

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**COMPARACIÓN POR RIBOTIPIA DE CEPAS DE *Salmonella typhi*
AISLADAS EN EL HOSPITAL ROOSEVELT, GUATEMALA DURANTE
1986 Y 2000-2003**

LILIAN ANDREA MARTÍNEZ CARRERA

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, abril de 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**COMPARACIÓN POR RIBOTIPIA DE CEPAS DE *Salmonella typhi*
AISLADAS EN EL HOSPITAL ROOSEVELT, GUATEMALA DURANTE
1986 Y 2000-2003**

INFORME DE TESIS

Presentado por

LILIAN ANDREA MARTÍNEZ CARRERA

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, abril de 2005

ACTO QUE DEDICO

A Dios: Porque Tú haces de los sueños, metas. Y, aunque el tiempo pareciera largo o el trabajo imposible, tomas lo que no es para que sea, para que en momentos como éste, toda la honra sea para ti.

A mis padres: Lilian Elizabeth Carrera Orellana de Martínez, por brindarme todo lo necesario para luchar; y Guillermo Martínez Oliva, por enseñarme que no importan los desalientos, se puede llegar.

A mis hermanos: Guillermo José y Pablo Josué, por ser ejemplo para mí de nobleza y amistad.

A mis amigos: A los de la promo, en especial a Sheilee Díaz, Lesbia Pineda, Mary Córdoba, Karlita Armas, Guicho Espinoza, Carlitos Serrano, Gaby Abdalla, Luis Osorio, Alejandra Castillo, Laura Barragán, Carola Astorga y Marta María Méndez. Porque hicieron de cada día, algo para recordar.

Con cariño y admiración a Ana Lidia Cabrera, Rebeca Méndez, Miriam Miyares y Karla Escobar.

A las familias: Mazariegos Bock, porque a través del tiempo nuestra amistad perdura. Rueda Carrillo, Cristian y Jorge Luis, por ser mis amigos y hermanos. Afre Galicia, por darme siempre de su cariño, sin importar las circunstancias.

A José Roberto Afre Galicia, porque gracias a ti, los triunfos saben mejor.

A mis grandes amigas, Karem Portillo y Flor Burgos.

A mis catedráticos: Por ser pilares en mi formación profesional.

A mi patria Guatemala: Por todo lo bello que ella es y hacerme dichosa con el regalo de estudiar.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por abrir sus puertas y darme todo cuanto yo estuve dispuesta a recibir.

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el hermoso campo de la Biología Molecular. Gracias, por toda la colaboración dada. A su personal, en especial, a Teresita Véliz, por ser mi gran compañera y a veces la única, en este camino. La admiro y quiero mucho. A Tinita Muyón, por todos sus consejos y ayuda.

A mis asesores, M. Sc. Olga Rebeca Torres de Matute y M. Sc. Rafael Antonio Pratdesaba Zea, por todas sus enseñanzas y apoyo profesional y moral. Fue un alto honor trabajar con los grandes.

Al Departamento de Medicina Interna e Infectología del hospital Roosevelt, en especial, a los Dres. Claudio Ramírez e Iris Cazali, por brindar todas la facilidades posibles y proveer la semilla del estudio que hoy da su fruto.

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), particularmente, a Sandy Pineda y Patricia Landaverde, por su asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	ANTECEDENTES	3
3.1.	FIEBRE TIFOIDEA	3
3.1.1.	Descripción general de <i>S. typhi</i>	4
3.1.2.	Patología y manifestaciones clínicas	6
3.1.3.	Cuadro Clínico	7
3.1.4.	Epidemiología	8
3.1.5.	Tratamiento	10
3.1.6.	Cultivo, aislamiento e identificación	11
3.2.	PCR, huella digital y ribotipia	11
3.2.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
3.2.2.	Ribotipia y Huella digital	12
3.3.	Estudios realizados anteriormente	14
4.	JUSTIFICACIÓN	16
5.	OBJETIVOS	17
6.	HIPÓTESIS	18
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
8.	RESULTADOS	38
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
10.	CONCLUSIONES	42
11.	RECOMENDACIONES	43
12.	REFERENCIAS	44
13.	ANEXOS	50

13. ANEXOS

1. RESUMEN

Previo a 1990, el servicio de enfermedades infecciosas del Hospital Roosevelt trataba frecuentemente casos de fiebre tifoidea con complicaciones severas. La ausencia de cepas de *Salmonella typhi* resistentes a antibióticos y la falta de factores predisponentes identificables del hospedero, sugirieron la posible presentación en el país de variantes de *S. typhi* más agresivas. Lo anterior, motivó el estudio de un total de 97 cepas de *S. typhi* aisladas del Hospital Roosevelt durante 1986 (43), 1990 (3), 2000 (8), 2001 (16), 2002 (14) y 2003 (13). No se pudo realizar por completo, la correlación entre cepa y cuadro clínico, ya que solamente se pudo tener acceso a 21 historias clínicas. Sin embargo, aún siendo pocas las historias, se observan presentaciones clínicas muy diferentes, algunas con complicaciones (encefalitis, compromiso hepático, neumonía, dificultad respiratoria, endocarditis, pancreatitis, perforación y hemorragia intestinales) y otras con cursos sin ninguna complicación. La identificación y la susceptibilidad de las cepas fueron realizadas en el Laboratorio de Infectología del Hospital Roosevelt y no se encontró ninguna cepa resistente a los antibióticos. Con el fin de identificar las variantes de *S. typhi* y determinar alguna diferencia y/o similitud entre éstas, los aislamientos fueron tipificados por medio de ribotipia en el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). El ADN genómico fue extraído por medio de tiocianato de guanidinio y digerido con la enzima de restricción *Pst*I. Luego, se ribotipificó utilizando una sonda de ADN ribosomal marcada previamente con Digoxigenina. Para el análisis de clusters se utilizó el programa Gene Profiler RFLPscan 3.5.6 y para el análisis discriminante y la realización del dendrograma se utilizó el SPSS 10.0. Los resultados muestran una alta diversidad de *S. typhi*. Sin embargo, las cepas de 1986 son muy parecidas a las de 2001. El año que presenta mayor diversidad es 2003. Se observan cepas genéticamente muy distantes al resto y cepas muy parecidas que han conservado sus características a través del tiempo. Al comparar las cepas según la complicación presentada, se encontraron bandas en común, sugiriendo la posible localización en el genoma, de genes que codifican características que hacen a estas cepas capaces de producir complicaciones específicas.

2. INTRODUCCIÓN

La fiebre tifoidea es causada por una bacteria Gram-negativo conocida como *Salmonella enterica* serovar *typhi* y tiene como único hospedero al ser humano (1). Se inicia con malestar general, debilidad, pérdida de apetito, dolor de cabeza y altas fiebres (1, 2). Sin embargo, la fiebre tifoidea puede presentar complicaciones potencialmente mortales que incluyen toxemia (envenenamiento de la sangre), miocarditis (inflamación del músculo cardíaco), neumonía (3) y las más severas sangrado intestinal y perforación del intestino delgado (4). En la actualidad, la fiebre tifoidea es endémica en Guatemala. Desde el año 2001, la fiebre tifoidea se convirtió en una enfermedad de notificación obligatoria para el país, incluida dentro del sistema de información gerencial de salud (SIGSA). Sin embargo, la fiebre tifoidea se ha presentado en Guatemala desde hace muchos años y con variada agresividad. Esta investigación identificó diferencias genéticas entre las cepas aisladas de un mismo año y a través de los años, obteniendo así, clonas que han circulado en nuestro país desde 1986. Para determinar las diferencias genéticas entre las cepas, se utilizó la técnica de ribotipia que consiste en obtener patrones de la región del DNA que codifica para la síntesis de proteínas, estos patrones son marcadores genómicos valiosos, ya que se conservan en las bacterias. La ventaja de la ribotipia sobre la huella digital es que reduce en gran manera el número de bandas y facilita así, las comparaciones entre cepas muy similares.

3. ANTECEDENTES

3.1. FIEBRE TIFOIDEA

En 1829 Charles Louis describió los síntomas que diferenciaban a la tifoidea de otras fiebres y relacionó los síntomas clínicos con las lesiones observadas en intestinos, nodos linfáticos mesentéricos y bazo. Bretonneau en Francia y Smith en Estados Unidos reconocieron la naturaleza contagiosa de la enfermedad (5).

En 1873, W. Budd en Inglaterra demostró que la descarga intestinal era uno de los medios principales de transmisión de la fiebre tifoidea por la contaminación del agua (5).

En 1880, Eberth identificó el patógeno en los tejidos de los pacientes (5). En 1884, Gaffky en Alemania cultivó y aisló *Salmonella typhi* en cultivo puro del bazo de pacientes de tifoidea (5).

En 1896, Pfeiffer y Kolle en Alemania, y Wright en Inglaterra desarrollaron la primera vacuna para aplicación en seres humanos compuesta de bacterias inactivadas por calor y demostraron que los anticuerpos específicos protegían a cobayos ante la exposición a dosis de prueba de tifoidea. Ese mismo año, Widal informó que el suero convaleciente de pacientes de tifoidea aglutinaba la bacteria, lo que dio lugar al término “aglutininas” y la prueba serológica de diagnóstico (en base a Felix y Widal) de *S. typhi* (5).

Wright administró su vacuna a dos oficiales del Cuerpo Médico Indio, uno de los cuales ingirió bacilos de tifoidea sin desarrollar la enfermedad. Wright evaluó su vacuna en 2.835 soldados voluntarios. A pesar de varias reacciones adversas, los resultados fueron suficientemente alentadores para garantizar la vacunación de las tropas que partían hacia la Guerra de los Boers en Sudáfrica (1899). Sin embargo, Wright sólo pudo vacunar a 14.000 voluntarios (5).

La oposición a la vacunación creció, y una partida completa de vacunas fue echada por la borda en Southampton. Las consecuencias resultaron catastróficas. Se informaron más de 58.000 casos de tifoidea entre los soldados del Ejército Indio, y 9.000 no sobrevivieron (5). Esta controversia tuvo eco en la comunidad científica, cuando Wright y el estadístico Karl Pearson intercambiaron comentarios en las columnas del *British Medical Journal*. Por último, el departamento de guerra decidió realizar pruebas y llegó a la conclusión de que la vacuna era efectiva. Wright recibió luego una condecoración. A fines de la Primera Guerra Mundial, la vacuna contra la tifoidea, si bien no era obligatoria, era casi rutinaria en el Ejército Británico (5).

Luego se elaboraron otras vacunas de células enteras con formalina e inactivadas por calor, en especial en Francia. La vacunación sistemática se introdujo por primera vez en el Ejército Francés durante la Primera Guerra Mundial (5).

3.1.1. Descripción general de *S. typhi*

La fiebre tifoidea es causada por una bacteria Gram-negativo conocida como *Salmonella enterica* serovar *typhi*. A diferencia de otros miembros de *S. enterica*, *S. typhi* tiene como único hospedero al ser humano, y no se conoce ningún reservorio animal (1). En la mayoría de los casos, la infección se produce por consumir bebidas y alimentos contaminados con heces fecales de humanos que contienen *S. typhi*. Destacan: la leche, el queso, los helados y otros derivados lácteos, los mariscos que crecen en lugares cercanos a puntos de eliminación de las aguas residuales, las verduras regadas con aguas contaminadas, los huevos, algunas carnes y el agua (1,2). El contagio directo entre el enfermo y las personas de su entorno es posible, pero no frecuente (2). La dosis infectiva de *S. typhi* es de 100,000 unidades formadoras de colonia y su período de incubación es variable (de 4 días hasta 6 semanas) (1,6).

Las propiedades de virulencia en patógenos bacterianos son a menudo mediadas por genes contenidos en islas de patogenicidad, que son segmentos largos e inestables del cromosoma que no están presentes en organismos no patógenos (7). En *S. typhi* se han identificado ocho islas de patogenicidad (8,9):

SPI-1: Esta región codifica un sistema de secreción tipo III que transporta proteínas bacterianas dentro del citosol de las células hospederas, resultando en ordenamientos del citoesqueleto que median un rápido ingreso de la *S. typhi* dentro de una vesícula unida a la membrana. Su función es mediar la invasión de células epiteliales del intestino (8).

SPI-2: Codifica un segundo sistema de secreción tipo III. A nivel celular, SPI-2 es requerida para el crecimiento bacteriano en las células epiteliales y para sobrevivir en los macrófagos (8).

SPI-3: Requerida para el crecimiento en macrófagos y virulencia sistémica en ratones. También, parece ser requerida para adaptación a bajas concentraciones de magnesio, y a un bajo pH, condiciones encontradas en el ambiente vacuolar dentro de la célula (8).

SPI-6 y SPI-10: Determinan características de virulencia entre éstas las fimbrias (9).

SPI-7: Codifica para: el antígeno Vi, Sop E, pili Tipo IV (9).

SPI-8: Codifica pseudogenes-bacteriocinas (9).

SPI-9: Codifica las proteínas T1SS y RTX (9).

La diversidad entre la clase *Enterobacteriaceae* ha sido en parte, debido a la adquisición de ADN por transferencia horizontal, incluyendo mecanismos como

transducción (bacteriófago-mediado), conjugación (plásmido-mediado) o transformación (ingreso de ADN a las células competentes) (1). *In vivo*, se ha demostrado la transmisión de plásmidos de resistencia a otras especies bacterianas, y es posible que esto haya sucedido con los plásmidos encontrados en algunas cepas de *S. typhi*, sin embargo, no se ha encontrado correlación obvia entre plásmidos específicos o patrones de plásmidos y el curso clínico de los pacientes (10).

Numerosos factores del hospedero pueden predisponer a infecciones extraintestinales por *Salmonella*, incluyendo SIDA, anemias hemolíticas y defectos genéticos que afectan a IL-12, IFN- γ , y la oxidasa NADPH fagocítica, pero inclusive en el hospedero susceptible, ciertos serotipos de *Salmonella* son más probables de causar infecciones sistémicas (8). Estos mismos serotipos son más probables de causar infecciones invasivas en personas sin predisposiciones anormales identificables (8). Sobre fiebre tifoidea específicamente, los estudios son limitados, pero se ha documentado una posible asociación entre ciertos haplotipos HLA-clase II y la susceptibilidad a fiebre tifoidea (1).

3.1.2. Patología y manifestaciones clínicas

Los sucesos patológicos de la fiebre tifoidea comienzan en el tracto intestinal luego de la ingestión oral de los bacilos (1). La dosis infectiva es cercana a 100,000 bacterias (1). El microorganismo penetra en la mucosa del intestino, entra al sistema linfoide mesentérico, y luego alcanza el torrente circulatorio (Fig. 3 y 4). Esta bacteremia inicial es usualmente asintomática (1). Luego, la bacteria es fagocitada por los macrófagos y las células monocíticas del sistema reticuloendotelial. Aquí se multiplica y vuelve a aparecer en la circulación iniciando así la fase sintomática de la infección (1).

La hiperplasia del sistema reticuloendotelial, que incluye a los ganglios linfáticos, el hígado y el bazo, es característica de la fiebre tifoidea. La necrosis en las placas hiperplásicas de Peyer, puede coincidir con erosión de los vasos sanguíneos en las lesiones del tubo intestinal, lo cual lleva a hemorragia profusa (1).

3.1.3. Cuadro Clínico

Se inicia con malestar general, debilidad, pérdida de apetito, dolor de cabeza y estreñimiento. Se mantiene durante unos cinco días, hasta que se inicia el período febril con 40°C. Se deteriora el nivel de conciencia del enfermo, estado conocido como estupor, y aparecen lesiones rojas en la piel que pueden permanecer durante 14 días (1,2).

La evolución puede ser hacia la curación o complicarse con lesiones cardiacas severas, hemorragias gastrointestinales que pueden llegar a la perforación intestinal, alteraciones neurológicas importantes o conducir a una infección crónica, dando lugar al estado de portador de *S. typhi* (1,2).

El cuadro clínico puede variar (11):

- Diarrea 30-50%
- Estreñimiento 3-50%
- Dolor abdominal 13-61%
- Vómitos 25-68%
- Cefalea 8-75%
- Tos 8-69%
- Dolor orofaríngeo 2-73%
- Anorexia, mal estado general, mialgias, artralgias, epistaxis.
- La fiebre cae al cuarto día de administrar antibiótico (11).

El examen físico es negativo a la primera semana, a la segunda semana se observa mal estado general, esplenomegalia 23-68%, hepatomegalia 30-40%, insuficiencia hepática, ictericia, sangrado, choque y CID (coagulación intravascular diseminada) (11).

Rash en un 13% de pacientes en la segunda semana, meningismo en 5%, meningitis, convulsiones, clonus (convulsión caracterizada por contracciones y relajaciones alternadas), alteraciones psiquiátricas 5-10%, bradicardia relativa (más en adultos que en niños), miocarditis (arritmias, soplos). Suelen aparecer entre 12 a 20 roseolas (11).

3.1.4. Epidemiología

Cuando aparece fiebre tifoidea existe un 30% de probabilidad que la sufra otro familiar, esto es importante para la vacunación de los casos. La fuente de contaminación son pacientes con fiebre tifoidea o los portadores asintomáticos, en la enfermedad aguda son contaminantes las heces, la orina, los vómitos y secreciones bronquiales (11). Los portadores crónicos expulsan 10^6 bacilos por gramo de heces (11). Los bacilos contaminantes pueden sobrevivir por semanas en el hielo, agua, alimentos y sobre la cáscara de huevo. Los alimentos y el agua contaminados directa o indirectamente con excretas humanas constituyen la fuente de infección mas común (11).

