

# Determinación de la existencia de plásmidos en aislamientos de *Salmonella enteritidis* (fagotipos 4 y 8) y su análisis en la resistencia antimicrobiana

## Determination of plasmids in *Salmonella enteritidis* isolates (phage types 4 and 8) and their relationship with antimicrobial resistance

Ma de Lourdes Ontiveros Corpus<sup>a</sup>, Arturo Mancera Martínez<sup>a</sup>, Jesús Vázquez Navarrete<sup>a</sup>, Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez<sup>a</sup>

### RESUMEN

La salmonelosis producida por *Salmonella enteritidis* (SE), es una enfermedad que afecta a las aves y a los mamíferos, incluyendo al hombre, por lo que se le considera una zoonosis. El propósito del presente estudio fue relacionar la presencia de plásmidos y la resistencia antimicrobiana en cepas de SE de origen aviar. Se trabajaron 50 cepas de SE, 21 del fagotipo 4 y 29 del fagotipo 8. Para realizar la prueba de resistencia antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en placa con un Kit comercial, siguiendo la técnica de Kirby-Bauer. Para la extracción del plásmido se utilizó el método lisis-alcalina. Se encontró una resistencia de un 100 % a amikacina, gentamicina, netilmicina y nitrofurantoina en cepas que contenían desde uno hasta cinco plásmidos, por lo que no es posible relacionar la resistencia encontrada en algunas cepas debido a la presencia de plásmidos. Todas las cepas presentaron un plásmido común de 12 Kpb. En todas las cepas del fagotipo 4 se observó la presencia de plásmidos de 9 y 23 Kpb, mientras que las cepas del fagotipo 8 además de presentar estos mismos plásmidos, tenían dos plásmidos de 3 y 6 Kpb, los cuales diferencian ambos fagotipos.

**PALABRAS CLAVE:** *Salmonella enteritidis*, Fagotipos, Plásmidos, Resistencia.

### ABSTRACT

Salmonellosis caused by *Salmonella enteritidis* (SE), is a zoonosis affecting birds and mammals, humans included. The purpose of this study was correlating the presence of plasmids with antimicrobial resistance in SE strains of poultry origin. Fifty (50) SE isolates were analyzed, including 21 phage type-4, and 29 phage type-8 isolates. The antimicrobial resistance test was performed using a commercial, Kirby-Bauer's plate diffusion kit. Plasmids were extracted using the alkaline lysis method. Strains featuring 1 to 5 plasmids showed 100 % resistance to amikacin, gentamicin, netilmycin, and nitrofurantoin. Therefore it was not possible to correlate the resistance found in some strains with the presence of plasmids. All isolates shared a common 12 Kpb plasmid. All phage-4 isolates showed the presence of both 9 and 23 Kpb plasmids. These two plasmids were also found in phage-8 isolates, but they also showed two additional plasmids (3 and 6 Kpb's), thus allowing for the differentiation between these two phage types.

**KEY WORDS:** *Salmonella enteritidis*, Phage types, Plasmids, Resistance.

### INTRODUCCIÓN

La salmonelosis producida por *S. enteritidis* (SE) es una enfermedad que afecta a las aves y a los mamíferos incluyendo al hombre, por lo que se le considera una zoonosis<sup>(1,2)</sup>. Se ha pensado que el

### INTRODUCTION

Salmonellosis caused by *S. enteritidis* (SE) is a disease affecting birds and mammals, humans included. Therefore it is considered as a zoonosis<sup>(1,2)</sup>. It has been said that the worldwide increase in SE

Recibido el 31 de octubre de 2003 y aceptado para su publicación el 11 de diciembre de 2003.

