonella infantis* (control positivo, 100 pb). Línea 7 y 9; *Salmonella ohio* (250 pb) detectadas en muestras de pacientes. Línea 10; Muestra negativa.

Identificación de los parásitos en las muestras fecales.

A partir de las 155 muestras fecales de los infantes analizadas, la frecuencia de *Entamoeba histolytica* fue del 62% (n= 147), seguido de *Giardia lamblia* con el 36% (n= 86) y de *Iodamoeba butschlii* con el 2% (n = 4) (Gráfica 4).



GRÁFICA 4. Frecuencia de los parásitos detectados en las muestras fecales de los infantes asintomáticos

Asociación de los serotipos de *Salmonella* con los parásitos presentes en las muestras.

En este estudio se encontró que la asociación *S. ohio/ Entamoeba histolytica* fue del 61%, *S. ohio/Giardia lamblia* del 38%, *S. ohio/Iodamoeba butschlii* del 1%, *S. newport/Entamoeba histolytica* del 50%, *S. newport /Giardia lamblia* del 50%, *S. typhimurium/Entamoeba histolytica* del 50% y *S. typhimurium /Giardia lamblia* del 50% (Tabla 4).

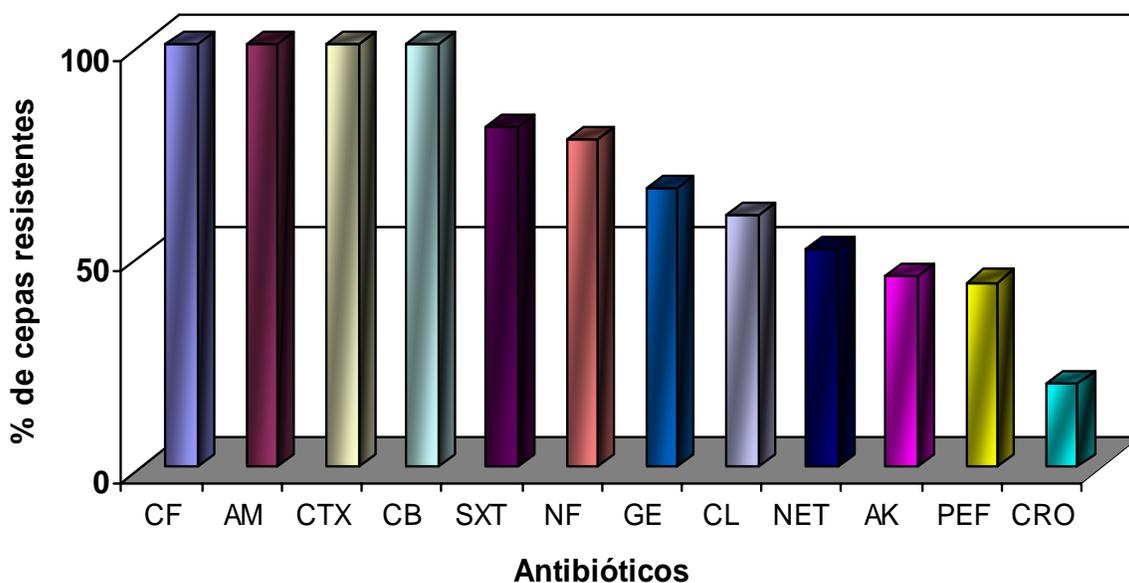
Serotipo	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Salmonella ohio</i>	61% (n = 81)	38% (n = 50)
<i>Salmonella typhimurium</i>	50% (n = 1)	50% (n = 1)
<i>Salmonella newport</i>	50% (n = 1)	50% (n = 1)

TABLA 4. Asociación de los distintos serotipos de *Salmonella* detectados por PCR multiplex con los parásitos existentes en las muestras fecales de los infantes asintomáticos.

Resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* identificados por PCR multiplex.

El 100% (n=62) de los serotipos de *Salmonella* (*S. ohio*, *S. newport* y *S. typhimurium*) identificados por PCR multiplex fueron resistentes a cefalotina (CF), ampicilina (AM), cefotaxima (CTX) y carbencilina (CB), mientras que el porcentaje de cepas resistentes para el sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) fue de 80.6% (n=50), para la nitrofurantoína (NF) del 77.4% (n=48), gentamicina (GE) del 66.1% (n=41), cloranfenicol (CL) del 59.6% (n=37),

netilmicina (NET) del 51.6% (n=32). Los antibióticos a los que las cepas presentaron menor resistencia fueron la ceftriaxona (CRO) con el 19.3% (n=12) seguido de pefloxacina (PEF) con el 43.5% (n=27) y la amikacina (AK) con el 45.1% (n=28) de cepas susceptibles según lo referido en el Gráfico 8.