El 85% de las epidemias se relacionan con un vehículo común, que usualmente contamina alimentos o bebidas y el 10% por contacto directo entre humanos, especialmente en niños. Entre los vehículos menos comunes se encuentran las transfusiones plaquetarias, endoscopías y aparatos de fibra óptica mal esterilizados. La diseminación de persona a persona es frecuente en instituciones médicas, responsables del 60% de las epidemias en el personal médico y paramédico y de casi 100% de los brotes epidémicos en servicios de guarderías infantiles (11).

A nivel mundial, la OMS ha estimado alrededor de 16 millones de casos de fiebre tifoidea por año (2). De estos casos, aproximadamente el 10% evolucionan a enfermedad severa o con complicaciones y sin un tratamiento específico, el 5-30% de todos los pacientes con fiebre tifoidea pueden morir (2). El índice de fatalidad de la fiebre tifoidea varía considerablemente de un área endémica a otra, así como el espectro de complicaciones clínicas por ejemplo, encefalopatía y shock son comunes (10% de los casos) en Indonesia, pero no lo son en Perú o Chile (<2% de los casos) (10). Aproximadamente el 70% de todos los casos fatales de fiebre tifoidea ocurren en Asia, (Fig. 5). Datos basados en hospitales y en estudios de áreas endémicas han mostrado que los pacientes más afectados son de 1 a 5 años de edad. El mejoramiento de las condiciones de vida y la introducción de antibióticos en 1940 logró una reducción drástica de casos y de mortalidad debida a fiebre tifoidea en los países industrializados. Sin embargo, esta enfermedad todavía constituye un problema para la salud pública en muchas partes del Sur y Este de Asia, África y Sur América. En 1996-1998 ocurrió un brote de fiebre tifoidea en Tajikistan, causando más de 24000 casos. Un incremento en el número de casos ha ocurrido recientemente cerca de Uzbekistán (12).

3.1.4.1. Fiebre tifoidea en Guatemala: El Sistema de Información Gerencial de Salud (SIGSA) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social informó para el año 2001, un total de 149 casos de fiebre tifoidea reportados por los centros de salud, encontrándose entre las 50 causas de mayor morbilidad en el país (13), para el año 2002 se reportaron 255 casos (14), registrando 7 brotes en 5 áreas de salud, El Quiché, Ixil, Baja Verapaz, Sololá y Chiquimula (13), y para el año 2003 se reportaron 91 casos (14). Para el año 2001 se reportaron 13 muertes por fiebre tifoidea (14), para el año 2002 se reportaron 16 muertes (14) y para el año 2003 no hay muertes reportadas (14). Del año 2000 hacia atrás no existen reportes documentados de casos ni muertes por fiebre tifoidea (13,14), pero sí se dieron casos, como los estudiados por el Hospital Roosevelt.

No se sabe si los diferentes índices de mortalidad entre regiones geográficas son debidos a la variación genética en cepas locales de *S. typhi*, diferencias en la susceptibilidad de poblaciones de hospederos, u otros factores (1,8,15). Se ha observado que inclusive en el hospedero susceptible, ciertos serotipos de *Salmonella* son más probables de causar infecciones sistémicas (8). Estos mismos serotipos son más probables de causar infecciones invasivas en personas inmunocompetentes (8).

3.1.5. Tratamiento

En 1948, se utilizó cloranfenicol para tratar la fiebre tifoidea hasta que en 1972 se reportó el primer brote masivo de resistencia. Se desconoce la causa de por qué la bacteria se tardó 20 años en volverse resistente (1).

Después de 1972, se utilizó co-trimoxazole y ampicilina o amoxicilina, hasta que en 1980 se reportó resistencia a estos tres antibióticos (1).

Hoy en día, las cefalosporinas de tercera generación y las fluoroquinolonas se han convertido en las drogas de elección. En el sur de Asia se han reportado resistencias a quinolona. Además, podría emerger resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Esto da la idea, del aparecimiento de una fiebre tifoidea intratable. Un tratamiento alternativo a las fluoroquinolonas promete ser la azitromicina (1).

En Guatemala, como antibióticos de elección se han utilizado cefamandole, el cual es sustituido por cloranfenicol cuando la primera terapia falla. En seguida, trimetoprim-sulfametoxazol y ampicilina (16,17) son usados debido a que son las drogas disponibles en los servicios de salud no hospitalarios. No se cuenta con una fuente de datos sobre las susceptibilidades antibióticas de *S. typhi* a nivel nacional.

3.1.6. Cultivo, aislamiento e identificación

El diagnóstico de fiebre tifoidea se basa en la demostración de *S. typhi* en la sangre, médula ósea, heces o lesiones específicas de un paciente con síntomas característicos de la enfermedad (1). Hemocultivos son positivos para el 80% de pacientes con tifoidea durante la primera semana de fiebre (6).

Entre los medios más utilizados para cultivar *S. typhi* se encuentran agar sulfito de bismuto, agar XLD (xilosa-lisina-desoxicolato), agar SS (*Salmonella* – *Shigella*) y MacConkey (6,18,19). La colonia sospechosa de *Salmonella* spp. se inocula en TSI y luego en LIA. La mayoría de cepas de *S. typhi* producen una reacción K/AG+ en TSI, indicando que la glucosa es fermentada con gas y poca producción de H₂S (6); y K/KG± en LIA. Entre las pruebas bioquímicas utilizadas para identificar *S. typhi* se encuentran indol, rojo de metilo, Voges Proskauer, citrato urea, lisina descaboxiladasa y la fermentación de azúcares (2). Cuando se sospecha de *S. typhi* se debe realizar serología con antisueros Vi y O del grupo D (6). *S. typhi* aglutina con Vi pero no con O, luego de ebulir por 15 minutos, aglutina con O pero no con Vi (6).

3.2. PCR, huella digital y ribotipia

3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La huella digital basada en el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) puede identificar cepas individuales de microorganismos, cuando se usan secuencias blanco específicas e iniciadores apropiados (Fig. 7, 8 y 9). Esto facilita la investigación de brotes de enfermedades, la determinación de la distribución geográfica de agentes infecciosos, la comprensión de los patrones de transmisión y la evaluación del significado biológico de diferencias genéticas, todo esto contribuye a identificar factores

de riesgo y designar las medidas de control subsecuentes para la prevención de enfermedades (20).

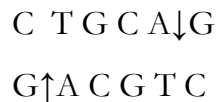
El principio fundamental del PCR es la amplificación de un fragmento específico de ADN a través de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial hasta que se ha acumulado suficiente producto para ser visualizado (20). Así, una sola molécula puede generar billones de copias de ella misma después de 30 ciclos de replicación exponencial (20). Cada ciclo de amplificación está constituido de tres temperaturas, en las cuales los ingredientes de la mezcla de la reacción de PCR experimentan diferentes procesos físicos y bioquímicos (desnaturalización, anidado y extensión) para que el ADN patrón sea replicado (20). El primer paso es una incubación a 94 °C que permite la desnaturalización de las dos hebras de la doble hélice del ADN patrón. Esto es seguido por el paso de anidado que permite la hibridación de los primers, cebadores o iniciadores, con sus secuencias complementarias en el ADN blanco (20). Finalmente, el ciclo es completado durante un paso de extensión a 72°C cuando la polimerasa va desde el primer en la dirección 5' a 3', replicando la hebra patrón. La amplificación se realiza en 25 a 35 ciclos (20).

3.2.2. Ribotipia y Huella digital

La caracterización de *S. typhi* tradicionalmente ha dependido de la fago tipificación. Sin embargo, la fago tipificación no provee una información epidemiológica útil cuando sólo existen unos pocos fagotipos predominantes (21). No obstante, se han desarrollado varias técnicas moleculares que se aplican satisfactoriamente en la investigación epidemiológica de cepas de *S. typhi*. Una de estas técnicas es la ribotipia, la cual ha probado ser útil para diferenciar cepas de *S. typhi* (21, 22). Los ribotipos, son patrones de la región del DNA que codifica para la síntesis de proteínas, y pueden ser usados como marcadores genómicos valiosos, ya que se conservan en la bacteria (22). La ventaja de la ribotipia es que reduce en gran cantidad

el número de bandas en la huella digital cromosómica y facilita así las comparaciones entre cepas muy similares (22).

Sin embargo, la variabilidad de los patrones de ribotipos dependen en gran manera de las enzimas de restricción escogidas para la digestión del ADN total (21,22). Altwegg y colaboradores, utilizaron *EcoRI*, *SmaI*, y *PstI* para la ribotipificación de *S. typhi* y encontraron que *PstI* provee la mejor discriminación entre cepas (21). Pang y colaboradores también encontraron que *PstI* es superior a *SmaI* (21). Nastasi y colaboradores estudiaron distintas enzimas de restricción y encontraron que *ClaI* provee la mejor discriminación entre cepas (21). Fica y colaboradores, ribotipificaron sus cepas chilenas utilizando *PstI* y *ClaI* y encontraron que ambas enzimas de restricción fueron capaces de demostrar que las cepas aisladas durante un año epidémico y uno no epidémico, fueron adquiridas de múltiples fuentes (21). En este estudio, se encontró que tanto *PstI* como *ClaI* produjeron una amplia variedad de patrones que se correlacionan bien una con la otra (21). La enzima *PstI* (*Providencia stuartii*) realiza el siguiente corte (23):



Para llevar a cabo la ribotipia, se digiere el ADN purificado con la enzima de restricción de elección. Los fragmentos son separados por electroforesis en gel de agarosa en un sistema buffer de tris-borato-EDTA por 42 horas a 1V/cm con un aparato de gel horizontal. Los fragmentos del ADN en el gel son transferidos a la membrana de nylon. Se debe depurinar primero el ADN con HCl y luego neutralizar con NaOH. La membrana se lava con 2XSSC (NaCl y citrato de sodio) y es hibridizada con una sonda rRNA 16S-23S marcada (21).

La ribotipia evidencia cambios en la región 16S-23S del ADN, que codifica para la síntesis de ARN ribosomal, pero no evidencia cambios en sitios de restricciones

distintos. Por lo tanto, se deben además, obtener los patrones de restricción del ADN total y compararlos con los ribotipos (21).

Para obtener la huella digital del ADN de las cepas de *S. typhi* se utilizan tres enzimas de restricción (*EcoRV*, *MluI* y *NarI*) (18). *NarI* produce el mayor número de patrones de restricción que son fácilmente interpretados porque posee bandas bien separadas (21).

3.3. Estudios realizados anteriormente

En 1999 Ling y colaboradores, estudiaron 217 cepas de *S. typhi* que fueron aisladas de sangre o de heces de pacientes en tres hospitales en Hong Kong de 1985 a 1997, y 73 cepas de *S. typhi* aisladas de sangre o de heces de pacientes en Vietnam, durante enero de 1989 y octubre de 1990. Los aislamientos fueron identificados con el sistema API y fueron serotipificados por aglutinación con antisueros específicos. Se realizó la susceptibilidad antibiótica por MIC, utilizando 18 antibióticos (entre éstos β -lactámicos, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazole, tetraciclina y cloranfenicol). Se encontró a través del análisis de ribotipos y de la huella digital del ADN que la fiebre tifoidea en Hong Kong fue causada por una amplia variedad de cepas. No se estableció una única clona. Algunas cepas presentaron los mismos patrones pero fueron aislados en diferentes años, lo que dejó la interrogante de cómo los pacientes adquirieron la infección de la misma fuente en un intervalo amplio de tiempo. La mayoría de los aislamientos de Hong Kong pertenecían a grupos diferentes a los de Vietnam. Se encontraron cepas de ambas localidades que compartían el mismo ribotipo y el patrón de ADN, lo que pudo ser resultado del intercambio de cepas entre áreas en el Sureste de Asia, por el comercio y la migración (21).

Un repentino brote de fiebre tifoidea en Chile empezó en 1977 y duró hasta 1986. Estudios epidemiológicos incriminaban indirectamente comida obtenida de

vendedores ambulantes, y agua contaminada utilizada para irrigar vegetales. Sin embargo, éstos y otros estudios fallaron en identificar factores definitivos que pudieran explicar la magnitud y el repentino apareamiento del brote de 1977 a 1986, y tampoco se pudo detectar ninguna falla potencial en el saneamiento o cambios en la susceptibilidad de la población de hospederos o en las características de las cepas de *S. typhi*. Así que, en 1996 Fica y colaboradores realizaron un estudio que tenía como objetivo determinar si la fiebre tifoidea de años epidémicos fue causada por cepas de *S. typhi* con características únicas o por fallas no detectadas de saneamiento. Para la identificación de *S. typhi* se utilizaron antisueros. Se determinaron biotipos para evaluar la habilidad de las cepas para fermentar 5 diferentes azúcares (dulcitol, celobiosa, D-xilosa, arabinosa y glicerol) y un decarboxilato L-arginina. Se realizaron las susceptibilidades antibióticas para cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina. Los ribotipos por *PsA* obtenidos de las cepas de años epidémicos y endémicos, indicaron que se trataba de clonas filogenéticamente distintas. Estos resultados excluyeron la diseminación de una variante única de *S. typhi* como responsable del brote epidémico. La baja efectividad de la vacuna de *S. typhi* en Chile se podría explicar por infecciones producidas por cepas de *S. typhi* marcadamente diferentes a la cepa atenuada de la vacuna. Este estudio sugiere que brotes de fiebre tifoidea pueden ser asociados con ribotipos predominantes de *S. typhi* o con muchos ribotipos de *S. typhi*. Se llegó a la conclusión de que la alta variedad de ribotipos en Chile pudo ser el resultado de múltiples fuentes de infección y que la amplia variación genética en las cepas de *S. typhi* involucradas en los años epidémicos indicaba probablemente fallas en el saneamiento. Esta hipótesis fue apoyada por el hecho de que en 1991, después de la emergencia del cólera en Chile, la incidencia de fiebre tifoidea declinó drásticamente después de que el gobierno implementara medidas sanitarias y programas de educación para prevenir la diseminación del cólera en el país (24).

En 1987, Figueroa y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo sobre fiebre tifoidea en Guatemala. Para la recolección de datos utilizaron una boleta la cual se utilizó en el presente estudio (25).

4. JUSTIFICACIÓN

La evolución de la fiebre tifoidea, como cualquier otra patología, depende del hospedero, del ambiente y del agente etiológico. Sin embargo, se ha observado que pacientes inmunocompetentes han desarrollado una fiebre tifoidea con complicaciones severas y en algunos casos hasta la muerte. Además, se han reportado en una misma región diferentes formas de presentación de la enfermedad. El presente estudio, buscó identificar diferencias genéticas entre cepas de *S. typhi* aisladas en Guatemala para descubrir distintas clonas circulando en nuestro país, o bien, mutaciones a través de los años, lo cual, constituirá el punto de partida para otros estudios que permitan identificar si estas diferencias en el ADN corresponden a nuevas formas de invasión o agresividad. Esto contribuirá a entender de mejor manera esta patología y al mejoramiento del tratamiento y de la vacuna.

5. OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar los ribotipos de las cepas de *S. typhi* aisladas en el Hospital Roosevelt en los años 1986, 1990, 2000, 2001, 2002, y 2003.

ESPECIFICO:

Comparar los patrones de ribotipos obtenidos de *S. typhi* de los distintos años y determinar si existe alguna diferencia entre éstos.

6. HIPÓTESIS

Existen diferencias entre los ribotipos de las distintas cepas de *S. typhi* para los distintos años. Antes de 1990, circuló una clona predominante y marcadamente diferente a las clonas de los siguientes años.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo:

Se utilizaron 97 cepas de *S. typhi*, aisladas de pacientes del Hospital Roosevelt, durante los años 1986, 1990, 2000, 2001, 2002 y 2003. Las cepas fueron recolectadas, aisladas e identificadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Roosevelt y fueron guardadas por el personal de los laboratorios Dr. Leonardo Mata del INCAP, en stocks con glicerol a -70°C para el estudio genético posterior.