<sup>a</sup> CENID-Microbiología. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (INIFAP) Carretera México Toluca Km 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa 05110. México, D.F. Tel 5570-3886. ontiveros.lourdes@inifap.gob.mx Correspondencia al primer autor.

incremento a nivel mundial de los brotes de SE se debe a un aumento en la virulencia, cuyo grado varía en las diferentes cepas<sup>(3)</sup>; sin embargo, a la fecha no existe evidencia clara de la existencia de un nuevo marcador de virulencia específico. Se ha sugerido la asociación de factores de virulencia como las fimbria tipo I o niveles superiores de lipopolisacárido de membrana externa, o un plásmido tipo específico<sup>(4,5)</sup>.

El control de las salmonelosis en aves de nuestro país es considerada una prioridad sanitaria, estableciéndose en 1994 una Campaña nacional contra la salmonelosis aviar, la cual incluye mecanismos de vigilancia y control para *Salmonella pullorum* (pulorosis) y *Salmonella gallinarum* (tifoidea aviar) pero sin considerar a la SE<sup>(6)</sup>. Las investigaciones epidemiológicas realizadas sobre esta enfermedad han involucrado a los huevos crudos o semicocidos como vehículo de transmisión de SE<sup>(2,3,7)</sup>. Los informes sobre la incidencia de gastroenteritis causada por SE en el hombre, se han incrementado en muchas partes del mundo en los últimos veinte años. La presencia de esta enfermedad en la avicultura comercial de México, puede representar un importante problema de salud pública, así como la comercialización de la producción avícola nacional, ya que ciertos países aplican restricciones a la importación de aves y huevo procedentes de países considerados como infectados, por ejemplo el caso de los Estados Unidos de Norteamérica, el cual establece en su publicación de CFR de 1996 que todos los países a excepción de Canadá padecen esta enfermedad<sup>(1,5)</sup>.

Los brotes de SE se han presentado tanto en Europa como en Norteamérica, considerándose que casi una tercera parte de los brotes en humanos de 1990 a 1994 en los Estados Unidos, se asocian a consumo de huevo contaminado o alimentos preparados con estos<sup>(3,8)</sup>. En Europa se le considera responsable del 50 al 90 % de las salmonelosis que afectan al humano<sup>(2,8,9,10)</sup>. En España, estudios epidemiológicos indican que las salmonelas que afectan al humano y que se presentan con mayor frecuencia son: SE que se han encontrado en gallinas de rastro en un 51 % y en alimento de consumo humano de

outbreaks is due to increased virulence. Virulence varies among different strains<sup>(3)</sup>. So far there is no clear evidence of the existence of a new, specific virulence marker. The association with external virulence factors such as type-1 fimbria, higher outer membrane lipopolysaccharide levels, or one specific plasmid type has been suggested<sup>(4,5)</sup>.

The control of poultry salmonellosis is considered as a high-priority public health issue in Mexico. In 1994 the National poultry salmonellosis campaign was established, including surveillance and control mechanisms for *Salmonella pullorum* (pullorosis), and *Salmonella gallinarum* (fowl typhoid), nevertheless, SE was not considered<sup>(6)</sup>. SE epidemiological research has involved raw and under-cooked eggs as a transmission vehicle<sup>(2,3,7)</sup>. In the last 20 years, increased SE-associated gastroenteritis incidence in humans has occurred in several parts of the world. The presence of this disease in the Mexican poultry industry can represent an important public health issue. Mexico's poultry trade can also be badly affected, since certain countries impose restrictions to the import of poultry and eggs from countries considered as infected. This is the case of the USA, since the CFR (1996) establishes that SE exists in all countries except Canada<sup>(1,5)</sup>.

SE outbreaks have occurred in Europe and North America. It is considered that nearly one third of the human outbreaks that occurred in 1990-1994 in the USA have been associated with the consumption of either contaminated eggs, or foods prepared with contaminated eggs<sup>(3,8)</sup>. In Europe, SE has been blamed for 50 to 90 % of human salmonellosis cases<sup>(2,8,9,10)</sup>. In Spain, epidemiological studies show that human salmonellosis has been most frequently caused by SE isolates found in spent hens (51 %) and poultry origin foods (33 %); and *S. typhimurium* of different origins (23.6 %)<sup>(8,9)</sup>.

