



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Prevalencia de *Salmonella* spp en
alimentos consumidos
en comercios ambulantes**

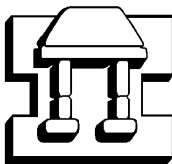
T E S I S
PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

DIANA PICAZO VILLANUEVA

**M en C. ERIC MONROY PÉREZ
DIRECTOR DE TESIS**



IZTACALA

México

2009



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.

INDICE

Resumen	3
Introducción y Antecedentes	4
Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
Resultados	22
Discusión	29
Conclusiones	35
Bibliografía	36

RESUMEN

En los países en vías de desarrollo la *Salmonellosis* adquirida por alimentos contaminados continúa siendo una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad. El propósito de este estudio fue identificar por PCR multiplex los principales serotipos de *Salmonella* en un grupo de alimentos. Se analizaron un total de 36 alimentos recolectados en puestos ambulantes ubicados en la periferia de la FES Iztacala. El 50% (n = 18) de los alimentos analizados fue positivo para algún serotipo de *Salmonella*, dentro de los cuales *Salmonella ohio* se identificó en el 40% (n = 14), *Salmonella anatum* en el 5.7% (n = 2), *Salmonella newport* (n = 1) y *Salmonella infantis* en el 2.8% (n = 1), en cada caso. El 100% de los serotipos de *Salmonella* identificados en los alimentos mostró resistencia a la ampicilina, carbenicilina, gentamicina amikacina y cefalotina. La elevada frecuencia de *Salmonella* en los alimentos expendidos en la periferia de la FES Iztacala, podría representar un riesgo de salud para los consumidores de la población universitaria.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) representan uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, anualmente se registran un total de 6 a 81 millones de casos (1). Dentro de las ETAS, las infecciones gastrointestinales (diarrea) son consideradas las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo, principalmente en niños, en donde se ha reportado que en cada minuto que transcurre mueren 10 niños menores a los cinco años de edad (2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que de un total de 500 millones de personas que viajan anualmente como turistas, más del 50% experimentan diarrea (entre el 20 y 50% de estos casos son causados por agentes infecciosos) (3).

En México en los años de 1980-1989, las diferentes instituciones de salud, 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 (4). 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 perfringens* (177 casos) y *Klebsiella pneumonie* (85 casos y 28 defunciones).

Dentro de las bacterias que pueden ocasionar infecciones gastrointestinales por la ingesta de agua o alimentos contaminados se encuentra *Escherichia coli*, *Shigella* spp, *Salmonella* spp, entre otras (tabla 1) (5).

P A T Ó G E N O
Rotavirus
<i>E. coli</i> enterotoxigénica
<i>E. coli</i> 015-H7
<i>Klebsiella</i> spp
<i>Salmonella</i> spp
Adenovirus
Virus de la Hepatitis A
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Clostridium</i>
<i>Bacillus cereus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Giardia lamblia</i>
<i>Shigella</i> spp.
<i>Pseudomonas</i> spp
<i>Entamoeba histolitica</i>
<i>Campylobacter</i> spp
<i>Yersenia enterolitica</i>
<i>Candida albicans</i>
<i>Trichinella spiralis</i>
<i>Ascaris lumbricoides</i>
<i>Trichuris trichiura</i>
Citomegalovirus

Tabla1. Principales patógenos que contaminan los alimentos y el agua (1984-1999).

Características y patología de *Salmonella*

Las bacterias pertenecientes al género de *Salmonella* spp son bacilos Gramnegativos, de 0.7–1.5 x 2.05 micras, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son organismos aerobios facultativos y se encuentra en el tracto intestinal y materia fecal, tanto de humanos como de animales.

Las enfermedades producidas por *Salmonella* son de dos tipos, las fiebres entéricas y la gastroenteritis. En ambas infecciones, las bacterias se ingieren con los alimentos y agua contaminada, para posteriormente iniciar la infección mediante la adherencia y la colonización del tracto intestinal (6).

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 una semana. Se caracteriza por náuseas y vómito, 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 (7).

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 (7)

Resistencia a antibióticos

El uso de los antibióticos tanto para uso humano como veterinario y agrícola, ha ocasionado la selección de bacterias resistentes a estos agentes (8). Un ejemplo de esto lo constituyó el estudio realizado en México sobre 697 cepas clínicas de *Salmonella* y 195 de *Shigella*, en donde se detectó que el 20.5% de las primeras fue resistente a ocho o más antibióticos, en tanto que el 17% de las segundas fue resistente a cuatro o más antibióticos (8).

De esta manera el uso indiscriminado de los antimicrobianos puede seleccionar cepas multirresistentes a estos agentes, las cuales pueden tener grandes efectos de salud sobre la población, por ejemplo en México en el año de 1972 y 1973 ocurrió una epidemia de fiebre tifoidea, en donde se encontró un mínimo de 10,000 casos, con una mortalidad de 10 a 12%. La cepa de *Salmonella typhi* causante de la infección era resistente al cloranfenicol, antibiótico de primera elección, así como a la sulfonamida, tetraciclina y estreptomicina (9).

La alta frecuencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos debido a que poseen plásmidos representa un serio problema para el tratamiento eficaz de los pacientes infectados y, a nivel poblacional, la presencia de plásmidos constituye una grave fuente de diseminación de la resistencia, toda vez, que muchos plásmidos que confieren resistencia a antibióticos son capaces de transferirse a otras bacterias de la misma especie, de especies distintas, e incluso, de géneros diferentes.

La resistencia a antibióticos mediada por plásmidos fue descrita por primera vez en Japón (10) y posteriormente confirmada en las epidemias de disentería bacilar causadas por *Shigella dysenteriae* en centro América y el Sur de México en 1969-1970 (11). La cepa causante de la epidemia contenía un plásmido que le confería resistencia a varios antibióticos, entre ellos los de elección.