7.2. Recursos

7.2.1. Humanos

- Br. Lilian Andrea Martínez Carrera (tesista)
- Licda. Olga Rebeca Torres de Matute (asesora)
- Lic. Rafael Antonio Pratdesaba Zea (asesor)
- Dr. Claudio Ramírez (colaborador)
- Dra. Iris Cazali (colaboradora)
- Teresa Véliz (colaboradora)
- Sandy Pineda (colaboradora)
- Patricia Landaverde (colaboradora)

7.2.2. Institucionales

- Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)
- Hospital Roosevelt
- Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP)

7.2.3. Físicos

7.2.3.1. Materiales:

7.2.3.1.1. Materiales de laboratorio

- asas bacteriológicas no calibradas

- pipetas serológicas
- micropipetas automáticas
- puntas para micropipetas (tips)
- bolsas plásticas
- gradillas
- servilletas de papel
- papel parafinado
- papel aluminio
- parafilm
- tubos eppendorf
- agitador magnético
- papel filtro
- papel para Cromatografía Whatman 3 mm
- membranas de nylon MSI Magnagraph
- guantes de látex
- papel plástico

7.2.3.1.2. Cristalería

- beakers de 25, 100, 250, 500 ml
- erlenmeyer de 250, 500, 1000, 2000 ml
- balones aforados de 10, 50, 100, 250, 500, 1000
- probetas de 10, 50, 100 500, 1000 ml
- embudos
- viales
- pipetas Pasteur
- tubos de ensayo 13x100 con tapón de rosca
- bandejas Pyrex
- Moldes y vidrios para electroforesis

7.2.3.1.3. Equipo

- autoclave (Castle Steam Sterilizer)
- horno (Wilco) y horno microondas
- balanza (AND, EK-120A)
- incubadora (Thelco 32 M) 37 °C
- vortex (GENIE-2, Scientific Industries)
- refrigeradora (Hot Point)
- congeladores (Pro-scientific) a -70°C y -20°C
- centrífuga para tubos eppendorf (Eppendorf)
- rotador automático (Eberbach Corporation)
- baño maría con agitación a 37 °C (Blue M Electric Company).
- baño de María con agitación a 65°C (Belleo Biotechnology)
- cámara para electroforesis horizontal (Hoefer Scientific)
- fuente de poder para la electroforesis (Hoefer Scientific)
- bomba de vacío (Fisher Scientific)
- pipetores (Holt Line #24583)
- transiluminador (Fotodyne)/cámara fotográfica polaroid

7.2.3.1.4. Medios de cultivo

- Caldo Luria-Bertani
- Agar Mackonkey
- Agar Muller Hinton

7.2.3.1.5. Reactivos

Electroforesis de ADN

- Agarosa de alta pureza, 0.7%-1.0% en buffer TBE 1x

- Buffer TBE 10 x (Tris- boratos-EDTA)
- EDTA 0.5 M pH 8
- Buffer TE 10 mM-HCL pH 8, 1mM EDTA pH 8
- Buffer Tris-HCl 1 M pH 8
- Bromuro de etidio (Sigma) Stock: 10 mg/ml
- Dodecil sulfato de sodio 10 % (SDS)

Extracción de ADN con tiocianato de guanidinio

- Reactivo GES Stock: tiocianato de guanidinio 5M, EDTA 100mM, 0.5 % sarkosyl
- Agua destilada estéril y agua para HPLC
- EDTA 0.5 M pH 8
- Sarkosyl al 10%
- Acetato de amonio 7.5 M
- Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
- Isopropanol
- Etanol al 70%

Extracción de ADN con QIAamp tissue DNA extraction kit

- Buffer ATL (QIamp tissue DNA extraction kit)
- Proteínasa K (QIamp tissue DNA extraction kit)
- Buffer AL (QIamp tissue DNA extraction kit)
- Buffer AW1 (QIamp tissue DNA extraction kit)
- Buffer AW2 (QIamp tissue DNA extraction kit)

Digestión de ADN con enzimas de restricción

- Agarosa de alta pureza (Sigma)
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Enzimas de restricción, PstI (Roche Diagnostic)

- Buffer para enzima de restricción (Roche Diagnostic).
- Marcadores de peso molecular de ADN II, marcado con digoxigenina (Roche Diagnostic).

Southern blotting

- HCl 1M
- Agua desmineralizada
- NaOH 0.5 M
- NaCl 1.5 M
- Tris-HCl 0.5 M
- Buffer 2X SSC (Cloruro de Sodio y Citrato de Sodio)
- Buffer 6X SSC (Cloruro de Sodio y Citrato de Sodio)
- Buffer 20X SSC (Cloruro de Sodio y Citrato de Sodio)
- Bromuro de etidio (Sigma)

Marcación de ARN con digoxigenina. Transcripción reversa de rARN en cADN

- Cebos, primers o iniciadores (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).
- rARN (Roche Diagnostic)
- dNTPs (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).
- Transcriptasa reversa (Invitrogen Cat. No. 18020-024)
- LiCl 4M

El resto son los reactivos grado biología molecular usados rutinariamente

Cómo estimar el rendimiento del ADN marcado con digoxigenina

- Solución de NBT (Nitro Azul de Tetrazolio) (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).

- Solución de BCIP (x-fosfato), (5-bromo 4-cloro indoil-fosfato) (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).
- ADN control marcado, (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).
- Buffer de dilución de ADN, (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).
- Anti-DIG-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).
- Reactivo de bloqueo (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).

Prehibridación, Hibridación, Lavados y Desarrollo de color

- Solución de hibridación: 0.1 M Ácido Maleico, 0.15 M NaCl, pH 7.5.
- Buffer de lavado: 0.1 M Ácido Maleico, 0.15 M NaCl, 0.3 %(v/v) Tween 20, pH 7.5.
- Buffer de detección: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5.
- Reactivo de bloqueo (Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).
- NBT/BCIP (vial 9 Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit).

7.3. Procedimientos

7.3.1. Extracción de ADN de *S. typhi* con Tiocianato de Guanidinio (26)

1. Se tomó una asada del caldo de *S. typhi* almacenado con glicerol a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se sembró en 2 ml de caldo LB. Se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 horas o hasta que se alcanzó la fase log. Se transfirió el caldo a tubos eppendorf y se centrifugó a 7 000 rpm por 5 minutos. Se almacenó el botón de células a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. Se resuspendieron las células en 100 µl de buffer TE.
3. Se agregaron 0.5 ml de reactivo GES y se mezcló en vortex.
4. Se incubó a 37 °C por 10-15 minutos o hasta que la lisis se completó.
5. Se enfrió el lisado en hielo por 5 minutos.
6. Se agregaron 0.5 ml de acetato de amonio 7.5 M frío y se mezcló.
7. Se incubó en hielo por 10 minutos.
8. Se agregaron 0.5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
9. Se mezcló cuidadosamente.
10. Se centrifugó a 14 000 rpm por 25 minutos.
11. Se transfirió la fase líquida a tubos eppendorf y se midió volumen exacto.
12. Se precipitó el ADN con 0.54 volúmenes de isopropanol frío.
13. Se invirtió por 1 minuto para mezclar.
14. Se precipitó por centrifugación a 6 500 rpm por 20 segundos.
15. Se lavaron los botones 3 veces con etanol a 70% (13 000 rpm por 4 minutos cada lavada).

7.3.1.2. Extracción de ADN de *Salmonella typhi* con QIAamp tissue DNA extraction kit (27)

1. Se usó el crecimiento de 1 caja de *S. typhi*.
2. Se recolectó el crecimiento con un hisopo estéril, se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 180 µl de buffer ATL.
3. Se agregó 40 µl de proteinasa K.
4. Se mezcló en vortex por 15 segundos.
5. Se incubó en Baño María a 56 °C por 1 hora, en movimiento.
6. Se agregaron 200 µl de buffer AW1 y se mezcló en vortex por 15 segundos.
7. Se transfirió la muestra a la columna de extracción, se centrifugó a 8 000 rpm por 1 minuto.
8. Se descartó el filtrado.

9. Se agregaron 500 μ l de buffer AW2. Se centrifugó a 12 000 rpm por 3 minutos.
10. Se descartó el filtrado.
11. Se agregaron 200 μ l de agua destilada HPLC. Se dejó en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Se centrifugó la columna a 8 000 rpm por 1 minuto.
13. Se recolectó el filtrado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se guardó a -20 °C.

7.3.2. Chequeo de la calidad del ADN por el método de minigel (26)

1. Se preparó un minigel de agarosa al 07% en buffer TBE 1X y se agregó bromuro de etidio 1: 15 000.
2. Luego, de que se solidificó la agarosa, se Inocularon 10 μ l de muestra + 10 μ l de buffer de carga en el pozo correspondiente.
3. Se dejó correr con buffer TBE 1X, por espacio de 2 horas a 40 miliamperios, para verificar la calidad de cada muestra de ADN antes de realizarse la restricción con endonucleasas (19).

7.3.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción (23,26)

1. Se cortó el ADN con la enzima *Pst*I en el buffer de reacción 10X, a 37 °C en baño de maría por un mínimo de 2 horas, siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima (Roche Diagnostic). Al concluir el tiempo de incubación, se desnaturalizó la enzima sometiéndola a 65 °C en baño de maría.

La siguiente tabla contiene ejemplos de los volúmenes que se usaron más frecuentemente:

μl de ADN	μl de enzima	μl Buffer 10X	μl H ₂ O	Volumen final μl
10	1	2	7	20
15	1	2	2	20
20	1	3	6	30
25	1	3	1	30
30	1	4	5	40

2. Electroforesis de muestras: se preparó agarosa al 0.7% en 1X TBE. Usando la unidad de electroforesis horizontal se colocó un peine de 15 pozos y 2 mm de grosor. Se instaló la fuente de poder para correr a 20V y se permitió que la electroforesis continuara hasta que el frente de color azul alcance 2/3 del largo del gel (≈ 20 h).
3. Se verificó que el ADN haya migrado y separado bien y se fotografió. .

7.3.4. Electroforesis de ADN (26)

Gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 0.7% de la siguiente manera:

1. Se pesaron 0.7 g de agarosa (ó 1.05 g para 150 ml de gel)
2. Se agregaron 10 ml de buffer TBE 10X (estéril, en refrigeración y para geles de 150 ml, usar 15 ml de TBE 10X)
3. Se completó el volumen a 100 ml con agua desmineralizada.
4. Se hirvió hasta que se disolvieran todos los cristales de agarosa (3 minutos en high en el horno de microondas fueron suficientes).
5. Se dejó enfriar a 55 °C.

6. Se agregaron 10 μ l de bromuro de etidio con guantes.
7. Se vertió en el molde con el peine apropiado, evitando formar burbujas.
8. Se dejó solidificar 30 minutos y se colocó a 4 °C durante otros 30 minutos en una superficie plana.

7.3.5. Inoculación de muestras (26)

1. Se agregaron 900 ml de buffer TBE 1 al tanque horizontal.
2. Se mezclaron 10 μ l de muestra con 10 μ l de buffer de carga sobre un pedazo de parafilm.
3. Se inocularon en el pozo correspondiente sin formar burbujas.
4. Se inoculó el marcador de peso molecular II en el primer y en el último pozo.
5. Se tapó el tanque cuidando que el polo negativo (negro) estuviera cerca de las muestras y el polo positivo (rojo) en el extremo opuesto.
6. Se corría a 20 miliamperios si se trataba de ADN genómico y si el gel era de chequeo se corría a 40 miliamperios.

7.3.6. Revelado del gel (26)

1. Se paró la fuente de poder cuando el frente azul llegaba a una pulgada del final del gel.
2. Utilizando guantes y con cuidado de no botar el gel, se sacaba y se llevaba al cuarto oscuro, con la máscara protectora contra luz U.V. puesta, se coloca el gel sobre el transiluminador (fotodyne), se observaba el gel y si el resultado era satisfactorio, se tomaba una fotografía Polaroid.

7.3.7. Fotografías de ADN (26)

1. Se colocó la cámara con el adaptador sobre el gel. Se aseguró que tuviera rollo (un número sale del extremo derecho, que indica el número de foto del rollo inserto).
2. La apertura debe ser de 5.6 y el tiempo de un segundo. Si quedaba muy negro, se usaba 8 de apertura por medio segundo.
3. Se oprimió el botón verde hasta que escuchar “clac”.
4. Se sacaba la fotografía horizontalmente, a los 45 segundos se levantaba la cubierta protectora.

7.3.8. Blots de Southern (23)

7.3.8.1. Preparación del gel para blot de southern

1. Se depuró el ADN, introduciéndolo en 250 ml de HCl 0.25 M durante 5-10 min.
2. Se lavó el gel 2-3 veces con agua (5segundos por lavado).
3. Se trató el gel con 250 ml de NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M durante 30 minutos para desnaturalizar el ADN.
4. Se descartó la solución desnaturalizante, sin lavar el gel.
5. Se neutralizó con Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M durante 30 minutos.

7.3.8.2. Procedimiento para Southern blotting (23)

1. Se cortaron 4 pedazos de papel Whatman 3mm con el tamaño y forma del gel. Se cortó un pedazo de papel filtro un poco más ancho que el gel y del largo de la bandeja donde se puso el blot.

2. Se mojó la membrana de nylon en 2XSSC y se mojó el papel filtro en esta solución.
3. Se colocó el papel filtro sobre el soporte. Se agregó suficiente 20XSSC para asegurarse que los extremos del papel filtro estuvieran sumergidos. Se invirtió el gel y se colocó sobre el papel filtro. Con una pipeta, se eliminaban las burbujas.
4. Se colocó la membrana sobre el gel, marcando el extremo derecho superior del lado opuesto de la membrana.
5. Se mojó cada pedazo de papel Whatman 3 mm en 2XSSC y se colocó sobre la membrana. Se sacan las burbujas después de cada pieza.
6. Se envolvieron las orillas del sándwich de gel y de la membrana con papel plástico. Se colocaron luego una pila de toallas de papel sobre el sandwich. Se colocó un vidrio como soporte sobre las toallas de papel y un peso sobre éste (un frasco de un litro de buffer) (400-1000 g). Se dejó que la transferencia ocurriera durante la noche.
7. Después de la transferencia nocturna, se removió la membrana del gel y se lavó en 6X SSC. Se dejó secar completamente al aire (0.5-1 hora).
8. Después de seca, la membrana se horneó a 80 °C durante 30 minutos, para fijar el ADN a la membrana.
9. Se tiñó el gel con bromuro de etidio para asegurarse que la transferencia fuera completa.

7.3.9. Prehibridación, Hibridación y Lavados (23)

7.3.9.1. Prehibridación (23)

Los volúmenes fueron calculados para 200cm². Se ajustaron conforme cambiaba el tamaño de la membrana. Se preparó la solución de hibridación y se colocó en baño maría con agitación hasta que el reactivo de bloqueo se disolviera.

Esto tomó por lo menos una hora. Después de que el reactivo de bloqueo se disolvió, se agregaron 50 ml de solución de hibridación a una bolsa conteniendo el filtro (si se trabajaba con dos filtros se colocaban “espalda con espalda”, de manera que el lado que contendía ADN quedara hacia fuera). Se permitió la prehibridación en baño maría a 68 °C, con agitación por lo menos durante una hora. La solución de hibridación se preparaba con anticipación y se almacenaba congelada hasta que se necesitaba.

7.3.9.2. Hibridación (23)

1. Se removió la solución de pre-hibridación de la bolsa. Se rodaba una pipeta sobre la bolsa para remover cualquier solución remanente.
2. Se agregó 10 ml de solución de hibridación conteniendo la sonda marcada a la bolsa. La solución de hibridación conteniendo la sonda **se desnaturalizaba (hervía durante 10 minutos) y se enfriaba en hielo (durante 5 minutos) antes de ser agregada a la bolsa.**
3. Se sacaron las burbujas y se selló la bolsa con calor. Se verificó que estuviera bien sellada y se incubó a 68 °C en baño maría durante la noche con agitación.

7.3.9.3. Lavados y Desarrollo de color (23)

NOTA: Todos los pasos siguientes se realizaron a temperatura ambiente y con agitación.

1. Se lavó la membrana (1 a 5 minutos) con buffer de lavado.
2. Se descartó la solución anterior y se agregó 100 ml de reactivo de bloqueo 1X y se incubó por 30 minutos.
3. Se centrifugó el vial del Anti-DIG (vial 8 Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit) por 5 minutos a 10 000 rpm cada vez que se

usaba. Se pipeteó 10 μ l de la superficie el Anti-DIG y se agregó a 10 ml de reactivo de bloqueo 1X (Dilución del anticuerpo 1:5 000). Se incubó por 1 hora.

4. Se lavó dos veces 15 minutos con 50 ml de buffer de lavado.
5. Se equilibró de 2 a 5 minutos con 50 ml de buffer de detección.
6. Se incubó la membrana en una bandeja de vidrio con tapadera, se agregaron 40 ml de solución de sustrato de color.

7.3.9. Marcación de ARN con digoxigenina. Transcripción reversa de rARN en cADN (23,28)

NOTA: se usaron **guantes estériles** mientras se manipulaba el ARN.

Todas las cantidades y soluciones están calculadas para filtros de 200 cm².

ESTE PROCEDIMIENTO SINTETIZA SUFICIENTE SONDA PARA HIBRIDAR DOS FILTROS DE 200 CM².

1. A un eppendorf estéril se agregó:
 - 2 μ l de primers 10x (vial 5-hexanucleotideo Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit a -20°C), 4 μ l de buffer de reacción 5x (Buffer 5x para AMV-transcriptasa reversa Invitrogen -70°C), 0.25 μ l rARN (a 4 °C, Boehringer Mannheim), 12.75 μ l de agua desionizada estéril. Se mezcló durante tres segundos en la microcentrífuga.
2. Se calentó a 68 °C durante 5 minutos, luego se enfrió **lentamente** a temperatura ambiente.
3. Se agregaron: 2 μ l de dNTPs 10x (vial 6 Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit a -20°C), 3.0 μ l de transcriptasa reversa (AMV-RT

Invitrogen a -20°C), se mezcló centrifugando tres segundos. Se necesitaron aproximadamente 20-30 U de AMV-RT por sonda.

4. Se incubó a 42°C por una hora.
Se precipitó la sonda agregando $2\ \mu\text{l}$ de Lic. 4M y $50\ \mu\text{l}$ de etanol frío al 95% (-20°C). Se mezcló por agitación en el fondo del tubo.
5. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 15 minutos. Se removió el sobrenadante. Se lavó el botón con $100\ \mu\text{l}$ de etanol al 70%. Se centrifugó durante 4 minutos. Se removió el sobrenadante.
6. Se secó durante 15 minutos al vacío.
7. Se resuspendió el botón en $20\ \mu\text{l}$ de TE. Cuando el botón era difícil de disolver, se agregó SDS al 0.1 % al TE y se incubó hasta por 30 minutos a 37°C . Se congeló a -20°C .
8. Antes de usar la sonda: se hirvió durante 10 minutos y luego se enfrió en hielo durante 5-10 minutos. Se transfirió la sonda a 10 ml de solución de hibridación.
9. Se agregó la solución de hibridación conteniendo la sonda a la bolsa con el filtro prehibridado.

La sonda se reusa hasta cinco veces, descongelándola a temperatura ambiente o 37°C , seguido de ebullición durante 10 minutos y enfriamiento brusco, en hielo durante 5-10 minutos.