Several SE phage types have been identified in the USA and Europe including phage types 4, 6, 8, 13<sup>a</sup>, 14b, and others. Major public health importance has been attributed to phage types 4 and 8<sup>(2,8,9,10,11)</sup>.

The purpose of this research was to correlate the presence of plasmids with antimicrobial resistance

origen aviar en 33 % además *S. typhimurium* de diferentes orígenes en un 23.6 %<sup>(8,9)</sup>.

En el continente Europeo y los Estados Unidos se han identificado los fagotipos 4, 6, 8, 13<sup>a</sup> y 14b de SE entre otros, habiéndoseles atribuido una mayor importancia al 4 y al 8 para la salud pública (2,8,9,10,11).

El propósito del presente estudio fue relacionar la presencia de plásmidos y la resistencia antimicrobiana en 50 cepas de origen aviar de SE, ya que es conocido que en este DNA extracromosómico se codifica la resistencia contra algunos antibióticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 50 cepas de SE las cuales se aislaron de muestras provenientes de los estados de México, Morelos, Querétaro, Puebla, Jalisco, Coahuila, Durango y Oaxaca. Cada una de las cepas de SE fue sembrada en agar MacConkey y se incubaron por 24 h a 37 °C, posteriormente se les realizaron pruebas bioquímicas convencionales y serotipificación con antiseros somáticos (O) y flagelares (H) comerciales (Difco Laboratories, Detroit, Michigan), USA<sup>(12,13,14,15)</sup>. Para realizar la fagotipificación se utilizó un juego de diez bacteriófagos numerados del 1 al 10, obtenidos de la División de Patógenos Entéricos de Salud Pública de Londres, Reino Unido. La dilución de prueba (Routine Test Dilution) utilizada fue de 1:10,000 para el bacteriófago No 7 y de 1:1,000 para los demás<sup>(15,16)</sup>.

Para realizar la prueba de resistencia antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en placa, con discos comerciales (BIO-RAD), siguiendo la técnica de Kirby-Bauer para observar la resistencia a los antimicrobianos. El panel de los antibióticos incluyen los siguientes: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg); carbenicilina (100 µg), pefloxacina (5 µg), amikacina (30 µg), gentamicina (10 µg), ceftriazona (30 µg), cloranfenicol (30 µg), trimetropin-sulfametoxazol (25 µg), netilmicina (30 µg) y nitrofurantoína (300 µg). La concentración de los cultivos se estandarizó a  $15 \times 10^7$  ufc/ml y se

in 50 SE isolates of poultry origin, since it is known that this extra-chromosomal DNA codes for the resistance to some antibiotics.

## MATERIALS AND METHODS

Fifty (50) SE isolates from the states of Mexico, Morelos, Querétaro, Puebla, Jalisco, Coahuila, Durango, and Oaxaca were used. Each isolate was seeded in MacConkey's agar, and then incubated for 24 h at 37 °C. Conventional biochemical tests and serotyping with commercial somatic(O) and flagellar (H) antisera (Difco Laboratories, Detroit, Michigan<sup>(12,13,14,15)</sup>) were performed. For phage typing purposes, a set of 10 bacteriophages (numbered 1-10) was used. Bacteriophages were obtained from the Enteric Pathogen Division, London Public Health, the UK. The two test dilutions were 1:10,000 for bacteriophage No. 7, and 1:1,000 for all others<sup>(15,16)</sup>.

Antimicrobial resistance was analyzed using the Kirby-Bauer's plate diffusion technique with commercial (BIO-RAD) discs. The following antibiotics were tested: ampicillin (10 µg); cephalothin (30 µg); cefotaxime (30 µg); carbenicilline (100 µg); pefloxacin (5 µg); amikacin (30 µg); gentamicin (10 µg); ceftriazone (30 µg); chloramphenicol (30 µg); trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg), netilmicine (30 µg); and nitrofurantoin (300 µg). Culture concentrations were standardized in  $15 \times 10^7$  colony forming units (CFU)/ml, cultured in Mueller Hinton medium (Merck-México S. A.), using a sterile cotton swab. Cultures were incubated at 37 °C for 18 to 20 h. Inhibition zone diameters were determined in millimeters using a zone meter (Antibiotic Zone Reader Fisher-Lilly). Minimum inhibitory concentrations were also determined for each antibiotic using 3 phage type (1, 3, and 9<sup>a</sup>) SE standard strains, which are very frequently found among poultry isolates<sup>(5,14,17)</sup>.

