

**DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. MEDIANTE PCR EN
Periplaneta americana Linneo DE LA ZONA URBANA EN
TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.**

SARAI MONSERRAT CUETO MEDINA

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR
AL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO**

Torreón, Coahuila; México. Diciembre de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. MEDIANTE PCR EN *Periplaneta americana* Linneo DE LA ZONA URBANA EN TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

TESIS

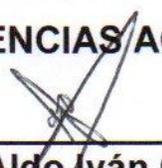
POR

SARAI MONSERRAT CUETO MEDINA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado de:

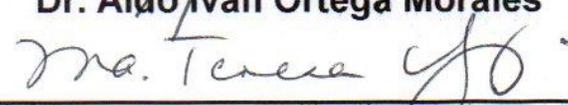
MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS

Asesor principal:



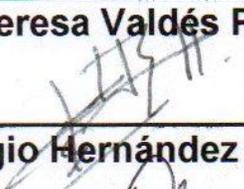
Dr. Aldo Iván Ortega Morales

Asesora:



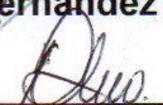
Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga

Asesor:



M. C. Sergio Hernández Rodríguez

Asesor externo:



Dr. Miguel Ángel Gallegos Robles



Dr. Fernando Ruíz Zarate
Subdirector de Posgrado



Dr. Pedro Antonio Robles Trillo
Jefe del Departamento de Posgrado

Torreón, Coahuila; México. Diciembre de 2013

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a **Dios** por permitirme llegar a este mundo y darme la oportunidad de vivir, de crecer y madurar, por guiar mis pasos hacia el camino correcto.

A mi **Alma Mater** por formarme, educarme y darme las bases de mi éxito en el paso por esta vida, por apoyar cada día los estudios de posgrado.

Mi más sincero y grande agradecimiento a mis **Asesores** Dr. Miguel Ángel Gallegos Robles, Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga, M.C Sergio Hernández Rodríguez y al Dr. Aldo Iván Ortega Morales; por aceptar, apoyar este proyecto y por darme la oportunidad de hacerlo realidad.

Al **M. C. Uriel González Salas**, por todo su apoyo, paciencia y cátedra, al enseñarme todo lo relacionado a este proyecto.

Al **Departamento de Parasitología** en especial al M. C. Javier López Hernández, a la Sra. Graciela Armijo, a la Ing. Gabriela Muñoz, al Ing. Raúl Soto y a la Ing. Bertha Alicia Cisneros por acogerme, ayudarme y por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Un gran agradecimiento a la **Facultad de Agricultura y Zootecnia** de la UJED, en especial al Laboratorio de Citogenética, por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

Mi más sincero agradecimiento a la **Dra. Verónica Ávila**, a la **Dra. Quetzaly Siller** y al **Dr. Jorge Sáenz**, por estar siempre ahí, apoyando este proyecto, con sus consejos y sus enseñanzas, también por permitir en algunas ocasiones el uso del Laboratorio de Biología Molecular de la **Facultad de Ciencias Biológicas** de la UJED

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el apoyo económico brindado a lo largo de dos años, para la culminación de este proyecto.

A mis **padres** por el apoyo incondicional, por la paciencia y por ayuda en esta etapa de mi vida.

A mis **hermanas y hermano, amigos y amigas**, por su comprensión, cuando no podía convivir con ustedes y por su apoyo ¡Gracias!

Y el agradecimiento más grande es para mí príncipe y mi princesa por soportar todo este tiempo lejos de ustedes, por soportar que no les haya puesto la atención adecuada, por cada día que me esperaron a comer, que me esperaron para jugar y su apoyo incondicional ¡Gracias!

DEDICATORIAS

A mis padres **Fernando Cueto Espino** y **Lucina Medina Ramírez** que han sido el sostén de mi vida y un gran ejemplo a seguir, gracias por su apoyo incondicional tanto moral como material.

A mis hermanas **Lucina, Berenice, Viridiana, Lucero** y **Aurora**, a mi hermano **Fernando** y a mi cuñado **José Carlos** que me han acompañado y me han apoyado en todos mis logros y fracasos, los quiero mucho.

A mi esposo **Antonio**, porque sin su apoyo y amor incondicional no habría logrado todo lo que he logrado hasta ahora, porque al amarme tal cual soy me permite crecer moral y profesionalmente.

A mi hija **Isabel Tonantzin** que ha venido a iluminar mi vida, es la razón por la cual he hecho lo imposible para terminar este proyecto y quien me da más ánimo para seguir adelante y lograr mis metas. Por mí, por ella y por mi esposo.

A mis hermosos sobrinos **Alex** y **Ayelen**, por estar ahí, siempre con sus travesuras acompañando a mi princesa, este esfuerzo también es suyo.

Y por último y no menos importante mis amigos y amigas **Lupita, Liz, Tania** (aun en la distancia), **Fidel, Adelfo, Félix, Ayde, Uriel, Elizabeth Lira** y **Laura**, que me han acompañado y me han soportado tantos años.

Soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

COMPENDIO
**DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. MEDIANTE PCR EN
Periplaneta americana Linneo DE LA ZONA URBANA EN
TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.**

POR

SARAI MONSERRAT CUETO MEDINA

MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO. DICIEMBRE DE 2013

Palabras clave: *Salmonella*, cucarachas, PCR, PCR-RFLP, serotipo

Se colectaron 400 cucarachas (100 por cada hábitat) en los sistemas de alcantarillado dentro y a los alrededores de hospitales, escuelas, restaurantes y casas habitación del área urbana de Torreón, Coahuila, México para determinar la presencia de *Salmonella* sp. en el tracto digestivo de *Periplaneta americana* L., considerando que las cucarachas actúan como reservorios y transmisores mecánicos de hongos, helmintos, protozoarios, además de bacterias como *Salmonella* sp. Las cucarachas fueron diseccionadas para obtener el tracto digestivo, a partir del cual se extrajo ADN con la técnica CTAB y se sometieron a la PCR para amplificar el gen *invA* de *Salmonella* sp., con un tamaño de 287 pb. En general, los resultados mostraron una frecuencia baja de la bacteria en comparación con lo esperado, lo que comprueba que no todas las cucarachas portan la bacteria en el tracto digestivo. La

frecuencia de cucarachas positivas a *Salmonella* sp. fue mayor en las colectadas en casas habitación ($P < 0.01$) que en hospitales, restaurantes y escuelas. De acuerdo a los polimorfismos de longitud en los fragmento de restricción (RFLP) basado en el PCR del gen *fliC*, para determinar el serotipo de la *Salmonella* sp. presente en el tracto digestivo de las cucarachas, los resultados mostraron que *Salmonella enteritidis* fue el único serotipo encontrado en los ambientes de hospitales, escuelas y casas habitación.

ABSTRACT
DETECTION of *Salmonella* spp. BY PCR IN *Periplaneta americana* Linnaeus IN THE URBAN AREA OF TORREON, COAHUILA, MEXICO.

BY
SARAI MONSERRAT CUETO MEDINA
MASTER IN AGRARIAN SCIENCES

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
TORREÓN, COAHUILA; MÉXICO. DICIEMBRE DE 2013

Specimens of *Periplaneta americana* L. (n=400) were collected from sewage systems in around hospitals, schools, restaurants and houses (100 for each environment) in the urban area of Turreon, Coahuila, Mexico to determine the frequency of *Salmonella* sp. in the digestive tract of cockroaches, since they act as reservoirs and mechanical vectors of fungi, helminthes, protozoa, as well as bacteria such as *Salmonella* sp. Cockroaches were dissected to obtain their digestive tract, from which DNA was extracted according to CTAB techniques and were run in PCR to amplify *Salmonella* sp. *invA* gene, 287 pb. In general, results showed a low frequency of the bacteria in comparison whit results expected, which shows that not all cockroaches carry the bacteria in the digestive tract. *Salmonella* sp. positive frequency was greatest in cockroaches collected from houses (P< 0.01) than those from hospitals, restaurants and schools. Results showed that *Salmonella enteritidis* was the only serotype found in hospitals, schools, restaurants and house environments, according to *fliC* gene and restriction fragment longitude polymorphism

(RFLP) used to determine *Salmonella* serotype present in the digestive tract of de cockroaches.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS	vi
COMPENDIO	viii
ABSTRACT	x
INDICE	xii
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Antecedentes	4
2.2 Orden Blattodea	7
2.2.1 Historia evolutiva de las cucarachas.....	7
2.2.2 Morfología.....	7
2.2.3 Las cucarachas como plagas urbanas.....	10
2.2.4 Patógenos asociados a cucarachas	10
2.2.5 Familia Blattidae	11
2.3 <i>Periplaneta americana</i>	12
2.3.1 Ubicación taxonómica de <i>P. americana</i> según Triplehorn & Johnson (2005)	12
2.3.2 Ciclo biológico.....	12
2.3.3 Biología y hábitos.....	13
2.3.4 Patógenos asociados a <i>Periplaneta americana</i>	14
2.4 <i>Periplaneta americana</i> y <i>Salmonella</i> sp.	15
2.4.1 <i>Salmonella</i> sp. en la cutícula de <i>Periplaneta americana</i>	16
2.4.2 <i>Salmonella</i> sp. en tracto digestivo y heces de <i>Periplaneta americana</i>	16
2.4.3 Incidencia de <i>Salmonella</i> sp. en <i>P. americana</i> de diferentes ambientes	18
2.5 Microbiota en los insectos.....	18
2.5.1 Estructura del tracto digestivo de los insectos	18
2.5.2 El tracto digestivo del insecto y la microbiota	19
2.5.3 Condiciones físicas	20

2.5.4 Mecanismos de defensa	21
2.5.4.1 Interacción insecto-patógeno.....	21
2.5.4.2 Elementos sensores de patógenos	23
2.5.4.3 Regulación de la respuesta: las rutas de señalización	24
2.5.4.4 Péptidos antimicrobianos.....	25
2.5.4.5 Especies Reactivas de Oxígeno.....	26
2.5.4.6 Melanización.....	26
2.5.4.7 Oponización	26
2.5.4.8 Coagulación.....	26
2.5.4.9 Respuesta inmune celular	27
2.5.4.10 Fagocitosis	27
2.5.4.11 Encapsulación	27
2.5.4.12 Nodulación.....	27
2.5.4.13 Análisis de la microbiota intestinal de insectos.....	28
2.6 <i>Salmonella</i>	28
2.6.1 Historia.....	28
2.6.2 Nomenclatura de <i>Salmonella</i>	30
2.6.3 Taxonomía de <i>Salmonella</i> según Barreto y Rodríguez (2012)	31
2.6.4 Características generales.	31
2.6.5 Hábitat	32
2.6.6 Patogénesis, transmisión y virulencia.	32
2.6.7 Isla de patogenicidad <i>SPI-I</i>	33
2.6.8 Diagnóstico de <i>Salmonella</i>	34
2.6.8.1 Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
2.6.8.2 RFLP's	35
2.6.8.3 Gen de invasividad A (<i>invA</i>)	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Ubicación geográfica del municipio de Torreón, Coahuila.	37
3.2 Clima.....	37
3.3 Zona urbana.....	37
3.4 Colecta y preservación de especímenes	38

3.5	Dissección de cucarachas	38
3.6	Extracción de ADN.....	38
3.7	Reacciones PCR.....	39
3.8	PCR-RFLP	40
3.9	Análisis de datos.....	41
4.	RESULTADOS	42
5.	DISCUSIÓN.....	45
6.	CONCLUSIONES.....	48
7.	RECOMENDACIONES.....	49
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	50

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Patógenos asociados a <i>Periplaneta americana</i> según Tattfeng <i>et al.</i> (2005)	15
Cuadro 2. Primers utilizados para la amplificación de PCR de los genes <i>invA</i> y <i>fliC</i> de <i>Salmonella</i> sp.	40
Cuadro 3. Resultados de cucarachas positivas y negativas a <i>Salmonella</i> portada en el tracto digestivo y analizadas por PCR.....	42
Cuadro 4. Prueba de X^2	43
Figura 1. Productos de PCR del gen <i>invA</i> de <i>Salmonella</i> a partir de ADN obtenido del tracto digestivo de: A. Líneas 1-3 = cucarachas colectadas en hospitales. B. Líneas 1-6 = cucarachas colectadas en escuelas. C. Líneas 1-5, 6 y 7 = cucarachas colectadas en casas habitación. + = control positivo (<i>S. Enteritidis</i>). M = marcador molecular 100 pb. El fragmento observado es de 287 pb.	44
Figura 2. A. Líneas 1-8 = productos de PCR del gen <i>fliC</i> amplificado a partir del ADN obtenido del tracto digestivo de cucarachas, + = control positivo <i>S. Enteritidis</i> , - = control negativo, M1 = marcador molecular 250 pb. B. Líneas 1-5 = perfiles de restricción del gen <i>fliC</i> obtenidos con la enzima <i>Sau3AI</i> , + = control positivo <i>S. Enteritidis</i> , M2 = marcador molecular 100 pb.....	44

1. INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae e incluye a bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y son móviles (Jurado *et al.*, 2010). Es una de las bacterias patógenas entéricas más frecuentes tanto en países desarrollados como subdesarrollados; la cual, dependiendo de su especie, tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa, hospedero involucrado, estado inmunológico del individuo e intervención médica; puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa, hasta una infección sistémica que compromete la vida del paciente humano (Figueroa & Verdugo, 2005).

La principal vía de transmisión es la fecal-oral, a través de la ingestión de alimento directa o indirectamente contaminado (Jurado *et al.*, 2010). La mayoría de los serotipos de *Salmonella* (59%) se incluyen dentro de *S. enterica* subsp. *enterica*, que es el agente causal del 99% de las infecciones en humanos y animales homeotermos; causando fiebre tifoidea y gastroenteritis. El resto de las subespecies normalmente son encontradas en animales poiquilotermos y raramente en humanos (Brenner *et al.*, 2000).