Instrucciones especiales: Los reactivos deben sacarse del congelador inmediatamente antes de usar, colocarse en una hielera con hielo picado y usar rápidamente en forma aséptica. Únicamente usar tips nuevos, estériles, nunca reintroducir un tip usado a un vial. Estos reactivos son **sumamente caros**, no deben arriesgarse por ahorrar un tip, sólo use tips nuevos, **nunca dejarlos fuera del congelador**, guardarlos inmediatamente después de usarlos.

7.3.9.1. Cómo estimar el rendimiento del ADN marcado con digoxigenina (23)

Roche Diagnostic, DIG DNA labeling and detection kit contiene ADN control marcado, que puede usarse en un ensayo directo para estimar el rendimiento de ADN marcado con DIG. Se recomienda que el rendimiento de ADN marcado con DIG de cada reacción de primers al azar se estime de acuerdo con el procedimiento siguiente.

Este proceso confirma que la reacción de marcación fue exitosa y que produjo suficiente muestra para aplicaciones subsiguientes y familiariza al usuario con la metodología básica de detección del sistema Roche.

Procedimiento:

1. Se mezclaron 45 μl de NBT y 35 μl de BCIP en 10 ml de buffer 3. **Este substrato de color se preparó fresco y se usó en el último paso. Se protegió de la luz directa, guardándolo en una gaveta antes de usarlo.**
2. Se hicieron diluciones seriadas del ADN marcado control en buffer de dilución de ADN.

ADN marcado control	ADN/Buffer	Concentración	Dilución
Concentración Inicial	Dilución	Total	Final
5 ng/ μl	1 μl /4 μl	1 ng/ μl (A)	1:5
1 ng/ μl (dilución A)	1 μl /9 μl	100 pg/ μl (B)	1:50
100 pg/ μl (dilución B)	1 μl /9 μl	10 pg/ μl (C)	1:500
10 pg/ μl (dilución C)	1 μl /9 μl	1 pg/ μl (D)	1:5 000
1 pg/ μl (dilución D)	1 μl /9 μl	0.1 pg/ μl (E)	1:50 000

Las diluciones A-E pueden guardarse a -20°C por un mínimo de un año.

1. Se colocó 1 μl de las diluciones B-E en una membrana de nylon cargada positivamente, marcando la membrana débilmente con un lápiz para identificar cada dilución.
2. Se hicieron diluciones seriadas de la sonda recién marcada (de concentración inicial desconocida) en buffer de dilución de ADN de acuerdo a la tabla del paso dos, hasta llegar a una dilución de 1:50 000.
3. Se colocó 1 μl de cada una de las diluciones preparadas en el inciso 4 sobre la misma membrana de nylon, marcando débilmente con un lápiz para identificar cada dilución.
4. Se fijaron los ADNs a la membrana horneando a 80 °C por 30 minutos.
5. Se incubó por 30 minutos en 10 ml de reactivo de bloqueo.
6. Se incubó por 30 minutos en 10 ml de solución de Anti-DIG.
7. Se lavó la membrana 2 veces por 15 minutos con 10 ml de buffer de lavado.
8. Se equilibró de 2 a 5 minutos con 10 ml de .buffer de detección.
9. Se incubó la membrana en 2 ml de solución de color en un contenedor en la oscuridad.
10. Se paró la reacción con buffer TE o con agua.
11. Se comparó la intensidad de las manchas del control y de las diluciones de la sonda para estimar la concentración de la sonda preparada. El cuadro siguiente permite realizar dicha comparación:

Pmol	0.25	0.025	0.0025	0.00025
ADN control	●	●	●	○
Sonda	●	●	●	○
Experimental	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴

7.4. Diseño de la investigación:

7.4.1. Muestra:

Por conveniencia. Se utilizaron 97 cepas de *Salmonella typhi* aisladas en el Hospital Roosevelt y almacenadas a -70 °C en el INCAP, (43 de 1986, 3 de 1990, 8 de 2000, 16 de 2001, 14 de 2002 y 13 de 2003).

7.4.2. Historias Clínicas:

Para la recolección de datos de las 21 historias clínicas a las que se pudo tener acceso en el Hospital Roosevelt, se utilizó una boleta (Boleta 1). Sin embargo, la información encontrada en las historias clínicas fue muy diversa y poco representativa por lo que únicamente se tomó el dato de las complicaciones.

7.4.3 Análisis Genético y Estadístico:

7.4.3.1. Análisis multivariado:

Este tipo de análisis es útil para explicar relaciones entre una gran cantidad de indicadores o para explorar relaciones no conocidas entre estos (29,30). A continuación se describen brevemente las técnicas multivariadas utilizadas en el presente estudio:

7.4.3.1.1. Análisis por conglomerados (clusters).

Es una herramienta estadística que permite ubicar sujetos en subgrupos. Se utiliza generalmente cuando se sospecha la existencia de segmentos pero no se conocen (30,31).

Los clusters fueron utilizados para encontrar agrupaciones de cepas de *S. typhi* que compartieran bandas entre sí. El cluster por año permite ver las diversas presentaciones para ese año. El

cluster de todos los años, muestra una idea sobre la semejanza entre años.

7.4.3.1.2. Dendrogramas

Son usados para visualizar la secuencia anidada de los clusters que resultan en un conglomerado jerárquico (30,31).

En este tipo de gráfica se observa que entre más corta es la distancia génica, más parecidas son las cepas y más pequeño es el rectángulo que las relaciona. Se utilizó el método de mediana (UPGMA) para realizar las uniones.

7.4.3.1.3. Análisis discriminante

Ayuda a comprender las diferencias entre grupos. Explica, en función de características métricas observadas, por qué los objetos/sujetos se encuentran asociados a distintos niveles de un factor. Esta técnica tiene como objetivo fundamental comprender las diferencias entre grupos para poder predecir la probabilidad de que una entidad, persona o empresa, pertenezca a un grupo determinado (31).

Esta técnica permite observar las diferencias entre las cepas para cada año, y al mismo tiempo se observan las diferencias entre los años mediante una gráfica que asocia cada diferencia por medio de un factor (ejes de la gráfica).

Para el análisis de clusters se utilizó el programa Gene Profiler RFLPscan 3.5.6 y para el análisis discriminante y la realización del dendrograma se utilizó el SPSS 10.0.

8. RESULTADOS

De las 97 muestras de ADN cromosomal de *S. typhi* digeridas con *Pst*I se obtuvieron bandas con pesos moleculares de 5187 a 27069 kb (Fig. 1). El análisis del cluster de los ribotipos por año, muestra que existe una gran similitud entre las cepas de 1986 y de 2001, y entre las cepas de 2000 y 2003 (Gráfica 1). El análisis discriminante de los años confirma lo anterior e indica que el año 2003 presenta la mayor diversidad de cepas (Gráfica 2). Los análisis de clusters por año muestran para 1986 diversas agrupaciones de cepas (Gráfica 3); para 1990, tres únicos aislamientos que son completamente diferentes (Gráfica 4); para 2000, dos grandes grupos de cepas (Gráfica 5); para 2001, tres grandes grupos de cepas (Gráfica 6); para 2002, tres grandes grupos y tres cepas completamente distintas del resto (Gráfica 7) y para 2003, tres grupos de cepas muy distintos entre ellos (Gráfica 8). Según el dendrograma de todos los ribotipos obtenidos, se observan agrupaciones que incluyen cepas de 1986, 2001, 2002 y 2003 (Gráfica 9). Además, existen dos cepas pertenecientes a 1986 que son completamente diferentes a todo el grupo estudiado, dos cepas de 1986 idénticas entre sí y dos cepas, una de 2001 y otra de 2002, que son idénticas también (Gráfica 9). Al agrupar los ribotipos de las cepas presentes en una determinada complicación, se observan bandas en común (Fig. 2). Las tres cepas involucradas en compromisos hepáticos poseen dos bandas en común (11224 kb y 7201 kb); las dos cepas involucradas en neumonías poseen dos bandas en común (14035 kb y 11224 kb); las dos cepas involucradas en endocarditis poseen dos bandas en común (13021 kb y 11224 kb); las cepas involucradas en pancreatitis poseen dos bandas en común (11224 kb y 7201 kb); las dos cepas involucradas en perforación intestinal y en hemorragia gastrointestinal respectivamente, poseen una banda en común (7201 kb) y carecen de la banda (11224 kb) que la mayoría de las cepas del estudio presentan. La cepa obtenida de un portador crónico, posee una banda (8063 kb) que no está presente en ninguna otra cepa de las estudiadas con historia clínica. Las tres cepas que no están

involucradas en ninguna complicación, son muy diferentes entre ellas puesto que no presentan ninguna banda en común.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La caracterización molecular de las cepas de *S. typhi* aisladas en el Hospital Roosevelt durante 1986, 1990, 2000, 2001, 2002 y 2003; muestra una alta diversidad. Estos resultados excluyen la diseminación de una variante única de *S. typhi* en Guatemala. Estudios realizados en continentes como Asia y Europa, han sugerido que la endemicidad y los brotes de fiebre tifoidea pueden estar asociados con ribotipos predominantes (32) o con muchos ribotipos de *S. typhi* (33), como lo observado en el presente estudio. La gran variabilidad de ribotipos puede ser debido a múltiples fuentes de infección, lo cual significaría fallas en el saneamiento (34,35).

Los resultados muestran variantes de *S. typhi* de 1986 muy similares a las variantes de 2001; lo que puede sugerir, reordenamientos en el ADN de la bacteria. Ha sido reportado que *S. typhi* puede experimentar cambios en su genoma por transferencia horizontal, incluyendo mecanismos como transducción (bacteriófago mediado), conjugación (plásmido mediado) o transformación (1).

El dendrograma de 1990 indica que se trata de cepas muy diferentes del resto de los años, sin embargo, se contó únicamente con tres aislamientos, por lo que podría no ser significativo. El análisis discriminante muestra que las cepas más homogéneas entre sí son las de 1986 y las de mayor diversidad son las de 2003, lo cual podría reflejarse en presentaciones clínicas muy diferentes. Lamentablemente, no se contó con los archivos médicos de estos años y por lo tanto, se presenta una propuesta para la realización de un estudio prospectivo (Boleta 1).

Se observa que dos cepas de 1986, identificadas como 30 y 10303, son las más distantes genéticamente del grupo. Se desconoce la razón de tal diferencia. Tampoco se cuenta con los cuadros clínicos de los pacientes contagiados con estas cepas. Son necesarios otros estudios para profundizar sobre estas diferencias tan marcadas, que pudieran involucrar mecanismos de virulencia no vistos en otras cepas.

Dos cepas de 1986 son idénticas entre sí. Sin embargo, no se cuentan con los archivos para poder identificar si eran cepas aisladas de un mismo paciente, del mismo

tipo de muestra o al mismo tiempo en el curso de la enfermedad. Se tienen otras dos cepas idénticas, una de 2001 y la otra de 2002. Esto podría significar que la cepa ha conservado sus características a través del tiempo y posiblemente es transmitida por un foco que continúa latente o un portador crónico.

Se observa que tres cepas aisladas en agosto de 2001, de diferentes pacientes, presentan la mayoría de bandas en común. Esto sugiere un posible brote, sin embargo, se necesitaría de la procedencia de los pacientes para poder trazar un mapa con posibles fuentes comunes de contaminación y el archivo médico de estos pacientes no refería en detalle este dato. Lo anterior recalca la importancia de la ribotipia como una valiosa herramienta en la determinación de brotes epidémicos (36).

Al comparar los ribotipos de las historias clínicas obtenidas, según las complicaciones presentadas, se observan bandas en común lo que da lugar a la posible localización de segmentos (de genes) que codifiquen características que hacen a estas cepas capaces de provocar complicaciones específicas. Se tiene que estas bandas en común se conservan a través de los años. Sin embargo, el intervalo de tiempo es de 1 ó 2 años, se debe estudiar si estas bandas son conservadas por mayores intervalos de tiempo. Las cepas aisladas de pacientes sin complicaciones, presentan patrones de restricción muy diferentes entre sí y entre los obtenidos de cepas involucradas en complicaciones.

La cepa aislada de un portador crónico, solamente posee una banda que no está presente en ninguna otra cepa de las estudiadas con historia clínica. Esto sugiere, que este tipo de cepas debe poseer diferencias muy sutiles, lo que concuerda con el hecho de que deben evadir muy bien al sistema inmune para poder localizarse en las vías biliares y multiplicarse cuando lo requieran (1,2).

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Existe una alta diversidad de *S. typhi* en Guatemala. No hay variantes que predominen.
- 10.2 La ribotipia es una útil herramienta para la epidemiología molecular, ya que permite discriminar entre cepas de la misma bacteria, comparando su ADN ribosomal el cual es muy conservado.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Tomar en especial consideración las muestras 30 y 10303 (ambas de 1986), para posteriores investigaciones, por ser las más distantes genéticamente del grupo estudiado. También, las muestras 9031 y 16119, ya que debieron ser purificadas dos veces para poder ser cortadas con la enzima de restricción. Se cree, estas muestras pudieran poseer algún mecanismo de protección del ADN.
- 11.2 Realizar un estudio prospectivo de fiebre tifoidea en Guatemala a nivel nacional. Ubicar posibles brotes por medio de la ribotipia de cepas aisladas de pacientes y del agua, datos que podrían ayudar a la identificación de focos de infección.
- 11.3 Aislar cepas de *S. typhi* con su respectiva historia clínica. Comparar según complicaciones presentadas para corroborar las bandas en común encontradas en este estudio.
- 11.4 Dar continuación al presente tamizaje a través de estudios más específicos como secuenciaciones de genes (38,39).

12. REFERENCIAS

- 1) Wain J, et al. Unlocking the genome of the human typhoid bacillus. March 2002. Lancet Infectious Disease. Vols. 2, Vol. 2. Pp. 163-169.
- 2) House, D, et al. Typhoid fever: pathogenesis and disease. Current Opinion in Infectious Diseases 2001. Oct 14:5 573-8.
- 3) Levine MM. Typhoid fever vaccines. In Plotkin SA, Orenstein WA Vaccines 3rd ed. Saunders Company 1999; 781-814
- 4) Hook, E. *Salmonella* species (including typhoid fever). In Principles and Practice of Infectious Diseases 3rd. ed. Mandell GL et al. Churchill Livingstone 1990, Pp. 1700-1716.
- 5) Aventis Pasteur. Historia de la Vacunación, Fiebre tifoidea. México 2000. www.aventispasteurmex.com/enfermedad_tifoidea
- 6) Murray, Patrick. Manual of Clinical Microbiology. 8 th. Edition. Washington D.C. American Society of Microbiology, 2003. Vols. 2, Vol. 1. Pp. 663-667.
- 7) Ochman, Howard, et al. Distribution of Pathogenicity Islands in *Salmonella* spp. Infection and Immunity, Dec 1996. Pp. 5410-5412.
- 8) Fierer, J, Guiney DG. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. University of California at San Diego School of Medicine, La Jolla, California, USA. April 2001. Pp. 775-780.

- 9) Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology. Volume 17, Number 1. Published Quarterly. January 2004. Pp. 1-254.
- 10) Finch, MJ, et al. Plasmids in *Salmonella typhi* in Lima, Peru, 1987-1988: epidemiology and lack of associations with severity of illness or clinical complications. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 1992. Pp. 390-396.
- 11) Zúñiga. Pediatría I. Fiebre Tifoidea. El Salvador. Oct 2001. www.aulavirtual.com.sv
- 12) World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biological. www.who.int/vaccines-diseases/diseases/typhoid_fever.shtml. Copyright, 2003.
- 13) Sistema de Información Gerencial de Salud (SIGSA) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. República de Guatemala. Años 2001, 2002 y 2003.
- 14) Boletín Epidemiológico Nacional. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. República de Guatemala. Años 2001, 2002 y 2003.
- 15) Thong, Kwain-Lin, et al. Molecular Analysis of Isolates of *Salmonella typhi* Obtained from Patients with Fatal and Nonfatal Typhoid Fever. Journal Of Clinical Microbiology, April 1996. Pp. 1029-1033.
- 16) Ruano, César. Fiebre tifoidea, diagnóstico y tratamiento en el Hospital José Felipe Flores en Totonicapán. Mayo, 1982. Facultad de Medicina. USAC, Guatemala.
- 17) Schumann, Mercedes. Evaluación y nuevas alternativas para el tratamiento de *Salmonella typhi*. Noviembre, 1992. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala.