Isolates were also cultured under agitation in Luria-Bertani's liquid medium<sup>(12)</sup> in an incubator for 48 h, then subjected to the plasmid extraction process. Twenty (20) ml of the bacterial culture were taken, then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C.

sembraron en medio Mueller Hinton (Merck-México S.A.) con hisopo estéril. Se incubaron a 37 °C durante 18 a 20 h y se midieron las zonas de inhibición en con mayor frecuencia en cepas de origen aviar<sup>(5,4,17)</sup>.

También fueron cultivadas en medio líquido de Luria-Bertani<sup>(12)</sup> en una incubadora con agitación durante 48 h, y sometidas al proceso de extracción de plásmidos. Se tomaron 20 ml del cultivo bacteriano, el cual fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y al paquete celular se le agregaron 1.6 ml de una solución (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM); una vez resuspendido se dosificó en tubos eppendorf (400 µl cada uno) y se adicionaron 300 µl de una solución de NaOH 0.2N y SDS 1%, se agitaron los tubos hasta clarificar, se dejaron reposar en hielo por 5 min para después adicionarles 300 µl de CH<sub>3</sub>COOK 3M (pH 5), se agitaron lentamente hasta que se formó un coágulo y se congelaron; así se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min a 0 a 5 °C; el sobrenadante se separó y por cada 400 µl de éste se le adicionaron 800 ml de etanol. Se agitaron los tubos y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugaron a 15,000 rpm por 15 min y se decantó el sobrenadante, el sedimento se dejó secar a temperatura ambiente para evaporar el etanol residual. Finalmente se les adicionaron 50 µl de (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 Mm) para resuspender el material genético y se mantuvieron los tubos en refrigeración a 4 °C. Posteriormente se prepararon geles de agarosa al 0.7 % en donde se corrieron las muestras obtenidas. En cada corrimiento se puso un marcador de tamaño (DNA del fago λ cortado con *Hind* III), al gel se le aplicó un potencial de 80±5 volts durante 90 min. Terminada la corrida del gel, éste se tiñó con bromuro de etidio (5 µg/ml) durante 5 a 10 min, observándose la presencia de los plásmidos en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta<sup>(18,19,20,21,22)</sup>.

## RESULTADOS

Se identificó la presencia de SE en varias explotaciones avícolas, de los diferentes estados: México, Morelos, Querétaro, Puebla, Jalisco, Coahuila, Durango y Oaxaca. Los aislamientos

The supernatant was discarded and 1.6 ml of a 25 mM Tris-HCl/10 mM EDTA/50 mM Glucose solution was added to the cell pack. Re-suspended bacteria were distributed among Eppendorf's tubes (400 µl each), and 300 µl of a 0.2N NaOH/1% SDS solution were added. Tubes were agitated till clarification, and then set aside on ice for 5 min. Three hundred (300) µl 3M CH<sub>3</sub>COOK (pH 5) were added. Tubes were then gently agitated until a clot was obtained, then frozen. Tubes were later centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 0 to 5 °C. Supernatant was separated. To each 400 µl supernatant, 800 ml ethanol were added. Tubes were agitated, and then allowed to stand at ambient temperature for 10 min. Afterwards, tubes were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min, and the supernatant was discarded. Sediment was allowed to dry off at ambient temperature for residual ethanol to be evaporated. Fifty (50) µl of a 25 mM Tris-HCl/10 mM EDTA solution were finally added in order to re-suspend the genetic material. Tubes were maintained in refrigeration at 4 °C. Agarose gel (0.7 %) plates were prepared, and used to run the samples obtained. A size marker (phage λ DNA cut with *Hind* III), was placed on each run. Gels were subjected to an 80±5 volt potential for 90 min. Upon gel run completion, gels were stained with ethidium bromide (5 µg/ml) for 5 to 10 min). The presence of plasmids was observed using a short wave, UV trans-illuminator (18,19,20,21,22).