A menor escala, en los hospitales, también se han encontrado cepas multirresistentes portadoras de plásmidos. Así por ejemplo, en una unidad de quemados de un hospital de Seattle ocurrió un brote de infección por *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, ambas cepas poseían al mismo plásmido que les confería la resistencia (12).

Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos

Se ha descrito que los mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por plásmidos pueden agruparse en 4 categorías (13):

- A) Inactivación del antibiótico.
- B) Alteración del sitio blanco que actúa como receptor al antibiótico.
- C) Disminución del transporte del antimicrobiano al interior de la célula.
- D) Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco.

Los mecanismos de resistencia y los mecanismos de acción de los principales grupos de antibióticos se aprecian en la tabla 2.

ANTIBIOTICOS	MECANISMOS DE ACCIÓN	BLANCO DE ACCIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA	BASE GENÉTICA
<input type="checkbox"/> lactámicos <ul style="list-style-type: none"> • Penicilinas • Cefalosporinas 	Inhibición de la síntesis de la pared celular	Proteínas de unión de la penicilina (PBPs)	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis del anillo <input type="checkbox"/> lactámico (<input type="checkbox"/> lactamasas) • Alteración del blanco (PBPs) 	Plásmido y cromosoma
Macrólidos y lincosamidas	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> • Metilación del material ribosomal 23s (metilasa) • Hidrólisis de la lactona de eritromicina (eritromicina-esterasa) 	Plásmido y cromosoma
Cloranfenicol	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	Modificación del antibiótico evitando su unión al ribosoma (cloranfenicol-acetil-transferasa)	Plásmido
Aminoglucósidos <ul style="list-style-type: none"> • estreptomicina • neomicina • kanamicina • gentamicina 	Inhibición de la síntesis de proteínas	Subunidad 50s del ribosoma	<ul style="list-style-type: none"> • Modificación del antibiótico impidiendo su transporte (acetil-transferasa, fosfatidil-transferasa, adenil-transferasa-metilasa) • Modificación de la subunidad 50s del ribosoma • Disminución de la captación por la célula 	Plásmido y cromosoma Plásmido Cromosoma
Quinolonas y ácido nalidixico	Inhibición de la Replicación, Transcripción, Recombinación y superenrollamiento del ADN	ADN girasa	<ul style="list-style-type: none"> • Mutación sobre ADN girasa • Disminución de la permeabilidad • Eflujo 	Cromosoma Cromosoma Cromosoma
Tetraciclina	Inhibición de la síntesis de proteínas	Proteína de la subunidad ribosómica 30s	Interferencia con el transporte de la droga (proteínas inducibles)	Plásmido
Sulfonamidas Trimetoprim	Inhibición de la síntesis del ácido fólico		Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco	Plásmido

Tabla 2. Mecanismos de Acción y de Resistencia a los antibióticos por las bacterias

Mecanismo de variación de fases en *Salmonella* spp

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 *FliC* (antígenos flagelares fase I) y *FljB* (antígenos flagelares fase II). De esta manera solo un antígeno flagelar es expresado en un tiempo.

En el mecanismo de variación de fases, se encuentra implicado el operón *fljBA*, el cual 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 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 creó determina los epítopes de los antígenos H (14).

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 (15).

Recientemente se desarrollo un método de de PCR multiplex, parecido al desarrollado para Fase II, con el que se puede detectar alelos flagelares de Fase I más comunes (14).

En los últimos años el desarrollo de la PCR múltiplex 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 (16). 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 *fljB* (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 (17).

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 (18,19,20), 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 un 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” (21).

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

OBJETIVO GENERAL

- Identificar los diferentes serotipos de *Salmonella* spp. por PCR multiplex en alimentos expendidos en puestos ambulantes de la periferia de la FES Iztacala.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar por PCR multiplex los principales serotipos de *Salmonella* que expresan el flagelo de Fase I.
- Detectar los principales serotipos de *Salmonella* que expresan el flagelo de Fase II por PCR multiplex.
- Determinar la resistencia a antibióticos por el método de kirby Bauer en los serotipos de *Salmonella* detectados

MATERIALES Y MÉTODOS

Transporte de los alimentos

Para el desarrollo de este estudio un grupo de alimentos fueron recolectados y transportados en frascos estériles al Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala, UNAM.

Procesamiento de los alimentos

De cada uno de los alimentos recolectados se tomó una muestra de 25g y se maceró por medio de un mortero estéril. Al término fueron depositados en un matraz que contenía 225 ml de agua peptonada y se incubaron a 37° C por 24 horas. Después de agitar vigorosamente el matraz, se tomó una muestra del cultivo, se sembró por el método de estría cruzada en el medio de agar MacConkey y se incubó a 37° C por 24 horas.

Obtención 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 se mezcló en un vortex por 20 segundos y se llevó a ebullición 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 (que contenía el DNA templado) y se guardó a -20°C para su posterior utilización.

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

Los primers (tabla 3) y el ensayo de PCR multiplex que utilizamos para detectar los distintos serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase I, fue el descrito por Herrera *et al* (14). El volumen final de la mezcla de reacción para PCR fue de 25 μl , la cual contenía 2 μl de DNA templado, 8.5 μl de nuclease free water estéril, 1 μl de cada primer (5 pmol); Sense 60, Antisense-i, Antisense-z₁₀, Antisense-lv, Antisense-r, Forward G, Reverse-G, Forward-Sdf-1, Reverse-Sdf-1, 1.4 μl (7 pmol) de los primers; Reverse-eh, Antisense-b, Forward-d y Reverse-d (todos los primers serán de Sigma-Genosys), 1.5 mmol de MgCl_2 , 0.5 U de AmpliTaq polimerasa y 100 mmol de dNTPs (PuRetaqTM Ready-To-GoTM PCR beads), 1.5 de buffer para PCR. 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 por 7 minutos a 72°C .