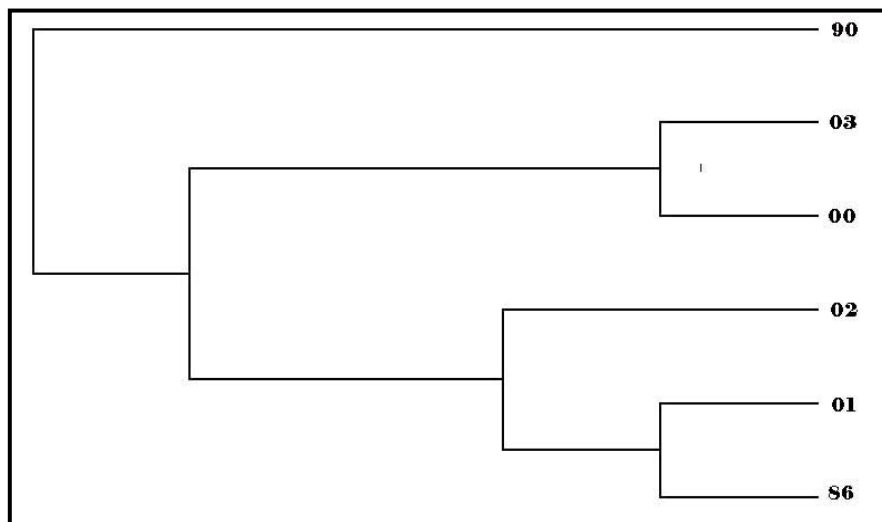
- 18) The HiMedia Manual for Microbiology Laboratory Practice. India 1998. Pp. 455-456.
- 19) Koneman E.W. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th. Edition. Phyladelphia, 1998. Pp. 505-508.
- 20) Harris, Eva. A Low-Cost Approach to PCR, Appropriate Transfer of Biomolecular Techniques. New York, 1998. Oxford University Press. Pp. 10-25.
- 21) Ling, J.M, et al. Molecular Methods for the Epidemiological Typing of *Salmonella enterica* Serotype *typhi* from Hong Kong and Vietnam. Journal Of Clinical Microbiology, Jan 2000. Pp. 292-299.
- 22) Stull TL. A broad spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. J Infect Dis 1988; 157: 280-286.
- 23) Roche Diagnostic GmbH. <http://roche-applied-science.com/> Germany, 2004.
- 24) Fica, Alberto. Prat-Miranda, Soledad. Epidemic Typhoid in Chile: Analysis by Molecular and Conventional Methods of *Salmonella typhi* Strain Diversity in Epidemic (1977 and 1981) and Nonepidemic (1990) Years. Journal of Clinical Microbiology, July 1996. Pp. 1701-1707.
- 25) Figueroa Sanchez, Gina. Fiebre tifoidea, revisión de diez años de casos confirmados bacteriológicamente, atendidos en el Hospital Roosevelt, durante el período 01 de enero de 1978 al 31 de diciembre de 1987. Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 94.

- 26) Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 1st. Edition. USA, 1982. Cold Spring Harbor Laboratory. Vol. 1 Pp. 97, 150, 157, 161, 162, 163. Chapter 7.
- 27) QIAamp Tissue DNA extraction Kit Protocole.
- 28) Invitrogen life technologies. Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptasa (AMV-RT) USA.
- 29) Rencher, A. C. Methods of multivariate analysis. Wiley Interscience. NT, USA. 1995.
- 30) Marriott, F. H. C. A dictionary of statistical terms. 5th. Ed. Internacional Statistical Institute by Longman Sc. 6 Technical. UK. 1990.
- 31) Huberty, C.J. Applied Discriminant Analysis. Wiley Interscience. 1994.
- 32) Mather, K. Molecular techniques in the study of *Salmonella typhi* in epidemiologic studies in endemic areas comparison with Vi phage typing. 1986 Am. J. Trop. Med. Hyg. Pp. 831-835.
- 33) Mourad, A. Multiple-drug resistant *Salmonella typhi*. Clin. Infect. Dis. Pp. 135-136.
- 34) Medina, E. Fiebre Tifoidea en Chile, consideraciones epidemiológicas. Rev. Med. Chile 1983. Pp. 609-615.
- 35) Morris, J. Typhoid fever in Santiago, Chile 1984: a study of household contactas of pediatric patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. Pp. 1198-1202.

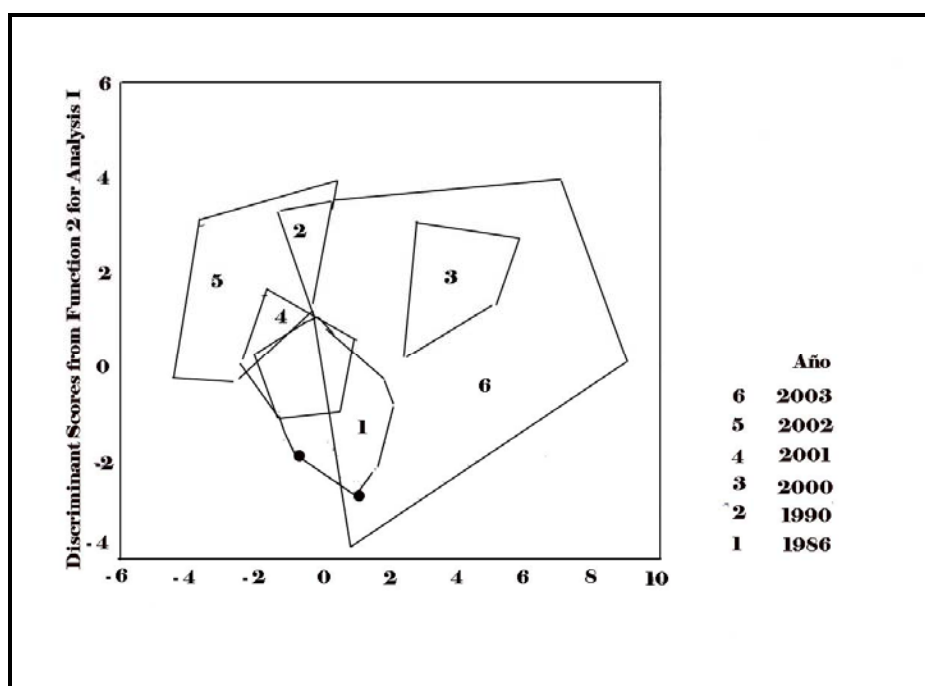
- 36) Altwegg, M. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. J. Infect. Dis. 1989. Pp. 145-149.
- 37) Ramírez C, Ordoñez K, Sabbaj J. Typhoid Fever: diagnostic considerations and complications (abstract no. 376). In: Program and abstracts of the 16th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. Washington, DC. 1976.
- 38) Groisman, E. Salmonella-host interactions; regulation of gene expression: Salmonella. Research in the Department of Molecular Microbiology. Washington University in St. Louis, School of Medicine. groisman@borcim.wustl.edu
- 39) Miller, V. Molecular and Genetic Analysis of Invasion by Enteric Bacteria; Yersinia, Salmonella. Research in the Department of Molecular Microbiology. Washington University in St. Louis, School of Medicine. miller@borcim.wustl.edu.
- 40) Grimont, N. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 1986 Pp. 165-175.
- 41) Thong, K. Epidemiological analysis of sporadic *Salmonella typhi* isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. 1994. Pp. 1135-1141.
- 42) Nastasi, A. rDNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of Salmonella typhi infectious. Epidemiol. Infect. 1991. Pp. 565-576.
- 43) Clements, John. Enteric fever, *Salmonella*, *Shigella* slides. <http://www.tmc.tulane.edu/departments/microbiology/clements/teaching/Pages/Lectures/Sphoto.html>. Copyright, 1999.

- 44) Infection and disease. Invasion and Survival in Host Cell.
<http://s99.middlebury.edu/BI330A/projects/harris/invsurv.htm>. Copyright 2000.
- 45) World Health Organization/VRD. *Multidrug resistant Salmonella typhi*.
http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/graphs/4_mdr-salmonella.htm. Copyright, 2000.
- 46) Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Daños a la Salud, Morbilidad por Fiebre Tifoidea. PAHO El Paso.
<http://www.fep.paho.org/healthprofiles/morbid.htm>. © Copyright 1998-1999.
- 47) Peterson, Johnny. Bacterial Patogenesis. Relation between disease and tests.
<http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch007.htm>. Copyright, 2000.
- 48) Bates, Kim. DNA AND ITS ROLE IN HEREDITY.
<http://bio.winona.msus.edu/bates/Bio241/dna.htm>. March 24, 2004.
- 49) Medical Diagnostic Laboratorios. Diagnostic Services: Application of the Polymerase Chain, Methodologies in Molecular Diagnostic Medicine.
<http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>. © Copyright 2000.
- 50) Course of Bio-engineering. The Applications of Cloning in Gene Analysis.
<http://www.nonoil.com/bio/engineering/chapt8.htm>. China, 2001

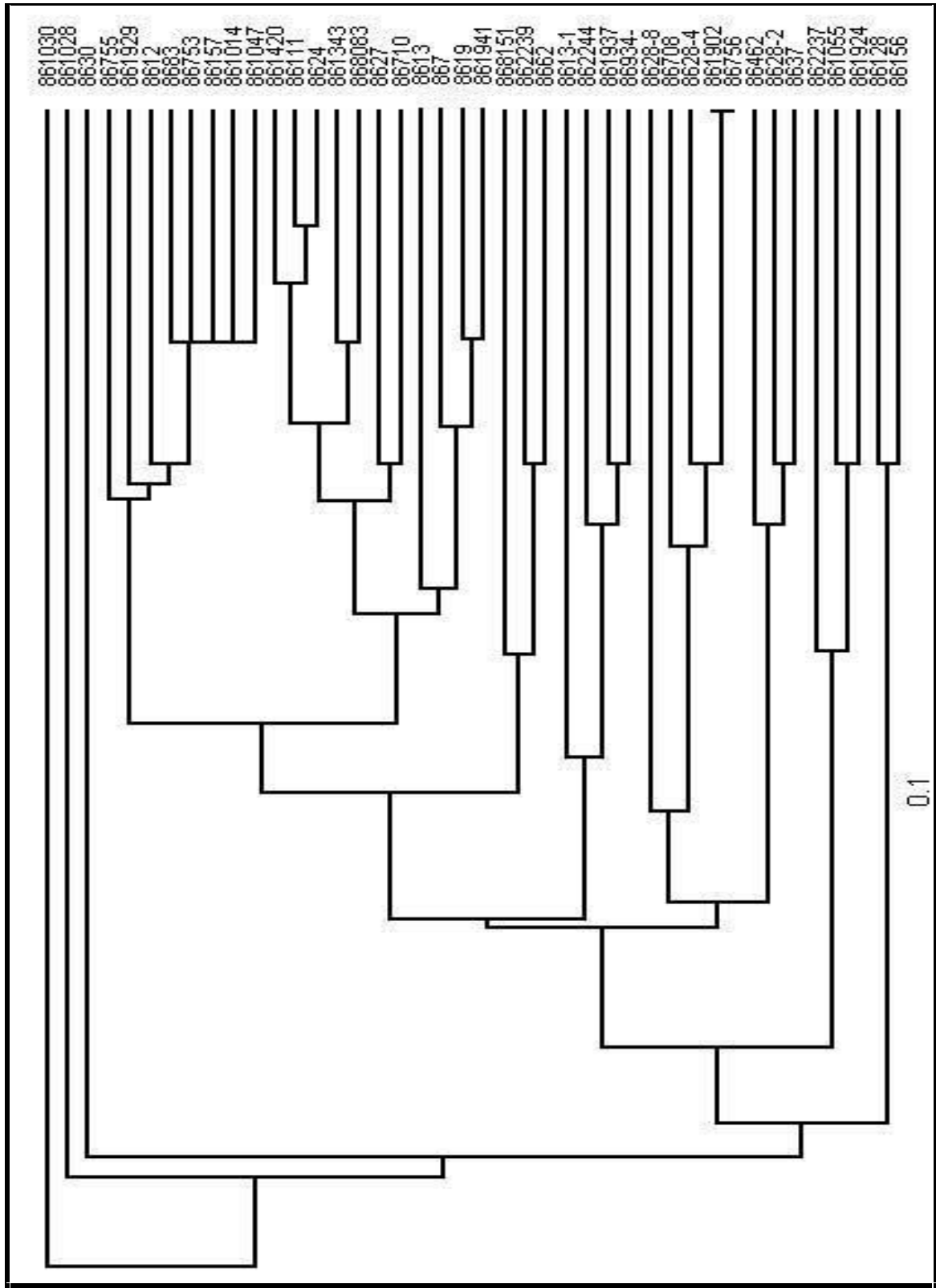
Gráfica 1. Análisis del cluster de los ribotipos por año. Tres aislamientos incluidos para el año 1990, 13 aislamientos para el 2003, 8 aislamientos para el 2000, 14 aislamientos para el 2002, 16 aislamientos para el 2001 y 43 aislamientos para 1986.



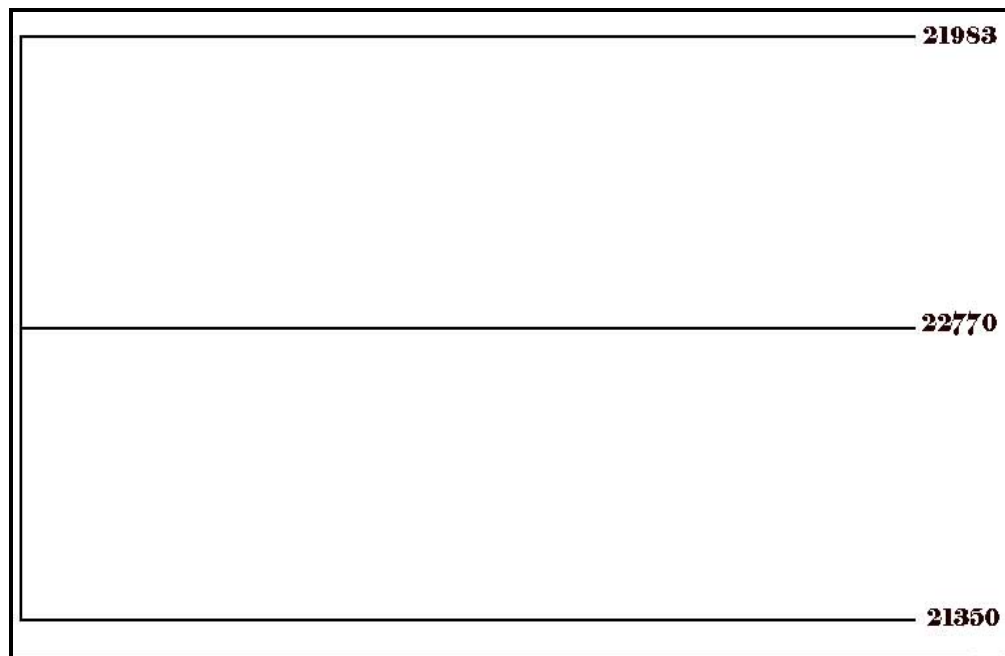
Gráfica 2. Análisis discriminante de los años, utilizando el programa SPSS 10.0. El tamaño de cada polígono refleja la diversidad de los aislamientos para ese año, con un mayor tamaño reflejando mayor diversidad. Además, la sobreposición entre polígonos refleja similitud entre los aislamientos de esos años.



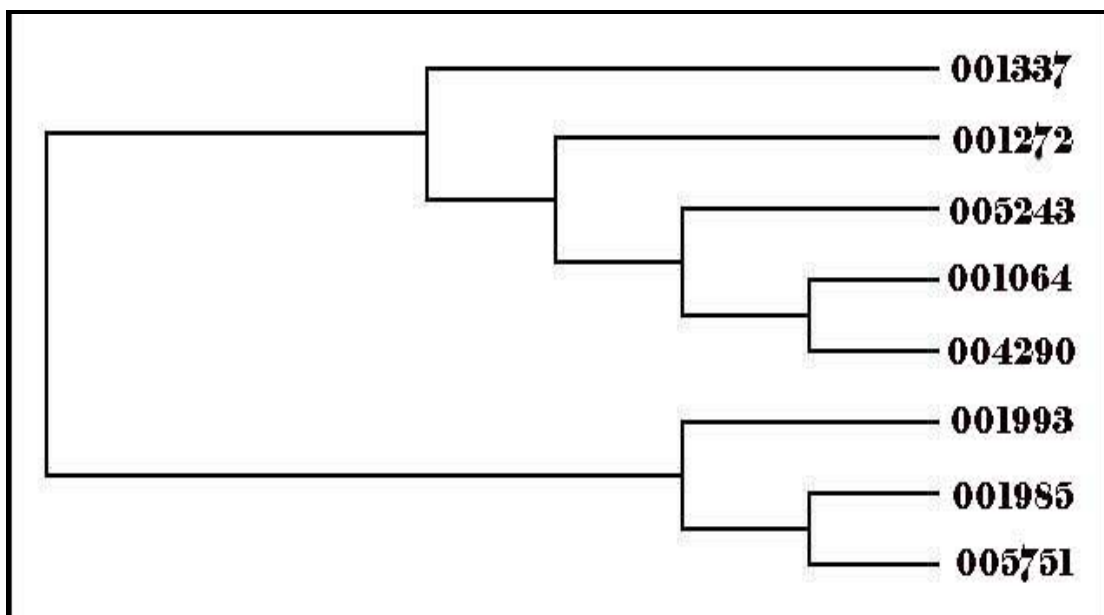
Gráfica 3. Cluster de las cepas aisladas en 1986.



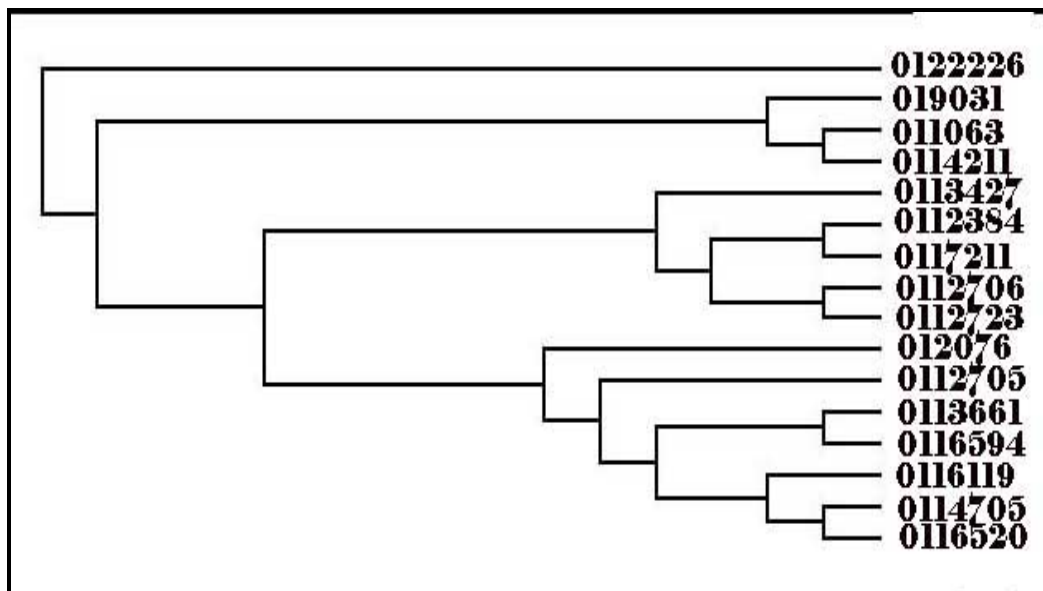
Gráfica 4. Cluster de las cepas aisladas en 1990.