## RESULTS

The presence of SE was determined in several poultry operations, in the states of Mexico, Morelos,

Cuadro 1. Estados de la República Mexicana en los que se aislaron los fagotipos 4 y 8 de *Salmonella enteritidis*

Table 1. Mexican States where phage types 4 and 8 of *Salmonella enteritidis* were isolated

States	Phage types	Total
Mexico, Querétaro, Morelos, Puebla, and Jalisco	4	21
Mexico, Coahuila, Durango, Morelos, Querétaro, Puebla and Oaxaca	8	29

Cuadro 2. Resistencia de *Salmonella enteritidis* a diferentes quimioterapéuticos

Table 2. Resistance of *Salmonella enteritidis* to different chemotherapeutics

	Concentration in µg (Disc)	Resistance <i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> (%)	Phagetypes
Amikacin	30	100	8
Ampicillin	10	0	-
Carbenicilline	100	0	-
Cephalothin	30	0	-
Cefotaxime	30	0	-
Ceftriaxone	30	30	4
Chloramphenicol	30	0	-
Gentamicin	10	100	8
Netilmicine	30	100	8
Nitrofurantoin	300	100	8
Trimethoprim- sulfamethoxazole	25	0	-
Pefloxacina	5	0	-

resultaron ser fagotipo 4 (21) y fagotipo 8 (29) (Cuadro 1).

En el análisis de resistencia a los antibióticos en aislamientos de *S. enteritidis* sólo se encontró una resistencia en un 100 % con, amikacina (30 µg/ml), gentamicina (10 µg/ml), netilmicina (30 µg/ml), nitrofurantoína (300 µg/ml) y un 30 % con ceftriazona (30 µg/ml) (Cuadro 2).

Para conocer si las cepas aisladas de los diferentes brotes tenían alguna relación, se les realizó un perfil de plásmidos. En todas las cepas del fagotipo 4 se observó la presencia de plásmidos de 9 y 23 Kpb, mientras que las cepas del fagotipo 8, además de presentar estos mismos, tenían dos plásmidos de aproximadamente 3 y 6 Kpb, los cuales diferencian ambos fagotipos. Todas las cepas presentaron un plásmido común de 12 Kpb. En todos los aislados obtenidos de una misma parvada se observa el mismo perfil de plásmidos (Cuadro 3).

## DISCUSIÓN

Los marcadores biológicos pueden ser usados como una herramienta en el estudio de la prevalencia de

Cuadro 3. Perfil de plásmidos en cepas de *Salmonella enteritidis*. Fagotipos 4 y 8

Table 3. Plasmid profiles in *Salmonella enteritidis* isolates. Phage types 4 and 8

Plasmid profile Kpb's	Phage Type 4		Phage Type 8	
	Total	%	Total	%
3.5/2.5/1.9//6.0/3.0	0	0.0	2	6.2
3.5/2.5/1.9/3.0	1	4.6	0	0.0
3.0/6.0	1	4.6	0	0.0
2.5	1	4.6	5	15.6
1.9	1	4.6	0	0.0
3.0/6.0	1	4.6	0	0.0
No plasmids	16	76.2	22	79.6
Total	21	100	29	100

Querétaro, Puebla, Jalisco, Coahuila, Durango, and Oaxaca. Twenty one (21) isolates corresponded to phage type 4, while 29 isolates corresponded to phage type 8 (Table 1).

The antibiotic resistance analysis of SE isolates only showed 100 % resistance to amikacin (30 µg/ml); gentamicin (10 µg/ml); netilmicin (30 µg/ml); nitrofurantoin (300 µg/ml). Thirty (30) percent resistance to ceftriazone (30 µg/ml) was detected (Table 2).

