

Caracterización fenotípica y genotípica de *Salmonella* Typhimurium variante 5- asociada a un brote de enfermedad transmitida por alimentos en el municipio de Paz de Río, Boyacá, 2010

Miguel Ángel Díaz Osorio¹, Paula Lucía Díaz Guevara², Edna Catering Rodríguez Cárdenas¹, Lucy Angeline Montaña Valencia², Mabel Idaliana Medina Alfonso², Gloria Isabel González Patiño², María Elena Realpe³

RESUMEN

Introducción: *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium variante 5- es un patógeno muy relacionado con animales, especialmente con palomas, y asociado en pocos casos con infecciones esporádicas en humanos. Sin embargo, los sistemas de vigilancia epidemiológica han permitido detectarla en brotes en humanos.

Objetivo: caracterizar por técnicas fenotípicas y genotípicas los aislamientos de *Salmonella* Typhimurium variante 5- asociados a un brote de enfermedad transmitida por alimentos (ETA) en el municipio de Paz de Río, Boyacá, en el 2010.

Materiales y métodos: doce aislamientos de *Salmonella* spp., fueron remitidos para confirmación bioquímica, identificación del serotipo y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Se analizaron genotípicamente por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) con las enzimas *XbaI* y *BlnI*.

Resultados: todos los aislamientos se confirmaron como *Salmonella* spp., y presentaron resistencia a tetraciclina y estreptomycin y sensibilidad a los demás antibióticos ensayados; 11/12 se identificaron como *Salmonella* Typhimurium variante 5- y mostraron en la PFGE el patrón COIN10.JPX.X01.0168 con la enzima *XbaI* y dos aislamientos de este mismo grupo se confirmaron con la enzima *BlnI* obteniendo el patrón de PFGE COIN10.JPX.A26.0002. El aislamiento restante se identificó como *Salmonella* Typhimurium con patrón de PFGE con la enzima *XbaI* COIN10.JPX.X01.0221.

Conclusión: se reporta por primera vez en Colombia un brote de ETA asociado epidemiológicamente con aislamientos de *Salmonella* Typhimurium variante 5- que estuvieron relacionados fenotípica y genéticamente.

PALABRAS CLAVE

Enfermedades Transmitidas por los Alimentos; Infecciones por Salmonella; Salmonella Typhimurium; Serotipificación; Vigilancia Epidemiológica

¹ Investigador, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

² Profesionales, Laboratorio de Salud Pública, Boyacá, Colombia.

³ Coordinadora del Grupo de Microbiología, Red Nacional de Laboratorios, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

Correspondencia: Miguel Ángel Díaz Osorio; migandi@gmail.com

Recibido: febrero 04 de 2013

Aceptado: julio 11 de 2013

SUMMARY

Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium variant 5- isolates associated with an outbreak of food-borne disease in Paz de Rio, Boyacá, Colombia, in 2010

Introduction: *Salmonella enterica* serotype Typhimurium variant 5- is a pathogen closely related to animals, especially pigeons, which has been also associated in rare cases with sporadic infections in humans. However, epidemiological surveillance systems have enabled the detection of this variant in human outbreaks.

Objective: To characterize by means of phenotypic and genotypic techniques the isolates of *Salmonella* Typhimurium variant 5- associated with an outbreak of food-borne disease in Paz de Rio, Boyacá, Colombia (2010), in order to establish their molecular relationships.

Materials and methods: Twelve isolates of *Salmonella* spp., were analyzed by biochemical, serotyping and antimicrobial susceptibility tests. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Xba*I and *Bln*I enzymes was used to establish their molecular relationships.

Results: All isolates were confirmed as *Salmonella* spp. They were resistant to tetracycline and streptomycin and sensitive to the rest of antibiotics tested. Eleven isolates were identified as *Salmonella* Typhimurium variant 5- and grouped in COIN10.JPX.X01.0168 pattern using the enzyme *Xba*I; two isolates in this group were confirmed using the enzyme *Bln*I with the COIN10.JPX.A26.0002 pattern. One isolate was identified as *Salmonella* Typhimurium with COIN10.JPX.X01.0221 pattern with the enzyme *Xba*I.