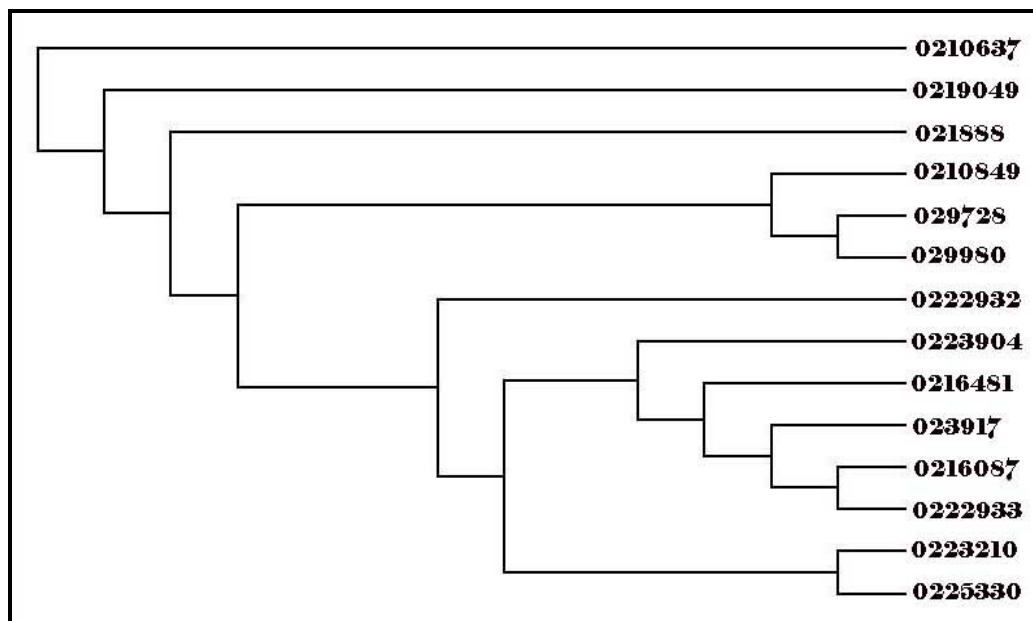
Gráfica 5. Cluster de las cepas aisladas en 2000.



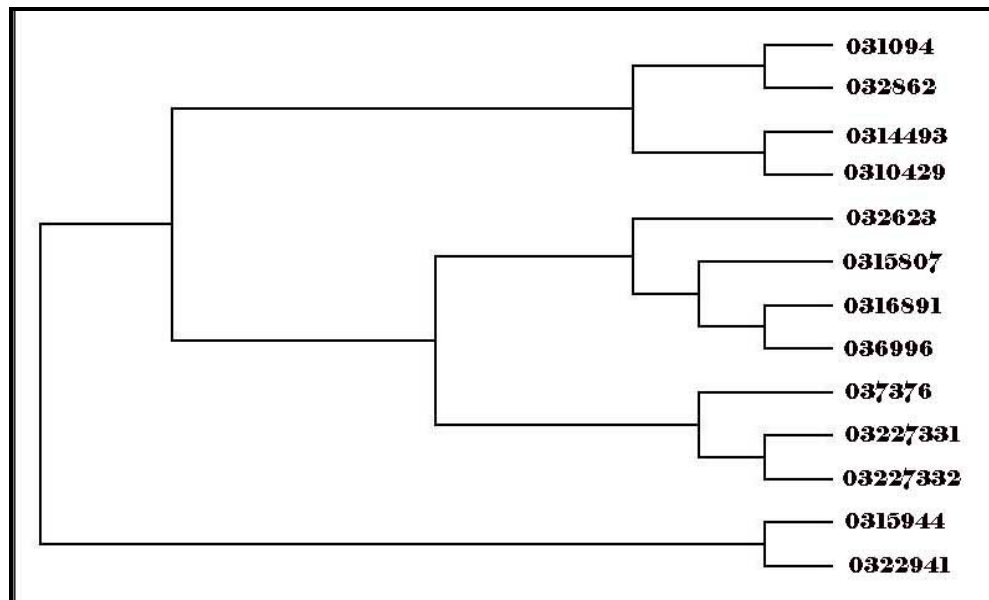
Gráfica 6. Cluster de las cepas aisladas en 2001.



Gráfica 7. Cluster de las cepas aisladas en 2002.



Gráfica 8. Cluster de las cepas aisladas en 2003.



Gráfica 9. Dendrograma de los ribotipos obtenidos de 97 aislamientos de *S. typhi*.

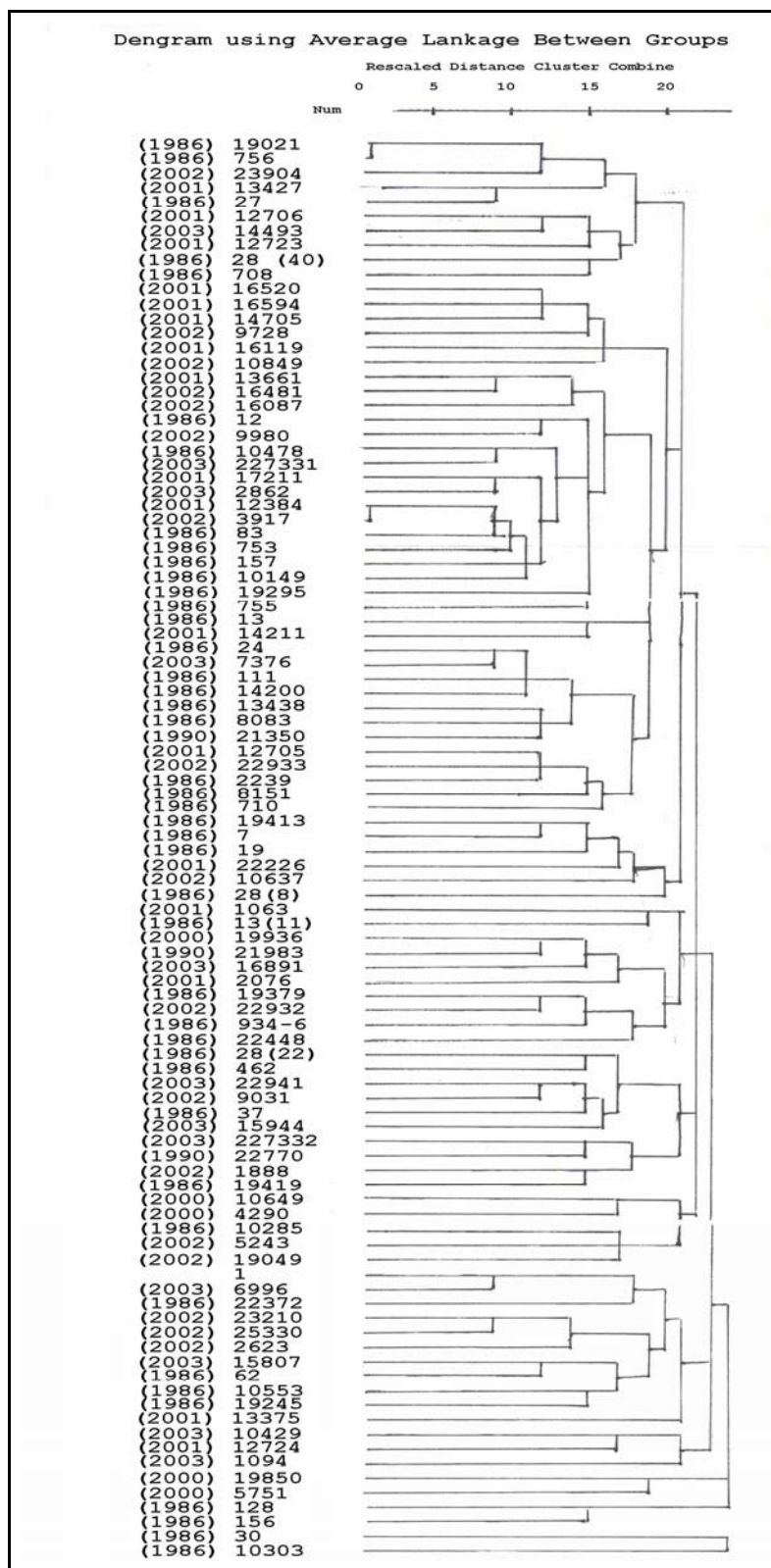
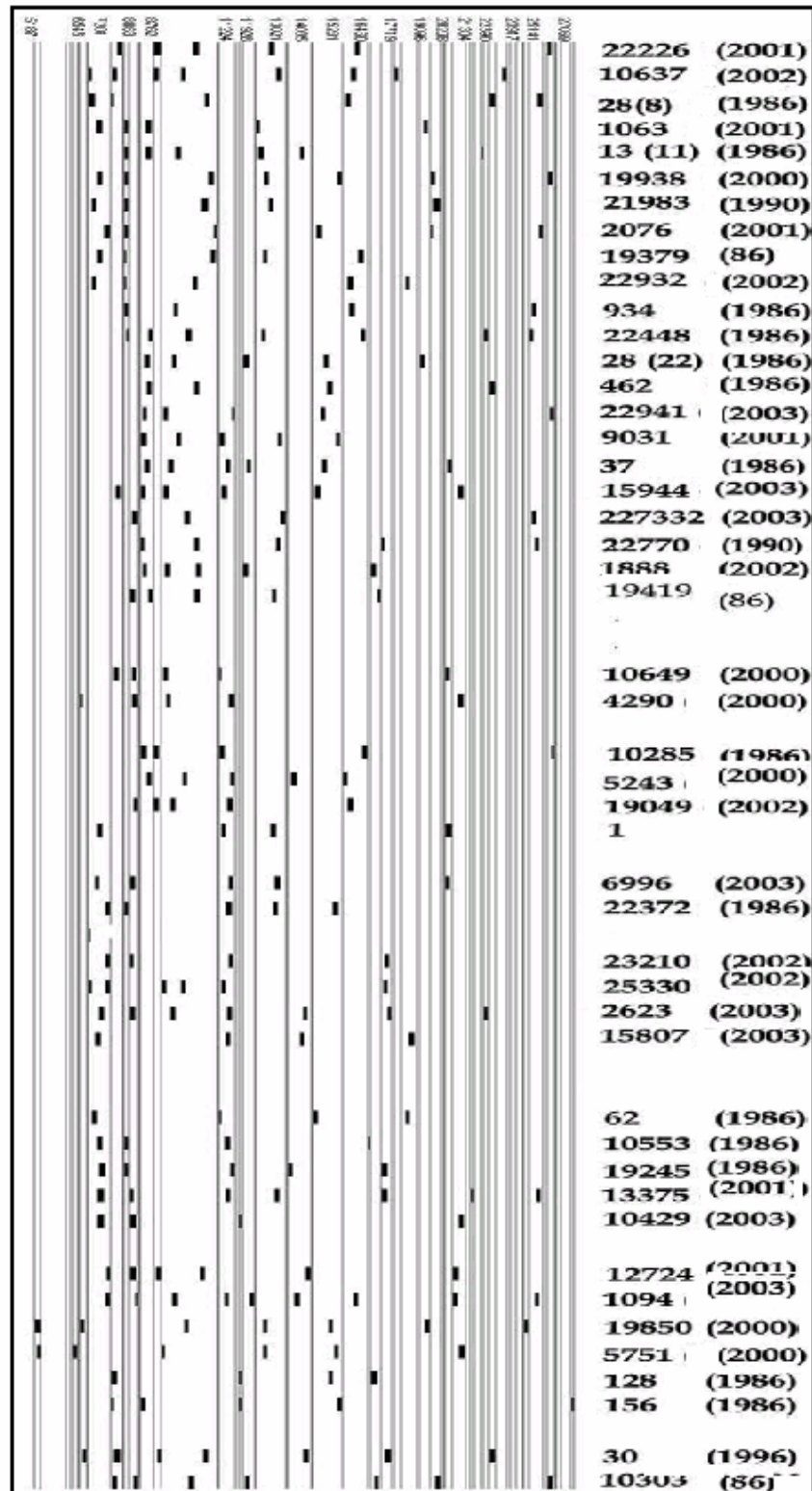


Figura 1. Ribotipos de *S. typhi* obtenidos por medio de la digestión de la enzima de restricción *Pst* I. Este diagrama es una recopilación de 12 Southern blots hibridados con una sonda de 16S-23S rADN marcada con digoxigenina (DIG), la cual fue detectada subsecuentemente utilizando anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, dirigidos a la porción DIG. Cada muestra se presenta con el año de aislamiento entre paréntesis.

A



B

19021	(1986)
756	(1986)
23904	(2003)
13427	(2001)
27	(1986)
12706	(2001)
14493	(2003)
12/23	(2001)
28 (40)	(1986)
708	(1986)
16520	(2001)
16594	(2001)
14705	(2001)
9728	(2002)
16119	(2001)
10849	(2002)
13661	(2001)
16087	(2002)
12	(1986)
9980	(2002)
10478	(1986)
227331	(2003)
17211	(2001)
2862	(2003)
23184	(2001)
3917	(2002)
83	(1986)
753	(1986)
157	(1986)
10149	(1986)
19295	(1986)
755	(1986)
13	(1986)
14211	(2001)
24	(1986)
7376	(2003)
111	(1986)
14200	(1986)
13438	(1986)
5083	(1986)
21350	(1990)
12705	(2001)
22933	(2002)
2239	(1986)
8151	(1986)
710	(1986)
19413	(1986)
7	(1986)
19	(1986)

Figura 2. Comparación de ribotipos según complicaciones clínicas. Se obtuvo los datos clínicos de únicamente 21 casos: (1) Encefalitis; (2) Compromiso hepático; (3) Neumonía; (4) SDRA; (5) Endocarditis; (6) Pancreatitis; (7) Perforación Intestinal; (8) HGI; (9) Aisladas en agosto 2001; (10) Sin complicaciones; (11) Portador crónico.

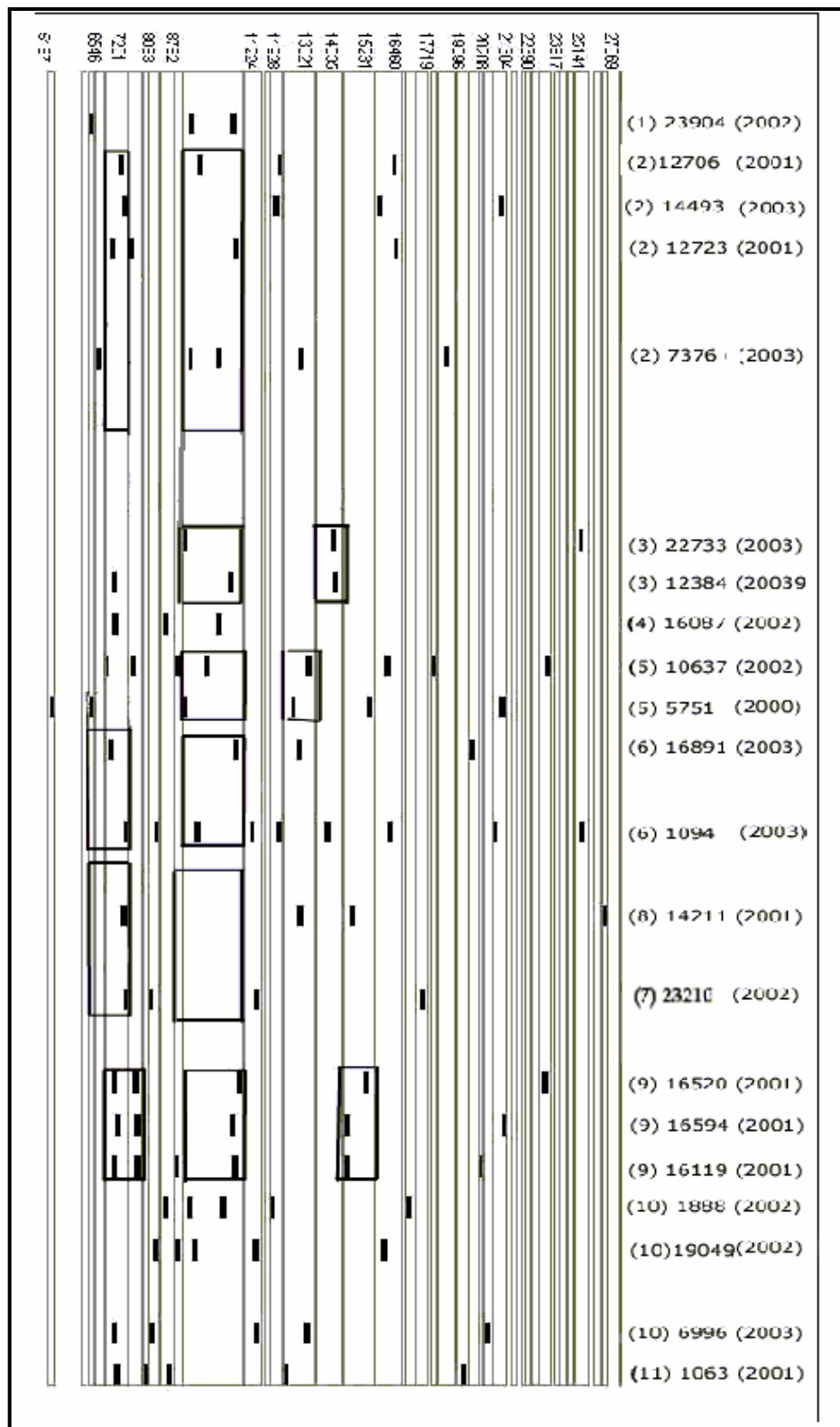
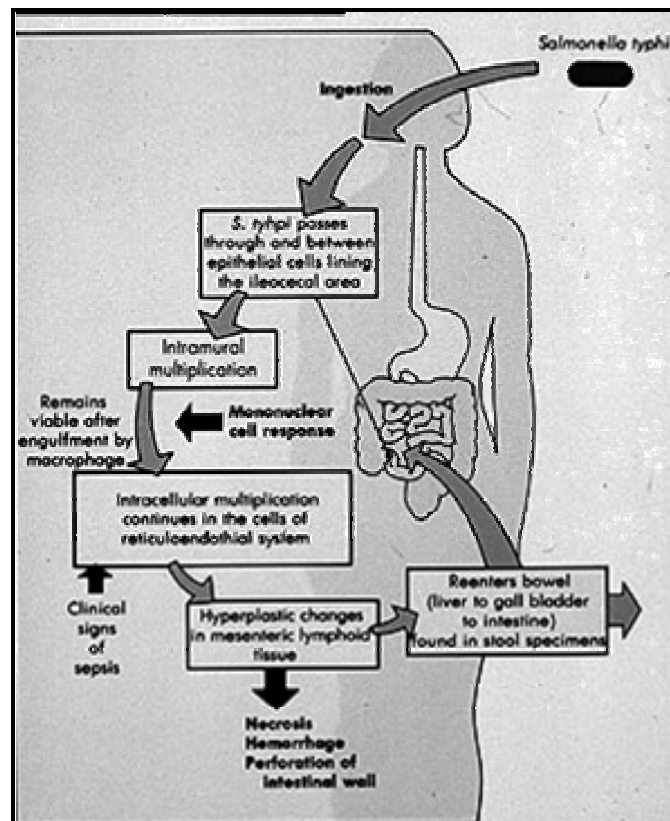