Plasmids were profiled in order to learn whether the isolates from the different outbreaks had some degree of correlation. All phage-4 isolates showed the presence of both 9 and 23 Kpb plasmids. These two plasmids were also found in phage-8 isolates, but they also featured plasmids of approximately 3 and 6 Kpb's thus allowing for the differentiation between both phage types. All strains showed a common 12 Kpb plasmid. The same plasmid profile was found in all isolates obtained from one same flock (Table 3).

## DISCUSSION

Biologic markers can be used as a tool to study the prevalence of animal origin diseases in human patients. A good biologic marker allows for the differentiation between bacterial strains in an epidemiological study (23).

enfermedades de origen animal y paciente humano. Un buen marcador biológico es el que diferencia entre cepas bacterianas en una investigación epidemiológica<sup>(23)</sup>.

En este trabajo se logró identificar *Salmonella enteritidis* fagotipos 4 y 8, utilizando como marcadores biológicos su perfil de plásmidos; estos resultados mantienen similitud con lo reportado en el continente Europeo y los Estados Unidos en donde se han identificado los fagotipos 4, 6, 8, 13<sup>a</sup> y 14b entre otros, habiéndoseles atribuido una mayor importancia al 4 y 8 para la salud pública<sup>(5,8,9)</sup>.

En cuanto a la resistencia antimicrobiana de las cepas estudiadas, se encontró una resistencia en un 100 % a amikacina, gentamicina, netilmicina y nitrofurantoina en SE fagotipo 8, pero fueron sensibles a la ampicilina, carbenicilina, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol y trimetropin-sulfametoxasol<sup>(13,14,24)</sup>. Mientras que Tan *et al.*<sup>(23)</sup> probaron la susceptibilidad de *S. enteritidis* para antibióticos de uso común y no encontraron un patrón de resistencia<sup>(21,23)</sup>.

También se ha demostrado que la sensibilidad a los antibióticos es diferente en cada serotipo, pero en general observaron un incremento en el número de aislamientos resistentes<sup>(25)</sup>. Este tipo de estudio contribuye a controlar estas infecciones y alertar sobre el aumento de la resistencia a algunos antibióticos, lo cual debe motivar la instauración de medidas de salud pública y de control en el uso de antibióticos, sobre todo en animales<sup>(20,23)</sup>.

En el Instituto Nacional de Investigación Veterinaria de Bélgica se encontró que 34 de 39 cepas de *Salmonella enteritidis* de origen humano y animales, resistentes a la ampicilina, compartían el mismo plásmido. Estos mismos investigadores demostraron la transferencia del plásmido epidérmico R de *S. enteritidis* a *E. Coli* y viceversa.

El perfil de plásmidos es un método controversial para la diferenciación de aislamientos de *S. enteritidis*, ya que algunos autores encontraron que no es discriminatorio hacer la diferenciación

This research identified SE phage types 4 and 8, using plasmid profiles as biologic markers. Our results match those reported in Europe and the USA, where phage types 4, 6, 8, 13<sup>a</sup>, 14b, and others have been identified. Major public health relevance has been attributed to phage types 4 and 8<sup>(5,8,9)</sup>.

As far as the antimicrobial resistance of the strains studied is concerned, 100% resistance to amikacin, gentamicin, netilmycin, and nitrofurantoin was found in SE phage type-8 isolates, but these isolates were sensitive to ampicillin, carbenicilline, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphenicol, and trimethoprim-sulfamethoxazole. (1,5,13,14,24) On the other hand, Tan *et al.*<sup>(23)</sup> showed susceptibility of SE to commonly-used antibiotics, and they did not find a resistance pattern<sup>(21,23)</sup>.

It has also been observed that antibiotic sensitivity differs for each serotype; even though, a general increase in the number of resistant isolates has been observed. This type of studies should contribute to the control of these infections as well as to raise the level of awareness about increased resistance to some antibiotics. This should encourage the implementation of public health measures, and the control of antibiotic use, mainly in animals<sup>(20,23)</sup>.