Las cucarachas actúan como portadoras de microorganismos y transmiten de manera mecánica y por medio de arrastre agentes infecciosos o parasitarios (Kassiri & Kazemi, 2012), tales como bacterias (*E. coli*, *Salmonella sp.*), hongos, helmintos, protozoarios y algunos virus; pero su participación en la transmisión directa de la infección en humanos rara vez se ha establecido (Fathpour *et al.*, 2003).

Algunos parásitos se han encontrado en la superficie externa o partes internas del cuerpo de las cucarachas y algunas investigaciones han demostrado que la exposición a estas; pueden desempeñar un papel importante en los problemas de salud relacionados con el asma. Además, son capaces de ocasionar reacciones alérgicas a muchas personas (Smith & Whitman, 1992) y lesiones locales denominadas *Herpes blattae* (Ponce *et al.*, 2005) y afectan la calidad de algunos productos al contaminarlos con sus cuerpos o secreciones (Torres *et al.*, 2006).

La íntima asociación de las cucarachas con los humanos, las coloca en un status de plaga (Gracyk *et al.*, 2005). De las 4000 especies de cucarachas conocidas en la actualidad, solo un pequeño grupo (menos de 1 %) es considerado plaga (Gutiérrez, 2010).

La cucaracha americana (*Periplaneta americana* L.) es una especie muy ampliamente distribuida en la zona urbana de Torreón, Coahuila (Hernández *et al.*, 2013); esta especie se localiza frecuentemente en depósitos de agua, el sistema de alcantarillado, estructuras de desagüe y áreas perimetrales (Ponce *et al.*, 2005). Es muy común que se les vea por las noches fuera de las alcantarillas, incluso que se les encuentre en cocinas y otras áreas de las viviendas, negocios de comida, hospitales e incluso escuelas; pueden contaminar las superficies por donde caminan. Aunado a esto, la prevalencia de enfermedades relacionadas con la bacteria *Salmonella sp.*, de 2005 a 2012, la Jurisdicción Sanitaria No. 6 reportó un total de 11,409 casos de salmonelosis y 5,052 de tifoidea en el Municipio de Torreón, Coahuila, México. (SINAVE, 2012)

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Detectar la presencia de la bacteria *Salmonella* sp. en el tracto digestivo de cucaracha americana (*Periplaneta americana* L.) en la zona urbana de Torreón, Coahuila, México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Colectar especímenes de *Periplaneta americana* L. en escuelas casas habitación, hospitales y establecimientos de comida.
- Determinar la presencia de la bacteria *Salmonella* sp. dentro del tracto digestivo de las cucarachas colectadas.

HIPÓTESIS

En Torreón, Coahuila; México, la bacteria *Salmonella* spp puede ser portada en el tracto digestivo de cucaracha americana (*Periplaneta americana* L.) de manera natural.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

Probablemente el primer estudio sobre *Salmonella* sp. en cucarachas se realizó en 1898 por el italiano Cao, en donde experimentó con algunos patógenos para el hombre y las cucarachas (Cao, 1898).

En 1922, fueron comprobados los experimentos de Cao por Macfie, quien añadió otros patógenos a los experimentos (Macfie, 1922).

El siguiente paso para determinar a la cucaracha como vector de organismos patógenos fue retomado en 1930 por el investigador Italiano Antonelli, al tratar de determinar la causa de dos pequeños brotes de fiebre tifoidea, donde manifestó que la enfermedad probablemente se diseminaba por la cucaracha *Periplaneta orientalis* (Antonelli, 1930).

En el año de 1933 en el Departamento de Salud del Estado de Texas, donde experimentaban Beck y Coffe; encontraron que una epidemia de infecciones por *Salmonella typhimurium* en su colonia de conejillos de indias, fue probablemente difundida por la cucaracha *P. americana* (Beck & Coffe, 1943).

Durante el año de 1948, se desarrollaron 3 estudios: en el primer experimento, se capturaron en Australia diversas cucarachas en un pabellón dedicado al tratamiento de enfermedades gastrointestinales y encontraron que estos insectos albergaban varias especies de *Salmonella* sp. (Mackerras & Mackerras, 1948). El segundo experimento se realizó una alimentación controlada con cucarachas y

descubrieron que una cepa de *Salmonella sp.* se albergaba por 42 días en el tracto digestivo (Makerras & Pope, 1948). En ese mismo año, Bitter y Williams demostraron que *P. americana* no necesariamente puede estar directamente asociada con un brote de enfermedad activa, pero puede albergar organismos patógenos y por lo tanto, ser una fuente potencial del inicio de un brote (Bitter y Williams, 1948).

En 1951, se desarrolló un estudio dirigido por Leibovitz sobre el comportamiento de *Salmonella sp.* y otros patógenos, al pasar por el hemocele de las cucarachas (Leibovitz, 1951).

Roth y Willis (1960) publicaron una extensa revisión de asociaciones bióticas de las cucarachas en donde citan un sinnúmero de patógenos para los humanos, los cuales fueron encontrados en su cuerpo o heces.

En los años 1976 y 1977, los investigadores Greenberg y Klowden realizaron dos experimentos con *Salmonella sp.*: primero estudiaron la capacidad de sobrevivencia de la bacteria en el tracto digestivo y las heces fecales de las cucarachas (Klowden & Greenberg, 1976) y posteriormente observaron el efecto de los antibióticos en *Salmonella sp.* presente en la cucaracha americana (Klowden & Greenberg, 1977).

Ramírez (1989), realizó una investigación de todos los patógenos que portan las cucarachas y las alergias que provocan; en su estudio encontró: bacterias, helmintos, protozoarios y virus.

En 1991 se efectuó nuevamente un estudio propuesto por Devi y Murray, sobre las cucarachas como reservorios de *Salmonella sp.* y los antibióticos causantes de resistencia a la bacteria (Devi & Murray, 1991).

Otro estudio importante fue el de Kopanic *et al.* (1994), en el que desarrollaron diversas pruebas para comprobar el rol de las cucarachas en la transmisión de *Salmonella sp.*, se hicieron pruebas de laboratorio con una cría de cucarachas e inoculación con la bacteria (Kopanic *et al.*, 1994)

En el año 2005, otros investigadores realizaron un estudio sobre la transmisión mecánica de organismos patógenos y el rol de las cucarachas (Tatfeng *et al.*, 2005); otros trabajos similares son los de Tachbele *et al.* (2006) y Al-Mayali (2010).

En Culiacán, México, durante el año 2010 se hizo un estudio sobre cepas de *Salmonella sp.* en un zoológico, donde se tomaron muestras de todos los animales incluyendo las plagas insectiles; donde las cucarachas dieron positivo para *Salmonella enterica* serotipo *albany* (Silva *et al.*, 2010).

Para el año 2012, la cantidad de estudios en este ámbito había crecido inmensurablemente; donde el tema principal es la presencia de bacterias tanto en tracto digestivo, heces fecales y parte externa de las cucarachas.

El estudio más reciente es acerca de un aislamiento y caracterización de la microbiota asociada en las cucarachas, donde se extrajo el tracto digestivo, se diseccionó en sus partes principales y se puso en medios de cultivo; una de las bacterias encontradas fue *Salmonella paratyphi B* (Bagde *et al.*, 2013).

2.2 Orden Blattodea

2.2.1 Historia evolutiva de las cucarachas

Los registros fósiles indican una relativa abundancia de cucarachas en el periodo carbonífero. Este período forma parte del paleozoico y comenzó hace 362.5 millones de años, finalizando hace unos 290 millones de años; sus huellas en el tiempo las muestran como una forma de vida exitosa y estable (Torres *et al.*, 2006). El fósil completo más grande de una cucaracha (*Arthropleura pustulatus*), vivió hace unos 300 millones de años, 55 millones de años antes de los dinosaurios, en una zona pantanosa de Ohio y es totalmente parecida, aunque más grande que las formas modernas que viven en los trópicos (Camousseight, 2006).

Al margen de la evolución y a las más diversas condiciones, estos fósiles vivientes son testigos inmutables de gran parte de la historia del planeta (Lozano, 2003). El fósil de la cucaracha que encontraron los geólogos en una mina de carbón en el noreste de Ohio mide 8.9 cm; en comparación, la cucaracha americana moderna con el fósil mide sólo 3.8 cm de largo (Jones, 2010).

2.2.2 Morfología

Las cucarachas han conservado su forma básica ancestral (Pesante, 1992), son insectos cursoriales con 5 segmentos tarsales, ninguna de las patas está modificadas para cavar o agarrar (Triplehorn & Johnson, 2005). Presentan por lo general forma aplanada dorsoventralmente (Ponce *et al.*, 2006). El cuerpo es ovalado y la cabeza es ocultada desde arriba por el pronoto (Triplehorn & Johnson, 2005), está provista de un par de antenas filiformes que funcionan como órganos táctiles y olfativos (Pesante, 1992).

Las alas generalmente se encuentran presentes, aunque en algunas especies son reducidas (Triplehorn & Johnson, 2005). El ala frontal llamada *tegmina* es típicamente dura y algo translúcida, con venas bien definidas. Las alas posteriores, son membranosas y mucho más grandes (Pesante, 1992). Las hembras de muchas especies tienen alas más pequeñas que las alas de los machos (Triplehorn & Johnson, 2005)

Los ojos son compuestos y consisten de un sinnúmero de facetas. La posición de los tres ocelos se encuentra cerca de la base de las antenas es variado, muy desarrollado en las especies que vuelan (*macrópteras*), rudimentario en las especies con alas reducidas (*braquiópteras*) y ausente en las especies sin alas (*ápteras*) (Pesante, 1992). Las partes bucales son del tipo masticador (Ponce *et al.*, 2006), los palpos maxilares y labiales están bien desarrollados, con cinco y tres segmentos respectivamente (Pesante, 1992).

Al final del abdomen presentan 2 pequeños apéndices denominados cercos con sedas sensitivos a la vibración causada por bajas frecuencias de sonido (Pesante, 1992) y la captación de vibraciones por el aire. Estos cercos le dan la información sobre un posible depredador (Galaica, 2009). La parte posterior terminal del abdomen de algunas ninfas y de todos los machos tienen estilos entre los cercos que surgen del noveno segmento abdominal (Triplehorn & Johnson, 2005). En las especies aladas, los estilos sólo se perciben en vista ventral. Los estilos sirven para identificar los sexos (Pesante, 1992).

La respiración tiene lugar mediante un sistema traqueal, que es un sistema de tubos que se extienden por todo el cuerpo. Estos tubos terminan en porciones cerradas y más pequeñas (traqueolas) que penetran los tejidos (Jaramillo *et al.*, 1999). Las tráqueas se abren al exterior por medio de espiráculos (orificios externos) en el tórax y el abdomen. Estos espiráculos son fácilmente visibles a simple vista, encontrándose por parejas en segmentos del abdomen (Galaica, 2009).

La circulación es abierta y carece de venas o arterias. Los fluidos corren a través de una cavidad llamada vaso dorsal (Jaramillo *et al.*, 1999) que se extiende a lo largo del cuerpo. Este corazón tubular impulsa la hemolinfa (sangre), la cual no actúa en el transporte de oxígeno (Galaica, 2009); sino llevando nutrientes del sistema digestivo a los tejidos y removiendo desechos que son llevados a los órganos excretores (Galaica, 2009).

Se dice que las cucarachas tienen dos cerebros, ya que poseen dos pares largos de ganglios nerviosos en la cabeza y un ganglio simple al final del abdomen. Estos dos centros sensoriales están conectados por fibras gigantes que llevan los impulsos diez veces más rápido que los nervios ordinarios; esta característica es lo que las hace tan rápidas y hábiles (Jaramillo *et al.*, 1999).

En la digestión y excreción, la comida pasa a través de las piezas bucales y recorre todo el sistema digestivo realizando la digestión y la absorción de nutrientes, los desechos son excretados en forma de heces por el ano (Galaica, 2009).

2.2.3 Las cucarachas como plagas urbanas

Las principales especies de cucarachas sinantrópicas en América del Norte y Europa son *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis*, *Supella longipalpa* y *Periplaneta fuliginosa* (Bonney et al., 2008). En Torreón, Coahuila; México, las especies más comunes son *Periplaneta americana*, *Blattella germanica*, *Blattella asahinai*, *Supella longipalpa*, *Blatta lateralis* y *Pycnoscelus surinamensis*; siendo la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) la especie más abundante y ampliamente distribuida (Hernández-Rodríguez et al., 2012).

2.2.4 Patógenos asociados a cucarachas

Son pocas las especies de cucarachas en el área urbana y que invaden las viviendas, estas lo son la cucaracha americana, alemana, bandas café, ahumada, oriental y australiana americana *Blattella germanica*, *Supella longipalpa*, *Blatta orientalis* *Periplaneta fuliginosa* y *Periplaneta australasiae* (Ponce et al., 2005). Todas estas representan una plaga de hábitos nocturnos. Las cucarachas transportan patógenos que logran permanecer viables en su tracto digestivo y heces por varios días o semanas (Mille & Peters, 2004). Los agentes patógenos que producen enfermedades en humanos, son transportados en las patas y cuerpos de las cucarachas, estos son depositados en la comida y diversos utensilios. El excremento y exuvias también contienen numerosos alérgenos que afectan los ojos, la piel y producen asma (Gliniewicz et al., 2003).

A continuación se describen los principales grupos de agentes patógenos presentes en cucarachas.

Algunos estudios micológicos han revelado la presencia de actinomicetos y blastomicetos patógenos en exoesqueleto, proctodeo y hemoceloma de especímenes capturados en viviendas y hoteles (Prado *et al.*, 2002).

Los helmintos representan después de las bacterias, el grupo más relevante, porque muchos de ellos son parásitos primarios del hombre. Estos se albergan en el aparato digestivo de las cucarachas y adicionalmente se ha observado la presencia de huevos de helmintos en las heces de estos insectos (Al-Mayali & Al-Yaqoobi, 2010).

Se ha demostrado la presencia de protozoarios patógenos en el hombre que pueden ser transportados por las cucarachas y pueden desencadenar enfermedades como la amibiasis y giardiasis (Lopata *et al.*, 2005).

