

Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México

Phage typing of *Salmonella enteritidis* strains isolated from poultry in Mexico

Arturo Mancera Martínez^a, Jesús Vázquez Navarrete^a, Assad Heneidi Zeckua^b

RESUMEN

Estudios previos en México han demostrado la presencia de *Salmonella enteritidis* (SE) en la avicultura comercial. Una de las principales vías de infección del hombre con SE, es por medio del consumo de huevo crudo o subproductos no cocidos. El objetivo de este trabajo fue fagotipificar aislamientos de SE obtenidos de aves en México. Se utilizaron 73 aislamientos confirmados por serotipificación. Catorce aislamientos se identificaron como fagotipo 4, mientras que 29 pertenecieron al fagotipo 8. Treinta aislamientos no fueron tipificables. El fagotipo 4 se aisló de reproductoras y pollo de engorda, mientras que el fagotipo 8 de progenitoras, reproductoras, gallinas de postura comercial, pollo de engorda, nacedoras y huevo. Los aislamientos identificados procedieron de los estados de: Coahuila, Durango, Estado de México, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro. Se recomienda el desarrollo de otros estudios con cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas de aves y humanos en México, encaminados a determinar la posible relación entre la infección en aves y el hombre, pudiendo estar actuando en deterioro de la salud pública.

PALABRAS CLAVE: *Salmonella enteritidis*, Fagotipificación, Avicultura, Salud pública, México.

ABSTRACT

Previous research in México has demonstrated the presence of *Salmonella enteritidis* (SE) in commercial poultry. Uncooked eggs/egg products are a major source of SE infection in humans. The purpose of this research was to phage type Mexican poultry SE isolates. Seventy three serotype-confirmed isolates were used. Fourteen isolates were identified as phage type 4, while 29 corresponded to phage type 8. Thirty isolates were non typeable. Phage type 4 was isolated from breeders and broilers. Phage type 8 was isolated from grand parent stock, breeders, commercial layers, broilers, hatchers, and eggs. Isolates identified came from the following Mexican states: Coahuila, Durango, Mexico State, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla, and Queretaro. Further studies on SE isolates from poultry and humans in Mexico are recommended, since such isolates might be deleterious for public health.

KEY WORDS: *Salmonella enteritidis*, Phage typing, Poultry industry, Public health.

Salmonella enteritidis (SE) es una bacteria que ha adquirido importancia en los últimos años debido al incremento de infecciones en el hombre y en las aves comerciales, causando brotes de infecciones entéricas en el humano y pérdidas económicas en la industria avícola^(1,2,3). Las infecciones en el humano se han relacionado frecuentemente con la

The bacterium *Salmonella enteritidis* (SE) has gained relevance in recent years, since it has resulted in infectious enteric outbreaks in mankind, and economic losses for commercial poultry^(1,2,3). Human infections have been frequently associated with the consumption of contaminated foods such as raw eggs, and products manufactured with raw

Recibido el 15 de mayo de 2003 y aceptado para su publicación el 12 de noviembre de 2003.

a Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); Km. 15.5 Carretera Federal México-Toluca, Colonia Palo Alto, Delegación Cuajimalpa, 05110, México, D.F. Tel.: (525) 570-3886; Fax: (525) 570-4073. mancera@micro.inifap.conacyt.mx. Correspondencia al primer autor.

b Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica, Dirección General de Sanidad Animal (DGSA), SAGARPA.