The Belgium's National Veterinary Research Institute found that 34 of 39 SE ampicillin-resistant strains of human and animal origin shared one same plasmid. The same authors showed the transfer of the R epidermic plasmid of SE to *E. coli* and vice-versa.

Plasmid profiling is a controversial method for the differentiation of SE isolates, since some authors have found no discrimination while using this method for SE differentiation<sup>(23)</sup>. In addition, profiling has the advantage of establishing whether or not an isolate is related with previous outbreaks. This research found 100 % resistance to amikacin, gentamicin, netilmycin, and nitrofurantoin in isolates containing 1 to 5 plasmids. Therefore, it was not possible to establish a correlation between the presence of this plasmids and the antibiotic resistance found in some SE strains.

de *S. enteritidis* por medio de este método<sup>(23)</sup>. El análisis del perfil tiene, además, la ventaja de poder relacionar o no un aislado con brotes anteriores. En este trabajo se encontró una resistencia de 100 % a amikacina, gentamicina, netilmicina y nitrofurantoina en cepas que contenían de uno hasta cinco plásmidos, por lo que no es posible correlacionar la resistencia encontrada en algunas cepas con su presencia.

### CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

En todas las cepas del fagotipo 4 se observó la presencia de plásmidos de 9 y 23 Kpb, mientras que las cepas del fagotipo 8 además de presentar estos mismos, tenían dos plásmidos de 3 y 6 Kpb aproximadamente, los cuales diferencian ambos fagotipos. Estos hallazgos pueden contribuir en las investigaciones epidemiológicas para el control de la salmonelosis en aves de nuestro país. La aplicación de técnicas moleculares como es el perfil de plásmidos, se puede considerar como una herramienta más para poder diferenciar los fagotipos de SE. Considerando que se encontró una resistencia de 100 % a amikacina, gentamicina, netilmicina y nitrofurantoina en cepas que contenían desde uno hasta cinco plásmidos, no es posible correlacionar la resistencia en algunas cepas con su presencia.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al CONACYT por el financiamiento parcial de este estudio a través del Proyecto 3778P-B9607. A la M. en C. Laura Hernández Andrade por su colaboración en la revisión del texto.

### LITERATURA CITADA

1. USDA-FSIS. United States Department of Agriculture-Food Safety and inspection Service. *Salmonella enteritidis* in eggs: Advance notice of proposed rulemaking. 7 CFR Part 59. Department of Health and Human Services. 21 CFR Part 100. FAA-USA.1998.
2. Kid H, Read DH, Chin RP, Bickford AA, Walker RL, Ardans A, «et al». *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection in a

### CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

All phage-4 strains showed the presence of both 9 and 23 Kpb plasmids. In addition to these two plasmids, plasmids of approximately 3 and 6 Kpb's were also found in phage-8 strains, thus allowing for the differentiation between these two phage types. These findings should contribute with epidemiological research aiming the control of poultry salmonellosis in Mexico. Molecular techniques such as plasmid profiling can be considered as one additional tool for the differentiation among SE phage types. Considering that 100 % resistance to amikacin, gentamicin, netilmycin, and nitrofurantoin was found in SE strains containing 1 to 5 plasmids, it was not possible to correlate the presence of these plasmids with the antibiotic resistance detected in some strains.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to CONACYT (Mexico's National Science and Technology Council) for having partially funded this research, through project 3778P-B9607, as well as to Laura Hernández Andrade M. Sc. for revising this text.