GRÁFICA 8. Resistencia a antibióticos de los distintos serotipos de *Salmonella* identificados en los infantes asintomáticos.

CF=Cefalotina, AM=Ampicilina, CTX=Cefotaxima, CB=Carbencilina, SXT=Sulfametoxazol-trimetoprim, NF=Nitrofurantoína, GE=Gentamicina, CL=Cloranfenicol, NET=Netilmicina, AK=Amikacina, PEF=Pefloxacina, CRO=Ceftriaxona

DISCUSIÓN.

Pacientes analizados

En este estudio se describió que en el 57% (n=88) de los infantes analizados, se identificó algún serotipo de *Salmonella* (Gráfica 2). El porcentaje corrobora lo propuesto por Larrosa-Haro y cols. 2002, en un estudio realizado en la ciudad de Guadalajara, en el que analizaron las muestras fecales de 288 lactantes y preescolares con diarrea aguda. Estos autores encontraron que en el 5.1% de los casos, el agente causal de la diarrea fue *Salmonella* spp.³⁰

Si bien los niños analizados no presentaron evacuaciones líquidas o algún otro síntoma de gastroenteritis en el momento del estudio, no se descarta la posibilidad de que a futuro pueden cursar con cuadros de diarrea o de algún otro síntoma de infección intestinal. Se ha descrito que la gastroenteritis es un problema de salud pública que ocasiona elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo.³¹

Desde la década de los ochenta, la incidencia de gastroenteritis ocasionada por *Salmonella* en el mundo industrializado ha aumentado considerablemente y ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países.^{32, 33} Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo de la industrialización en las fases de producción de alimentos, cambios en la práctica del manejo de estos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos. Estos cambios han tenido como consecuencia nuevos problemas en la higiene de los alimentos al originar una fácil diseminación de *Salmonella* spp así como de otros gérmenes patógenos en los

alimentos.³⁴ La mayoría de los brotes gastrointestinales por *Salmonella* se han asociado con algunos productos avícolas como son el huevo y el pollo y con menor frecuencia, con alimentos contaminados por manipulación.^{35, 36}

La salmonelosis es una enfermedad aguda de distribución mundial, con variaciones en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con importancia en áreas que no cuentan y no han alcanzado las medidas de salud pública óptimas. Afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en los extremos de la vida: en menores de cinco años y mayores de 60 años de edad, que son los grupos más vulnerables.^{37, 38}

En México en los años de 1994 a 1998 ocurrió un incremento en el registro de las notificaciones de casos de salmonelosis de 100,342 en 1994 a 215,155 en 1998 (tasa de 111.21 y 223.53 por 100,000 habitantes, respectivamente) con una mayor incidencia en los grupos de 15 a 24 años, de 25 a 44 años y de 45 a 64 años (Secretaría de Salud, 1995).³⁹

En los Estados Unidos de América (EUA) se estima que cada año ocurre un promedio de 800,000 a cuatro millones de infecciones por *Salmonella*, de las cuales alrededor de 500 son fatales. Aproximadamente 40,000 de éstas se confirman con laboratorio y son serotipificadas por los laboratorios estatales de salud pública, los cuales a su vez informan al Centro de Prevención y Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia (CDC, por sus siglas en inglés).³⁵

Identificación por PCR multiplex de los serotipos de *Salmonella* spp expresan los antígenos flagelares Fase I y Fase II en las muestras de los infantes.

En este estudio se describió que en el 57% (n=88) de las muestras fecales de los infantes asintomáticos se identificó algún serotipo de *Salmonella* (gráfica 2), dentro de los cuales el serotipo más frecuente fue *S. ohio* con el 98% (n=86), seguido de *S. newport* (n=1) y *S. typhimurium* (n=1) con el 1%, en cada caso (figura 3, fotografía 1 y fotografía 2). Los serotipos detectados en este trabajo, coinciden con los identificados por Gutiérrez-Cogco y cols. en 1994⁴⁰, en un estudio realizado en 24,394 cepas de *Salmonella* aisladas de pacientes Mexicanos con gastroenteritis durante el periodo de 1972 a 1999, en donde el serotipo identificado con mayor frecuencia fue *S. typhimurium*, seguido de *S. enteritidis*, *S. anatum*, *S. infantis*, *S. newport* y *S. ohio*, entre otros. Los datos de este trabajo también son similares a los encontrados en un estudio realizado en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” en la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, en 170 cepas de *Salmonella* aisladas de niños con y sin diarrea, en donde se identificaron 30 serotipos distintos (*S. agona*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. anatum*, *S. poona*, *S. enteritidis*, *S. ohio*, *S. cerro*, etc.).⁴¹

En este estudio la detección de los serotipos de *Salmonella* que expresaron el antígeno flagelar Fase I, coinciden con los identificados por Herrera-León y cols (2004)²⁷, en un amplio estudio realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, en Majadahonda Madrid, España. Estos autores 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 serotipos diferentes, cuyos amplicones se encontraron entre 100 a 500 bp.