Proyecto parcialmente financiado por el CONACYT, 25900-B.

ingestión de alimentos contaminados como el huevo crudo, y productos elaborados con huevo crudo o semi cocido^(4,5,6). La clasificación de *Salmonella* spp está basada en sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi)⁽⁷⁾. La fórmula antigénica de *Salmonella enteritidis* es O: 1,9,12; H: g,m⁽⁸⁾. Los estudios epidemiológicos de esta infección en todo el mundo, han determinado la clasificación de los diferentes aislamientos de SE en fagotipos (FT), tomando en consideración ciertas características como su virulencia y patogenicidad^(9,10,11). La metodología de fagotipificación es la misma en todo el mundo, ya que utiliza los mismos bacteriófagos, y es ampliamente utilizada para la clasificación de aislamientos de *Salmonella* que pertenecen a serotipos comunes. La utilización de la fagotipificación para propósitos epidemiológicos, se basa en asumir que los aislamientos que pertenecen al mismo fagotipo tienen relación epidemiológica entre sí, mientras que aislamientos de diferente fagotipo carecen de esa relación; además los serotipos deben demostrar una alta estabilidad dentro de la población y con el paso del tiempo^(12,13).

Los brotes de SE en humanos y en aves de México, han sido poco estudiados. En el caso de humanos, estos se han restringido en la mayoría de los casos a la identificación de género y a la aplicación de un tratamiento; mientras que en las aves se han elaborado informes clínicos sugiriendo la infección por esta bacteria, logrando en algunos casos el aislamiento de SE, pero sin realizar la identificación con antiseros específicos, ni su clasificación en fagotipos. Esta clasificación es importante para nuestro país, ya que nos permite conocer cuántos y cuáles son los fagotipos existentes en México, así como su distribución geográfica. Durante 1994 y 1995 se estableció la metodología de serotipificación para aislamientos de SE aisladas de aves en México^(14,15), continuando con el establecimiento de la metodología de fagotipificación en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Veterinaria, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

El propósito de este estudio fue el de identificar por primera vez en México, el fagotipo de 73 aislamientos de SE provenientes de la avicultura nacional, los

or undercooked eggs^(4,5,6). *Salmonella* spp. classification is based on bacterial somatic (O), flagellar (H), and capsule (Vi) antigens⁽⁷⁾. The antigenic formula of SE is O: 1,9,12; H: g,m⁽⁸⁾. Epidemiological surveys of this infection throughout the world have categorized SE isolates into phage types (FT), taking into consideration certain bacterial traits such as virulence and pathogenicity^(9,10,11). Phage typing methodology is the same throughout the world, since the same bacteriophages are used. This methodology is widely employed for the characterization of *Salmonella* isolates belonging to common serotypes. Phage typing for epidemiological purposes is based on the assumption that isolates belonging to one same phage type are epidemiologically related with each other, whilst isolates from different phage types lack such relationship. In addition, phage types must show high levels of stability within a population and throughout the time^(12,13).

Only a few studies have been performed about SE outbreaks in humans and poultry in Mexico. Most human's studies have been limited to genus identification, and to treatment application. In poultry, clinical reports suggesting SE have been prepared, and in some cases SE has been actually isolated, but no specific antisera have been used, and no serotype classification has been performed. This classification is important for Mexico, since it allows us to learn about which and how many phage types we do have, as well as their geographic distribution. During 1994/1995 SE isolate serotyping methodology was established^(14,15). Phage typing methodology was further established in Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Veterinaria, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Mexico's National Veterinary Microbiology Disciplinary Research Center, The National Institute of Forestry, Agricultural and Animal Research, INIFAP).

The purpose of this study was to identify –for the first time– the phage types of 73 SE isolates from the Mexican poultry industry. Such isolates were obtained, preserved, and supplied by different public and private institutions.

cuales fueron aislados, conservados y aportados por diferentes instituciones públicas y privadas.

La nomenclatura utilizada para clasificar a los integrantes del género *Salmonella* ha sufrido múltiples cambios^(8,16). Recientemente, se ha propuesto una nueva clasificación en la que sólo se tienen dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, dividiendo la primera en seis subespecies^(7,17). En este escrito se utiliza la nomenclatura sencilla de *Salmonella enteritidis*, por ser de uso común y tener muchos años de uso, además de ser la utilizada por la Organización Mundial de la Salud⁽¹⁸⁾.