*End of english version*



- commercial layer flock in Southern California: Bacteriologic and epidemiologic findings. *Avian Dis* 1996;(40):665-671.
3. Poppe C, DemezuK W, Mc Faddien, Jhonson RP. Virulence of *Salmonella enteritidis* phagotipes 4, 8 y 13 and other *Salmonella* spp. for dag-old chicks, hens and mice. *Canadian Res* 1993;57,(4) 281-287.
4. Christensen P, Olsen E, Hansen C, Bisgaard M. Characterization of *Salmonella enterica* sevar *gallinarum* and *pullorum* by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Histology* 1992;461-470.
5. Parry MF. Epidemiology and mechanisms of antimicrobial resistance. *Am J Infect* 1989;7(5):6-94.
6. SARH, Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO- 1993. Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar. *Diario Oficial*, 1º. de septiembre de 1994. México.
7. Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. Serotipos de *Salmonella* identificados

- en los servicios de salud de México. Salud Pública de México. 2000;42(6):490-495.
8. Tello AO. Infecciones e intoxicaciones de origen alimentario. Situación en España. 1976-1987. XII Congreso Nacional de la Asociación Española de Microbiología. Pamplona, España 1989:299-300.
  9. Rowe B. *Salmonella enteritidis*: The problem nationally and internationally. XII Congreso Nacional de la Asociación Española de Microbiología. Pamplona, España. 1989:299-300.
  10. Bleem A. The *Salmonella enteritidis* situation in the United States. Animal Health Insight, USDA: APHIS: VS, Fall: 1991:15-23.
  11. Preliminary report: Natural or raw almonds and an outbreak of a rare phage type of *Salmonella enteritidis* infection. OCDR 2002;28.
  12. Mac Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Médica Panamericana; 1990.
  13. Difco Laboratories. Serological Identification of *Salmonella*. Technical Information 1229. Detroit, Michigan, USA: 1997.
  14. The Merck manual of diagnosis and therapy. Enterobacteriaceae infection [on line] [www.merck.com/pubs/manual/section 15/ chapter15/15/a.num](http://www.merck.com/pubs/manual/section_15/chapter15/15/a.num). 2003.
  15. Rowe B, Hall MLM. Kauffmann-White scheme. Central Public Health Laboratory, London, UK. 1989:17.
  16. Mancera MA, Vázquez NJ, Ontiveros CL, Tenorio GV. Resultados de la fagotipificación de *Salmonella enteritidis* en el INIFAP de 1994 al 2000. Memorias del 2º. Congreso internacional de epidemiología. Veracruz, Veracruz. México. 2001:11-31.
  17. Dargatz AD, Fedorka-Cray P, Petersen EK, Headrick M, Wineland EN, Tollefson L. The National antimicrobial resistance monitoring system for enteric bacteria (NARMS-EB). United States Animal Health Association. Special Session on Antimicrobial Resistance. 1999.
  18. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Biología molecular de la célula. 3ª ed. España: Editorial Omega; 1996.
  19. Dorn R, Silapanuntakul R, Angrik E, Shipman LD. Plasmid analysis and epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in three commercial layer flocks. Avian Diseases 1992;(36):844-851.
  20. Nagaraja K, Kim C, Bichler L. Plasmid diversity and genetic fingerprinting of *Salmonella enteritidis* isolated from poultry of human origin. Memorias de la XXI convención anual ANECA. Cancún, Q. Roo, México. 1996:353-359.
  21. Tenorio GV. Construcción de un banco genómico de *Haemophilus pleuropneumoniae* serotipo 1 [tesis maestría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1990.
  22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
  23. Tan RL, Koons CW, Barret B, Teclan RF, Bixter D, Sinclair C, Thacker HI, Saeed AM. *Salmonella enteritidis* in human and animals: Changes in phenotypic and genotypic characteristics in ten years». United States Animal Health Association. 1999.
  24. Ontiveros CL, Mancera MA, Vázquez NJ, Tenorio GV. Investigación de plásmidos y patrón de resistencia a los antibióticos en cepas de *Salmonella enteritidis*. Memorias del 20. Congreso internacional de epidemiología. Veracruz, Veracruz. México. 2001:378-380.
  25. Siruent E, Ruíz M, Rodríguez JC, Royo G. Serotipos y sensibilidad antibiótica del género *Salmonella* en Elche. Rev. Española Quimiot SOS;15(1):