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

El método de PCR y los primers que utilizamos (tabla 4) para identificar los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase II, fue el descrito por Echeita *et al.* (15), 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 μ l 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. Las cepas de referencia de *Salmonella* que utilizamos como control para la PCR fueron; *Salmonella typhimurium* y *Salmonella infantis*.

Para los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase I, nosotros identificamos 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	CCTGTCACTTTCGTGGTTAT	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 3. 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	CTTATGCCRATAATGGTACTACACTG	568-594
Antisense- R5mod	GGTTACAGVAGCCGTACCAG	666-647
Antisense-R6	CTCCTGTACTTCTGTTTTGGTTGTA	858-834
Antisense-R7	TAATCGCCATTTTTGTCGAG	758-739
Antisense-R1mod	TTGACCAAYKYMGCSCAT	957-938
Sense-Fw	GTGGGGCAACMCTCAATACTG	569-589
Antisense-Rw	CCTGCCACTTTCGTGGTTGC	809-790
Sensen-Fe	GGCAACCCGACAGTAACTGGCGATAC	631-656
Antisense-Rx	CCATCCTTAAAGGATACGGC	685-667
Antisense-Rz15	ATCAACGGTAACTTCATATTTG	765-744

Tabla 4. Primers utilizados en la detección del antígeno flagelar de fase II por PCR multiplex

Susceptibilidad a antibióticos en los serotipos de *Salmonella* identificados

Una vez identificadas las bacterias se utilizó la técnica de Bauer-Kirby para probar la sensibilidad y/o resistencia de cada cepa encontrada, para lo cual se tomaron 5 colonias (de cada cepa) con un asa estéril y se inocularon en 5 ml de caldo Mueller Hinton, se incubaron a 37° C hasta que apareció una turbidez ligera (3 horas), la turbidez se ajustó con solución salina estéril hasta que se obtuvo 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), el estándar correspondió a 10⁸ microorganismos/ml. Posteriormente se inoculó sobre el agar de Mueller-Hinton 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 (Sanofi, diagnostics, Pasteur), con una pinza estéril y se colocó sobre el agar de Mueller-Hinton. Así el antimicrobiano se difundió formando un gradiente de concentración, que inhibió o permitió el crecimiento de la bacteria en un tiempo de 24 h a 37° C. De esta manera las cepas se clasificaron como susceptibles (S) o resistentes (R) dependiendo del halo de inhibición (el cuál se midió con un vernier), conforme a las recomendaciones del fabricante respecto a los puntos de corte (Tabla 5). La cepa control utilizada para medir la reproducibilidad de esta técnica fue *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

ANTIBIÓTICO	ABREV.	FAMILIA	ACCION ^Y	DIAM. HALO INH. (mm) ^Z		
				R	I	S
Ampicilina	AM	Aminopenicilina	1	<28		>29
Cefalotina	CF	Cefalosporina de 1ª Gen.	1	<14	15-17	>18
Cefotaxima	CTX	Cefalosporina de 3ª Gen.	1	<14	15-22	>23
Ceftazidima	CAZ	Cefalosporina de 3ª Gen.	1	<14	15-17	>18
Cefuroxima	CXM	Cefalosporina de 2ª Gen.	1	<14	15-17	>18
Dicloxacilina	DC	Penicilina semisintetica	1	<10	11-12	>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	11-15	>16

Tabla 5. Antibióticos utilizados contra los serotipos de *Salmonella* identificados.

^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

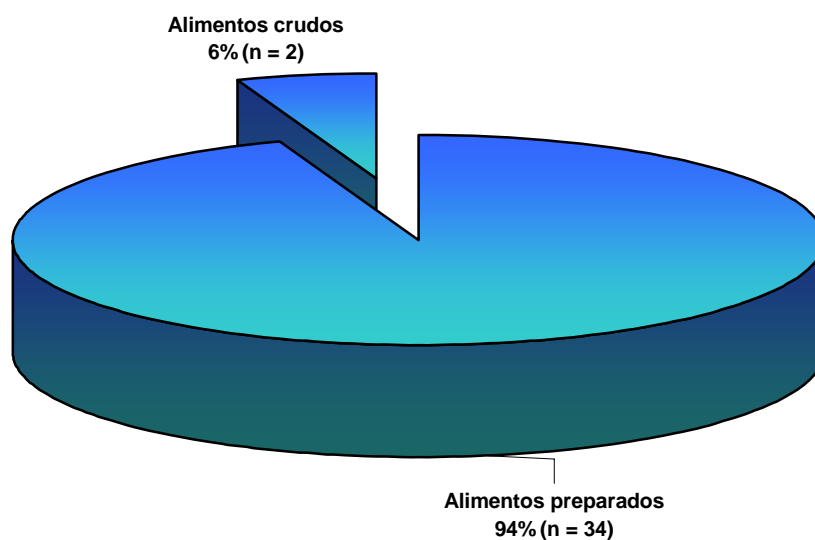
Alimentos Analizados

Para el desarrollo de este estudio se analizaron un total de 36 alimentos recolectados en puestos ambulantes ubicados en la periferia de la FES Iztacala. En la tabla 6 se observa que el 25% (n = 9) de los alimentos analizados fueron tacos de diferentes guisados (suadero, al pastor, longaniza, etc), el 18.8% (n = 5) correspondió a tortas (varias) y a enchiladas, en cada caso y el 5.5% (n = 2) a tortas de papa, gorditas de papa, sincronizadas, hamburguesas y verduras con queso, en cada caso. El 2.7% (n = 1) correspondió a hotdog, quesadilla de camarón, empanada, mollete, papas, chilaquiles y sopa, en cada caso.

