

## **Caracterización de *Salmonella enteritidis* usada para el control de roedores**

Characterization of *Salmonella enteritidis* used to control rodents

Rosa María González Hernández<sup>1</sup>, Rigoberto Fimia Duarte<sup>2</sup>, Jorge Fraga Nodarse<sup>3</sup>, Virginia Capó<sup>3</sup>, José A. Fraga Castro<sup>4</sup>, Reinaldo Espino Llerena<sup>4</sup>.

### **RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue caracterizar cepas de *Salmonella enteritidis* usadas en el control de roedores. Para ello se consideró, *Salmonella enterica*, subespecie *enterica*, serotipo *enteritidis*, variedad Danysz, lisina negativa, fagotipo 6a (componente activo del rodenticida Biorat®); *Salmonella enterica*, subespecie *enterica*, serotipo *enteritidis* 7/30, grupo D (Mongolia); de *Salmonella enterica*, serotipo *enteritidis* (cepa de referencia) y de las cepas de *Salmonella enteritidis* que provocaron brotes de salmonelosis humana en Cuba. A todas las cepas se les realizó comprobación bioquímica y serológica, prueba de susceptibilidad antimicrobiana, perfil plasmídico y RAPD-PCR. Todas las cepas analizadas fueron caracterizadas bioquímicamente como lisina decarboxilasa negativa. Se observó que las cepas para el control de roedores mostraron alta susceptibilidad frente a los antimicrobianos de elección. Las cepas del brote presentaron un plásmido de 38 Md, mientras que las cepas utilizadas para el control de roedores presentaron plásmidos con una talla 3,0; 4,0 y 59 Md. El RAPD mostró diferencias con las cepas que causaron brotes en humanos. Las cepas de *Salmonella enteritidis* usadas en el control de roedores son genéticamente diferentes a las cepas que provocaron brotes en humanos. Se confirmó que *Salmonella enteritidis* como componente activo del Rodenticida Biorat®, no causó salmonelosis en Cuba.

**Palabras clave:** biorat, fagotipo, roedores, *Salmonella enteritidis*, serotipo.

### **ABSTRACT**

The objective of this research was to characterize strains of *Salmonella enteritidis* used in rodent control. To do this, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype *enteritidis*, variety Danysz, lysine negative phage type the 6th (Biorat® rodenticide active component) was considered; *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype *enteritidis* 7/30, group D (Mongolia); *Salmonella enterica*, serotype *enteritidis* (reference strain) and *Salmonella enteritidis* strains that caused outbreaks of human salmonellosis in Cuba. All of the strains underwent biochemical and serological testing, antimicrobial susceptibility testing, plasmid profile and RAPD-PCR. All strains tested were characterized biochemically as negative lysine decarboxylase. It was noted that strains to control rodents showed high susceptibility to the chosen antimicrobial. Outbreak strains showed a 38 Md

<sup>1</sup> Laboratorios Biológico Farmacéuticos (LABIOFAM). Sucursal Matanzas, Cuba.

<sup>2</sup> Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Villa Clara, Cuba.

<sup>3</sup> Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>4</sup> Laboratorios Biológico Farmacéuticos (LABIOFAM). La Habana, Cuba.

plasmid, while strains used for rodent control had plasmids with a size 3.0; 4.0 and 59 Md. The RAPD showed differences with strains that caused outbreaks in humans. *Salmonella enteritidis* strains used in rodent control are genetically different from the strains that caused outbreaks in humans. *Salmonella enteritidis* was confirmed that as the active component of Biorat® Rodenticide, did not cause salmonellosis in Cuba.

**Key words:** biorat, fagotipo, rodents, *Salmonella enteritidis*, serotipo.

## INTRODUCCIÓN

Salmonelosis es una zoonosis que es causa importante de infecciones en el ser humano. Esta es producida por el género salmonella el que incluye a más de 2400 serotipos los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza y con gran potencia para causar enfermedades intestinales. Otros serotipos se han descritos dentro de este género hasta llegar en la actualidad a más de 2400 (Ward, Desa & Rowe, 1987; Sangweilu, Manges, Hen, Ferric & Lee, 1999; Valdés, 2001). Es importante destacar que casi todas las cepas de *Salmonella* son patógenas para el hombre (Shangkuan, 1986; Ward et al, 1987; Paungt, Vanoff, Wan & Finlay, 1997).