En condiciones naturales se han hallado detectado especies patógenas de bacterias que promueven diversos cuadros de disentería, diarrea, fiebre tifoidea, gastroenteritis y otros padecimientos; ocasionadas por bacterias de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Samonella* presentes en cucarachas (García *et al.*, 2012).

2.2.5 Familia Blattidae

Las cucarachas de esta familia miden 25 mm o mas de longitud, tienen cuerpo oval aplanado, cabeza dorsalmente cubierta por el pronoto, alas con placa subgenital hendida y machos con estilos alargados, delgados y simétricos. Esta familia agrupa varias especies de plagas domesticas como *Blatta orientalis* y *Periplaneta americana* (Domínguez, 1994).

2.3 *Periplaneta americana*

A pesar de su nombre, la cucaracha americana no es nativa de América, probablemente fue introducida desde África por embarcaciones y actualmente presenta una distribución cosmopolita, excepto en los lugares permanentemente congelados (Smith & Whitman, 1992).

2.3.1 Ubicación taxonómica de *P. americana* según Triplehorn & Johnson (2005)

Dominio: Eukarya

Reino: Animalia

Phyllum: Arthropoda

Subphyllum: Atelocerata

Clase: Hexapoda

Superorden: Dictyoptera

Orden: Blattodea

Familia: Blattidae

Género: *Periplaneta*

Especie: *P. americana* (L.)

2.3.2 Ciclo biológico

Los huevos se encuentran contenidos en una ooteca o cápsula de huevos color rojizo a café oscuro, de ocho a 10 mm de longitud (Smith & Whitman, 1992). Cada hembra produce de 6 a 14 ootecas cada una, contiene de 14 a 16 huevos (Ogg *et al.*, 2006) los cuales son adheridos en áreas calientes y protegidas, cerca de la comida (Ponce *et al.*, 2005). Una ooteca de huevos se puede formar en una semana y se pueden producir de 12 a 28 durante los meses cálidos. Donde el clima permite

que vivan en el exterior, las ootecas se pueden encontrar en la madera húmeda. Aunque las hembras producen ootecas durante todo el año, ovipositan más durante el verano (Randall, 1998).

Las ninfas surgen de la ooteca aproximadamente en seis semanas a partir de la ovipostura y mudan de exoesqueleto 13 veces durante 18 meses, antes de llegar a la etapa adulta sexualmente madura (Ogg *et al.*, 2006). Dependiendo de la temperatura pueden tardar de seis a 18 meses para madurar (Randall, 1998).

Los adultos miden aproximadamente entre 34 a 53 mm de longitud, son de color café rojizo; excepto por una banda submarginal pálido marrón a amarillento alrededor del borde del escudo del pronoto, el último segmento del cerco es dos veces más largo que ancho. Ambos sexos son alados, las alas de los machos se extiende más allá de la punta del abdomen, mientras que las hembras no (Smith & Whitman, 1992).

2.3.3 Biología y hábitos

Los adultos son voladores débiles que prefieren la comida fermentada, se encuentran afuera y dentro de las casas, principalmente en climas cálidos. Son Comunes en ciudades con sistema de alcantarillado, dentro de estructuras de desagüe y en áreas perimetrales (Ponce *et al.*, 2005). Las cucarachas son omnívoras y se alimentan de una gran variedad de materiales como: cubiertas de libros, plafones de techo que contengan almidón, el forro interior de las suelas de zapatos, sus propias exuvias, otras cucarachas muertas, sangre fresca o seca, excremento y detritus alimentarios que se quedan impregnados en los niños. Arrojan una secreción

nauseabunda por el aparato bucal y por las aberturas glandulares del cuerpo, dando un olor persistente y típico (Ponce *et al.*, 2006). Estos insectos son de vida nocturna, las especies domésticas se refugian durante el día en grietas, detrás de los muebles, en cañerías y desagües. Es común encontrarlas agrupadas debido a que poseen hormonas de agregación (Faccioli y Panozzo, 2010).

2.3.4 Patógenos asociados a *Periplaneta americana*

Los microorganismos patógenos al hombre son transportados sobre la superficie del cuerpo o de manera interna. Algunas de las enfermedades que propagan son: salmonelosis, lepra, cólera, micosis, neumonía, difteria, ántrax, tétanos, tuberculosis, toxoplasmosis, diarreas y gripes (Crespo y Valverde, 2005). Las bacterias transportadas por *P. americana* pueden mostrar resistencia a los antibióticos; por lo tanto, es importante su control en hogares, escuelas, restaurantes, industria alimentaria y hospitales (Mpuchane *et al.*, 2006).

Algunos de los patógenos encontrados en la superficie, tracto digestivo, heces y extremidades de *P. americana* se muestran en el cuadro 1 (Tatfeng *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Patógenos asociados a *Periplaneta americana* según Tattfeng *et al.* (2005)

Bacterias	
Patógeno	Enfermedad
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Gastroenteritis, infección de heridas, vías urinarias
<i>Bacillus subtilis</i>	Conjuntivitis, contaminación de comidas
<i>Campylobacter jejuni</i>	Enteritis
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bacterias
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea, Infección de heridas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neumonía, Infecciones en vías urinarias
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra
<i>Nocardia sp.</i>	Actinomycetoma
<i>Proteus morgani</i>	Infección de heridas
<i>Proteus rettgeri</i>	Infección de heridas
<i>Proteus vulgaris</i>	Infección de heridas
<i>Proteus mirabilis</i>	Gastroenteritis, Infección de heridas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gastroenteritis, Infecciones respiratorias
<i>Salmonella bredeny</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Salmonella newport</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Salmonella oranienburg</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Salmonella panama</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Salmonella paratyphi-B</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Salmonella rienmorbificans</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Salmonella bareilly</i>	Gastroenteritis, Contaminación de alimentos
<i>Serratia marscesens</i>	Contaminación de alimentos
<i>Streptococcus faecalis</i>	Neumonía
Hongos	
<i>Aspergillus niger</i>	Neumomicosis, otomicosis
Helmintos	
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Gusano
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Gusano redondo
<i>Hymenolopsis sp</i>	
<i>Necator americanus</i>	
<i>Trichuris trichuria</i>	Triquinosis
<i>Entamoeba hystolytica</i>	Amibiasis
<i>Giardia spp.</i>	Giardiasis
Virus	
<i>Poliomyelitis</i>	Polio

2.4 *Periplaneta americana* y *Salmonella* sp.

Diversas especies bacterianas se han aislado de *P. americana*. En Francia 56 especies de bacterias fueron aisladas de las cucarachas y 14 especies resultaron ser patógenos o potencialmente patógenos para el hombre y los animales, como *E. coli* y *Salmonella* sp. (Vythilingam *et al.*, 1997)

2.4.1 *Salmonella sp.* en la cutícula de *Periplaneta americana*

Con base a varios estudios en donde se colectaron cucarachas en instalaciones de eliminación de heces (registros), se reveló que *Salmonella sp.* sobrevive en el cuerpo de las cucarachas y la variación de la cantidad de las bacterias patógenas encontradas depende de los diferentes sitios de colecta dentro de las casas (Lammia *et al.*, 2005). Un estudio previo de *Salmonella sp.* en cucarachas colectadas en cocinas, baños y dormitorios de residencias, mostró una cantidad de 1.35×10^8 , 5.99×10^7 y 1.64×10^8 Unidades Formadoras de Colonias respectivamente. Los porcentajes de las cucarachas que portan *Salmonella sp.* mayor a 10^6 UFC/cucaracha, fue mucho menor en el baño que en la cocina; esto podría indicar la limpieza de los baños, mediante el uso de desinfectantes (Mpuchane, 2006).

La viabilidad e infectividad de *Salmonella sp* todavía sigue siendo cuestionada, debido a las altas temperaturas que se pueden alcanzar en las alcantarillas desnaturalizando a la bacteria (Tatfeng *et al.*, 2005).

2.4.2 *Salmonella sp.* en tracto digestivo y heces de *Periplaneta americana*

La obtención de *Salmonella sp.* puede ser por alimentación, ya que el hábitat de esta especie es el sistema de alcantarillado y es común encontrar enterobacterias como este patógeno en las heces humanas, las cuales sirven como fuente de alimento para *P. americana* (Klowden and Greenberg, 1976). Además existe una contaminación cruzada entre cucarachas, debido a la alimentación omnívora de esta especie, al alimentarse de exuvias, excretas e incluso otros individuos muertos (Kopanic *et al.*, 1994).

Ramírez (1989) demostró que *Salmonella oranienburg* permaneció viable en heces de *P. americana* por más de 140 días y *S. enteritidis* se multiplicó pocas veces en la hemolinfa de esta cucaracha, solo permaneció viable de 4 a 6 días.

Se ha analizado la multiplicación de *Salmonella typhimurium* en tracto digestivo de *P. americana*, a través de inoculación y monitoreándolas durante 96 horas, en donde se observó la disminución de la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias, lo que demuestra el potencial de contaminación que tiene la especie (Klowden and Greenberg, 1976; Kopanic *et al.*, 1994).

La presencia de cucarachas en ambientes potencialmente patogénicos como los hospitales es un aspecto importante a considerar, pues en los hospitales se desechan sanitizantes y antibióticos, que alterarían bioquímicamente la microbiota del tracto digestivo de las cucarachas (Akinjogunla *et al.*, 2012)

El estudio más reciente de *Salmonella* sp. en tracto digestivo de *P. americana* es acerca de un aislamiento y caracterización de la microbiota asociada en las cucarachas, donde se extrajo el tracto digestivo, se diseccionó en sus partes principales y se puso en medios de cultivo. En este, una de las bacterias encontradas fue *Salmonella paratyphi* B (Bagde *et al.*, 2013).

La cucaracha americana constituye un reservorio importante para *Salmonella* sp.; por lo tanto, el control de esta podría minimizar considerablemente la propagación de enfermedades infecciosas en nuestro entorno (Lammia *et al.*, 2005).

2.4.3 Incidencia de *Salmonella sp.* en *P. americana* de diferentes ambientes

En estudios realizados en tracto digestivo de *P. americana* colectadas en drenajes de hospitales (n=40), nueve de ellas (22.5%) resultaron positivo a la bacteria *Salmonella sp.* (Fathpour, 2004). Sin embargo; Tachbele (2006) en un estudio similar encontró una incidencia de 26.5 % en 34 especímenes colectados de hospitales.

Fathpour (2004) colectó 80 cucarachas en hogares y encontró la presencia de la bacteria en 57 (71.25%) especímenes. Mientras que Tachbele (2006) realizó pruebas de *Salmonella sp.* en 23 cucarachas obtenidas de restaurantes donde un espécimen (4.3 %) resultó positivo a la bacteria.

2.5 Microbiota en los insectos

2.5.1 Estructura del tracto digestivo de los insectos

La estructura básica del tracto digestivo es similar en todos los insectos aunque poseen una diversidad de modificaciones asociadas con la adaptación a diferentes tipos de alimentación. Se divide en tres regiones: estomodeo, mesenterón y proctodeo (Chapman *et al.*, 2013).

El estomodeo es la parte anterior del tubo digestivo y está cubierto de una membrana relativamente gruesa, hecha de cutícula, que a veces tiene pliegues y proyecciones o bien cerdas o espículas. El mesenterón es un saco alargado de diámetro generalmente uniforme y no presenta cutícula; sino una membrana peritrófica. El proctodeo es la parte final del intestino se extiende desde la válvula pilórica hasta el ano y está cubierto de cutícula al igual que el estomodeo, pero ésta es más fina y es permeable al agua (Lehane, 1997).

La membrana peritrófica está compuesta de quitina y proteína e impide que los alimentos entren en contacto directo con las células epiteliales; se desprende, envuelve a una porción de los alimentos y es eliminada con los productos digestivos. Esta membrana es permeable, protege el epitelio de daños mecánicos por partículas de alimentos, de la exposición a toxinas presentes en los alimentos y de la invasión microbiana; permitiendo el paso de enzimas digestivas en una dirección y de los productos de la digestión en la dirección opuesta (Shao *et al.*, 2001).

El diseño básico del tubo digestivo de los insectos presenta muchas modificaciones que reflejan adaptaciones a nichos especializados y a hábitos de alimentación y muchas de estas especializaciones han evolucionado para albergar microorganismos simbiotes (Chapman *et al.*, 2013).

2.5.2 El tracto digestivo del insecto y la microbiota

Desde la perspectiva de la colonización microbiana, el tubo digestivo de los insectos presenta un hábitat inestable. Además, el ciclo de vida de estos presenta desafíos para la transmisión de microorganismos entre generaciones. En la mayoría de los insectos, las hembras abandonan los huevos después de depositarlos, y el único comportamiento social involucra el apareamiento de los adultos. Como resultado, las oportunidades para transferencia directa de simbiotes intestinales entre congéneres son más limitadas. Sin embargo, algunas especies de insectos, incluyendo cucarachas, termitas, hormigas, algunas avispa y abejas, muestran comportamiento gregario o social, incluyendo trofalaxis o coprofagia, que permite la transmisión directa o indirecta, promoviendo así la entrada de microorganismos, ya sean simbiotes o patógenos (Martinson *et al.*, 2012).

Los microorganismos en el tracto digestivo de los insectos pueden incluir protistas, hongos, archaea y bacterias (Hongoh, 2010). Las especies bacterianas comprenden todos o la mayoría de los organismos en los intestinos de la mayoría especies de insectos. Estas comunidades bacterianas varían enormemente en tamaño, composición, ubicación y función dentro del tracto digestivo (Martinson *et al.*, 2012).