Conclusion: This is the first outbreak in Colombia of foodborne illness epidemiologically associated with isolates of *Salmonella* Typhimurium variant 5 -, which were phenotypically and genetically related.

KEY WORDS

Epidemiologic Surveillance; Foodborne Diseases; Salmonella Typhimurium; Serotyping; Salmonella Infections

INTRODUCCIÓN

De las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), la salmonelosis es una de las más comunes y

está ampliamente distribuida en el mundo; se la considera un problema de salud pública principalmente en países en vías de desarrollo. Es causada por *Salmonella enterica* y generalmente contraída por el consumo de alimentos de origen animal, principalmente carne, pollo, huevos y leche, y también por vegetales contaminados con materia fecal (1). Dependiendo del tamaño del inóculo, los factores de virulencia y el estado inmunológico del paciente, puede ocasionar desde una infección gastrointestinal leve y autolimitada hasta una enfermedad sistémica que llega a poner en peligro la vida del paciente (2).

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, se calcula que en los Estados Unidos de América se presentan anualmente 1,4 millones de casos de salmonelosis no tifoidea, que llevan a 15.000 hospitalizaciones y 580 muertes cada año (3). Según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) (4), en 2009 se informaron en Colombia 1.688 casos de salmonelosis y se determinó como causa a *Salmonella enterica* en 13% de los brotes de ETA; por su parte, datos del Grupo de Microbiología de la Red Nacional de Laboratorios (RNL) del Instituto Nacional de Salud (INS) mostraron que *Salmonella* Typhimurium fue el segundo serotipo más prevalente identificado en el 28% de los 734 aislamientos analizados en ese mismo año (5).

Actualmente se conocen 2.579 serovares de *Salmonella* caracterizados según el esquema de White-Kauffmann-Le Minore (W-K-L), que se basa en la detección de los antígenos del polisacárido O, que determinan el serogrupo, los factores flagelares H1 y H2 y el antígeno capsular Vi que complementan la definición del serotipo (6). Según la caracterización con antisueros específicos, *Salmonella* Typhimurium posee la fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:1,2 que expresa los factores antigénicos O:1, O:4, O:5 y O:12 del grupo O somático y los antígenos flagelares H1:i y H2:1,2. Sin embargo, se reconoce una variante 5 negativa (anteriormente llamada variante Copenhagen) con fórmula antigénica 1,4,12:i:1,2, que no expresa el factor antigénico O:5, pero mantiene los mismos antígenos flagelares H1 y H2 (7). Aunque inicialmente se reportó *Salmonella* Typhimurium variante 5- asociada a infecciones en palomas, también se la ha aislado de vacas y cerdos y ocasionalmente de perros y gatos (8,9). Muy pocas veces se ha relacionado esta variante de *Salmonella*

Typhimurium con casos esporádicos y brotes de enfermedades en humanos y otros mamíferos; también se ha documentado que los aislamientos de esta variante en palomas difieren en sus características bioquímicas y susceptibilidad a fagos de aquellos encontrados en humanos y otros animales (10).

Son pocos los informes publicados sobre la prevalencia e implicación de *Salmonella* Typhimurium variante 5- como agente causal de ETA en el mundo. Un estudio hecho en California por Cody y colaboradores en 1997 identificó dos brotes de *Salmonella* Typhimurium, uno de los cuales, debido al consumo de queso fabricado con leche cruda, fue causado por la variante 5- (11); en el sur y el oeste de Finlandia se registró otro brote debido a esta misma variante, por consumo de ensalada de vegetales; en él se logró identificar la lechuga como el alimento implicado (12). En Colombia no se ha reportado ningún brote de ETA debido a la variante 5-.

Desde el año 1997 hasta el 2011 el programa de vigilancia por el laboratorio de patógenos causantes de enfermedad diarreica aguda (EDA), realizado por el Grupo de Microbiología RNL con la participación de los laboratorios departamentales de Salud Pública del país, identificó 5.641 aislamientos de *Salmonella enterica*, de los cuales *Salmonella* Typhimurium fue el serovar más prevalente: 32,3%. Sin embargo, solo desde el 2003 se ha logrado identificar la variante 5- en el 5,1% de los serotipos de *Salmonella enterica* (5).