Se trabajaron 73 aislamientos de *Salmonella enteritidis*, los cuales fueron identificados por pruebas bioquímicas convencionales^(19,20) y serotipificados con antisueros somáticos (O) y flagelares (H) comerciales (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)⁽²¹⁾. Los antisueros somáticos utilizados fueron: Poli A- I - Vi ; grupo D1 factores 1, 9, 12; antisueros individuales de los factores 9 y 12 y grupo D2 factor 46. Se utilizaron los antisueros flagelares Complejo G y los antisueros individuales de los factores m, s, q y t. Los 73 aislamientos fueron colectados por laboratorios de diagnóstico privados; la Dirección General de Salud Animal de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos Hidráulicos (SAGAR) y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Consultando los archivos de estas instituciones, se realizó un análisis retrospectivo de los aislamientos, con la finalidad de determinar su origen en cuanto al Estado de la República y la función zootécnica de la explotación aviar de donde se aislaron. Todos los aislamientos fueron conservados en medio de mantenimiento hasta su utilización⁽²²⁾.

En la fagotipificación se utilizó un juego de diez bacteriófagos numerados del 1 al 10. Estos fueron obtenidos de la División de patógenos entéricos del laboratorio 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.

Para realizar la fagotipificación, cada aislamiento se sembró en 5 ml de caldo nutritivo adicionado de

Nomenclature to classify *Salmonella* members has changed several times throughout the time^(8,16). Recently, a new classification including only two species (namely: *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*) has been proposed. *Salmonella enterica* includes six subspecies^(7,17). In this paper the simple nomenclature *Salmonella enteritidis* is used, because of its common, long-lasting use. In addition, this name is also used by the World's Health Organization⁽¹⁸⁾.

Seventy three (73) SE isolates were first identified using conventional biochemical tests^(19,20), then serotyped using commercially available somatic (O) and flagellar (H) antisera (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)⁽²¹⁾. Somatic antisera included: Poly A- I - Vi; group D1 factors 1, 9, 12; individual antisera, factors 9 & 12, and group D2 factor 46. Flagellar Complex G antisera and individual factor m, s, q & t antisera were also used. All 73 isolates had been originally collected by either private diagnostic laboratories, Dirección General de Salud Animal de la SAGAR (General Administration of Animal Health, from SAGAR), or Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry). Looking at the archives of such institutions, a retrospective analysis was carried out in order to determine isolates' State, and poultry farm type of origin. All isolates were preserved in a maintenance medium, until used⁽²²⁾.

For phage typing, a set of ten (numbered 1-10) bacteriophages was used. Bacteriophages were obtained from the Enteric Pathogen Division, The London Public Health Laboratory, UK. The routine test dilutions used were 1:10,000 for bacteriophage No. 7, and 1:1,000 for all other bacteriophages.

For phage typing purposes, each isolate was seeded in 5 ml nutrient broth containing 0.85% sodium chloride (NaCl) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), using screw cap test tubes. Tubes were incubated for 3 h under constant stirring (150 rpm) to 37 °C in a stirring incubator (Lab-Line Instruments, Inc., Mod. 3527). The content of each tube was then poured into a Petri dish of nutrient

0.85% de cloruro de sodio (NaCl) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), en tubos de ensayo con tapón de rosca. Los tubos se incubaron en agitación continua (150 rpm) a 37 °C en una incubadora con agitación durante 3 h (Lab-Line Instruments, Inc., Mod. 3527). Posteriormente cada tubo se vació por separado en una caja de Petri conteniendo agar nutritivo adicionado de 0.85% de NaCl y 1.3% de Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). El caldo nutritivo con la bacteria se esparció por la superficie de la caja de Petri con movimientos circulares, retirando el exceso de líquido al final. A continuación se depositaron 10 µl de cada uno de los diez bacteriófagos sobre la superficie del agar conteniendo el aislamiento de SE, evitando la mezcla entre ellos. Siempre se siguió el mismo orden en la aplicación de los bacteriófagos, del 1 al 10, con la intención de evitar confusiones en la interpretación de la lisis producida por cada uno de ellos. Las cajas de Petri se incubaron a 37 °C durante 18 h, para posteriormente interpretar la lisis producida y clasificar los aislamientos en fagotipos. En cada fase de prueba se utilizaron cepas control de referencia⁽²³⁾.