Alimento	Número	Porcentaje
Tacos	9	25.0
Tortas	5	13.8
Enchiladas	5	13.8
Tortas de papa	2	5.5
Gorditas de papa	2	5.5
Sincronizadas	2	5.5
Hamburguesas	2	5.5
Verdura con queso	2	5.5
Hot dog	1	2.7
Quesadilla de camarón	1	2.7
Empanada	1	2.7
Mollete	1	2.7
Papas	1	2.7
Chilaquiles	1	2.7
Sopa	1	2.7
Total	36	100

Tabla. 6. Alimentos analizados para *Salmonella* spp.

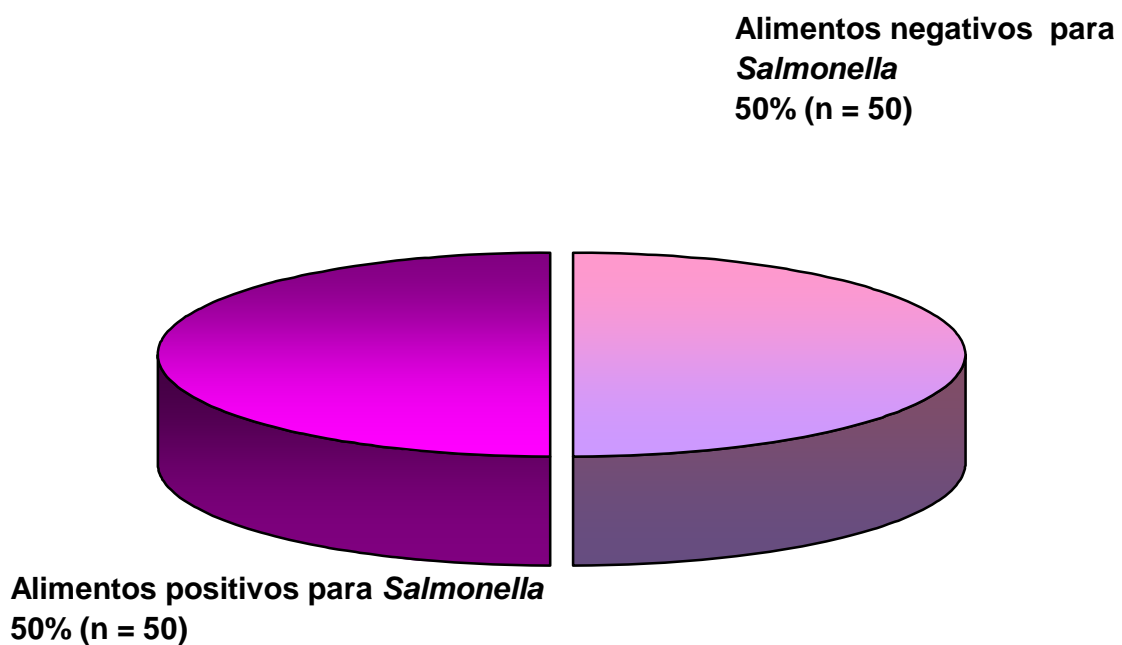
En la gráfica 1 se aprecia que el 94.4% de los alimento analizados fueron preparados y el 5.6% crudos.



Gráfica 1. Distribución de los alimentos analizados

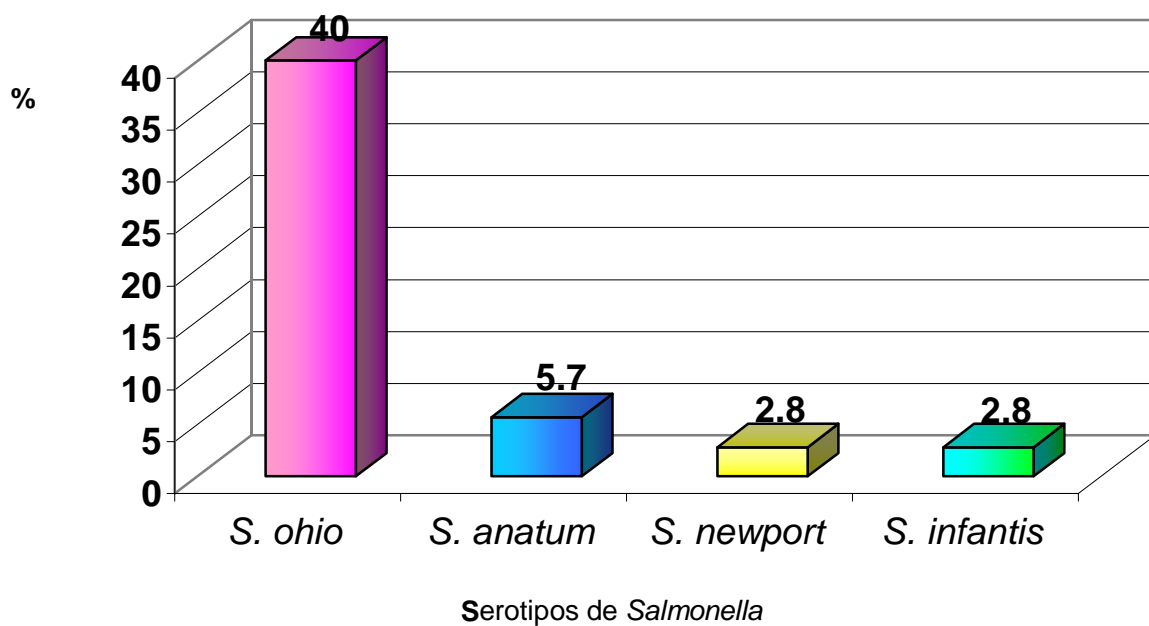
Identificación de los distintos serotipos de *Salmonella* en los alimentos analizados por PCR multiplex.