La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por la sigla en inglés de *pulsed field gel electrophoresis*) es una herramienta importante en la vigilancia epidemiológica para la detección y reconocimiento de brotes de infección; además de identificar la fuente, permite monitorear la tendencia a lo largo del tiempo y atribuir la enfermedad humana a varios alimentos y animales (13,14). Tal vigilancia es necesaria para ayudar a prevenir los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y sensibilizar a las autoridades de salud, a los productores de alimentos y a los consumidores (15). Colombia participa desde el 2004 en la Red PulseNet Latinoamérica y el Caribe y está certificada para hacer la técnica de PFGE para *Salmonella* con la enzima *XbaI*.

En el presente artículo se describe por primera vez la caracterización fenotípica y genotípica de *Salmonella*

Typhimurium variante 5- asociada epidemiológicamente a un brote de ETA en el municipio boyacense de Paz de Río.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del brote

El 14 de marzo de 2010 en un evento comunal se distribuyó aproximadamente a 800 personas arroz *atollado* (ingredientes: arroz, pollo, salchicha, chorizo, verdura y salsa de tomate) en un garaje del municipio de Paz de Río, Boyacá, preparado el día anterior en un restaurante del municipio. Según el informe entregado por la Oficina de Epidemiología de la Secretaría Departamental de Salud de Boyacá, entre los días 16 y 20 de marzo de 2010, 84 personas que habían consumido el arroz *atollado* acudieron, por síntomas de gastroenteritis aguda, a la Empresa Social del Estado (ESE) Salud Paz de Río donde se les hizo evaluación clínica y de laboratorio. De los 84 pacientes evaluados clínicamente, solo 12 remitieron al laboratorio de dicha ESE muestra de materia fecal para coprológico y coprocultivo. Las muestras se tomaron, dentro de las primeras 24 horas de haberse presentado el brote, en el medio de transporte de Cary-Blair y se mantuvieron a temperatura ambiente. Para el aislamiento de la bacteria se utilizaron la siembra directa en los medios XLD y Hektoen Enteric (Oxoid, UK) y el preenriquecimiento en caldo selenito (Oxoid, UK). La confirmación bioquímica convencional se hizo utilizando los medios *Triple Sugar Iron Agar* (TSI), *Lysine Iron Agar* (LIA), Citrato de Simmons, agar para motilidad, Úrea y Lisina (BD, EE. UU.) con los que se llegó a la identificación de *Salmonella* spp. Posteriormente, los 12 aislamientos se enviaron al Grupo de Microbiología del INS para su confirmación, serotipificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana.

Definición de caso

Todo paciente que consultó a la ESE Paz de Río por un cuadro clínico de EDA y había consumido el arroz *atollado* el 14 de marzo de 2010.

Investigación epidemiológica

Se llevó a cabo una visita al restaurante donde se preparó el arroz para hacer una inspección sanitaria de acuerdo con el Decreto 3075 de 1997 del Ministerio de Salud (16), en la que se verificaron las condiciones

higiénico-sanitarias del establecimiento y los equipos y utensilios de trabajo. Además, se solicitó el examen de manipulación de alimentos y se tomaron dos muestras de agua de los grifos del restaurante, las cuales se enviaron al Laboratorio de Salud Pública (LSP) de Boyacá, para análisis físico-químicos y microbiológicos con identificación de coliformes y enteropatógenos de acuerdo con la normatividad vigente (17). No se logró obtener para el análisis ninguna porción del arroz *atollado* porque se había consumido en su totalidad. Además, se recolectaron los datos demográficos de las personas intoxicadas que incluyeron edad y sexo mediante la ficha epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos del Instituto Nacional de Salud Cód. INS 355 (18) a cargo del técnico de saneamiento ambiental.

Caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de pacientes

Por medio de las pruebas bioquímicas convencionales ya mencionadas y el sistema semiautomatizado *MicroScan*[®] con panel NC50 (Siemens, Alemania) se confirmó la identificación del género *Salmonella* spp. Se hizo serotipificación de acuerdo con el esquema de W-K-L, utilizando antisueros monovalente y polivalente de grupo para detectar el antígeno O por aglutinación en lámina y las flagelinas H1 y H2 por floculación en tubo (Difco, EE. UU.) (19). La susceptibilidad antimicrobiana se determinó por el método de difusión de disco (Kirby-Bauer) a cloranfenicol (30 μ g), ácido nalidíxico (30 μ g), amoxicilina-ácido clavulánico (20/10 μ g), tetraciclina (30 μ g), aztreonam (30 μ g), amikacina (30 μ g) y estreptomycin (10 μ g); y por concentración mínima inhibidora (CMI) con el sistema semiautomatizado *MicroScan*[®] con panel NC50 (Siemens, Alemania) a ciprofloxacina (CIP), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT), ampicilina (AMP), meropenem (Mer), cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ) de acuerdo con las recomendaciones y el criterio de interpretación establecidos en 2010 por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI, por la sigla en inglés de *Clinical Laboratory Standards Institute*) (20). La subtipificación molecular se hizo por la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) con las enzimas de restricción *Xba*I (Promega, EE. UU.) y *Bln*I (Roche, EE.UU.) utilizando la cepa estándar de referencia *Salmonella* Braenderup H9812 como control

de calidad y siguiendo el protocolo estandarizado por la Red PulseNet (CDC, Atlanta, EE. UU.) (14). El análisis de los patrones de bandas generados por la PFGE se efectuó con el programa *Gel Compare 2*[®] V.4 (Applied Maths, Bélgica) utilizando el coeficiente de Dice para determinar la matriz de distancia con una optimización del 1,5% y una tolerancia del 1,5% en la posición de las bandas; para la construcción del dendrograma se utilizó el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*). La definición de las categorías de las relaciones genéticas entre los aislamientos se basó en los criterios de Tenover (21).

RESULTADOS

Descripción del brote

De las 800 personas que consumieron el arroz *atollado*, 84 presentaron enfermedad, lo que representa una tasa de ataque del 10,5%; la mayoría de los afectados (n = 52; 61,8%) fueron mujeres. Hubo afectados en todos los rangos de edad desde menores de un año hasta mayores de 65 años, con predominio del rango de 15 a 44 años que agrupó el mayor número de pacientes (n = 41; 48,8%). Los síntomas más comunes fueron: diarrea (100%), mialgias (100%), artralgias (100%) y fiebre (83%). De acuerdo con la curva epidémica, se logró determinar que el primer caso se presentó el 16 de marzo del 2010 y el último el 20 de marzo del 2010; más del 50% de las consultas médicas se presentaron entre 24 y 48 horas después de haber consumido el alimento.

Investigación epidemiológica

El reporte técnico de saneamiento ambiental determinó que el restaurante, los equipos y utensilios empleados en la preparación de los alimentos y los manipuladores de estos cumplían con las condiciones higiénico-sanitarias y las medidas de protección personal, de acuerdo con lo dispuesto en el Decreto 3075 de 1997 del Ministerio de Salud. Las muestras de agua de los grifos no presentaron coliformes totales ni enteropatógenos y se estableció un valor aceptable (sin riesgo para la salud humana) en los parámetros físico-químicos analizados, teniendo en cuenta la Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de la Protección Social y el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

De acuerdo con la entrevista hecha a la manipuladora de alimentos y propietaria del restaurante, se determinó que el pollo y el arroz, que fueron preparados el día anterior a su distribución, se almacenaron a temperatura ambiente sin refrigeración; además, no se logró evidenciar las condiciones previas de transporte y distribución de los ingredientes utilizados en la preparación del arroz *atollado*. El lugar (garaje) donde se repartió este no era adecuado para tal fin y las personas intoxicadas declararon no haber consumido ningún otro alimento.

Caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de pacientes

Los 12 aislamientos enviados por el LSP de Boyacá se confirmaron por métodos bioquímicos y semiautomatizados como *Salmonella* spp. Al serotipificarlos se estableció que 11 correspondían al serotipo Typhimurium variante 5- y el aislamiento restante, a *Salmonella*

Typhimurium. Todos presentaron el mismo patrón de susceptibilidad antimicrobiana con resistencia a tetraciclina y estreptomycin y sensibilidad al resto de los antibióticos ensayados.

La digestión con la enzima de restricción primaria *Xba*I del ADN cromosómico de los 12 aislamientos generó dos patrones distintos de PFGE: uno de ellos agrupó los 11 aislamientos de *Salmonella* Typhimurium variante 5- como indistinguibles, codificados como COIN10.JPX.X01.0168 y caracterizados por 13 bandas entre 803pb y 22pb. El otro patrón estuvo representado por un solo aislamiento de *Salmonella* Typhimurium codificado como COIN10.JPX.X01.0221 y generó 11 bandas entre los 980pb y 31pb. De acuerdo con la técnica de PFGE de la Red *PulseNet-CDC* para estudio de brotes, se confirmaron dos aislamientos indistinguibles con la enzima secundaria *Bln*I y se obtuvo un patrón de 11 bandas idénticas, denominado COIN10.JPX.A26.0002 (figura 1).

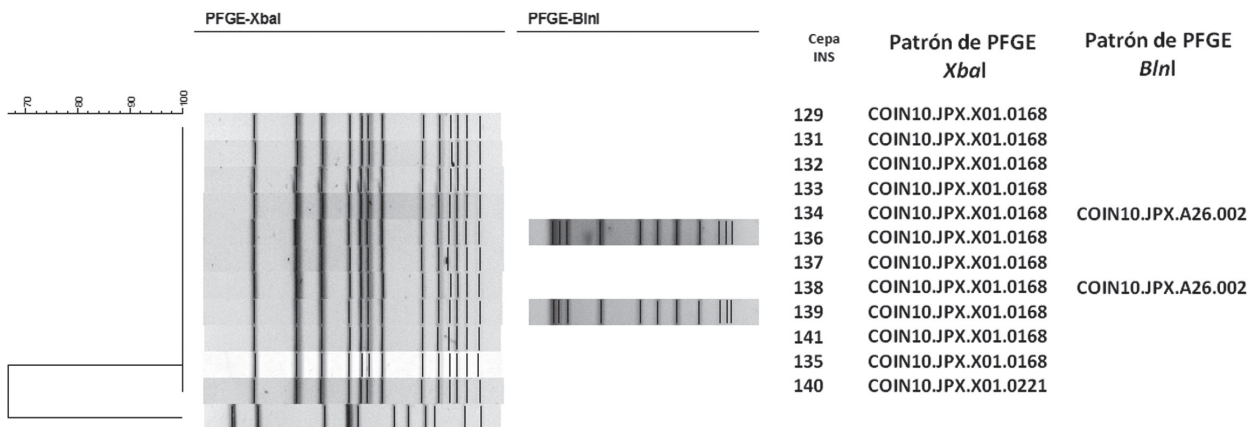


Figura 1. Dendrograma de los patrones de PFGE con las enzimas *Xba*I y *Bln*I, de 11 aislamientos de *Salmonella* Typhimurium var. 5- y uno de *Salmonella* Typhimurium hechos a partir de materia fecal

El análisis del dendrograma determinó una similitud del 100% entre los 11 aislamientos identificados como *Salmonella* Typhimurium variante 5-, lo cual los hace indistinguibles genéticamente, mientras que el otro aislamiento, a pesar de pertenecer al mismo género, especie y serotipo, presentó una similitud del 65% sin relación genética con los de la variante 5-.

DISCUSIÓN

La determinación de las características bioquímicas, serológicas y de susceptibilidad antimicrobiana es la base fundamental para identificar un posible brote de infección, pero es necesario el análisis del perfil genético de PFGE para poder asociar los aislamientos

idénticos o estrechamente relacionados con la fuente de infección del brote (13).