Las infecciones por este microorganismo han aumentado considerablemente en los últimos diez años, lo que hace imprescindible implementar nuevas medidas de prevención y control de la enfermedad (Laboratorios Biológico Farmacéuticos, LABIOFAM, 1995; Laconcha et al., 1998).

En los estudios epidemiológicos es esencial caracterizar las cepas que lo producen usando métodos de tipaje por biología molecular como estudios del perfil plasmídico, RAPD (Welsh & MacClelland, 1990; Williams, Kubelyk, Livak, Rafalski & Tingey, 1990), la fagotipificación ha sido el método que la mayoría usó desde 1950 para subdividir las cepas, incluso el serotipo. *Salmonella enteritidis* está asociado a las infecciones alimentarias específicamente los fagotipos. Por otro lado, los roedores son la causa principal de contaminación de las aves de corral y contaminación de los cereales de los que estos animales se alimentan, porque los roedores están en el contacto con todo los ambientes de la granja. Además, los roedores son reservorios naturales de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* y responsable por extender esta enfermedad al hombre. El paso de *Salmonella* a través de los roedores aumenta su virulencia para las aves de corral (Caetano-Anolles, Bassam, & Gresshoff, 1991; Akopyanz, Bukanov, Westblom, Kresovich & Berg, 1992).

Más de 6.000 toneladas del Rodenticida Biorat® se han usado durante más de 20 años en nuestro país. Biorat contiene *Salmonella enteritidis*, variedad Danysz, lisina negativa, fagotipo 6a que es específico para la familia de Muridae: ratas y ratones (LABIOFAM, 1989).

Durante todos esos años de aplicación de Biorat® en Cuba, así como en más de 15 países en el mundo dónde se ha usado para reducir la población de los roedores para disminuir las pérdidas agrícolas, no ha sido reportado ningún daño a salud humana ni de los animales relacionado con *Salmonella enteritidis*, variedad Danysz, lisina negativa, phagotype 6a (Thelfall, 1986). Sin embargo, como consecuencia del número creciente de informes alrededor del mundo de brotes de salmonelosis causadas por *Salmonella enteritidis* en el hombre y los animales domésticos y debido a la importancia este producto tiene para Cuba y para otros países, es vital ampliar el estudio bioquímico y molecular y las consecuencias clínico- microbiológicas de cepas de *Salmonella enteritidis* que son utilizadas en el control de roedores.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar cepas de *Salmonella enteritidis* usadas en el control de roedores.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Aislamiento bacteriano**

Se utilizaron tres cepas liofilizadas obtenidas de la colección de cepas de la Empresa de Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos (LABIOFAM): dos cepas de *Salmonella enteritidis* usadas para el control de roedores (*Salmonella enterica* subespecie entérica, serotipo enteritidis, lisina negativa, fagotipo 6a, (componente activo del Rodenticida Biorat ®); *Salmonella enterica* subespecie entérica, serotipo enteritidis 7/30, grupo D; y una cepa de referencia (*Salmonella enterica* subespecie entérica serotipo enteritidis) perteneciente a la colección de cepas del Instituto de Pasteur.

Se estudiaron trece cepas de *Salmonella enteritidis* que causaron los brotes de salmonelosis en los humanos en Cuba. Estas cepas se enviaron al Laboratorio Nacional de Referencia de enfermedades diarreicas agudas del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), las cuales provenían de la provincia Villa Clara (dos de alimentos y seis de aislamientos de humano), el resto de las cepas se obtuvieron de aislamientos de humanos de la provincia Santiago de Cuba durante los meses de junio y julio del 2003, respectivamente.

### **Biotipado**

Las cepas se caracterizaron según su acción en varios sustratos fermentables usando métodos bioquímicos convencionales para *Salmonella enteritidis* (Mac Fadding, 1980).