En la gráfica 2 se aprecia que en el 50% (n = 18) de los alimentos analizados se identificó al menos algún serotipo de *Salmonella*



Gráfica 2. Detección de *Salmonella* spp. en los alimentos analizados

A partir de los 18 alimentos positivos para *Salmonella* (50 %) (Gráfica 2), *Salmonella ohio* se identificó en el 40% (n = 14), *Salmonella anatum* en el 5.7% (n =2), *Salmonella newport* (n = 1) y *Salmonella infantis* en el 2.8% (n = 1), en cada caso (Gráfica 3, figura 1 y 2, respectivamente).



Grafica 4. Distribución de los serotipos de *Salmonella* spp. identificados en los alimentos por PCR multiplex

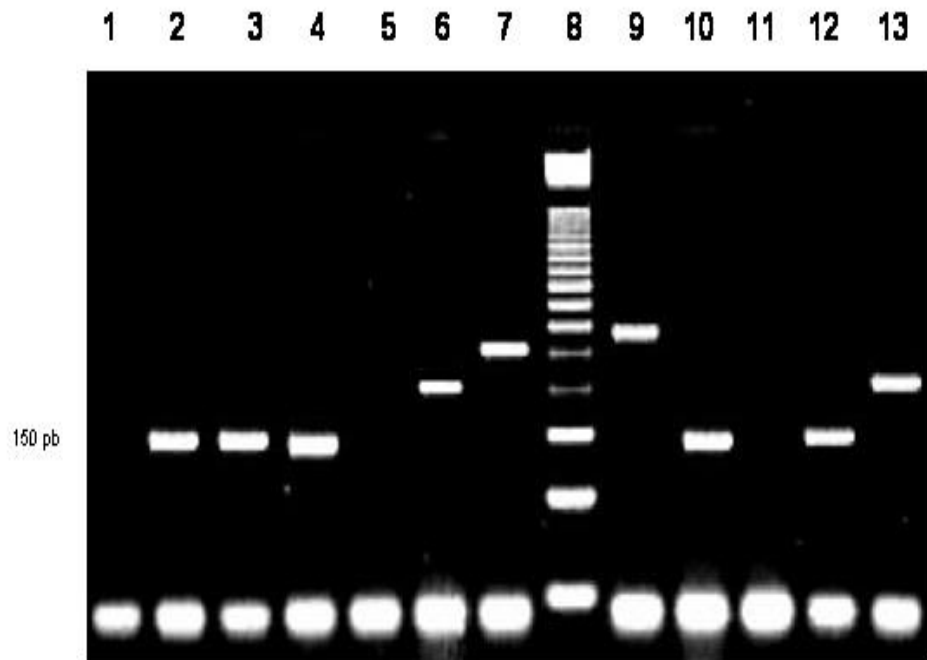


Figura 1. Detección de los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase I por PCR multiplex. Línea 1; Control negativo (sin ADN). Línea 2,3 y 4; *Salmonella ohio* (150 pb) detectadas en muestras de alimentos. Línea 5 y 11; muestras negativas. Línea 6: *S. newport* (200 pb) detectada en un alimento. Línea 7 *Salmonella typhimurium* (control, 250 pb). Línea 8; 50 pb Ladder. Línea 9; *S. infantis* (275 pb) identificada en alimentos. Línea 10 y 12; *Salmonella ohio* (150 pb) detectada en muestras de alimentos. Línea 13; *Salmonella anatum* (200 pb) detectada en alimentos.

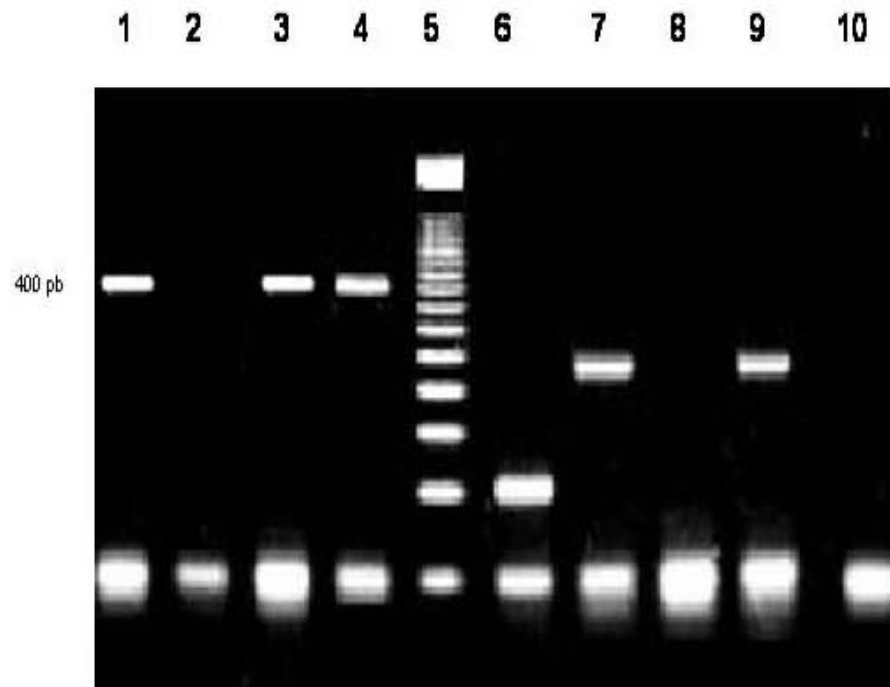
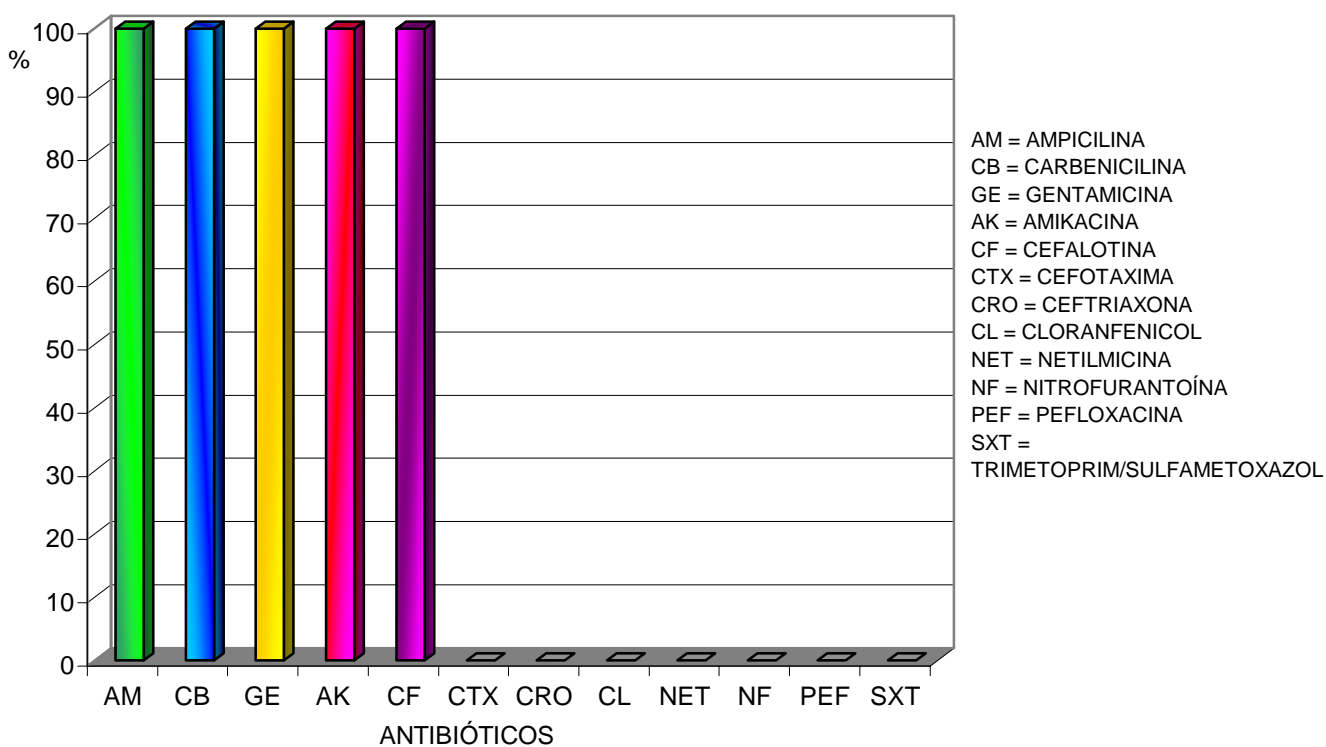