De los 73 aislamientos de SE trabajados, 14 correspondieron al fagotipo 4, 29 al fagotipo 8 y 30 se clasificaron como no tipificables. El fagotipo 4 se encontró en el estado de Jalisco; el fagotipo 8 en los estados de Coahuila, Durango y Oaxaca; y ambos fagotipos (4 y 8) en el Estado de México,

agar containing 0.85% NaCl and 1.3% Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). The bacterium-containing nutrient broth was spread over the Petri dish surface using rotational movements. At the end, all excess liquid was discarded. Ten µl each of ten bacteriophages were then added over the SE isolate containing-agar surface. All bacteriophage mixing was prevented. The same order of bacteriophage addition (1 to 10) was observed at all times, in order to avoid reading confusions at the time of interpretation of bacteriophage-caused lysis. Petri dishes were incubated to 37 °C for 18 h. Lysis was then interpreted and isolates were classified in accordance with their phage types. Reference control strains were used in each test phase⁽²³⁾.

Of the 73 SE isolates, 14 corresponded to phage type 4; 29 corresponded to phage type 8; and 30 were classified as non typeable. Phage type 4 was found in the state of Jalisco. Phage type 8 was found in Coahuila, Durango, and Oaxaca; Both 4 and 8 phage types appeared in the States of México, Morelos, Puebla, and Querétaro (Table 1). As far as bird/origin types are concerned, phage type 8 was isolated from grand parent stock, commercial layers, hatchers, and eggs, while both phage types 4 and 8 were isolated from breeders and broilers (Table 2). The state of origin of 10 isolates (one PT4 and seven PT8 isolates) could not be determined.

Cuadro 1. Estados de la República Mexicana en los que se aislaron los fagotipos 4 y 8 de *Salmonella enteritidis*
 Table1. Mexican States from which *Salmonella enteritidis* phage types 4 and 8 were isolated

State	Phage type 4	(%)	Phage type 8	(%)	Total	(%)
Coahuila			1	(2.33)	1	(2.33)
Durango			1	(2.33)	1	(2.33)
Estado de México	6	(13.95)	3	(6.97)	9	(20.93)
Jalisco	1	(2.33)			1	(2.33)
Morelos	1	(2.33)	1	(2.33)	2	(4.65)
Oaxaca			2	(4.65)	2	(4.65)
Puebla	3	(6.97)	11	(25.57)	14	(32.56)
Querétaro	2	(4.65)	1	(2.33)	3	(6.97)
No information	1	(2.33)	9	(20.93)	10	(23.25)
Total	14	(32.56)	29	(67.44)	43	(100)

Morelos, Puebla y Querétaro (Cuadro 1). En cuanto a la función zootécnica de las aves, se pudo determinar que el fagotipo 8 se aisló de aves progenitoras, aves de postura comercial, de nacedoras y de huevo, mientras que los fagotipos 4 y 8 se aislaron de reproductoras y pollo de engorda (Cuadro 2). No se pudo determinar el Estado de origen de 10 aislamientos (1 del FT 4 y 9 del FT 8), así como la función zootécnica de 8 de ellos (1 del FT4 y 7 del FT 8). Las cepas control de referencia manifestaron correctamente la lisis correspondiente a cada fagotipo.