Los serotipos de *Salmonella* identificados en este estudio, que expresaron el antígeno flagelar Fase II, se encuentran dentro de los 49 serotipos distintos identificados por Echeita *et al.* 2002²⁸, a partir de un total de 190 cepas de *Salmonella* spp. donadas por el Laboratorio Nacional de Referencia de España.

Identificación de los parásitos.

Se describió en este estudio que a partir de las 155 muestras fecales de los infantes, la prevalencia de *Entamoeba histolytica* fue del 62% (n= 147), seguido de *Giardia lamblia* con el 36% (n= 86) y de *Iodamoeba butschlii* con el 2% (n = 4) (gráfica 4). Los porcentajes coinciden con lo reportado por Ávila-Rodríguez en el 2007⁴², en un estudio realizado en el Centro de Investigación en Alimentos y Nutrición de la Facultad de Medicina-UJED en el estado de Durango, en el cual estudiaron las muestras fecales de 394 niños entre 6 a 36 meses de edad, detectando a *E. histolytica* en el 79.7% de las muestras y a *G. lamblia* en el 20.3%. En otro estudio realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la UNAM, en donde se analizaron las heces de 741 pacientes, se identificó a *Giardia lamblia* en el 29.9%, a *Entamoeba histolytica* en el 7.2% y a *Iodamoeba butschlii* en el 4.7%.⁴³

En México La Dirección General de epidemiología (1994) en el año de 1993 reportó un total de 445,189 casos de amibiasis ocurridos en la República Mexicana y 334,029 casos para 1994, distribuidos principalmente en los estados de Chiapas, Distrito Federal. Edo. de México, Tabasco, Oaxaca, entre otros.³⁸

Los parásitos intestinales son los agentes infecciosos más comunes en los humanos, principalmente entre la población infantil de los países en vía de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud ha estimado que en el mundo existen 3,500 millones de habitantes parasitados y aproximadamente 450 millones padecen enfermedad parasitaria y de ésta la mayor proporción corresponde a la población infantil.^{44, 45}

La frecuencia mundial de las distintas parasitosis intestinales es alta, especialmente en zonas geográficas donde las condiciones ecológicas favorecen la persistencia de los parásitos, además de las características socioeconómicas poblaciones como la pobreza, la ignorancia y la deficiente infraestructura; factores que comparten los países en vías de desarrollo y que, lamentablemente, en América Latina no han presentado modificaciones importantes en los últimos 50 años.⁴³

Resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* identificados por PCR multiplex.

En este estudio se describió que el 100% de los serotipos de *Salmonella* (*S. ohio*, *S. newport* y *S. typhimurium*) identificados por PCR multiplex fueron resistentes a los antibióticos cefalotina (CF), ampicilina (AM), cefotaxima

(CTX) y carbencilina (CB), el 80.6% al sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), el 77.4% a la nitrofurantoína (NF), el 66.1% a la gentamicina (GE), el 59.6% al cloranfenicol (CL), el 51.6% a la netilmicina (NET) (Gráfica 8). La elevada resistencia bacteriana detectada en este trabajo, refleja en la actualidad que el abuso de los antibióticos, tanto para uso humano, como veterinario y agrícola ha ocasionado la selección de bacterias resistentes a los antibióticos, constituyendo un serio problema médico para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por estos microorganismos. Por ejemplo se ha descrito que en los últimos 20 años, han surgido en todo el mundo cepas bacterianas resistentes a múltiples antimicrobianos, entre los cuales podemos encontrar a los serotipos de *Salmonella typhimurium*^{35, 46} y más recientemente *Salmonella Newport* y *Salmonella typhimurium* DT104 (resistente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfametoxazol y tetraciclina), esta última involucrada con agudas infecciones y muertes en animales y humanos en todo el mundo.^{47, 48} Se ha descrito que *Salmonella newport*, es resistente a la amoxicilina-acido clavulánico, cefalotina, cefoxitin y ceftiofur, gentamicina, kanamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y ceftriaxona.⁴⁹

CONCLUSIONES.

🏛 En este estudio se detectó que el 57% de las muestras fecales de los niños asintomáticos fueron positivas para algún serotipo de *Salmonella*.