Figura 2. Detección de los serotipos de *Salmonella* que expresan el antígeno flagelar de Fase II por PCR multiplex. Línea 1; *Salmonella newport* (400 pb) identificada en un alimento. Línea 2; Control negativo (sin ADN). Línea 3; muestra negativa. 4; *S. typhimurium* (control, 400 pb). Línea 5; 50 pb ladder. 6; *S. infantis* (100 pb) detectada en alimentos . Línea 7 y 9; *S. ohio* (250 pb) identificada en muestras de alimentos. 10; Muestra. negativa

Susceptibilidad a los antibióticos de los serotipos de *Salmonella* identificados en los alimentos.

El 100% de los serotipos de *Salmonella* identificados en los alimentos fue resistente a la ampicilina, carbenicilina, gentamicina amikacina y cefalotina (Gráfica 5).



Gráfica 5. Resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* identificados en los alimentos

DISCUSIÓN

En este estudio describimos que el 50% (n = 18) de los alimentos recolectados en puestos ambulantes ubicados en la periferia de la FES Iztacala presentó algún serotipo de *Salmonella* (gráfica 2). Nuestros datos son superiores a los reportados en un amplio estudio realizado en 1300 alimentos recolectados en diferentes lugares del Estado de Tamaulipas durante el 2005 (22), en donde se encontró que la prevalencia de *Salmonella* spp en los alimentos fue del 1.9% (n = 24). *Salmonella* es una bacteria de amplia distribución mundial que es capaz de contaminar gran variedad de alimentos y de infectar a varias especies de hospederos (23). La salmonelosis es una enfermedad que presenta una distribución estacional con el máximo de casos localizados entre los meses de abril a septiembre, tanto en humanos como en hospederos no humanos (24). Dada la importancia de la transmisión de este agente por medio de alimentos contaminados, varios estudios se han enfocado en evaluar la incidencia de la infección por *Salmonella* en diversas especies animales de importancia comercial, tanto en México como en el extranjero (25), así como la contaminación de los alimentos por esta bacteria (26).

En los Estados Unidos de América se calcula que *Salmonella* causa 1.3 millones de casos clínicos, 15,000 hospitalizaciones y 500 muertes al año debido a la intoxicación por consumo de alimentos contaminados,

considerándose un problema de salud pública (27). 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) (27). Por su parte en México se han reportado brotes de intoxicación alimentaria causados por *Salmonella enteritidis* (28), sin embargo se ha estudiado poco la prevalencia en alimentos, por lo que creemos es necesario se creen programas de vigilancia a nivel nacional. Los reportes conocidos incluyen: la incidencia de enteropatógenos presentes en alimentos comerciales y del hogar, en donde muestran que las comidas preparadas en casa son las de mayor incidencia de enteropatógenos, entre ellos *Salmonella* (29); la serotipificación de aislamientos de *Salmonella* a partir de fuentes humanas y no humanas en el periodo de 1972 a 1999, en donde se mostró que el serotipo *S. enteritidis* se incrementó gradualmente y desplazó *S. thyphimurium*, siendo actualmente el serotipo que se aísla con mayor frecuencia (30); el análisis por fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* a partir de aves de corral (31) y la detección de *Salmonella* spp. en camarón de exportación del Estado de Sinaloa (32).