Este es el primer informe sobre fagotipificación de cepas de SE aisladas de aves en nuestro país, siendo actualmente el INIFAP el único que realiza esta metodología. Es importante implementar esta identificación en los laboratorios de diagnóstico de México, ya que así se pueden clasificar con fines epidemiológicos las cepas de SE que causan infecciones en humanos y animales. Por otro lado, se deberán establecer mecanismos de vigilancia sobre esta enfermedad, que puede llegar a producir un detrimento de la salud pública causando gastos médicos, ausentismo laboral, baja productividad y problemas graves en personas de edad avanzada o inmunodeprimidos. Además, un estudio realizado en México demostró un alto número de aislamientos de SE, encontrando que este serotipo fue el más frecuentemente aislado a partir de muestras de humano entre 1991 y 1999⁽²⁴⁾.

Con la intención de fortificar la implementación de la inocuidad alimentaria y obtener el mejoramiento

Similarly, the bird/origin type of 8 isolates (one PT4, and 7 PT8 isolates) could not be determined. All reference control strains expressed correctly the lysis corresponding to each phage type.

This is the first report about Mexican poultry SE isolate phage typing. INIFAP is currently the only institution performing this methodology. It is necessary to implement this identification technology among Mexican diagnostic laboratories, since it would allow for the epidemiological identification of SE strains causing infections in humans and animals. On the other hand, surveillance mechanisms must be established for this particular disease which could be detrimental for public health, thus resulting in medical expenses, worker absence, decreased productivity, and serious problems in the elderly or immunocompromised patients. One additional study performed in Mexico showed a high number of SE isolates, and this serotype was most frequently isolated from human samples between 1991 and 1999⁽²⁴⁾.

In an attempt to reinforce food safety implementation, and to achieve improved consumer health, control programs for this particular disease in poultry must be developed. Also, poultry product management must be improved, as it has occurred in other countries^(25,26). Restrictive economic measures imposed by foreign countries –particularly the US– concerning poultry products originated in countries considered as SE-positive⁽²⁵⁾ are extremely important for Mexico. As a matter of

Cuadro 2. Funciones zootécnicas en las que se aislaron los fagotipos 4 y 8 de *Salmonella enteritidis* en México

Table 2. Type of birds/origin from which *Salmonella enteritidis* phage types 4 and 8 were isolated in México

Origin	Phage type 4	(%)	Phage type 8	(%)	Total	(%)
Grand Parents			1	(2.33)	1	(2.33)
Breeders	6	(13.95)	7	(16.27)	13	(30.23)
Laying hens			6	(13.95)	6	(13.95)
Broilers	7	(16.27)	6	(13.95)	13	(30.23)
Hatchers			1	(2.33)	1	(2.33)
Eggs			1	(2.33)	1	(2.33)
No information	1	(2.33)	7	(16.27)	8	(18.60)
Total	14	(32.56)	29	(67.44)	43	(100)

en la salud de los consumidores, es necesario desarrollar programas para el control de esta enfermedad en las aves y optimizar el manejo que se da a los diferentes productos avícolas, como ya se ha realizado en otros países^(25,26). Para nuestro país son de suma importancia las medidas restrictivas económicas adoptadas por diferentes países, especialmente los Estados Unidos de Norteamérica, sobre el intercambio comercial de productos avícolas con países considerados como infectados por SE⁽²⁵⁾. Con respecto a los programas de otros países para su control, el 11 de diciembre de 1999 el gobierno de los Estados Unidos de Norteamérica anunció un programa para reducir la transmisión de esta enfermedad a través del huevo, y reducir las infecciones en el hombre en un 50% para el año 2005, considerando que actualmente los costos asociados con la infección en el hombre por SE oscilan entre 150 y 870 millones de dólares al año⁽²⁷⁾.