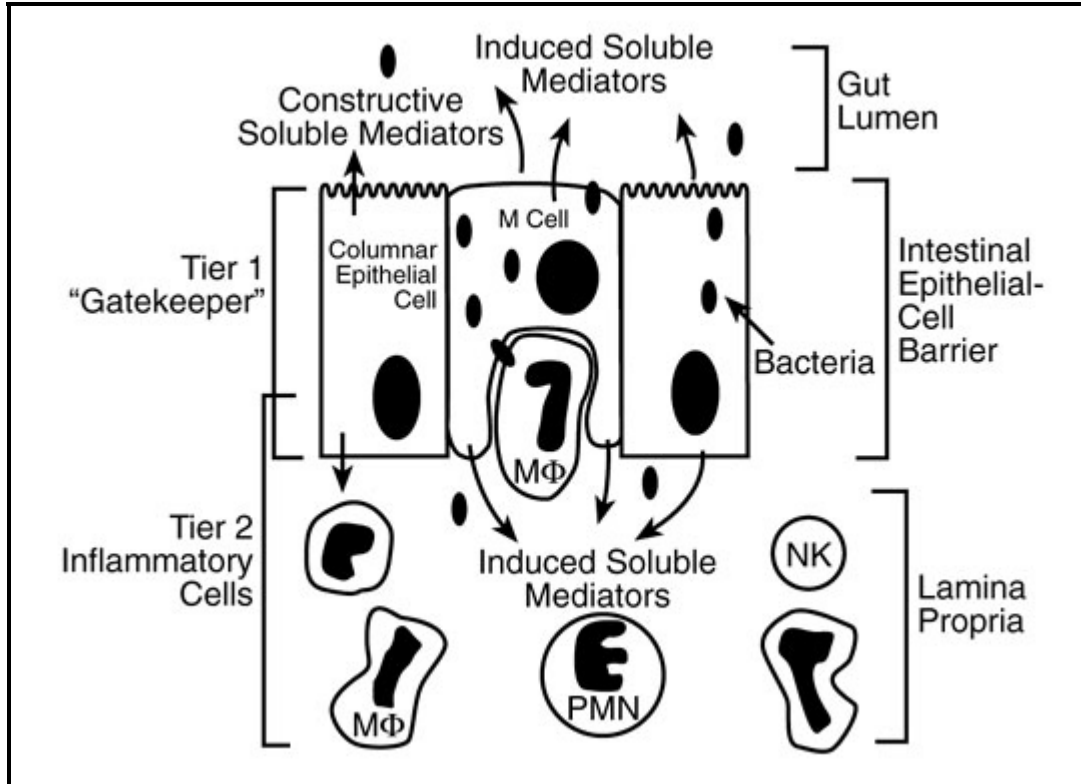
FIGURA 3. INFECCIÓN POR *Salmonella typhi*



Tomado de:

Clements, John. Enteric fever, *Salmonella*, *Shigella* slides.
<http://www.tmc.tulane.edu/departments/microbiology/clements/teaching/Pages/Lectures/Spoto.html>. Copyright, 1999.

FIGURA 4. INVASIÓN DE *Salmonella typhi*

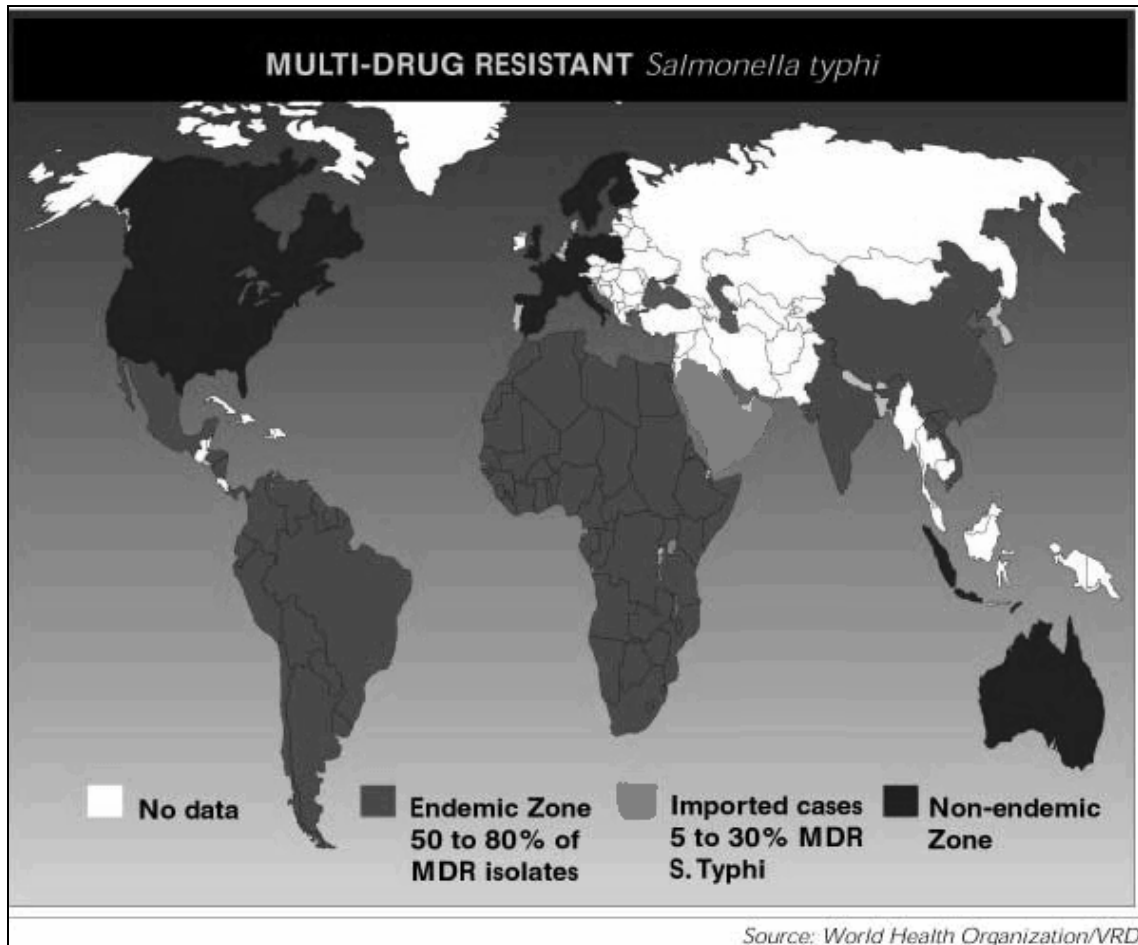


Tomado de:

Infection and disease. Invasion and Survival in Host Cell.

<http://s99.middlebury.edu/BI330A/projects/harris/invsurv.htm>. Copyright 2000.

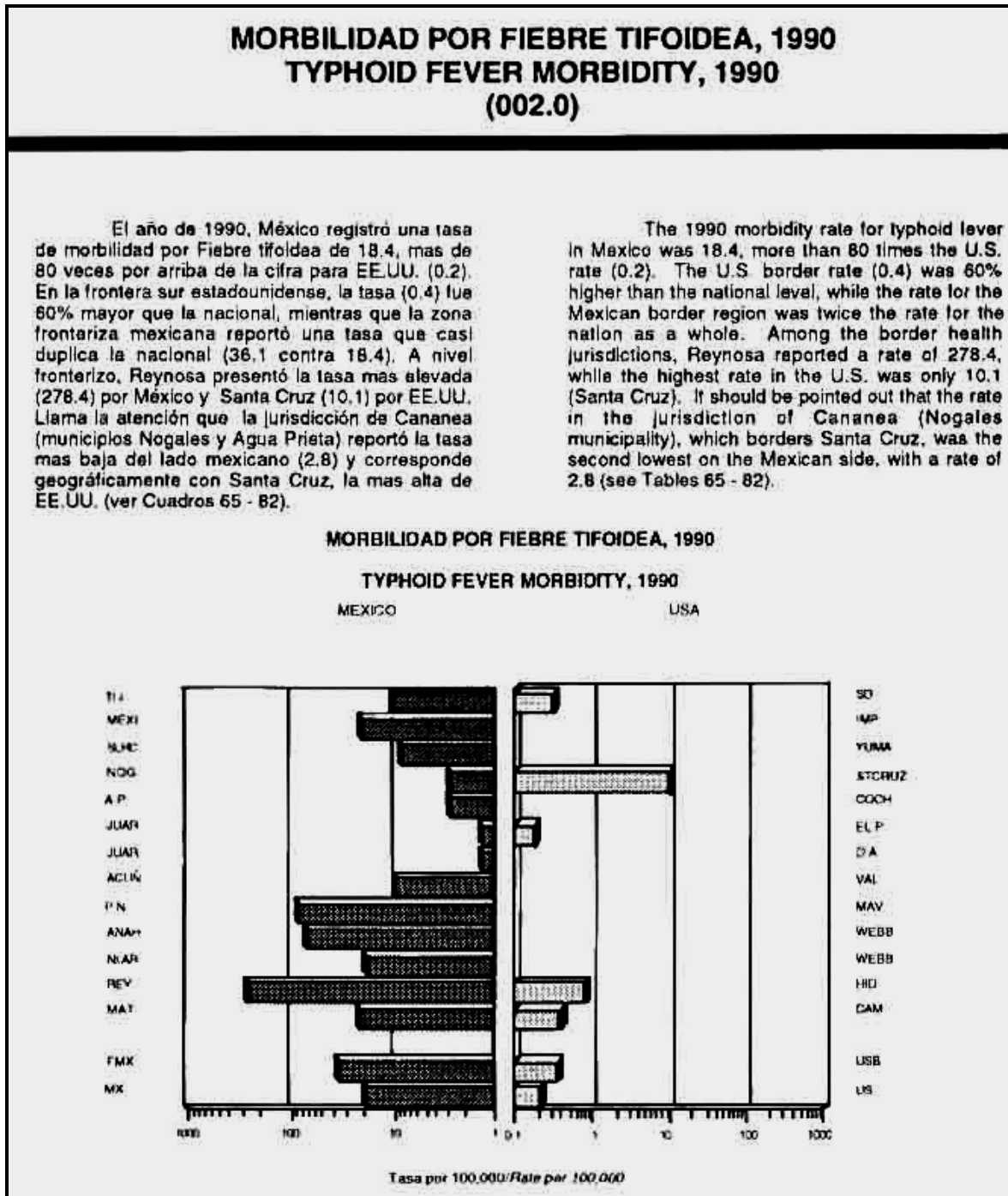
FIGURA 5. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE *Salmonella typhi*



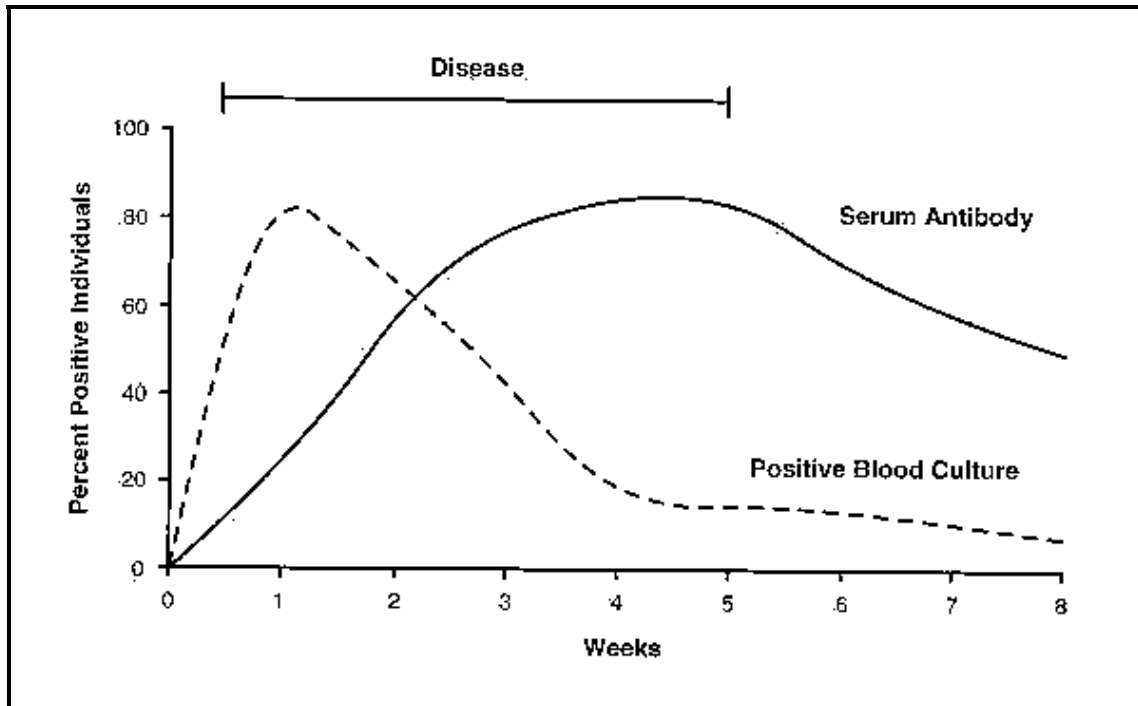
Tomado de:

World Health Organization/VRD. *Multidrug resistant Salmonella typhi*. Copyright, 2000. http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/graphs/4_mdr-salmonella.htm

FIGURA 6. MORBILIDAD POR FIEBRE TIFOIDEA EN MÉXICO Y ESTADOS UNIDOS



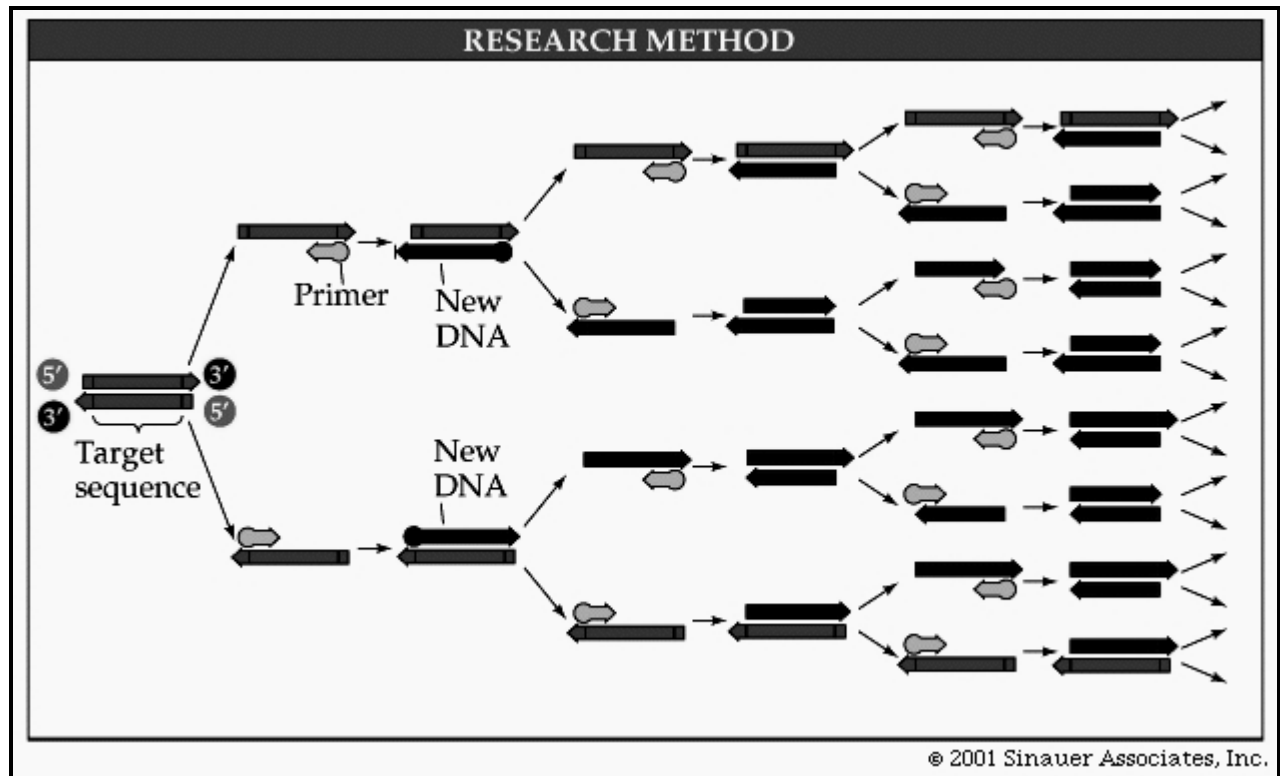
Tomado de:
Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Daños a la Salud, Morbilidad por Fiebre Tifoidea. AHO El Paso. <http://www.fep.paho.org/healthprofiles/morbid.htm>. © Copyright 1998-1999.