Aunque no se logró recuperar ninguna porción del alimento implicado en el brote de ETA para su confirmación, se lo pudo asociar epidemiológicamente con los aislamientos de *Salmonella* Typhimurium variante 5- identificados en las personas afectadas, pues se tuvo en cuenta la información sobre la ocurrencia del evento en el mismo tiempo, lugar y personas implicadas. Sin embargo, no se logró establecer el mecanismo por el cual se contaminaron los alimentos asociados con el brote.

De acuerdo con los datos de vigilancia epidemiológica de los serotipos de *Salmonella*, la prevalencia de *Salmonella* Typhimurium variante 5- en Colombia entre el 2003 y el 2009 fue de 5,4% (datos no publicados de la Vigilancia por Laboratorio de Aislamientos Causantes de Enfermedad Diarreica Aguda, EDA), porcentaje mayor que el 2,5% reportado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en ese mismo período (7). Sin embargo, cabe aclarar que no se tomaron los años anteriores a 2003 de la vigilancia en Colombia, ya que la variante 5- no se identificó por la no utilización del antisuero monovalente que detecta el antígeno somático O:5 y no se tomaron los años 2010 y 2011 de Colombia porque no hay registros de esta variante publicados en el Sistema Nacional de Vigilancia del CDC para ser comparados. Esto amerita que se mantenga dentro de la vigilancia epidemiológica la identificación de la variante 5- en los serotipos de *Salmonella* Typhimurium para conocer su frecuencia de circulación en el país.

Los 11 aislamientos de *Salmonella* Typhimurium variante 5- identificados en este estudio fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos ensayados, excepto a tetraciclina y estreptomina. Lo que contrasta con el patrón multirresistente informado en otros aislamientos de la variante 5- relacionados con el fagotipo DT104 en brotes de Estados Unidos y Finlandia (11,12).

El patrón COIN10.JPX.X01.0168 hallado en los aislamientos de este brote se ha detectado desde 2005 en 114 aislamientos tanto de *Salmonella* Typhimurium como de la variante 5-, los cuales han sido recuperados de eventos esporádicos procedentes de los departamentos de Antioquia, Boyacá y Cundinamarca y de

Bogotá dentro del programa de vigilancia por el laboratorio de patógenos causantes de EDA (5).

Se considera que la salmonelosis es un problema mundial de salud pública que afecta a personas de cualquier edad y condición social y que constituye una de las causas más comunes de gastroenteritis en los grupos más vulnerables, los niños y los ancianos, en los que puede ocasionar la muerte (1). En este estudio la variante 5- afectó a personas en todos los rangos de edad con predominio en el de 5 a 64 años en el que se presentó más del 80% de los casos; no hubo ninguna defunción debido a la oportuna acción de los servicios de salud del departamento de Boyacá y a la edad en que se presentaron estos casos; sin embargo, un brote epidémico de esta variante 5- en Panamá afectó a 10 recién nacidos en una sala de neonatología, quienes sufrieron un cuadro clínico de diarrea grave y sepsis neonatal, con una tasa de mortalidad del 100% (22). Ello demuestra la importancia de la identificación de este patógeno, que podría ocasionar cuadros clínicos graves, a pesar de la baja frecuencia con que se lo informa.

Hay muy pocos informes de la implicación de *Salmonella* en casos de infección con más de un serotipo (23,24). Entre ellos, Desy y colaboradores (25) reportaron un brote de ETA en personas que habían consumido ensalada de papa; en muestras de materia fecal de uno de los pacientes y en las de un trabajador del servicio de alimentos se identificó *Salmonella* Typhimurium variante 5- en coinfección con *Salmonella* Schwarzengrund. La frecuencia de este tipo de coinfección puede ser mayor de lo que se reconoce, por lo que amerita un análisis de varias colonias de un mismo cultivo, tanto por serotipificación como por PFGE, para determinar la presencia de dos o más serotipos en un brote.