Por ejemplo, una abeja adulta contiene aproximadamente 10^9 células bacterianas, un número similar se encuentra en los adultos de género *Rhodnius* y en adultos *Acheta domestica* (grillo), mientras que en adultos de saltamontes (*Melanoplus sanguinipes*) contiene aproximadamente 10^6 bacterias, y un adulto de *Drosophila melanogaster* tiene cerca de 10^5 bacterias (Ryu *et al.*, 2010)

En un estudio de la microbiota del tracto digestivo de termitas, cucaracha de madera y cucaracha común (*Periplaneta americana*), las dos especies sociales tenían comunidades de simbioses, como las bacterias y los protozoos, mientras que las comunidades del tracto de *P. americana* fueron dominada por especies de bacterias comunes presentes en el ambiente (Sabree *et al.*, 2012).

2.5.3 Condiciones físicas

La colonización por microorganismos depende de las condiciones físico-químicas del lumen de las diferentes regiones del tracto digestivo, las cuales pueden mostrar variación extrema tanto en pH y disponibilidad de oxígeno. El pH del tracto digestivo es de 10-12, pero se regula activamente y a menudo difiere del de la hemolinfa, que es por lo general cerca de 7 (Harrison, 2001).

2.5.4 Mecanismos de defensa

El tracto digestivo de los insectos varía ampliamente en morfología y propiedades físico-químicas, que influyen en la estructura de la comunidad microbiana. En insectos sociales, como las termitas, las hormigas y las abejas; se han encontrado interacciones que proporcionan oportunidades para la transferencia de las bacterias intestinales, con funciones especializadas en nutrición y protección contra parásitos, agentes patógenos y modulación de la inmunidad (Beckage, 2008).

El tracto digestivo de los insectos es una de las principales vías de entrada de microorganismos. Para minimizar los efectos negativos posee diferentes mecanismos como: la síntesis de péptidos antimicrobianos, producción de especies reactivas de oxígeno, activación de los sistemas de reparación y detoxificación, melanización, fagocitosis, apoptosis y la renovación celular, entre otros (Lemaitre *et al.*, 2007).

2.5.4.1 Interacción insecto-patógeno

El resultado de una infección depende de la interacción entre el huésped y el patógeno, siendo este tipo de interacción muy compleja y dinámica. El hospedante desarrolla estrategias para minimizar los efectos patogénicos, mientras que el patógeno desarrolla las propias para aumentar sus probabilidades de éxito en la infección. Los invertebrados más usados como animales modelo para el estudio de esta interacción son *Caenorhabditis elegans* y *D. melanogaster* (Rahman *et al.*, 2004).

Tanto los insectos como los mamíferos poseen una inmunidad innata, la cual hace referencia a la primera línea de defensa que sirve para limitar la infección

durante las primeras horas de exposición a los microorganismos (Hoffmann *et al.*, 1999). La principal diferencia que existe entre el sistema inmune de insectos y mamíferos reside en que éstos últimos poseen un sistema inmune con memoria, lo que se conoce también como inmunidad adquirida (Beckage, 2008).

A pesar de esta carencia, los insectos son capaces de inducir su respuesta inmune después de exposiciones subletales a sustancias dañinas e incluso transmitir cierta inducción a la descendencia (Rahman *et al.*, 2004). Además, el sistema inmune de los insectos posee la habilidad de distinguir entre diferentes clases de patógenos (Lemaitre *et al.*, 2007).

En el sistema inmune también se pueden diferenciar dos tipos de respuesta: la respuesta sistémica y la respuesta local. La respuesta inmune sistémica comprende los procesos de melanización, fagocitosis, encapsulación y la secreción de péptidos antimicrobianos a la hemolinfa por parte del cuerpo graso, lo cual hace que esta respuesta tenga lugar por todo el cuerpo del insecto. En cambio la respuesta inmune local hace referencia a la respuesta concreta y localizada que lleva a cabo un tejido u órgano del insecto para luchar contra la infección; por ejemplo, el tracto digestivo actuaría produciendo especies reactivas de oxígeno, produciendo péptidos antimicrobianos y mediante la barrera física que es la membrana peritrófica (Lemaitre *et al.*, 2007).

En la respuesta a patógenos podríamos distinguir tres tipos de elementos según su función general: un grupo de elementos encargados de reconocer los patógenos (elementos sensores), otro grupo de elementos pertenecientes a las rutas

de señalización, y otro tipo de elementos que, una vez identificada la presencia de los patógenos, intentan destruirlos (componentes efectores) (Beckage, 2008).

2.5.4.2 Elementos sensores de patógenos

Los elementos sensores son los encargados del proceso de reconocimiento mediante interacciones con los patógenos. Deben de ser capaces de distinguir entre los diferentes tipos de patógenos, así como la microbiota comensal del tracto digestivo de los insectos. Existen dos tipos de elementos sensores: las estructuras moleculares asociadas a patógenos (PAMS) y las partículas lipídicas. Las PAMS modulan el proceso de reconocimiento mediante interacciones específicas de proteínas con estructuras moleculares que indiquen un agente extraño. En el caso de las partículas lipídicas se han descrito diferentes funciones en los insectos, tanto como transportadores de lípidos (Rodenburg *et al.*, 2005), como partículas sensoras en el reconocimiento de lipolisacáridos, toxinas y en la producción especies reactivas de oxígeno, por lo que juegan papeles importantes en la respuesta inmune de los insectos (Cheon *et al.*, 2006).

Los mecanismos sensores son capaces de distinguir entre bacterias gram-positivas y bacterias gram-negativas. La pared celular de las bacterias está formada por peptidoglucanos (PGN), que son glucopéptidos formados por cadenas alternas de ácido *N*-acetilmuránico y *N*-acetilglucosamina unidas por enlaces peptídicos (Mengin-Lecreulx *et al.*, 2005).

Las moléculas que reconocen estas formas específicas de PGN son las **proteínas de reconocimiento de peptidoglucanos** o **PGRPs** y éstas activan las diferentes rutas o cascadas de señalización que inducen la producción de pépti

dos antimicrobianos, la fagocitosis y la hidrólisis de PGNs, entre otros mecanismos de respuesta (Pili-Floury *et al.*, 2004).

Las **proteínas que contienen thioéster o TEP's** son otro grupo de moléculas capaces de reconocer patógenos, y además inducen la fagocitosis, la actividad proteolítica del insecto para la destrucción del patógeno y la activación de la ruta JAK/STAT (Agaisse *et al.*, 2004). Diferentes proteínas TEP son responsables de detectar diferentes microbios para su ingestión y destrucción por parte de los hemocitos, proceso que se conoce como opsonización. En *D. melanogaster* existen seis proteínas TEP y se ha observado la inducción de 3 de ellas en hemocitos y cuerpo graso después de la infección con *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus* (Lagueux *et al.*, 2000).

2.5.4.3 Regulación de la respuesta: las rutas de señalización

Tras el primer paso de detección de los patógenos, se activan diferentes vías de señalización que desencadenarán las respuestas de defensa del insecto. Se han descrito principalmente tres rutas que modulan la respuesta inmune en insectos: la ruta Toll, la ruta de la inmunodeficiencia (IMD) y la ruta JAK/STAT (Janus Kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription)(Lemaitre *et al.*, 2007).

La **ruta Toll** responde básicamente a la infección producida por bacterias grampositivas y hongos. Esta ruta se encuentra muy conservada evolutivamente y juega un papel clave en el establecimiento del eje dorso-ventral en embriones de varios insectos, así como en varios procesos de desarrollo (Belvin *et al.*, 1996).

La **ruta *Imd*** responde básicamente a la infección de bacterias gram-negativas y a algunas gram-positivas. En lepidópteros se ha observado que la inyección de *E. coli* (bacteria gramnegativa) induce esta ruta aumentando la expresión de *relish* y del AMP *cecropina B1* en el cuerpo graso (Tanaka *et al.*, 2007).

La **ruta *JAK/STAT*** se ha visto implicada en la respuesta a bacterias gramnegativas (Buchon *et al.*, 2009) y a virus. Se ha propuesto que esta ruta podría actuar respondiendo al daño celular producido en la infección (Jiang *et al.*, 2009), aunque la activación de esta ruta no es suficiente para superar la infección (Dostert *et al.*, 2005).

2.5.4.4 Péptidos antimicrobianos

Los AMP's son péptidos pequeños que poseen propiedades antimicrobianas cuya función es matar a los microorganismos que invaden un organismo huésped (Imler *et al.*, 2005).

Los AMPs son capaces de permeabilizar las membranas procariontas, causando la desestabilización de la membrana debido al desplazamiento de los lípidos de ésta como por la inserción de carga positiva en la membrana con carga negativa de la célula procarionta (Shai, 2002).

Los AMP's una vez sintetizados en el cuerpo graso son liberados a la hemolinfa, donde su permanencia es muy variable (Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998). Algunos AMP's que se encuentran conservados en los insectos son la Cecropina, Defensina y Atacina; algunos son específicos de la especie o del orden (Imler *et al.*, 2005).

Un grupo especial de AMPs son las lisozimas, cuya función es la hidrólisis de los puentes entre las cadenas de peptidoglucanos que forman la pared celular de las bacterias, causando la lisis celular (Gandhe *et al.*, 2007).

2.5.4.5 Especies Reactivas de Oxígeno

Las infecciones naturales por bacterias inducen una rápida producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo una reacción obligatoria para mantener bajo control el crecimiento de las bacterias en el aparato digestivo. Aunque este sistema es capaz de controlar la microbiota intestinal, no es lo suficientemente potente para la eliminación de una infección bacteriana adquirida por vía oral (Charroux *et al.*, 2010).

2.5.4.6 Melanización

La melanización contribuye a la respuesta inmune, aislando las rupturas cuticulares y encapsulando los microorganismos. Además, en los sitios de melanización se producen especies reactivas de oxígeno que actúan contra los patógenos (Nappi *et al.*, 1995). Algunas bacterias provocan una respuesta melanocítica en los sitios de la infección (Brandt *et al.*, 2007).

2.5.4.7 Oponización

La oponización es el proceso en el cual las oponinas marcan al patógeno para su fagocitosis. Estas son moléculas que se unen a la membrana del patógeno acelerando su posterior fagocitosis (Stroschein-Stevenson, *et al.*, 2006).

2.5.4.8 Coagulación

La coagulación es un proceso muy importante ya que limita la pérdida de hemolinfa y crea una nueva barrera para evitar infecciones, inmovilizando las bacterias y promoviendo su muerte. El mayor componente de estas fibras es una

proteína llamada Hemolectina (Goto *et al.*, 2003). Este proceso es independiente de melanización (Scherfer *et al.*, 2004).

2.5.4.9 Respuesta inmune celular

Este tipo de respuesta se ha observado principalmente en los hemocitos presentes tanto en su forma libre circulante como sésiles. Estas células son capaces de llevar a cabo diferentes funciones en la respuesta inmune: fagocitosis, secreción de opsoninas y AMPs, encapsulación y nodulación (Stuart *et al.*, 2005).

2.5.4.10 Fagocitosis

La fagocitosis es la captación celular de un sustrato, siendo un proceso fundamental en organismos eucariotas y esencial en la limpieza de objetos dañinos en el organismo (Stuart *et al.*, 2005). Este proceso requiere el reconocimiento de la partícula mediante la unión al receptor, seguido de la formación del fagosoma y la internalización de la partícula mediante procesos dependientes de actina (Agaisse *et al.*, 2005).

2.5.4.11 Encapsulación

La encapsulación es otro proceso celular en el cual los hemocitos son activados y forman una cápsula multicapa alrededor del objeto extraño. Para ello los hemocitos producen melanina y especies reactivas de oxígeno, con el objetivo de matar al parásito que se encuentra en su interior (Nappi *et al.*, 1995).

2.5.4.12 Nodulación

En la nodulación los hemocitos se agregan alrededor de las bacterias, hongos o virus. La diferencia con la encapsulación radica en el tamaño del patógeno, ya que en esta última se trata de patógenos de gran tamaño (Beckage, 2008).

2.5.4.13 Análisis de la microbiota intestinal de insectos.

En estudios recientes sobre microbiota basada en la identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S, muchos investigadores han informado sobre la diversidad de microorganismos presentes en el tracto digestivo de los insectos (Colman *et al.*, 2012). Mientras que éstos están empezando a producir una imagen de la diversidad bacteriana y la participación en las regiones del tubo digestivo de los insectos, los estudios deben ser interpretados con cautela, ya que se utilizan diferentes tejidos para la extracción de ADN a partir de células bacterianas y diferentes métodos de secuenciación (Engelbrektson *et al.*, 2010).

2.6 Salmonella

2.6.1 Historia

En 1813, Petit y Serres caracterizaron la fiebre tifoidea antes de la era de la bacteriología, basándose en los signos clínicos y las lesiones ulcerosas del intestino (Barreto y Rodríguez, 2012).

En Inglaterra en el año 1850, William Jenner distinguió los síntomas de la tifoidea basándose en la evidencia patológica del engrosamiento de las placas de Peyer y de los nódulos linfáticos mesentéricos; resaltando que los ataques previos de la fiebre tifoidea protegían de ataques subsecuentes, mientras que en el caso del tifus no sucedía lo mismo (Boyen *et al.*, 2008).

Seis años después en 1856, Budd describió la naturaleza infecciosa de la fiebre tifoidea de acuerdo a datos epidemiológicos, sugiriendo que la transmisión de la enfermedad ocurría a través del agua contaminada con desechos y que la fuente del agente infeccioso eran las heces humanas (Romero, 2007).

En 1885, Salmon y Smith descubrieron el *Bacillus choleraesuis* durante una epidemia de cólera porcino, describiéndole erróneamente como agente etiológico de la fiebre tifoidea.

El término *Salmonella sp.* fue creado por Lignieres en el año 1900, tomando como tipo el bacilo del cólera del cerdo (Chiu *et al.*, 2004). El bacilo de Eberth, el bacilo paratífico A y el bacilo paratífico B, fueron incluidos posteriormente en el género *Salmonella sp.*, de acuerdo con las conclusiones del Subcomité de las Salmonellas de la Asociación Internacional de Microbiología (Barreto y Rodríguez, 2012).