La lisis ausente o no clara en 30 de los aislamientos (41%) los clasificó como no tipificables, hecho que afectó el interés de este trabajo, reduciendo el número de fagotipos identificados a sólo dos, sabiendo que se han identificado más fagotipos en la industria avícola nacional⁽²⁸⁾. Se considera que la falta de definición en la lisis bacteriana, se debió entre diferentes causas, a la posible contaminación con otros bacteriófagos, los cuales no se manifiestan a simple vista en el crecimiento bacteriano, pero sí interfieren en la acción de los bacteriófagos utilizados en la metodología de fagotipificación. Las cepas testigo utilizadas mostraron resultados óptimos en cada prueba realizada, apegándose en todos los casos al esquema de fagotipificación desarrollado para SE⁽²³⁾.

El conocimiento de que existen diferentes fagotipos de SE en la avicultura de nuestro país, sugiere la realización de otros estudios con la finalidad de conocer cuáles otros y dónde se encuentran distribuidos⁽²⁸⁾. No obstante, la identificación de los fagotipos 4 y 8 de SE, sugiere un posible problema que involucre a la inocuidad alimentaria y a la salud pública nacional^(2,29,30). Estos datos no aportan evidencia suficiente para considerar que los Estados no muestreados estén libres de SE, o que existan otros fagotipos diferentes.

fact, on December 11, 1999, the US government announced a program aiming to decrease egg transmission of this disease, and to obtain a 50 % reduction in human infection rates by 2005, considering that current human SE-associated cost is 150-870 million dollars per year ⁽²⁷⁾.

Unclear or lack of lysis in 30 isolates (41 %) made us to classify them as non typeable isolates. This affected the interest of this research, since it reduced our results to only two phage types identified. Even though, we know that additional phage types have been identified in the Mexican poultry industry⁽²⁸⁾. We consider that the lack of definition in bacterial lysis was likely due –among other causes– to contamination with other bacteriophages which could not be grossly identified on bacterial growth at a glance, but that could have actually interfered with the action of the bacteriophages used for phage typing purposes. All control strains showed optimal results in each test performed following –in all cases– the scheme developed for SE phage typing⁽²³⁾.

The knowledge that several different SE phage types exist in the Mexican poultry industry, suggests performing further studies in order to discover what other phage types do we have, and to learn about their distribution⁽²⁸⁾. Nevertheless, the identification of SE phage types 4 and 8 suggests a potential food safety problem that might affect food safety, hence public health^(2,29,30). This data does not provide sufficient evidence as to suggest that non-sampled states are SE free, or that additional different phage types do not exist.

Results from this research are consistent with those published by O' Brien⁽³¹⁾ (who described the infection in broilers) and other workers^(6,32,33) (who described severe outbreaks in humans, associated with SE-contaminated eggs, and egg products).

The isolation of different phage types from grand parents (one PT 8 isolate) and breeders (six PT 4, and seven PT 8 isolates), suggests a serious problem for the Mexican poultry industry, since these two poultry branches are basically constituted by imported stock. This might represent an international epidemiologic problem, and can also result in the

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los obtenidos por O' Brien⁽³¹⁾ quien describe la infección en pollos de engorda para consumo, y con los de otros^(6,32,33) los cuales refieren la presentación de brotes severos en humanos, relacionados con el consumo de huevos contaminados con SE, así como productos o alimentos elaborados con ellos.

El hecho de haber identificado diferentes fagotipos en aislamientos de SE a partir de aves progenitoras (1 del FT 8) y de reproductoras (6 del FT 4 y 7 del FT 8), sugiere un problema de suma importancia para la avicultura comercial de México, ya que estas funciones zootécnicas están básicamente conformadas por aves de importación, lo cual representaría un problema epidemiológico de carácter internacional y llegar a causar la diseminación de la enfermedad dentro del país en aves para engorda, postura comercial y finalmente el huevo^(32,34,35).