FIGURA 7. RESPUESTA INMUNE CONTRA *Salmonella typhi*

Tomado de:

Peterson, Johnny. Bacterial Patogenesis. Relation between disease and tests. <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch007.htm>. Copyright, 2000.

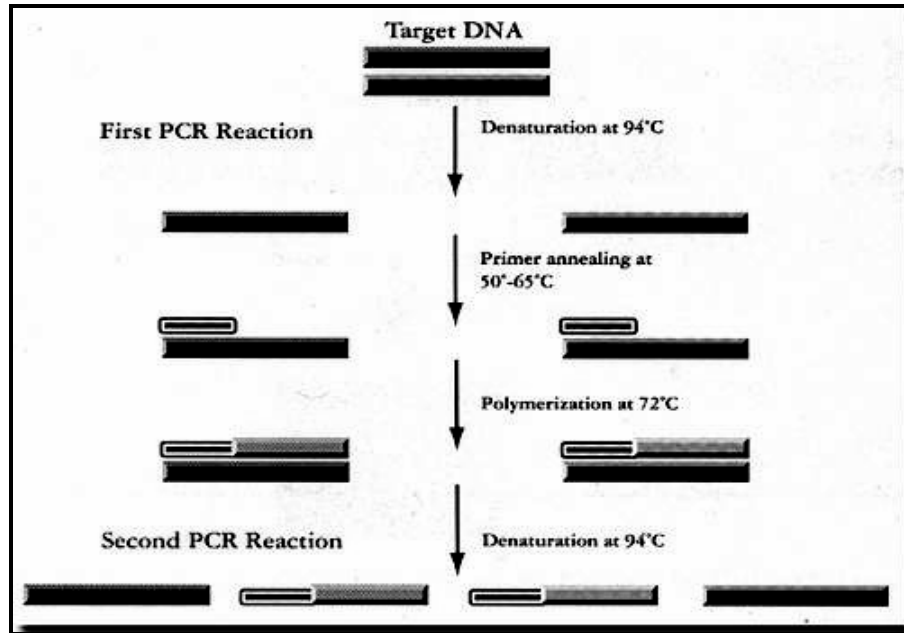
FIGURA 8. AMPLIFICACIÓN POR PCR



Tomado de:

Bates, Kim. DNA AND ITS ROLE IN HEREDITY.
<http://bio.winona.msus.edu/bates/Bio241/dna.htm>. March 24, 2004.

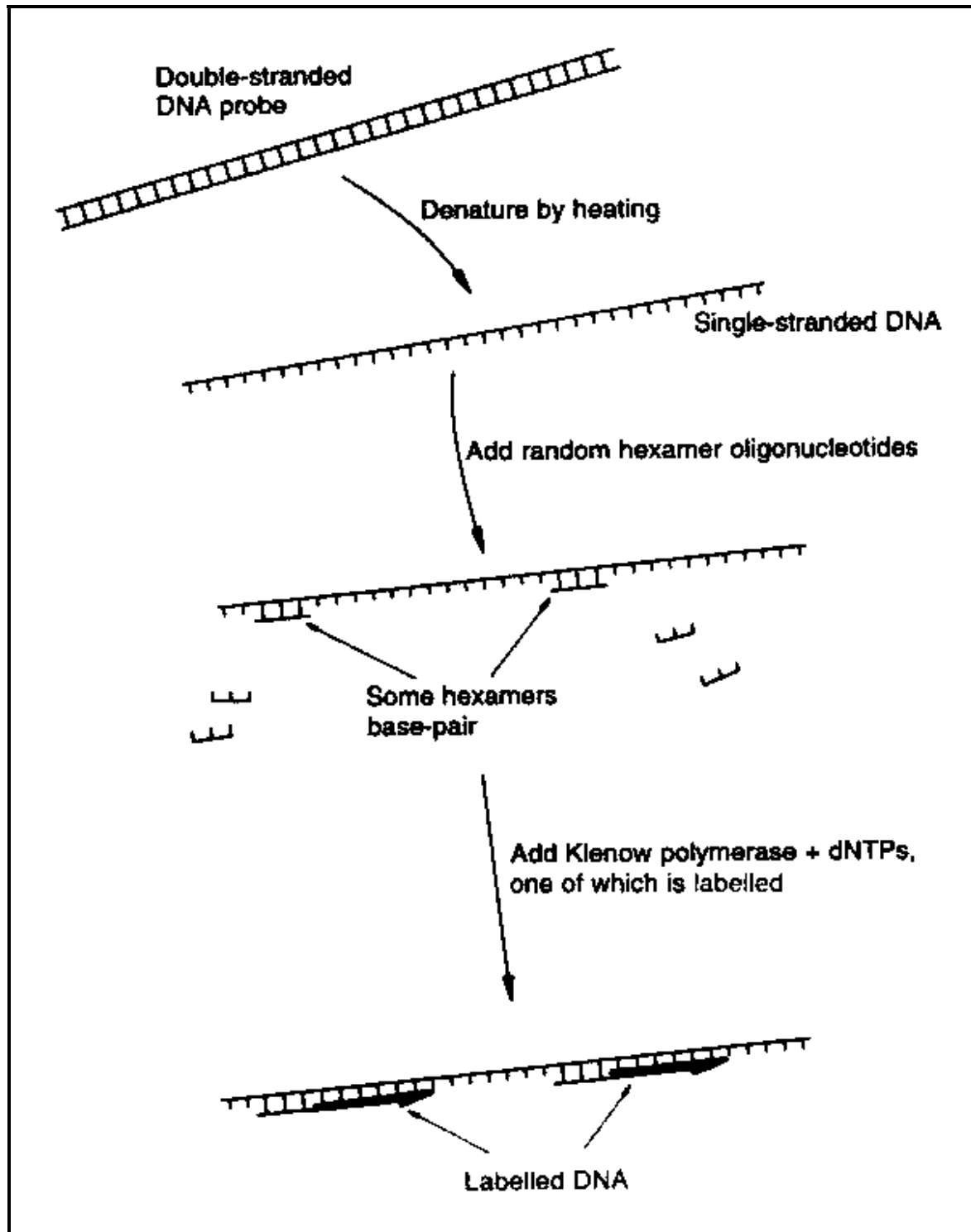
FIGURA 9. PASOS DEL PCR



Tomado de:

Medical Diagnostic Laboratorios. Diagnostic Services: Application of the Polymerase Chain, Methodologies in Molecular Diagnostic Medicine. <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>. © Copyright 2000.

FIGURA 10. MARCACIÓN DE LA Sonda



Tomado de:
Course of Bio-engineering. The Applications of Cloning in Gene Analysis.
<http://www.nonoil.com/bio/engineering/chapt8.htm>. China, 2001

FIEBRE TIFOIDEA-BOLETA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE HISTORIAS CLÍNICAS

1. REFERIDO DE

- | | | |
|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 1.1. Capital
Zona | 1.2. Interior: | |
| | 1.2.1. Chimaltenango | 1.2.2. Huehuetenango |
| | 1.2.3. Quetzaltenango | 1.2.4. Sacatepéquez |
| | 1.2.5. Jutiapa | 1.2.6. Izabal |
| | 1.2.7. Santa Rosa | 1.2.8. Totonicapán |
| | 1.2.9. Zacapa | 1.2.10. Alta Verapaz |
| | 1.2.11. Baja Verapaz | 1.2.12. Chiquimula |
| | 1.2.13. Petén | 1.2.14. San Marcos |
| | 1.2.15. Suchitepéquez | 1.2.16. El Quiché |
| | 1.2.17. El Progreso | 1.2.18. Escuintla |
| | 1.2.19. Retalhuleu | 1.2.20. Sololá |
| | 1.2.21. Jalapa | |

2. EDAD

- | | | | |
|-----------------|--------------------|-----------------------|-----------------|
| 2.1. 0-28 días | 2.2. 29 días-1 año | 2.3. >1-10 años | 2.4. 11-20 años |
| 2.5. 21-30 años | 2.6. 31-40 años | 2.7. 41-50 años | 2.8. 51-60 años |
| 2.9. 61-70 años | 2.10. >70 años | 2.11. No especificada | |

3. SEXO

- | | |
|---------------|----------------|
| 3.1. Femenino | 3.2. Masculino |
|---------------|----------------|

4. PADECE DE ALGUNA ENFERMEDAD QUE CAUSE INMUNODEPRESIÓN

- | | | | |
|---------|----------|-------------|-------------|
| 4.1. NO | 4.2. SI: | 4.2.1. SIDA | 4.2.2. Otra |
|---------|----------|-------------|-------------|

5. DURACION DE SÍNTOMAS

- | | | | |
|----------------|---------------|----------------|-----------------|
| 5.1. <3 días | 5.2. 3-7 días | 5.3. 8-14 días | 5.4. 15-28 días |
| 5.5. > 28 días | | | |

6. TRATAMIENTO PREVIO A CONSULTAR

- | | | | |
|---------|----------|----------------------|-------------------|
| 6.1. NO | 6.2. SI: | 6.2.1. Cloranfenicol | 6.2.2. Ampicilina |
| | | 6.2.3. SXT | 6.2.4. Quinolonas |
| | | 6.2.5. Otro | |

7. SINTOMAS

7.1. Cefalea	7.2. Epistaxis	7.3. Fiebre	7.4. Vómitos
7.5. Nausea	7.6. Diarrea	7.7. Estreñimiento	7.8. Dolor Abdominal
7.9. Anorexia	7.10. Escalofríos	7.11. Meteorismo	7.12. Tos
7.13. Mialgia	7.14. Disuria	7.15. Ictericia	7.16. Dolor de garganta
7.17. Otros			

8. SIGNOS

8.1. Conciencia:	8.1.1. NL	8.1.2. OBNUBIL	8.1.3. Estupor
8.1.4. Coma	8.1.5. No especificada		
8.2. Hidratación:	8.2.1. NL	8.2.2. DEH leve	8.2.3. DEH moderada
	8.2.4. DEH severa		
8.3. Distensión Abdominal	8.4. Dolor Abdominal	8.5. Irritación	
8.6. Hepatomegalia	8.7. Esplenomegalia	8.8. Ascitis	
8.9. Estertores	8.10. Adenomegalia	8.11. Artritis	
8.12. Edema	8.13. Ictericia	8.14. Exantema	
8.15. Fiebre >37.5	8.16. Bradicardia <60	8.17. Hipotensión	
8.18. Hipotermia	8.19. Taquicardia >100	8.20. Otro	

9. DATOS DE LABORATORIO

9.1. Leucocitos (/mm ³):	9.1.1. <1000	9.1.2. 1001-4500	
	9.1.3. 4501-10500	9.1.4. >10500	
	9.1.5. No reportados		
9.2. Hb/Ht:	9.2.1. <10/30	9.2.2. 10-15/31-45	9.2.3. >15/45
	9.2.4. No reportados		
9.3. Plaquetas (/mm ³):	9.3.1. <150 000	9.3.2. 150 001- 300 000	
	9.3.3. > 300 000	9.3.4. No reportados	
9.4. Orina:	9.4.1. NL	9.4.2. Proteinuria	9.4.3. Hematuria
	9.4.4. Otro		
9.5. Creatinina:	9.5.1. NL	9.5.2. 2-4	9.5.3. >4
	9.5.4. No reportada		
9.6. Bilirrubina total:	9.6.1. NL	9.6.2. 1.5.-4.0	9.6.3. > 4.0
	9.6.4. No reportada		
9.7. Transaminasas:	9.7.1. NL	9.7.2. 2-5 X NL	
	9.7.3. 6-10 X NL	9.7.4. >10 X NL	
	9.7.5. No reportadas		
9.8. Fosfatasa Alcalina:	9.7.1. NL	9.7.2. 2-5 X NL	
	9.7.3. 6-10 X NL	9.7.4. >10 X NL	
	9.7.5. No reportadas		

- 9.9. T. Protrombina: 9.9.1. NL 9.9.2. 15-20 s 9.9.3. 20-25 s
9.9.4. >25 s 9.9.5. No reportado

10. RAYOS X

- 10.1. Tórax: 10.1.1. NL 10.1.2. Infiltrado intersticial
10.1.3. Edema pulmonar 10.1.4. Consolidación localizada
10.1.5. Derrame pleural 10.1.6. Infiltrado alveolar
10.1.7. Esplenomegalia 10.1.8. Gas libre subdiafragmático
10.1.9. Hepatomegalia 10.1.10. Adenomegalia Mediastinal
10.1.11. No efectuados o no reportados
- 10.2. Abdomen: 10.2.1. NL 10.2.2. Ileo segmentario
10.2.3. Borramiento psoas 10.2.4. Gas libre intraabdominal
10.2.5. Hepatomegalia 10.2.6. Líquido abdominal libre
10.2.7. Esplenomegalia 10.2.8. Otros
10.2.9. No efectuados o no reportados

11. CULTIVO REALIZADO

TIPO DE CULTIVO	SEMANA DE LA ENFERMEDAD (DESDE INICIO DE LOS SINTOMAS)					
	PRIMERA	SEGUNDA	TERCERA	CUARTA	NEGATIVO	NO EFECTUADO
HEMOCULTIVO						
MELOCULTIVO						
COPROCULTIVO						
UROCULTIVO						
BILIS/DUODENAL						
LIQUIDO PLEURAL						
LIQUIDO ARTICULAR						
HERIDA OPERATORIA						
ESPUTO/TRAQUEA						
L.C.R.						
GANGLIO LINFATICO						
BIOSIA						
OTRO						

12. OTROS MICROORGANISMOS AISLADOS

- 12.1. NO 12.2. SI: 12.2.1. Microorganismo:
12.2.2. Sitio de aislamiento:
12.2.3. Contribución a enfermedad:
12.2.4. Tratamiento:

13. TRATAMIENTO

- | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| 13.1. Cloranfenicol | 13.2. Ampicilina | 13.3. Sulfa/TMP |
| 13.4. Norfloxacin | 13.5. Ciprofloxacina | 13.6. Otro: |
| 13.7. No tratamiento | 13.8. No refiere | |

14. DURACION DE TRATAMIENTO

- | | | | |
|-----------------------|-----------------|------------------|----------------|
| 14.1. 1-7 días | 14.2. 8-14 días | 14.3. 15-21 días | 14.4. >21 días |
| 14.5. No especificado | | | |

15. COMPLICACIONES

- | | | | |
|---------------|-----------|-----------------------|-----------------------|
| 15.1. Ninguna | 15.2. SI: | 15.2.1. Hemorragia GI | 15.2.2. Perf. Intest. |
| | | 15.2.3. Hepatitis | 15.2.4. Colecistitis |
| | | 15.2.5. Neumonitis | 15.2.6. Nefritis |
| | | 15.2.7. Meningitis | 15.2.8. SDRA |
| | | 15.2.9. Osteomielitis | 15.2.10. Artritis |
| | | 15.2.11. CID | 15.2.12. Otras |

16. CIRUGIAS

- | | | | |
|----------|-----------|----------------------------|------------------------------|
| 16.1. NO | 16.2. SI: | 16.2.1. Cierre Perforación | 16.2.2. Resección intestinal |
| | | 16.2.3. Traqueostomía | 16.2.4. Gastrostomía |
| | | 16.2.5. Colectomía | 16.2.6. Otra |

17. RECAIDAS

- | | | | |
|----------|-----------------|---|---------------------------|
| 17.1. NO | 17.2. SI A LOS: | 17.2.1. 1-7 días post Tx | 17.2.2. 8-14 días post Tx |
| | | 17.2.3. 15-21 días post Tx | 17.2.4. 22-28 días postTx |
| | | 17.2.5. >28 días | |
| | | 17.2.6. Tiempo no especificado | |
| | | 17.2.7. Seguimiento insuficiente/no seguimiento | |

18. MORTALIDAD

- | | |
|------------------------------|-------------------------|
| 18.1. Paciente vivo al final | 18.2. Paciente falleció |
|------------------------------|-------------------------|