Antes de 1883, existían múltiples especies de *Salmonella sp.* que fueron taxonómicamente aceptadas; sin embargo, como resultado de experimentos que indican un alto grado de ADN similar, todos los aislados de *Salmonella sp.* fueron clasificados en una sola especie denominada *Salmonella choleraesuis* (Barreto y Rodríguez, 2012); estas especies fueron posteriormente subclasificadas dentro de 6 subgrupos basados en el ADN similar y su rango de hospedantes como: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. En 1999, Euzéby propuso la designación *Salmonella enterica* como un “especie neotipo”; reemplazando a las especies del género *Salmonella* de *S. choleraesuis* a *S. enterica* (Chiu *et al.*, 2004)

Más de 2500 serotipos, algunos como *typhi* y *paratyphi*; están adaptados a humanos y no tienen ningún otro hospedante natural. Otros como los serotipos *typhimurium* y *enteritidis*, tienen un amplio rango de hospedantes y pueden infectar una considerable variedad de animales. Algunos como el serotipo *choleraesuis*

(cerdos), serotipo *dublin* (ganado vacuno y terneros) y serotipo *arizonae* (reptiles); son altamente adaptadas a especies animales específicas pero ocasionalmente infectan humanos (Frank *et al.*, 2002).

2.6.2 Nomenclatura de *Salmonella*

La nomenclatura y clasificación de *Salmonella sp.* ha variado de forma reiterada desde el concepto serotipo-especie propuesto por Kaufmann en 1966 (Popoff *et al.*, 2003).

La aplicación de técnicas de Biología Molecular para precisar las especies reales que conformaban el género, dio pie a que el Centro de Referencia e Investigación de *Salmonella* de la Organización Mundial de la Salud en el Instituto Pasteur (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*), reconociera la existencia de sólo dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (anteriormente designada *Salmonella choleraesuis*) (Uribe y Suárez, 2006).

Salmonella bongori no es patógena (Hansen-Wester *et al.*, 2006), es una bacteria oportunista en animales poiquilotermos. Algunas publicaciones la refieren como muy raras veces vinculada a infecciones en humanos (Pignato *et al.*, 1998). Los estudios moleculares concluyen que esta especie persiste como legado de una antigua separación del género *Salmonella* (Hansen-Wester *et al.*, 2006).

Salmonella enterica comprende seis subespecies que se diferencian por sus características bioquímicas y genéticas; aunque no estrictamente exactas, en ocasiones se les menciona como subgrupos bajo numeración romana: I *enterica*; II *salamae*; III a *arizonae*; III b *diarizonae*; IV *houtenae*; VI *indica* (Uribe y Suárez, 2006). El número romano V se reserva para los serotipos de *S. bongori*, *S. enterica*

subsp. *enterica* (o subgrupo I); se divide en cinco serogrupos: A, B, C, D y E . Cada uno comprende múltiples serotipos, al punto que se han identificado más de 2500 (Ryan y Ray, 2004) y causan el 99 % de las salmonelosis en humanos y animales superiores (Gutiérrez *et al.*, 2008).

2.6.3 Taxonomía de *Salmonella* según Barreto y Rodríguez (2012)

Reino: *Bacteria*

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: *Enterobacteriaceae*

Género: *Salmonella*

Especies: *S. bongori* y *S. enterica*

Subespecies

enterica

salamae

arizonae

diarizonae

houtenae

indica

2.6.4 Características generales.

Salmonella sp. es un género de la familia Enterobacteriaceae, Gram-negativa, en forma de bacilo, anaerobia facultativa, asporógena, no encapsulada. Su tamaño oscila de 0.3 a 1 μm x 1.0 a 6.0 μm (Álvarez, 2007). Las formas móviles poseen flagelos móviles (excepto *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*) (Jurado *et al.*, 2010). Esta puede multiplicarse y crecer fácilmente en medios de cultivo artificiales (Katscher, 1997). Es la enterobacteria de mayor importancia en salud

pública por producir trastornos del tracto gastrointestinal y septicemia, no solo en humanos sino en la mayoría de especies animales (Cubillos, 2009).

2.6.5 Hábitat

La *Salmonella* comúnmente infectando a humanos, ganado bovino, porcino, ovino, mamíferos silvestres, reptiles, aves e incluso insectos (Althouse *et al.*, 2003) también en caninos, felinos, ovejas, cerdos y equinos (Mastroeni *et al.*, 2000). Generalmente infecta por vía fecal-oral, y se encuentra generalmente en aguas residuales, mar y aguas de ríos. Pueden contaminar una gran variedad de alimentos (Mastroeni *et al.*, 2000).

La mayoría de los serotipos de *Salmonella sp.* (59%) se incluyen dentro de la especie *S. enterica* subsp. *enterica*, que es el agente causal del 99% de las infecciones en humanos y animales de sangre caliente; incluyendo la fiebre tifoidea y la gastroenteritis. El resto de las subespecies se aíslan normalmente de animales de sangre fría y del ambiente (Brenner *et al.*, 2000).

2.6.6 Patogénesis, transmisión y virulencia.

Salmonella sp. es un importante patógeno transmitido por alimentos y de importancia zoonótica (Cubillos, 2009). Los animales se consideran como reservorios de la infección en humanos. Resulta imposible determinar el alcance real de la salmonelosis transmitida por la carne de cerdo, la cual es considerada como una de las principales fuentes para los humanos, después de los huevos y la carne de aves (Baptista *et al.*, 2009). De igual manera esta bacteria puede ser transmitida en lácteos, frutas o verduras contaminadas con heces de animales (Bearson *et al.*, 2006) y carne mal cocida. Algunos estudios han aislado *Salmonella sp.* en bagre de

canal (*Ictalurus punctatus*) debido a la mala calidad del agua, contaminación fecal de animales salvajes, pobres condiciones sanitarias y mala distribución o comercialización (Pa and Marshall, 2009).

La *Salmonella sp.* ingresa al organismo humano por vía oral, a través de la faringe, el tracto respiratorio y conjuntiva. Se ha demostrado que la *Salmonella sp.* puede ser aislada de los linfonódulos mesentéricos, del contenido rectal y fecal después de 3 horas post-infección (Wray *et al.*, 2000).

El tracto gastrointestinal ofrece un ambiente de estrés a las bacterias invasoras. El primer mecanismo de defensa del huésped después de la infección oral es la barrera acida del estómago, siendo una barrera importante para la colonización y la infección del tracto gastrointestinal de microorganismos; reduce el número de bacterias viables y si algo afecta el pH del estómago podrían aumentar el número de Salmonellas que puedan colonizar (Haesebrouck *et al.*, 2004). Esta muerte de bacterias provoca la liberación de endotoxinas que pueden provocar una septicemia (Cubillos, 2009). Sin embargo, *Salmonella enterica* serotipo *typhimurium* y *E. Coli* O157:H7 han demostrado poseer adaptación contra el estrés ácido (Audia *et al.*, 2001).

2.6.7 Isla de patogenicidad SPI-I

La SPI-1 fue el primer locus mayor de patogenicidad descrito para *Salmonella*. Fue encontrado en base a una propiedad fundamental, la invasividad. La idea inicial fue identificar un mutante natural de *S. typhimurium* que no invadiera células epiteliales en cultivo. Posteriormente, se clonó en un vector plásmido una mezcla de fragmentos del genoma de una cepa naturalmente invasiva (banco de genes), y se

introdujo a células del mutante, identificando un fragmento que le confería la capacidad invasiva. Así se aisló un fragmento que contenía genes de invasividad, que fue denominado *invCBA* (Vásquez-Arroyo, 2004). Esta región ha sido extensamente estudiada y el número de genes en él contenida se ha extendido a 30. Se encuentra en el centisoma 63 y abarca 40 kb (Calva, 2002).

2.6.8 Diagnóstico de *Salmonella*

El género *Salmonella* es el agente causal más frecuente de enfermedades de transmisión alimentaria, por esto es uno de los más estudiados. En los países industrializados la *Salmonella sp.* infecta humanos, principalmente a través del consumo de comida de origen animal de cerdo, bovinos, aves de corral y huevos (Jense *et al.*, 2004). Es por esto que su diagnóstico e identificación toma gran importancia en el laboratorio. *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* son los serotipos aislados con mayor frecuencia en cerdos (Baptista *et al.*, 2009)

2.6.8.1 Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica sintetiza muchas veces una fracción de la cadena de ADN, copiándolo y amplificándolo; facilitando y aumentando la probabilidad de identificar determinados virus o bacterias causantes de una enfermedad. Posee ventajas inherentes que la caracterizan y por ende es un excelente método aplicable a la detección e identificación de *Salmonella sp.* y de otros patógenos. Además, las cepas carentes de antígenos somáticos (O) y/o flagelares (H) (cepas rugosas), que sólo son reconocidas como *Salmonella spp.* por el método tradicional de serotipificación, pueden ser identificadas mediante PCR; debido a que esta técnica detecta secuencias específicas de ADN y no es alterada por variaciones fenotípicas, que se pueden evidenciar por patrones bioquímicos (Velilla *et al.*, 2006).

La técnica de PCR ha sido utilizada como herramienta de investigación de focos de brotes alimentarios y en la identificación de agentes etiológicos responsables. Este método presenta alta sensibilidad, especificidad y menor tiempo de proceso. La realización de la detección por el método de la PCR depende en parte, de la extracción del DNA y la especificidad de los primers. Las matrices ambientales, alimentarias y clínicas son muy complejas, debido principalmente a la elevada cantidad de proteínas, glúcidos y lípidos existentes, como la presencia de otros microorganismos; esto contribuye a limitaciones de la técnica (Urrutia *et al.*, 2006).

2.6.8.2 RFLP's

La técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) descrita por Kan y Dozy en 1978, se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular, después de someterlo a un proceso de digestión con una enzima de restricción determinada. Dependiendo de si la enzima utilizada es de corte frecuente o no, se obtiene mayor o menor número de fragmentos. Inicialmente se utilizaron enzimas de restricción de corte frecuente que proporcionaban patrones de restricción electroforéticos con un gran número de bandas. La tecnología RFLP se utiliza como primer paso en los métodos de hibridación como el IS200-RFLP (Jeoffreys *et al.*, 2001) entre otros y se considera variante del método PCR, cuando se aplica a una secuencia conocida de ADN amplificada, es decir, PCR-RFLP (Kisiela *et al.*, 2005).

El gen *fliC* tiene regiones terminales conservadas y una región central variable la cual determina la especificidad antigénica y varios trabajos han demostrado que el

gen *fliC* es ideal para discriminar entre serotipos de *Salmonella* sp. mediante PCR-RFLP particularmente por digestión doble (Dauga *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2003)

2.6.8.3 Gen de invasividad A (*invA*)

El gen *invA* ha sido ampliamente utilizado en estudios para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos, debido principalmente a la estabilidad que presenta desde el punto de vista genético (Li & Mustapha, 2004)

El *invA* es un gen importante en la virulencia de *Salmonella* sp. Este gen es un factor de virulencia relacionado con el proceso de invasión al epitelio intestinal y utilizado por otros enteropatógenos como *Shigella* spp. durante el proceso de infección. El gen *invA* es común en todas las variedades invasoras, lo que significa que se puede asociar con posibles cuadros virulentos. Se encuentra codificado en el cromosoma bacteriano, lo que le confiere mayor estabilidad en una región conocida como isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* sp. (SPI1). Esta isla codifica, entre otras proteínas del sistema de secreción tipo III (Zhang *et al.*, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica del municipio de Torreón, Coahuila.

La colecta de cucarachas se realizó en el área urbana del municipio de Torreón, Coahuila; México; el cual se encuentra ubicado en la parte suroeste del estado de Coahuila. Su posición geográfica está determinada por las coordenadas 25° 32' 40" latitud norte y 103° 26' 30" longitud oeste. La extensión territorial del municipio es de aproximadamente 1,947.7 km². Se encuentra a una altitud promedio de 1140 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2013).

El desarrollo de éste trabajo se realizó durante el periodo comprendido entre los meses de Junio a Noviembre del año 2012.

3.2 Clima

La región es de clima estepario, con escasas lluvias, apenas entre 100 y 300 mm como media anual; la mayoría de estas precipitaciones van desde abril hasta octubre. La temperatura fluctúa entre los 0 y 40 grados centígrados, pero puede alcanzar hasta 44 °C en verano y -8 °C en invierno (INEGI, 2013).

Los vientos predominantes tienen dirección sur con velocidad variable de 20 a 44 kilómetros por hora, los cuales generalmente provocan tolvánas que cubren la visibilidad hasta algunos metros de distancia (INEGI, 2013).

3.3 Zona urbana

La zona urbana tiene clima muy seco semicálido y está creciendo sobre terrenos previamente ocupados por agricultura y matorrales. La población actual del municipio de Torreón es de 1, 230,000 habitantes (INEGI, 2013).

3.4 Colecta y preservación de especímenes

Los sitios de muestreo incluyeron 10 hospitales, 10 escuelas, 10 restaurantes y 50 casas habitación. En cada uno de los hospitales, restaurantes y escuelas se colectaron 10 especímenes, mientras que en cada una de las casas habitación dos especímenes, para un total de 400 cucarachas. La colecta se hizo al azar y de forma directa. Las cucarachas colectadas se conservaron con etanol al 96% en frascos de 125 ml, hasta su disección.

3.5 Disección de cucarachas

Las cucarachas se colocaron en un plato de cera y se sujetaron con dos alfileres de costura en el área del pronoto; posteriormente con unas tijeras de disección se retiraron las alas anteriores y posteriores y se cortaron los escleritos del abdomen hasta el área del pronoto. Con unas pinzas previamente desinfectadas en etanol al 96% y un escalpelo con un bisturí nuevo, se procedió a retirar todo el aparato digestivo. Este se colocó en un vidrio reloj, donde se maceró para posteriormente colocarlo en un vial de 1.5 ml. para su conservación hasta su uso se colocaron en un congelador a -20° C.

3.6 Extracción de ADN

Las muestras se llevaron al laboratorio de Citogenética de la FAZ-UJED donde se realizó la extracción de ADN siguiendo el método CTAB (cetyltrimethylammonium bromide).