Se concluye que mediante este estudio, se identificaron los fagotipos 4 y 8 de SE, los cuales han sido identificados en otros países como la causa de problemas digestivos en el humano, con implicaciones epidemiológicas en la salud pública. Será conveniente desarrollar estudios futuros que permitan identificar los serotipos y fagotipos de *Salmonella* más frecuentemente involucrados en las infecciones en el humano, considerando las poblaciones con riesgo de infección, la distribución geográfica de la enfermedad y las pérdidas económicas que causa, tanto para el sector salud como para la producción avícola.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento por la aportación de los aislamientos a: Investigación Aplicada, S. A. de C.V., AVI-MEX, S.A. de C.V., Dirección General de Salud Animal, SAGAR, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM y Agropecuaria Rural del Centro. Al Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, CENID-Microbiología, INIFAP, Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ-UNAM y

spread of the disease within the country among broilers, commercial layers, and eggs^(32,34,35).

We conclude that this research identified SE phage types 4 and 8, which have been also identified in foreign countries as causing digestive upsets in humans, with epidemiological public health implications. Further studies should be carried out as to identify the *Salmonella* serotypes/phage types that are most frequently involved in human infections, taking into account the populations under risk of infection, disease geographic distribution, and associated economic losses, in terms of both human health and poultry production.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to: Investigación Aplicada, S. A. de C.V., AVI-MEX, S.A. de C.V., Dirección General de Salud Animal, SAGAR, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, and Agropecuaria Rural del Centro, for providing isolates. Thanks also to Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, CENID-Microbiología, INIFAP, Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ-UNAM, and Laboratorio SERPROTEC for their technical assistance in the serotyping methodology. Our gratitude to Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal, Sección Nacional de Productores de Pollo Mixto de Engorda, Unión Nacional de Avicultores, and Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, for providing us with somatic and flagellar antisera. Thanks to CONACYT (Proyecto 25900-B) for their partial support in financing this study.

End of english version

Laboratorio SERPROTEC por su asistencia técnica en la metodología de serotipificación. Al Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal, Sección Nacional de Productores de Pollo Mixto de Engorda, Unión Nacional de Avicultores,

Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, por haber aportado los antisueros somáticos y flagelares utilizados. Se agradece al CONACYT (Proyecto 25900-B) por el financiamiento parcial de este estudio.