🏛 Los serotipos identificados por PCR multiplex en las heces de los infantes fueron *S. ohio*, *S. newport* y *S. typhimurium* .

🏛 La prevalencia de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Iodamoeba butschlii* fue elevada en los niños clínicamente sanos.

🏛 La asociación de *S. ohio*, *S. newport* y *S. typhimurium* con *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Iodamoeba butschlii*, evidenció que los niños de nivel primaria analizados en este estudio son portadores sanos de bacterias patógenas y de parásitos.

🏛 La mayoría de los serotipos de *Salmonella* identificados en este estudio presentaron alta resistencia a los antibióticos probados.

🏛 Con base a los resultados obtenidos se puede concluir que la detección de los distintos serotipos de *Salmonella* spp. por PCR multiplex en la materia fecal, podría ser un método rápido y eficaz en el diagnóstico clínico de las infecciones ocasionadas por este microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Molina, J., Ponce de Leon S., Guerrero, M. L., Carvalho, A., Romero, C., Báez, R., *Salmonella* gastroenteritis outbreak among workers from a tertiary care hospital in Mexico City. *Rev. invest Clin.* 1997; 49: 349-353.
2. Gutiérrez-Cogco, L., González-Bonilla, C., Giono-Cerezo, S., Beltrán, L. G., Principales serotipos de *Salmonella* identificados en 10 703 cepas en México entre 1982 y 1993. *Rev. Lat. Microbiol.* 1994; 36:221-226
3. Parilla, C. M. C., Castellanos, J. L. V., Castañeda E.O.S. and Fernandez, L.N., Brotes de intoxicaciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Sal. Púb. Méx.* 1993; 35: 456-463.
4. Murray, P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A., 2002, *Microbiología medica*, 4ª edición, Elsevier, España, 810 p.
5. Parra M., Durango, J., Máttar, S., *Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. Mvz-córdoba.* 2002; 7:(2), 187-200.
6. Clarke R.C. & C.L. Gyles. 1993. *Salmonella*. In Gyles C.L. C.O. Thoen editors. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* 2nd ed. Iowa State University Press. AMES: 133-153.

7. Lucas R.L., C.P. Lostroh, C.C. Diruso, M.P. Spector, B.L. Waner & C.A. Lee. Multiple factors independently regulate hilA and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J. Bacteriol.* 2000; 182:1872-1882
8. McClelland M., K.E. Sanderson, J. Spieth, S.W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston & R.K. Wilson. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *Nature.* 2001; 413:852-856.
9. Popoff, M. Y., Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th ed. *Institute Pasteur*, Paris, France. 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.
10. Brooks, G. F., Batel, J. S., Morse, S. A., 2005. Microbiología clínica de Jawetz. Melnick y Adelberg, 18^a edición, Manual Moderno, México, 786 p.
11. Gómez, T. M., Motarjemi, Y., Miyagawa, S., Kaferstein, F. K., and Stohr, K., Foodborne salmonellosis. *World Health Stat. Q.* 1997; 50:81-89.

12. Zhao, S., Qaiyumi, S., Friedman, S., Singh, R., Foley, S. L., White, D. G., McDermott, P. F., Donkar, T., Bolin, C., Munro, S., Baron, E. J. and Walker R. D., Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Newport Isolated from Humans and Food Animals, *J Clin Microbiol.* 2003; 41(12):5366-5371.
13. Ivanoff, B., Typhoid fever: global situation and W. H. O. recommendations. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1995; 26 (Suppl. 2):1–6.
14. Pang, T., Z. A. Bhutta, B. B. Finlay, and M. Altwegg. Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol.* 1995; 3:253-255.
15. Philips, C. A., and J. T. George, J. T. Guess what's lurking in the lunch. *Biologist.* 1994; 41:76-80.
16. Burnens, A. P., Stanley, J., Sechter, I., and Nicolet, J., Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:l,v:_, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34:1641–1645.
17. Lino, T. Genetics of structure and function of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 1977; 11:161–182.

18. Zieg, J., Silverman, M., Hilmen, M., and Simon, M., Recombinational switch for gene expression. *Science*. 1977; 196:170–172.
19. Newton, S. M., Wasley, R. D., Wilson, A., Rosenberg, L. T., Miller, J. F., and Stocker, B. A., Segment IV of a *Salmonella* flagellin gene specifies flagellar antigen epitopes. *Mol. Microbiol.* 1991; 5:419–425.
20. Wei, L. N., and Joys, T. M., Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*. *J. Mol. Biol.* 1985; 186:791–803.
21. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*. 1985; 230:1350-1354.
22. Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R.K., Horn, G., Erlich, H.A., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986; (S1):263-273.
23. Mullis, K.B., Faloona, F.A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987; 155:335-350.
24. Guyer, R.L., Koshland, D.E. Jr., The molecule of the year. *Science*. 1989; 246:1543-15469.