Se inactivó la muestra, poniéndola a hervir por cinco minutos y se adicionaron 50 µl de lisozima (10 mg/ml), se agitó e incubó a 37 °C durante una hora. Posteriormente se agregaron 100 µl de SDS 10%, más 10 µl de proteinasa K (10

mg/ml), se agitó e incubó a 65 °C durante 10 minutos; posteriormente se agregaron 100 µl de NaCl 5M y se agitó. Se adicionaron a la mezcla 100 µl de CTAB. Esta se agitó nuevamente e incubó durante 10 minutos a 65 °C. Se inactivaron las enzimas en agua hirviéndolas durante 5 minutos, se agregaron 600 µl de SEVAG, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos y se transfirieron 300 µl de sobrenadante a un tubo nuevo. Se adicionaron 180 µl de (0.6 volúmenes) de alcohol isopropílico frío para precipitar los ácidos nucleicos, se enfrió la mezcla a -20 °C durante una hora.

Nuevamente se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm por 15 min y se descartó la mayoría del sobrenadante. Se adicionó 1 ml de etanol frío y después se procedió a centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos, para descartar el sobrenadante, dejando 20 µl por encima del botón de ADN. De nuevo se centrifugó a 10,000 rpm por 1.5 minutos y se descartó la mayoría del sobrenadante cuidadosamente. Se invirtió el tubo y se dejó secar a temperatura ambiente.

El ADN obtenido se resuspendió en 20 µl de buffer TE 1X, se incubó a 65° C durante 20 minutos y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.7 Reacciones PCR

Para el diagnóstico molecular de *Salmonella* sp., se usaron iniciadores específicos para amplificar en reacciones separadas de PCR los genes *invA* y *fliC*. Las reacciones de PCR contenían 25 pmoles de cada uno de los iniciadores (Cuadro 2), dNTP's a una concentración de 2.5 mM (Invitrogen), 1.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 2.5 µl de buffer 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 10-200 ng de ADN templado y Agua Mili-Q para completar un volumen de 25 µl. Las secuencias de los oligos utilizados se muestra en el cuadro 2.

Para el gen *invA*, las condiciones del termociclador (Tech NE TC-512, Barlo World Scientific, USA) fueron un ciclo a 95 °C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineación de primers a 58 °C por 30 segundos y una extensión a 72 °C por 30 segundos, con una extensión final a 72 °C por 10 min.

Para el gen *fliC* todo el proceso fue exactamente igual, excepto la temperatura de alineación que fue de 60 °C. Los productos de PCR, el control positivo (*S. enteritidis*) y el marcador de peso molecular, fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% y teñidos con Gel Red y capturada la imagen en un fotodocumentador WiseDoc WGD-20 (DAIHAN Scientific Co. Ltd. Korea).

Para el gen *invA* de *Salmonella* sp. se utilizó un marcador hyperladder 100-pb (Bioline, USA) y para el gen *fliC* de *Salmonella* sp. se utilizó un marcador Ladder de 250-pb (Invitrogen, USA) para determinar el tamaño de los productos de PCR.

Cuadro 2. Primers utilizados para la amplificación de PCR de los genes *invA* y *fliC* de *Salmonella* sp.

Gen	Primers	Autor
<i>invA</i>	5' GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA 3' 5' TCATCCACCGTCAAAGGAACC 3'	Rahn <i>et al.</i> , (1992)
<i>fliC</i>	5' GCACAAGTCATTAATACAAACAGCC 3' 5' TTAACGCAGTAAAGAGAGGACG 3'	Dauga <i>et al</i> (1998)

3.8 PCR-RFLP

La determinación del serotipo de *Salmonella* sp. presente en el ADN obtenido del tracto digestivo de las cucarachas se realizó mediante digestión enzimática del

producto de PCR del gen *fliC* con la endonucleasa *Sau3AI* (Promega, Madison WI, USA) .

Después de la incubación, 6 μ l de la digestión se mezclaron con 3 μ l de buffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% de glicerol) y la electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 10%. La muestra se corrió durante 2.5 horas a 100 V en buffer 1X Tris-borato-EDTA. El Hyperladder 100-pb (Bioline) se utilizó como marcador molecular para determinar el tamaño de los fragmentos de restricción. Los geles se tiñeron y se fotografiaron.

3.9 Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba de X^2 ; con nivel de significancia de (0.01). Dicha prueba permitió determinar la existencia de diferencias significativas entre las proporciones de muestras positivas de cucarachas colectadas de hospitales, restaurantes, hogares y escuelas.

4. RESULTADOS

En este estudio 400 cucarachas de la especie *Periplaneta americana* L. fueron colectadas en hospitales, restaurantes, escuelas y casas habitación. En general, el 9.25% (37/400) de las cucarachas fueron portadoras de *Salmonella* sp. En relación con el origen de colecta, se presentó un mayor porcentaje de *Salmonella* sp. en el tracto digestivo de las cucarachas colectadas en casas habitación, siendo este menor porcentaje en las colectadas en escuelas, restaurantes y hospitales (Cuadro 3). Se presentó diferencia significativa ($P < 0.01$) en la incidencia de *Salmonella* sp. entre las cucarachas colectadas en casa habitación, hospitales, restaurantes y escuelas. Al excluir casa habitación y solo comparar la incidencia entre escuelas, hospitales y restaurantes se encontró diferencia significativa ($P < 0.01$). Sin embargo, no se presentó diferencias significativas ($P > 0.01$) en la incidencia de *Salmonella* entre las cucarachas colectadas en restaurantes y escuelas (Cuadro 4).

Cuadro 3. Resultados de cucarachas positivas y negativas a *Salmonella* sp. portada en el tracto digestivo y analizadas por PCR.

<i>Salmonella</i> sp., en el tracto digestivo de <i>Periplaneta americana</i>			
Hábitat	Número de muestras	Muestras positivas	Muestras negativas
Casas habitación	100	25 (25%)	75 (75%)
Escuelas	100	6 (6%)	94 (94%)
Hospitales	100	3 (3%)	97 (97%)
Restaurants	100	3 (3%)	97 (97%)
Total	400	37 (9.25%)	363 (90.75%)

Cuadro 4. Prueba de X^2

Prueba de homogeneidad (X^2)		
Comparando	X^2 calculada	X^2 tablas
4 Clases (Hospital, Casa habitación, Escuela, Restaurantes)	40.11	11.34 (3 gl; α 0.01)
3 Clases (Hospitales, Restaurantes, Escuelas)	10.56	9.21 (2 gl; α 0.01)
2 Clases (Escuelas, Restaurantes)	5.9	6.64 (1 gl; α 0.01)

La presencia de *Salmonella* sp. en el tracto digestivo de las cucarachas fue determinada mediante PCR amplificando los genes *invA* y *fliC*. La figura 1 muestra los productos de PCR del gen *invA* obtenidos a partir del ADN extraído del tracto digestivo de cucarachas colectadas en hospitales (A), escuelas (B), casas habitación (C) y restaurantes (D) y portadoras de *Salmonella* sp.

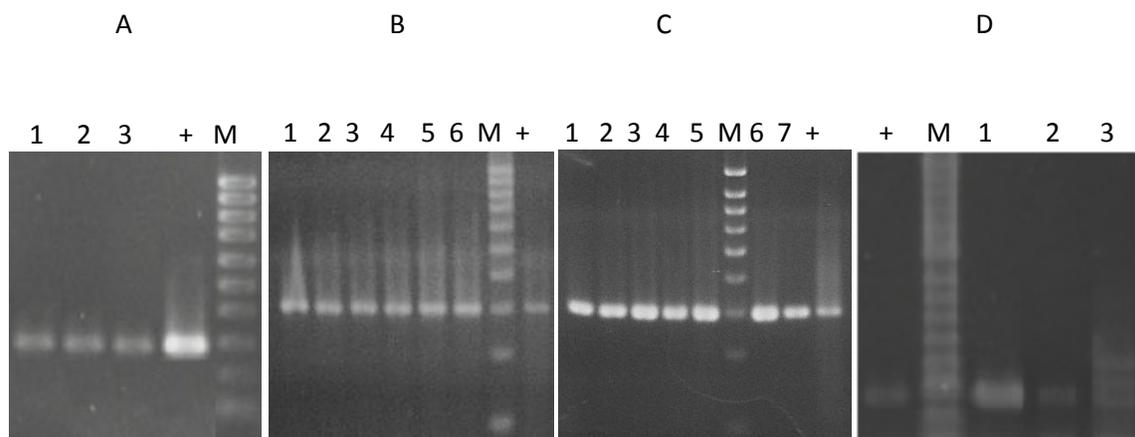


Figura 1. Productos de PCR del gen *invA* de *Salmonella* sp. a partir de ADN obtenido del tracto digestivo de: A. Líneas 1-3 = cucarachas colectadas en hospitales. B. Líneas 1-6 = cucarachas colectadas en escuelas. C. Líneas 1-5, 6 y 7 = cucarachas colectadas en casas habitación. D. Líneas 1-3 = cucarachas colectadas en restaurantes. + = control positivo (*S. enteritidis*). M = marcador molecular 100 pb. El fragmento observado es de 287 pb.

El tamaño de los productos de PCR del gen *fliC* amplificados a partir del ADN obtenido del tracto digestivo de las cucarachas positivas a *Salmonella* sp. fue para todos los amplicones de aproximadamente 1.5 kb de tamaño (Figura 2A). Los productos de PCR del gen *fliC* fueron cortados con la enzima *Sau3AI* generándose un patrón de restricción en todos los amplicones que correspondió con el de *S. enteritidis* (Figura 2B).

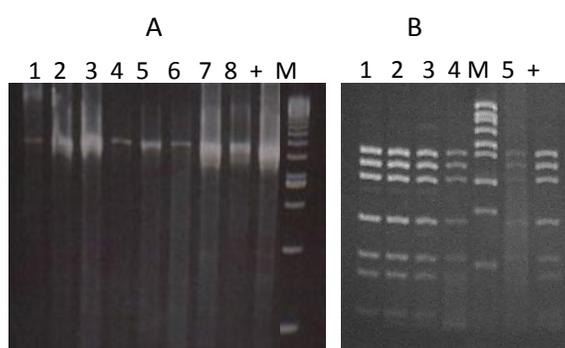


Figura 2. A. Líneas 1-8 = productos de PCR del gen *fliC* amplificado a partir del ADN obtenido del tracto digestivo de cucarachas, + = control positivo *S. enteritidis*, - = control negativo, M1 = marcador molecular 250 pb. B. Líneas 1-5 = perfiles de restricción del gen *fliC* obtenidos con la enzima *Sau3AI*, + = control positivo *S. enteritidis*, M2 = marcador molecular 100 pb.

5. DISCUSIÓN

En el área urbana de Torreón, Coahuila, México la especie de cucaracha más abundante es *P. americana* (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013). Esta es una especie peridomestica, omnívora, que para satisfacer sus necesidades de agua, alimento y humedad tiene como hábitat el sistema de alcantarillado y drenaje de las ciudades (Ponce *et al.*, 2005), y son capaces de portar y acarrear en su parte externa y diseminar bacterias, hongos, helmintos y virus de importancia médica (Tatfeng *et al.*, 2005). Entre las bacterias que porta *P. americana* se encuentra la bacteria *Salmonella* sp., la cual ha sido aislada de reptiles, aves e incluso insectos (Althouse *et al.*, 2003).

En este estudio mediante PCR se encontró al género de *Salmonella* sp. y mediante PCR-RFLP se encontró el serotipo *S. enteritidis*, lo cual se consigna lo reportado por Ramírez (1989), donde aisló del tracto digestivo y heces de *P. americana* dos serotipos de *Salmonella* sp. (*S. enteritidis* y *S. oranienburg*). Sin embargo, en estudios más recientes se ha encontrado el género *Salmonella* sp. en el tracto digestivo de *P. americana*, sin realizar estudios de tipificación (Fathpour, 2004; Tachbele, 2006; Bagde, 2013).

Fathpour (2004) y Tachbele (2006), reportaron una incidencia de *Salmonella* sp. en tracto digestivo de *P. americana* del 22.5% y 26.5% respectivamente; las cuales fueron colectadas en hospitales. Dichos porcentajes difieren con los encontrados en este estudio, ya que la presencia de *Salmonella* sp. en el tracto digestivo de *P. americana* colectadas en hospitales fue del (3%). El porcentaje de incidencia de *Salmonella* sp. encontrado en las cucarachas provenientes de

hospitales coincide con lo reportado por Akinjogunla *et al.* (2012) quienes indican que la presencia de desechos de sanitizantes y antibióticos alteran la microbiota del tracto digestivo de las cucarachas, por lo que las cepas susceptibles no sobreviven, mientras que las bacterias que adquieren una resistencia a estos antibióticos logran sobrevivir.

La incidencia de *Salmonella sp.* en tracto digestivo de cucarachas colectadas en restaurantes fue del 3%, que es similar al 4.3% reportado por Tachbele (2006); y el porcentaje de escuelas para este estudio fue de 6%, aunque no se encontraron estudios para comparar estos resultados. Las condiciones de higiene, como la presencia de sanitizantes, que también sirven como bactericidas y que son muy usados comúnmente para la desinfección de superficies, baños y cocinas pueden explicar esta baja incidencia de *Salmonella sp.* tal como lo consigna Mpuchane (2006).

La incidencia de *Salmonella sp.* en el tracto digestivo de las cucarachas colectadas en casas-habitación fue del 25%, mientras que Fathpuor (2004) encontró 71.25 % en este mismo hábitat. Estos datos indican la variabilidad de la presencia de *Salmonella sp.* en el tracto digestivo de *P. americana*, lo cual depende directamente del hábitat en que se encuentre esta especie. La diferencia entre las incidencias de *Salmonella sp.* pueden deberse a las condiciones bioquímicas del tracto digestivo de las cucarachas como el pH, la disponibilidad de oxígeno y a los mecanismos inmunológicos propios de la cucaracha (Harrison, 2001; Lemaitre *et al.*, 2007)

Los primers utilizados en este estudio demostraron una alta especificidad y sensibilidad a la presencia de *Salmonella* sp., pues las reacciones de PCR amplificaron únicamente las regiones esperadas a partir de los genes de interés, *invA* y *fliC* de *Salmonella* sp. aún en presencia de ADN de otros microorganismos.