LITERATURA CITADA

- Bleem A. The *Salmonella enteritidis* situation in the United States. *Animal Health Insight*. USDA: APHIS: VS: 15. USA. 1991.
- Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic. *Epidemiol Infect* 1990; (105):21-27.
- Schultz S, Morse D, Parkin W, Grady GF, Witte EJ, Vogt RL, *et al.* *Salmonella enteritidis* infections in the northeastern United States. *Morb Mortal Wkly Rep* 1987;(36):204-205.
- Gast RK, Holt PS. Persistence of *Salmonella enteritidis* from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. *Poultry Sci* 1998;(77):1759-1762.
- St. Louis ME, Morse DL, Potter ME, DeMelfi TM, Guzewich JJ, Tauxe RV, *et al.* The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. *J Am Med Assoc* 1988;(259):2103-2107.
- Telzak EE, Budnick LD, Zweig-Greenberg MS, Blum S, Shayegani M, Benson CE, *et al.* A nosocomial outbreak of *Salmonella enteritidis* infection due to the consumption of raw eggs. *N Engl J Med* 1990;323(6):394-397.
- Clarke RC, Gyles CL. *Salmonella*. In: Gyles CL, Thoen CO editors. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2nd ed. Iowa, USA. Iowa State University Press;1993:133-153.
- Rowe B, Hall MLM. Kauffmann-White scheme. London, UK: Central Public Health Laboratory. 1989.
- Gast RK. Aplicación de modelos experimentales para comprender y detectar las infecciones por *Salmonella enteritidis* en pollos. Curso de actualización sobre el control y prevención de la infección por *Salmonella enteritidis*. México. 1994:1-7.
- Rowe B. *Salmonella enteritidis*: The problem nationally and internationally [resumen]. XII Congreso nacional de la Asociación Española de Microbiología. Pamplona, España. 1989:301.
- Shipman L. *Salmonella enteritidis* (SE) phage type 4: Current information. *Foreign Animal Disease Report*. USDA USA APHIS: VS:1994;22(1):6-8.
- Baggesen DL, Wegener HC, Madsen M. Correlation of conversion of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 1, 4 or 6 to phage type 7 with loss of lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):330-333.
- Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 1990;(28):1903-1905.
- Mancera MA, Vázquez NJ. Identificación en México de *Salmonella enteritidis* con antisueros somáticos y flagelares, aislada de aves [resumen]. XIV Congreso panamericano de ciencias veterinarias. Acapulco, Guerrero. 1994:168.
- García M, Téllez G, Valladares C, Urquiza O. Determinación de la existencia de *Salmonella enteritidis* serotipo enteritidis a partir de 95 aislamientos de *Salmonella* sp. de brotes de campo en aves domésticas. XX Convención nacional de la Asociación nacional de especialistas en ciencias avícolas. Acapulco, Guerrero. 1995:108-112.
- Edwards PR, Ewing WH. *Identification of enterobacteriaceae*. 3rd ed. USA: Burgess Publishing Co.; 1972.
- OIE. International Office of Epizootics. *OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 2nd ed. France: International Office of Epizootics; 1992.
- WHO. World Health Organization. *Salmonellosis control: The role of animal and product hygiene*. Report Series 774: 9. Geneva: World Health Organization; 1988.
- Cowan ST, Steel KJ. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. Great Britain: Cambridge University Press; 1974.
- Mac Faddin JF. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. México: Médica Panamericana; 1990.
- Difco Laboratories. *Serological Identification of Salmonella*. Technical Information 1229. Detroit, Michigan, USA: 1977.
- Verdugo-Rodríguez A, López-Vidal Y, Puente JL, Ruíz-Palacios GM, Calva E. Early diagnosis of typhoid fever by an enzyme immunoassay using *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12(4):248-254.
- Ward LR, de Sa JDH, Rowe B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol Infect* 1987;(99):291-294.
- 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.
- USDA-APHIS. United States Department of Agriculture- Animal and plant health inspection service. *Importation of animals and animal products*; Proposed rule. 9 CFR Part 92, USA. 1996.
- 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. Food and drug administration. 21 CFR Part 100. USA. 1998.
- Clinton W. Clinton administration announces ambitious new plan to improve egg safety, reduce *Salmonella* illnesses. *Weekly radio address*. USDA, FDA. USA. December 11, 1999.
- Valladares JC, Barrientos B, Angulo E, Juárez D, Lara A, Urquiza O, *et al.* Epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in northeast Mexico. Proc Forty-Fifth western poultry disease conference. Cancún, México. 1996:253-256.
- Kinde H, Adelson M, Ardans A, Little EH, Willoughby D, Berchtold D, *et al.* Prevalence of *Salmonella* in municipal sewage treatment plant effluents in Southern California. *Avian Dis* 1997;41:392-398.
- Kinde H, Read DH, Chin RP, Bickford AA, Walker RL, Ardans A, *et al.* *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection in a commercial layer flock in Southern California: Bacteriologic and epidemiologic findings. *Avian Dis* 1996;40:665-671.
- O'Brien JDP. *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Vet Rec* 1988;122(9):214.
- Coyle EF, Ribeiro CD, Howard AJ, Palmer SR, Jones HI, Ward L, *et al.* *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection: Association with hens' eggs. *Lancet* 1988;(2):1295-1297.
- 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.
- Gast RK, Beard CW. Isolation of *Salmonella enteritidis* from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis* 1990;(34):991-993.
- Humphrey TJ. Infección por *Salmonella enteritidis* en pollos y gallinas de postura. Curso de actualización sobre *Salmonella enteritidis* y *Campylobacter* en las aves domésticas. México. 1991:20-26.