Desde la década de los ochenta, la incidencia de salmonelosis en el mundo industrializado ha aumentado considerablemente y ha alcanzado

proporciones epidémicas en varios países (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 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).

La salmonelosis es una enfermedad aguda que 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 (36). 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 (37).

Identificación de los distintos serotipos de *Salmonella* en los alimentos analizados por PCR multiplex.

En el presente estudio nosotros analizamos los cultivos de las muestras de 36 alimentos, para lo cual utilizamos por separado dos reacciones de PCR multiplex que nos permitió amplificar las regiones internas variables de los genes *fliC* y *fljB* de *Salmonella* que codifican para los antígenos flagelares 1 y 2, respectivamente (figura 1 y 2). En nuestro estudio la prevalencia de *Salmonella* en los alimentos fue del 50% (n = 18) (gráfica 2), dentro de las cuales los serotipos más importantes fueron *Salmonella ohio* con el 40% (n = 14), *Salmonella anatum* con el 5.7% (n = 2), *Salmonella newport* (n = 1) y *Salmonella infantis* con el 2.8% (n = 1), en cada caso (gráfica 3, figura 1 y 2, respectivamente). La elevada frecuencia de *Salmonella* detectada en los alimentos expendidos en la periferia de la FES Iztacala, refleja que el consumir alimentos en estos locales podría representar un riesgo de salud para la población universitaria. La presencia de *Salmonella* en los alimentos ya ha sido reportada en un amplio estudio realizado en 1300 alimentos muestreados en el Estado de Tamaulipas en el años del 2005, en donde se encontró que de los 24 alimentos positivos, el serotipo más frecuente fue *S. enteritidis* con el 53% (n = 14), seguido de *S. anatum* y *S. kentucky* con el 12.5% y el 8.3%, respectivamente (22). Las serovariedades encontradas por

nosotros, coinciden con las identificadas por las encontradas en un amplio estudio realizado en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, en Majadahonda Madrid, España, en el que detectaron por PCR multiplex el gen *fljB* (codifica para el flagelo 2) de un total de 190 cepas de *Salmonella* spp. donadas por el Laboratorio Nacional de Referencia de España (14), y en el cual se identificaron un total de 49 serovariedades distintas. Nuestras serovariedades también coinciden con las detectadas en otro estudio realizado dos años más tarde en el mismo Instituto de Salud Carlos III, en el que detectaron por PCR multiplex el gen *fliC* (codifica para el flagelo 1) de un total de 161 cepas de *Salmonella* spp., en donde se identificaron un total de 72 serovariedades diferentes (15).

En México en un estudio realizado en 24,934 cepas de *Salmonella* recuperadas de pacientes infectados en diversos centros de salud públicos y privados de la República Mexicana en el periodo de 1972 a 1999, se detectaron un total de 199 serovariedades distintas, predominando *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. derby*, *S. agona*, *S. anatum*, *S. typh*, *S. newport*, *S. infantis* entre otras (38).

Susceptibilidad a los antibióticos de los serotipos de *Salmonella* identificados en los alimentos

Nosotros en este estudio describimos que el 100% de los serotipos de *Salmonella* (*S. ohio*, *S. anatum*, *S. newport* y *S. infantis*) identificados por PCR multiplex fueron resistentes a la ampicilina, carbenicilina, gentamicina, amikacina y cefalotina (Gráfica 5). 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* (39,40) 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 (41,42). Se ha descrito que *Salmonella newport*, es resistente a la amoxicilina-acido clavulánico, cefalotina, gentamicina, kanamicina, trimetoprim-sulfametoxazol y ceftriaxona (CDCP, 2002)

CONCLUSIONES

1. La mitad de los alimentos recolectados en los puestos ambulantes de la periferia de la FES Iztacala se encontraron contaminados por *Salmonella*.
2. Las serovariedades más importantes de *Salmonella* identificadas en los alimentos fueron *Salmonella ohio*, *Salmonella anatum*, *Salmonella newport* y *Salmonella infantis*.
3. La elevada frecuencia de *Salmonella* en los alimentos expendidos en la periferia de la FES Iztacala, refleja que el consumir alimentos en estos locales podría representar un riesgo de salud para la población universitaria, y más aún si consideramos la elevada resistencia bacteriana a los antibióticos.
4. El uso del PCR multiplex en este estudio resultó ser un método eficaz, rápido y confiable en la identificación de las distintas serovariedades de *Salmonella*, por lo que sugiere se incorpore en las técnicas microbiológicas de los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coria J, Villalpando S, Gómez D, Treviño A. 2001. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. *Rev Mex Ped* 68 (5): 200-215.
2. Snyder, J.D, Merson, M.H. 1982. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease; a review of active surveillance data. *Bulletin of the World Health Organization*. 60(4).
3. HHO. World Health Statistics Annual. 1984. Ginebra.
4. Dirección General de Epidemiología. 1990. Informe Semanal. p. 52.
5. Flores-Abuxapqui JJ, Suárez GJH, Puc Franco MA, Hereida MRN, Franco JM. 1993. Prevalencia de enteropatógenos en los niños con diarrea Líquida. *Rev Lat-Amer Microbiol*. 35:351-3561.
6. Freeman, B.A. 1985. *Microbiología de Burrows*. Vigésima segunda edición. Editorial Mc. Graw Hill.
7. Fernández CJ, Pinedo SA, Carnero VM. 2001. Intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias. *Medicina Preventiva y Sal Pub*. 481-490.
8. Kuperstoch-Portnoy YM. 1981. Antibiotic Resistance of Gramnegative bacteria in México: Relationship to drug consumption. En Levy, S.B.; R.C. Clowes, E.L. Koenig (eds). "Molecular