Se sabe que las cucarachas son portadoras de un alto número de géneros y especies de bacterias como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *S. aureus*, *S. feacalis*, *S. epidermidis*, *Aeromonas* sp, *Candida* sp, *Rhizopus* sp, *Aspergillus* sp, entre otras (Tatfeng *et al.*, 2005). Los resultados del presente estudio indican que los primers aquí empleados se pueden utilizar para la detección de *Salmonella* sp. a partir de cucarachas y otros insectos (Figura 1).

El gen *fliC* tiene regiones terminales conservadas y una región central variable la cual determina la especificidad antigénica. Varios trabajos han demostrado que el gen *fliC* es ideal para identificar los serotipos de *Salmonella* sp. mediante PCR-RFLP particularmente por digestión doble (Dauga *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2003). La secuencia nucleotídica del gen *fliC* de *S. enteritidis* posee seis sitios de corte para la endonucleasa *Sau3AI*, lo que generó los siete fragmentos que se observan en los carriles de la Figura 2B, demostrando que el gen *fliC* a partir del cual se generó el producto de PCR provenía de *S. enteritidis*.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que la bacteria *Salmonella* sp. esta presente en el tracto digestivo de *Periplaneta americana*.

Se acepta la hipótesis planteada ya que la bacteria *Salmonella* sp. se encuentra presente en el tracto digestivo de *P. americana*.

En relación con el tipo de hábitat de *P. americana*, la incidencia de *Salmonella* sp. en casa habitación fue de 25%; la incidencia en escuelas fue 6%, mientras que en restaurantes y hospitales fue del 3%.

Las cucarachas constituyen un reservorio importante de patógenos, por lo tanto, el control de las cucarachas minimizará considerablemente la propagación de enfermedades infecciosas en nuestro entorno.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda buscar la presencia de *Salmonella* sp. en otras regiones del cuerpo de *Periplaneta americana* en donde la bacteria pudiera estar presente como son exoesqueleto, cutícula, hemolinfa y heces fecales.

Se recomienda realizar futuros estudios de presencia de bacterias patógenas incluyendo *Salmonella* sp. en otras especies de cucarachas asociadas a los ambientes urbanos y previamente reportadas en el área de estudio del presente trabajo como son *Blatella asahinai* y *Blatella germanica*.

Finalmente se recomienda realizar estudios de presencia de *Salmonella* sp. en el tracto digestivo de *P. americana* en ambientes urbanos y peridómesticos para conocer la incidencia y prevalencia de los porcentajes en esos lugares.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agaisse, H., L. S. Burrack, J. A. Philips, E. J. Rubin, N. Perrimon, and D. E. Higgins. 2005. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science*.309, 1248-5.
- Akinjogunla, O. J.; Odeyemi, A. T. and Udoinyang, E.P. 2012. Cockroaches (*periplaneta americana* and *blattella germanica*): reservoirs of multi drug resistant (MDR) bacteria in Uyo, Akwa Ibom State. *Scientific Journal of Biological Sciences* 1(2):19-30.
- Al-Mayali, H. and M. Al-Yaqoobi. 2010. Parasites of Cockroach *Periplaneta americana* (L.) in Al-Diwaniya province, Iraq. *J.Thi-Qar Sci.* 2(3):3-4.
- Althouse, C., S. Patterson, P. Cray and R. Isaacson. 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* bind to enterocytes and contribute to colonization of swine In vivo. *Infection and immunity.* 71(11): 6446-6452.
- Alvarez, N. 2007. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella entérica*. Universidad de Oviedo. Asturias, España. Pp 86-92.
- Antonelli, G. 1930. La blatta nella igiene domestica. *Gior. d. r. Sec. ital.d'ig.*, 62: 132-142.
- Audia, J., C. Webb, J. Foster. 2001. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291:97-106.
- Bagde U. S, U. Gopi & P. Ram. 2013. Isolation and characterization of gut-associated microbes in cockroaches. *African Journal of Microbiology Research.* 7(19):2034-2039.
- Baptista, F., L. Alban, A. Ersboll, L. Nielsen. 2009. Factors affecting persistence of high *Salmonella* serology in Danish pig herds. *Preventive Veterinary Medicine.* 92(4):301-308.
- Barreto G. A. y H. de la C. Rodríguez. 2012. La nomenclatura científica en el caso particular de *Salmonella*. *Rev. prod. anim.* 24 (2): 147-149.
- Bearson, S., B. Bearson, M. Rasmussen. 2006. Identification of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* genes important for survival in the swine gastric environment. *Applied and Environmental microbiology.* 72(4): 2829-2836.

- Beck, O., and W. B. Coffee. 1943. Observations on *Salmonella typhimurium*. J. Bact., 46: 200.
- Beckage, N.E. 2008. Insect Immunology. Academic Press, Amsterdam. pp. 256-260
- Belvin, M. P. and K. V. Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll/dorsal pathway. Annu Rev Cell Dev Biol.12, 393-416
- Bitter, R. S., and Williams, O. B. 1949. Enteric organisms from the American cockroach. Jour. Infec. Dis., 86: 87-90.
- Bonnefoy, X., H. Kampen, K. Sweeney. 2008. Public Health Significance of Urban Pests. Editorial World Health Organization. Copenhagen, Denmark. 567 p.
- Boyen, F., F. Haesebouck, D. Maes, F. Van Immerseel, R. Ducatelle, F. Pasmans. 2008. Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control. Veterinary microbiology. 130: 1-19
- Brandt, S. M. and D. S. Schneider. 2007. Bacterial infection of fly ovaries reduces egg production and induces local hemocyte activation. Dev Comp Immunol.31, 1121-30
- Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo & R. A. Tauxe. 2000. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* , 38 (7): 2465–2467.
- Brune A. and M. Ohkuma. 2010. Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. *Biology of termites: a modern synthesis*, (Bignell DE, Roisin Y, & Lo N, eds), Springer Netherlands, Dordrecht pp. 439–475..
- Buchon, N., N. A. Broderick, M. Poidevin, S. Pradervand, and B. Lemaitre. 2009. *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation. Cell Host Microbe.5: 200-211
- Calva, E. 2002. Capítulo 4. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Microbiología en Línea [En Línea] <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/> Fecha de consulta [03-09-13].
- Camousseight, A. 2006. DIVERSIDAD DE ESPECIES. ANIMALES INVERTEBRADOS. INVERTEBRADOS TERRESTRES 1ª edición CONAMA. Santiago de Chile. pag. 303.
- Cao, G. 1898. Sui passaggio dei microorganismi a traverso l'intestino dialcuni insetti. Ufficiale Sanit. Riv. Igiene Med., Patrica, II: 337-397.

- Chapman R. F., S. J. Simpson and A. E. Douglas. 2013. *The Insects: Structure and Function*, 5th edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Charroux, B. and J. Royet, 2010. *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly (Austin)*.4:40-7.
- Cheon, H. M., S. W. Shin, G. Bian, J. H. Park, and A. S. Raikhel. 2006. Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem*.281:8426-8435.
- Chiu, C., L. Su and C. Chu. 2004. *Salmonella enterica* serotype *Choleraesuis*: Epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev*; 17(2): 311-322.
- Colman D. R., E. C. Toolson and C. D. Takacs-Vesbach. 2012. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol Ecol* 21: 5124–5137.
- Crespo, F. A., Valverde A. del C. 2005. Artrópodos de Interés Médico en Argentina CAPITULO 16 BLATTARIA - CUCARACHAS. 1a edición. - Buenos Aires: Fundación Mundo Sano. pp. 107-112.
- Cubillos, D. 2009. Aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del genero *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B de la Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia en Villavicencio-Meta.. Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana.
- Dauga, C.; Zabrovskaja, A. and Grimont P.A.D. 1998. Restriction fragment length polymorphism analysis of some flagellin genes of *Salmonella enterica*. *J. Clin. Microbiol.* 36:2835–2843.
- Devi, S. J. N and C. J. Murray. 1991. Cockroaches (*Blatta* and *Periplaneta* species) as reservoirs of drug-resistant salmonellas. *Epidemiol. Infect* 107:357-361.
- Domínguez, R. R. 1994. Taxonomía I, protura a homóptera, claves y diagnosis. UACH Parasitología Agrícola. Chapingo, México. pp. 138-143.
- Dostert, C., E. Jouanguy, P. Irving, L. Troxler, D. Galiana-Arnoux, C. Hetru, J. A. Hoffmann, and J. L. Imler. 2005. The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat Immunol*.6:946-953.
- Engelbrektson A., V. Kunin, K. C. Wrighton, N. Zvenigorodsky, F. Chen, H. Ochman and P. Hugenholtz. 2010. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *ISME J* 4: 642–647.

- Faccioli, V. y L. Panozzo. 2010. Las cucarachas (Orden Blattaria). Museo provincial de ciencias naturales. Cartilla de difusión nº 17. Santa Fe, Argentina. [En línea] <http://www.unl.edu.ar/santafe/museocn/cartillas/> Fecha de consulta [20-10-2013).
- Fathpour, H., G. Emtiazi & E. Ghasemi. 2003. Cockroaches as Reservoirs and Vectors of Drug Resistant *Salmonella* spp. *Iranian Biomed. J.* 7(1): 35-38.
- Figueroa Ochoa, I. M., & Verdugo Rodriguez, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de microbiología* , 47(1-2): 25-42.
- Food-Related Environments. *Journal of Medical Entomology.* 49(3):1481-1484.
- Frank P, H. Peter, D. Jeroen and H. Freddy. 2002. Pathogenesis of infections with *Salmonella enteric* subsp. *Enteric* serovar *Muenchen* in the turtle *Trachemys scripta scripta*. *Veterinary Microbiology.* 87(4): 315-325.
- Galaica, J. 2009. Cucarachas. [en línea] <http://www.infoartropodos.es/articulos/cucarachas.pdf>. Fecha de consulta [17/01/2013].
- Galán, J. E and Curtiss R. 1991. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun* 59:2901–2908.
- Gandhe, A. S., G. Janardhan, and J. Nagaraju. 2007. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkworms (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochem Mol Biol.* 37:655-666.
- García F., M. J. Notario, J. M. Cabanás, R. Jordano and L. M. Medina. 2012. Incidence of bacteria of public health interest carried by cockroaches in different food-related environments. *Journal of Medical Entomology.* 49(6):1481-1484.
- Gliniewicz, A., E. Czajka, A. E. Laudy, M. Kochman, K. Grzegorzak, K. Ziówska, B. Sawicka, H. Stypulkowska-Misiurewicz and K. Pancer 2003. German Cockroaches (*Blattella germanica* L.) as a Potential Source of Pathogens Causing Nosocomial Infections Indoor and Built Environment, Vol. 12, No. 1-2, 55-60.
- Goto, A., T. Kadowaki, and Y. Kitagawa. 2003. *Drosophila hemolectin* gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. *Dev Biol.* 26(4):582-591.
- Graczyk TK, R. Knight and L. Tamang. 2005. Mechanical transmission of human protozoa and parasites by insects. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(1):126–132.

- Guo, X.; Chen, J.; Beuchat, L. R. and Brackett, R. E. 2000. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from hilA. *Appl Environ Microbiol* 66:5248–52.
- Gutiérrez, A. C., L. H. Paasch, y N. L. Calderón. 2008. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Vet. Mex.*, 39 (1): 81-90.
- Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle and A. Decostere. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine? What can we expect? *Veterinary microbiology*.100: 255-268.
- Hansen-Wester, I.; D. Chakravorty, and D. Hensel. 2006. Functional Transfer of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 to *Salmonella bongori* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*; 72 (5): 2879-2888.
- Harrison JF. 2001. Insect acid-base physiology. *Annu Rev Entomol* 46: 221–250.
- Hernández-Rodríguez, S., Ortega-Morales, A. I., Valdés-Perezgasga, Ma. T., Sánchez-Ramos, F.J., López-Hernández, J. y J. Santillán-Santana. 2013. Nuevos registros de cucarachas urbanas en Torreón, Coahuila, México (Insecta: Blattodea). *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*, 29(2): 428-430.
- Hong, Y.; Liu, T.; Hofacre, C.; Maier, M.; White, D. G.; Ayers, S.; Wang, L. and Maurer, J. J. 2003. A restriction fragment length polymorphism–based polymerase chain reaction as an alternative to serotyping for identifying *Salmonella* serotypes. *Avian Dis.* 47:387–395.
- Hongoh Y. 2010. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Biosci Biotech Bioch* 74: 1145–1151.
- Iannacone, J. y L. Alvarino. 2007. Integración del control químico y etológico para la supresión poblacional de *Blattella germanica* (Linnaeus) (Dictyoptera: Blattellidae) en Lima, Perú. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. *Parasitol Latinoam*, 62: 7-15.
- Imler, J. L. and P. Bulet. 2005. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy*.86:1-21.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. Información Nacional por Entidad Federativa y Municipios. [En línea] <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?ent=05>. Fecha de consulta [19/Octubre/2013].