25. Bellin, T., M. Pulz, A. Matussek, H. G. Hempen, and F. Gunzer. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescently hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:370–374.
26. González-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., González-Andrade, M. C., Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de la salud en México. *Sal Pub Méx.* 2000; 42:490-495ç
27. Herrera-Leon, S., McQuiston, J. R., Usera, M. A., Fields, P. I., Garaizar, J., and Echeita, M. A., Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp, *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (6): 2581-2586.
28. Echeita, M. A., Herrera, S., Garaizar, J. and Usera, M. A., Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. *Rev. Microbiol.* 2002; 153: 107-113.
29. Álvarez, j., Sota, A., Vivanco, A. B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A. and Garaizar, J., Development of a Multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (4): 1734-1738.
30. Larrosa-Haro, A., Ruiz-Pérez, M., Aguilar-Benavides, S., Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y tratamiento de lactantes y preescolares con diarrea aguda. *Sal Púb Méx.* 2002; 44:328-334.

31. Rabsch, W., Tschape, H. and Baumler, A. J., Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microb. Infection*. 2001; 3: 273-247.
32. Organización Mundial de la Salud. Control de la salmonelosis: importancia de la higiene veterinaria y de los productos de origen animal. Informe de un comité de expertos de la OMS. Ginebra: OMS, 1998, (Serie de Informes Técnicos num. 774).
33. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. Programa de Salud Pública Veterinaria. Buenos Aires: *Organización Mundial de la Salud*, 1998:5-6.
34. Tauxe, R. V. Emerging foodborne diseases and envolving public health challenge. *Emerg Infect Dis*. 1997; (3)4:425-434.
35. Glynn, MK, Bopp, C, Dewitt, W, Dabney, P, Mokhtar, M, Ângulo, FJ. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. *N Engl J Med*. 1998; 338:1333-1338.
36. Blaser MJ, Newman LS. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis*. 1982; 4:1096-1106.
37. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. México, D.F.: SSA. 1994:92,187, 281.

38. Secretaría de Salud. Boletín de Epidemiología. Sem 50. México, D.F.: Dirección General de Epidemiología, SSA, 1999.
39. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. México, D.F.: SSA, 1995;I:89, 1995;II:72, 1995;III:72, 1996;I:120, 1996;II:69, 1996;1:69, 1997:136, 232, 424, 1998:172, 266 y 454.
40. Gutiérrez, L., Giono, C. S., Escobar-G. A., Valdespino, G. J. L., Diagnostico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México, D.F.: INDRE-SSA, 1994, 219-234.
41. Concha-Valdez, F. G., Flores-Abuxapqui, J. J., Puc-Franco, M. A., Heredia-Navarrete M. R., Frecuencia del gen spvB en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de niños con y sin diarrea. *Rev Biomed.* 2004; 15:201-206.
42. Ávila-Rodríguez, E. H., Ávila-Rodríguez, A., Araujo-Contreras, J. M., Villarreal-Martínez, A., Douglas, T., Factores asociados a parasitosis intestinal en niños de la consulta ambulatoria de un hospital asistencial. *Rev Méx Pediatr.* 2007; 74 (1): 5-8.
43. Sánchez-Vega, J. T., Tay-Zavala, J., Robert-Guerrero, L., Romero-Cabello, R., Ruíz-Sánchez, D., Rivas-García, C., Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Rev Fac Med UNAM.* 2000; 43 (3):80-83.

44. Ximénez C. Las parasitosis intestinales en México. México: Fundación Mexicana para la Salud, AC. 2002. p. 13-34.
45. World Health Organization. Intestinal Parasites: Control strategies. Available from: <http://www.who.int./ctd/intpara/strategies.html>.
46. Threlfall, E. J., Ward, L. R, Frost, J. A, and Willshaw, G. A., The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 2000;62:1–5.
47. Cody, S. H., S. L. Abbott, A. A. Marfin, B. Schulz, P. Wagner, K. Robbins, J. C. Mohle-Boetani, and D. J. Vugia. Two outbreaks of multidrugresistant *Salmonella* serotype typhimurium DT104 infections linked to rawmilk cheese in northern California. *JAMA.* 1999; 281:1805–1810.
48. Evans, S., and R. Davies. Case control study of multiple-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infection of cattle in Great Britain. *Vet. Rec.* 1996; 139:557–558.
49. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Newport—United States, January–April 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2002; 51:545–548.