- Biology, Pathogenicity, and Ecology of bacterial plasmids,. pp.529-537. Plenum Press. New York.
9. Kumate J. 1981. Antibióticos y quimioterápicos, 2ª. Ed. Méndez Cervantes, México, D.F. pp.51-82.
 10. Watanabe T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev.* 27:87-115
 11. Mata LJ, Gangarosa EJ, Cáceres A. Perera DR, Mejicanos ML. 1970. Epidemic Shiga Bacillus dysentery in Central America. I. Etiologic Investigations in Guatemala *J Infec Dis.* 122: 170-180.
 12. Elwell, L. 1978. Common plasmid specifying tobramycin resistance in two enteric bacteria isolated from burn patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 13:312-317.
 13. Amábile Cuevas, C.F. 1988. La resistencia bacteriana a los antibióticos *Ciencia y desarrollo.* 80(XIV): 57-68.
 14. Herrera. S, Mc Quiston. R.J, Usera M.A, Fields I. P, Garaizar. J, Echeita. A. M. 2004. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. *J Clin Microb.* 42:2581-2586.
 15. Echeita. M.A, Herrera. S, Garaizar. J, Usera. M.A. 2002. Multiplex PCR based detection and identification of the most common salmonella second-phase flagellar antigens. *Rev Microbiol.* 153:107-113.

16. Mendez. A. S, Pérez. R. E. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Emferm Infec Microbiol Clin.* 22(3):183-192.
17. Octavio García-González. DNA based typing of *Salmonella* spp. using *fljB* and *fliC* gene sequences. 2005. Master Thesis Disertation Manuscript. Swedish Institute for Infection Disease Control (Smittskyddsinstitutet). Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
18. Saiki RK; Scharf S; Faloona F; Mullis KB; Horn GT; Erlich HA; Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-1354.
19. Mullis KB; Faloona FA; Scharf S; Saiki RK; Horn G; Erlich HA. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* (S1):263-273.
20. Mullis KB; Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155:335-350.
21. Guyer RL; Koshland DE Jr. 1989. The molecule of the year. *Science* 246:1543-15469.
22. Charles HGL, Medina SCE; Hernández R J. 2005. Prevalencia de *Salmonella* spp. en alimentos en el estado de Tamaulipas. *Rev Inv Clín.* 59:437-443.

23. Jay S, Grau FH, Smith K, Lightfoot D, Murria C, Davey GR. 1997. *Salmonella* In: Hocking AD, Arnold G, Jenson I, Newton K, Sutherland P. (eds). Foodborne microorganisms of public health significance. 5th ed.
24. Rodríguez A, Pangloli P, Richards HA, Mount JR, Draughon FA. 2006. Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental frame samples. *J Food Prot.* 69:2576-2580.
25. Ramírez G, Martínez R, Herradora m, Castrejón F, Galván E. 2005. Isolation of *Salmonella* spp. from liquid and solid excreta prior to and following ensilage in ten swine farms located in central México. *Bioresour Technol.* 96:587-595.
26. Castillo A, Villarruel-López A, Navarro-Hidalgo V, Martínez-González NE, Torres- Vitela MR. 2006. *Salmonella* and *Shigella* in Freshly Squeezed Orange Juice, Fresh Oranges, and Wiping Cloths. Collected from public Markets and street booths in Guadalajara, México. Incidence and comparison of Analytical Routes. *J Food Prot.* 69:2595-2599.
27. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5:607-625.

28. Chávez DME, Higuera I AL, Huertas JMA, Báez MR, Morales DJ, Arteaga CF. 2001. Brote por *Salmonella* enteritidis en trabajadores de un hospital. *Sal Púb Mex.* 43:211-216.
29. Word LV, Furguson LE. Hogan P, Thurman D, Morgan DR, Dupont HL. 1983. Incidence of bacterial enteropathogens in foods from México. *Appl Environ Microbiol.* 46:328-332.
30. Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., González-Andrade, M. C., 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de la salud en México. *Sal Púb Méx,* 42:490-495
31. Mancera MA, Vázquez NJ, Heneidi ZA. 2004. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. *Tec Pec Mex.* 42:287-294.
32. Pérez CL, Ñúñez EJF, Villagómez ZDA, Nicoli TM, Rubio LM. 2005. Inocuidad bacteriológica en camarón para exportación en México. *Vet Méx.* 36:411-423.
33. Organización Mundial de la Salud. 1998. 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, (Serie de Informes Técnicos núm. 774).
34. Tauxe, R. V. 1997. Emerging foodborne diseases and involving public health challenge. *Emerg Infect Dis.* (3)4:425-434.

35. Glynn, MK, Bopp, C, Dewitt, W, Dabney, P, Mokhtar, M, Ângulo, FJ. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. *N Engl J Med*. 338:1333-1338.
36. Secretaría de Salud. 1999. Boletín de Epidemiología. Sem 50. México, D.F. Dirección General de Epidemiología, SSA.
37. Dirección general de Epidemiología, Secretaria 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, 1997,:136, 232, 424, 1998:172, 266 y 454.
38. González-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., González-Andrade, M. C. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de la salud en México. *Sal Púb Méx*. 42:490-495
39. Glynn, MK, Bopp, C, Dewitt, W, Dabney, P, Mokhtar, M, Ângulo, FJ. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. *N Engl J Med*; 338:1333-1338.
40. Threlfall, E. J., Ward, L. R, Frost, J. A, and Willshaw, G. A., 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int. J. Food Microbiol*. 62:1-5.
41. Cody, S. H., S. L. Abbott, A. A. Marfin, B. Schulz, P. Wagner, K.

- Robbins, J. C. Mohle-Boetani, and D. J. Vugia. 1999. Two outbreaks of multidrugresistant *Salmonella* serotype Typhimurium DT104 infections linked to rawmilk cheese in northern California. *JAMA* 281:1805–1810.
42. Evans, S., and R. Davies. 1996. Case control study of multiple-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infection of cattle in Great Britain. *Vet. Rec.* 139:557–558.
43. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Newport—United States, January–April. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:545–548.