- Jaramillo, G. I., Córdoba, H., Armbrecht, I., Suárez, M. 1999. Biología de las Cucarachas. REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE ALERGIA, ASMA E INMUNOLOGIA. Vol. 7(3) [En línea] http://www.encolombia.com/articulos_alergia8-1.htm Fecha de Consulta [25/11/2010].
- Jensen, A., J. Lodal and D. Baggesen. 2004. High diversity of *Salmonella* serotypes found in a experiment with outdoor pigs. *Journal of Life Sciences*. 52 (2): 109-117.
- Jeoffreys, N. J., G. S. James, R. Chiew and G. L. Gilbert. 2001. Practical evaluation of molecular subtyping and phage typing in outbreaks of infection due to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Pathology* 33(1):66-72.
- Jiang, H. and B. A. Edgar. 2009. EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development*.136: 483-493.
- Jones, S. C. 2008. American Cockroach. The Ohio State University. Extension Specialist, Household and Structural Pests.
- Jurado, R., C. Arenas, A. Doblas, A. Rivero, & J. Torre-Cisneros. 2010. Fiebre Tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine* , 10 (52): 3497-3501.
- Kassiri, H. & S. Kazemi. 2012. Cockroaches [*Periplaneta americana* (L.), Dictyoptera; Blattidae] as carriers of bacterial pathogens, Khorramshahr, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiolgy* , 5(1):320-322.
- Katscher F. 1997. *Salmonella* or *Smithella*. *Nature*.338(6640): 320.
- Kisiela, D., M. Kuczkowski, L. Kiczak, A. Wieliczko, M. Ugorski. 2005. Differentiation of *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum from *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum by PCR-RFLP of the fimH gene. *J Vet Med B Infect DisVet Public Health* 52(5):214-218.
- Klowden M. J.and B. Greenberg. 1976. *Salmonella* in the American cockroach: evaluation of vector potential through dosed feeding esperiments. *J. Hyg. Camb.* 77(105):105-106.
- Klowden M. J. and B. Greenberg. 1977. Effects of antibiotics on the survival of *Salmonella* in the American cockroach. *J. Hyg. Camb.* 77(105):105-106.
- Kopanic, R. J., B. W. Sheldon and C. G. Wright. 1994. Cockroaches as vectors of *Salmonella*: laboratory and field trials. *J. Food. Prot.* 57, 125-132.

- Lagueux, M., E. Perrodou, E. A. Levashina, M. Capovilla, and J. A. Hoffmann. 2000. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of function mutants of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A.97, 11427-11432.
- Lammia, B., L. Mariam and A. Ahmed. 2007. Bacteriological analysis of *Periplaneta americana* L.(Dictyoptera; Blattidae) and *Musca domestica* L. (Diptera; Muscidae) in ten districts of Tangier, Morocco Journal of Biotechnology Vol. 6(17), pp. 2038-2042.
- Lehane, M. J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. Annu Rev Entomol.42: 525-550.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu Rev Immunol.25:697-743.
- Li, Y. and A. Mustapha. 2004. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in apple cider and produce by a Multiplex PCR. J Food Prot.; 1:27-33.
- Lopata, A. L., Jeebhay, M. F., Groenewald, M. Manjra, A. Toit, G. du, Sibanda, E. N., Calvert, J., Lee, S., Schinkel, M., Fenemore, B., Motala, C., Potter, P. C. 2005. SENSITISATION TO THREE COCKROACH SPECIES IN SOUTHERN AFRICA . University of Cape Town. Faculty of Health Sciences. Division of Immunology. 18(2): 62.
- Lozano, T. J. 2003. El triunfo de la cucaracha. Ciencia y salud. Murcia, España. [En línea] http://serv.laverdad.es/cienciaysalud/8_2_25.html. Fecha de consulta [22/09/13].
- Macfie, J. W. S. 1922. Observations on the role of cockroaches in disease. Am. Trop. Med., 4: 441-448.
- Mackerras, I. M., and Pope, P. 1948. Experimental *Salmonella* infections in Australian cockroaches. Australian J. Exper. Biol. & M. Sci., 16: 465-470.
- Mackerras, I. M., and Pope, P. 1948. Experimental *Salmonella* infections in Australian cockroaches. Australian J. Exper. Biol. & M. Sci., 16': 465-470.
- Mackerras, M. J., and Mackerras, I. M. 1948. *Salmonella* infections in Australian cockroaches. Australian J. Sci., 10: 115.

- Martinson VG, J. Moy and N. A. Moran. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl Environ Microb* **78**: 2830–2840.
- Mastroeni, P., J. Chabalgoity, S. Dunstan, D. Maskell and G. Dougan. 2000. *Salmonella*: Immune Responses and Vaccines. *The veterinary Journal*.161: 132-164.
- Matsuzaki, K. 2009. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 1687-1692.
- Mengin-Lecreulx, D. and B. Lemaitre. 2005. Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J Endotoxin Res*.11: 105-111.
- Mille, P. and B. Peters 2004. Overview of the public health implications of cockroaches and their management *N S W Public Health Bull* 15(11–12):208–211.
- Moll RM, W. S. Romoser, M.C. Modrakowski, A. C. Moncayo and K. Lerdthusnee. 2001. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *J Med Entomol* **38**: 29–32.
- Mpuchane, S., I. M. Matsheka, B. A. Gashe, J. A. G. Murindamombe and N. Mrema. 2006. Microbiological studies of cockroaches from three localities in Gaborone, Botswana. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*. 6(2):1-17.
- Nappi, A. J., E. Vass, F. Frey and Y. Carton. 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol*.68: 450-456.
- Ogg, B., Ogg, C., Ferraro, D., Jefferson, D. 2007. *Manual Para el Control de Cucarachas 2ª Edición*. University of Nebraska–Lincoln Extension pp. 7-15.
- Pa A. and D. Marshall. 2009. Comparison of culture media for enrichment and isolation of *Salmonella spp.* from frozen Channel catfish and Vietnamese basa fillets. *Food Microbiology*.26: 317-319.
- Pesante A., D. G. 1992. Ectoparásitos de Animales de la Finca. Capítulo III Cucarachas (Blattaria) Departamento Industria Pecuaria. Recinto Universitario de Mayagüez. PP 1-30.

- Piazuelo, R. M.; R. G. Jaramillo y O. R. González. 2009. Resistencia a deltametrina de cepas de *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae) en la ciudad de Cali, Colombia. Departamento de Biología, Universidad del Valle, Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas. *Revista Cubana Médica Tropical*, 61(3): 213.
- Pignato, S., G. Giammanco, C. Santangelo and G. M. Giammanco. 1998. Endemic Presence of *Salmonella Bongori* 48:z35:- Causing Enteritis in Children in Sicily. *Res. Microbiol.*, 149, 429-431.
- Pili-Floury, S., F. Leulier, K. Takahashi, K. Saigo, E. Samain, R. Ueda, and B. Lemaitre. 2004. In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem.*279:12848-12853.
- Ponce, G., P.C. Cantú, A. Flores, M. Badii, A. Barragán, R. Zapata e I. Fernández. 2005. Cucarachas: Biología e importancia en salud pública. Facultad de Ciencias Biológicas, Facultad de Salud Pública y Nutrición Universidad Autónoma de Nuevo León. *RESPYN (Revista de Salud Pública y nutrición)*, 6(3):1-6.
- Popoff, M. Y. J. Bockemuhl, And L. L. Gheesling. 2003. Supplement 2001 (No. 45) to the Kauffmann-White Scheme. *Res. Microbiol.*, 154, 173-174.
- Prado, M.A., F. C. Pimenta, M. Hayashid, P. R. Souza, M. S. Pereira e Elucir Gir 2002. Enterobactérias isoladas de baratas (*Periplaneta americana*) capturadas em um hospital brasileiro *Rev Panam Salud Publica* 11(2): 93-97.
- Rahman, M. M., H. L. Roberts, M. Sarjan, S. Asgari, and O. Schmidt. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101: 2696-2699.
- Ramírez, J. 1989. La cucaracha como vector de agentes patógenos. *Bol Of Sanit Panam.* 107(12):41-53.
- Randall, C. 1998. General Pest Management, a Guide for Commercial Applicators. Extension Associate Pesticide Education Program. Michigan State University. Extension Bulletin E -2048. Michigan Department of Agriculture. [En línea] <http://www.pested.msu.edu/Resources/bulletins/pdf/2048/E-48minusAppF.pdf> Fecha de consulta [12/08/2010].
- Rodenburg, K. W. and D. J. Van der Horst. 2005. Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts

- for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim Biophys Acta*.1736: 10-29.
- Romero R. 2007. *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3era Edición. Editorial Médica Panamericana. México. pp. 559-562.*
- Roth L. M. and E. R. Willis. 1960. The biotic associations of cockroaches. *Smithson. Misc. Coil.* 141: 470.
- Ryan, K. J. and C. G. Ray. 2004. *Sherris Medical Microbiology (4th ed.)*. McGraw Hill. Pp 655-677.
- Ryu JH, E. M. Ha and W.J. Lee. 2010. Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol* **34**: 369–376.
- Sabree, ZL., C. Y. Huang, G. Arakawa, G. Tokuda, N. Lo, H. Watanabe and N. A. Moran. 2012. Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Appl Environ Microb* **78**: 204–210.
- Scherfer, C., C. Karlsson, O. Loseva, G. Bidla, A. Goto, J. Havemann, M. S. Dushay, and U. Theopold. 2004. Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol*.14: 625-9.
- Shai, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*.66: 236-48.
- Shao L, M. Devenport and M. Jacobs-Lorena 2001. The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol* **47**: 119–125.
- Silva H. G., V. F. Ortiz, C. Alpuche y H. S. López. 2010. Análisis epidemiológico molecular de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de fauna silvestre en cautiverio del zoológico de Culiacán, Sinaloa. XIX Congreso Nacional de Patología Veterinaria.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). 2012. Tifoidea y *Salmonella* en la Jurisdicción Sanitaria No. 6 de Torreón, Coahuila.
- Smith, H.E. and Whitman, C.R. 1992. *Cockroaches*.NPCA Field Guide to Structural Pest.National pest control association inc. Guardians of your environment. 16 pp.
- Steinhaus, E. A. 1946. *Insect microbiology*. Comstock Publishing Company, Ithaca, New York.

- Stroschein-Stevenson, S. L., E. Foley, P. H. O'Farrell, and A. D. Johnson. 2006. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. PLoS Biol.4, e4.
- Stuart, L. M. and R. A. Ezekowitz. 2005. Phagocytosis: elegant complexity. Immunity.22, 539-550.
- Tachbele E., W. Erku, T. Gebre-Michael and M. Ashenafi. 2006. Cockroach-associate food-borne bacterial pathogens from some hospitals and restaurants in Addis Adaba, Ethiopia: Distribution and antibiograms.
- Tanaka, H., H. Matsuki, S. Furukawa, A. Sagisaka, Kotani, H. Mori, and M. Yamakawa. 2007. Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. Biochim Biophys Acta.1769: 559-68.
- Tatfeng, Y.; Usuanlele, M.; Orukpe, A.; Digban, A.; Okodua, M.; Oviasogie, F. and Turay, A. 2005. Mechanical transmission of pathogenic organisms: the role of cockroaches. J Vect Borne Dis 42: 130–131.
- Torres, Z. R., P. G. Arizpe-López, M. P. Tijerina, G. G. Ponce, S. A. Flores y M. H. Badii. 2006. Preferencia a diferentes alimentos de la Cucaracha Americana, *Periplaneta americana* L. en la zona urbana de Cadereyta Jiménez, N. L. Departamento de Zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. [En línea] <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee14/2006/documentos/Art36.pdf>. Fecha de consulta [11/Enero/2013].
- Triplehorn, A. C. and Johnson, F. N. 2005. BORROR AND DELONG'S INTRODUCTION TO THE STUDY OF INSECTS. 7th edition, Thomson brooks/cole. United States of America. P. 263-267.
- Uribe, C. Y M. C. Suárez. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia Médica*, 37 (2). [En línea] http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol37No2/html/PDF/cm_37n2a10.pdf. Fecha de consulta [12-Julio-2013].
- Urrutia, M., E. Reyes, C. Melo, M. Henríquez, J. Pineda y A. Sakurada. 2006. Estandarización de una técnica para la detección de *Salmonella* spp. útil para manipulación de alimentos mediante la técnica de amplificación molecular. Cienc Trab.8(22): 164-166.
- Uttenweiler-Joseph, S., M. Moniatte, M. Lagueux, A. Van Dorsselaer, J.A. Hoffmann, and P. Bulet. 1998. Differential display of peptides induced during

the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. Proc Natl Acad Sci U S A. 15;95(19):11342-7.

Vásquez-Arroyo, J. 2004. Microbiología Sanitaria. pp. 217-260.

Velilla, A., H. Terzolo and S. Feingold. 2006. Avances en el diagnóstico molecular de *Salmonella*. Mundo lácteo y carnico. pp 18-20.

Vythilingam I, J. Jeffery, P. Oothuman, A. R. Razak and A. Sulaiman 1997. Cockroaches from urban human dwellings: Isolation of bacterial pathogens and control. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 28: 218-222.

Wray C. and Wray A. 2000. *Salmonella* in domestic animals. CAB International. London , UK. Pp 72-78.

Zhang, S., A. Kingsley, R. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu and J. Figueiredo. 2003. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*-induced diarrhea. Infect Immun. 71:1-12.

CARTA DE RECEPCIÓN DEL ARTÍCULO

Texcoco, Estado de México 09 de diciembre de 2013
Ref.: 428-13

DR. MIGUEL ÁNGEL GALLEGOS ROBLES
PROFESOR-INVESTIGADOR
FACULTAD DE AGRICULTURA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
PRESENTE:

Por este medio le agradezco y acuso de recibido su artículo "**Salmonella sp. en cucarachas de hospitales, escuelas y casas del área urbana de Torreón, Coahuila, México**" cuyos autores(as) son: **Sarai Monserrat Cueto-Medina, Miguel Ángel Gallegos-Robles, Ma. Teresa Valdés-Perezgasga, Sergio Hernández-Rodríguez, Uriel González-Salas y Jacob Antonio González**, que fue enviado para su posible publicación a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Le notificamos que el autor(a) principal y los coautores(as), no podrán alterarse y quedaran como se envía en esta versión.

Asimismo, me permito informarle que su contribución será sometida a revisión técnica por los árbitros que se designen en caso de ser aceptado, se le notificará sobre las observaciones correspondientes.

Agradezco su colaboración y le envío un cordial saludo.

Atentamente



DRA. DORA MA. SANGERMAN-JARQUÍN
EDITORA EN JEFA DE LA REVISTA
MEXICANA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

c.c.p. * Archivo
DMSJ/mdpg