En este estudio se logró describir el primer brote de ETA en Colombia con 11 casos confirmados de infección por *Salmonella* Typhimurium variante 5-, que se asoció epidemiológicamente al consumo de arroz *atollado* en el municipio boyacense de Paz de Río.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Grupo de Microbiología, Red Nacional de Laboratorios e Investigación del Instituto Nacional de Salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe R V. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol Infect.* 2002 Aug;129(1):1–8.
2. Santos RL, Tsolis RM, Bäumlér AJ, Adams LG. Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis. *Braz J Med Biol Res.* 2003 Jan;36(1):3–12.
3. World Health Organization. Salmonella (non-typhoidal) Fact sheet N°139. Fact sheet N°139. Geneva; 2013.
4. Colombia Instituto Nacional de Salud. Semana Epidemiológica 30 Del Domingo, 26 de Julio de 2009 al Sábado, 01 de Agosto de 2009 Casos Totales en la Semana Epidemiológica 30 y Acumulados del Año. Bogotá D.C: Instituto Nacional de Salud; 2010. p. 9.
5. Colombia Instituto Nacional de Salud. Microbiología [Internet]. Inst. Nac. Salud. [cited 2013 Oct 7]. p. 2. Available from: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/exámenes-de-inter%C3%A9s-en-salud-publica/Paginas/microbiologia.aspx>
6. World Health Organization, Institut Pasteur. Antigenic formulae of the Salmonella Serovars. 8th ed. Paris: Institut Pasteur; 2001. p. 166.
7. CDC. Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2009. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC, 2009
8. Smyser CF, Snoeyenbos GH. A pigeon host-adapted type of Salmonella typhimurium var. Copenhagen. *Avian Dis.* 1972;16(2):270–7.
9. Frech G, Kehrenberg C, Schwarz S. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jan;51(1):180–2.
10. Scholtens RT, Caroli G. Rôle of pigeons in the spread of salmonellosis: incidence of different types of Salmonella typhi-murium var. copenhagen in pigeons, man, and other animals. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1971 Jan;37(4):473–6.
11. Cody SH, Abbott SL, Marfin AA, Schulz B, Wagner P, Robbins K, et al. Two outbreaks of multidrug-resistant Salmonella serotype typhimurium DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. *JAMA.* 1999 May 19;281(19):1805–10.
12. Takkinen J, Nakari U-M, Johansson T, Niskanen T, Siitonen A, Kuusi M. A nationwide outbreak of multiresistant Salmonella Typhimurium in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005. *Euro Surveill.* 2005 Jan;10(6):E050630.1.
13. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1661–9.
14. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006 Jan;3(1):59–67.
15. Motarjemi Y, Käferstein FK. Global estimation of foodborne diseases. *World Heal. Stat Q.* 1997 Jan;50(1-2):5–11.
16. Colombia Ministerio de Salud. Decreto Numero 3075 de 1997 por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones. D. Of. 1997;CXXXIII(43205):23.
17. Colombia Ministerio de la Protección Social, Colombia Ministerio de Ambiente, Colombia Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución número 2115 de 2007;por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. D. Of. 2007;CXLII(46679):20–7.
18. Colombia Instituto Nacional de Salud. Protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2011. p. 23.
19. Colombia Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para el diagnóstico bacteriológico de enfermedad diarreica bacteriana aguda, identificación de salmonella spp., shigella sp., y vibrio cholerae spp., Shigella sp., y Vibrio cholerae. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2011. p. 90.
20. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. *Clin. Lab. Stand. Institute.* 2010;30(1):M100–S20.
21. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field

- gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9.
22. Poveda R. Brote epidémico de diarrea por *Salmonella typhimurium* en la sala de prematuros del Hospital del Niño. *Rev. Hosp. Niño.* 1992;11(2):68-70.
23. Taylor JL, Dwyer DM, Groves C, Bailowitz A, Tilghman D, Kim V, et al. Simultaneous outbreak of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella schwarzengrund* in a nursing home: association of *S. enteritidis* with bacteremia and hospitalization. *J Infect Dis.* 1993 Mar;167(3):781-2.
24. Sotir MJ, Ewald G, Kimura AC, Higa JJ, Sheth A, Troppy S, et al. Outbreak of *Salmonella* Wandsworth and *Typhimurium* infections in infants and toddlers traced to a commercial vegetable-coated snack food. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Dec;28(12):1041-6.
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multiple-serotype *Salmonella* gastroenteritis outbreak after a reception --- Connecticut, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010 Sep 3;59(34):1093-7.