### **Serotipado**

Las cepas de *salmonella enteritidis* fueron crecidas en la agar soya tripticasa y su serotipificación fue determinada por la técnica de aglutinación de diapositiva por los medios de antisuero tipo-específico del Diagnóstico de Murex Inglaterra que usa el esquema Kauffmann-White (Le Minor & Popoff, 1997).

### **La comprobación de susceptibilidad antimicrobiana**

La susceptibilidad antimicrobiana fue evaluada por el método de difusión del disco (Bauer, Kirby, Sherris & Truck, 1966). Se evaluaron los modelos de susceptibilidad usando el NCCLS criterio (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999). Los antibióticos usados fueron proporcionados por OXOID (Unipath, España).

Los siguientes antibióticos fueron probados: ampicillin (UN, 10 $\mu$ g), cloramfenicol (C, 30 $\mu$ g), tetraciclina (T, 30 $\mu$ g), cefotaxime (Ctx, 30 $\mu$ g), trimetoprim-sulfametoxazol (SxT, 25 $\mu$ g), ácido nalidixico (Nx, 30 $\mu$ g), doxycilina (HAGA 30 $\mu$ g), ceftriazone (Cro 30 $\mu$ g), ampicillin-subactam (Sam 10/10 $\mu$ g), ácido amoxicillin-clavulanic (AML 20/10 $\mu$ g), cefotaxime (CTX 30 $\mu$ g), aztreonam (Atm 30 $\mu$ g).

### **Perfil plasmídico**

El perfil plasmídico de *S. enteritidis* fue determinado usando el método de Kado (Kado, 1981). La extracción de plásmido se ejecutó en un gel de electroforesis horizontal de 0.8% de agarosa, se visualizó bajo la luz de UV con bromuro del ethidium (0,5mg/mL) con voltaje constante 120 voltios durante 50 minutos (Biorat EEUU). El tamaño de plásmido fue determinado por la comparación a un marcador de ADN Supercoiled (Gibco-BRL, Introgen, España), el análisis de la regresión fue realizado para determinar la

relación lineal entre la base del tamaño molecular 10 logaritmo y la movilidad del plásmido. Los perfiles de Plásmido fueron elaborados considerando el número y tamaño de presente del plásmido. Sólo bandas luminosas y estables fueron consideradas para el análisis. Las bandas no-consistentes fueron consideradas como formas relajadas o circulares del ADN plasmídico superenrollado. El peso molecular de los plásmidos fue determinado por el método de la curva logarítmica de regresión lineal.

### **La amplificación aleatoria de AND polimórfico (RAPD)**

El extracto sea los usando hecho un método del fenol-cloroformo según el Maniatis et al., (1983), mencionado por Sambrook (Sambrook, 1989). La concentración de ADN se estimó el spectrophotometricamente y por OD que lee a 260 nm y la pureza de la muestra se examinó por el electroforesis en 0.8% agarosa gelifíquese en el pulidor de TBE (TBE 0.5X)(0.045 el tris-borato de M, 0,001 M EDTA) conteniendo el bromuro del ethidium (0,5mg/mL) con la visualización bajo un transilluminator de UV: Macrovue 2011, LKB.

Se perfeccionaron RAPD reactivos cebador y concentraciones de ADN previamente (los datos no muestran). La amplificación de ADN se realizó en un último volumen de 25  $\mu$ L usar Listo-a-vaya RAPD (Amersham), agregando 25 pmol el solo cebador, y 25 ng de plantilla ADN. Los mandos del negativo para cada uno de los 8 cebadores usados contenidos todos los componentes anteriores excepto el agua destilada estéril en lugar de la plantilla ADN. El perfil de amplificación consistió en un paso del desnaturación inicial a 95oC para 5 min seguidos por las repeticiones de 1 min a 95oC, 1 min a 65 oC y 2 min a 72oC. Los productos de PCR fueron analizados por el electroforesis en 2% agarosa se gelifica en pulidor de TBE que contiene el bromuro del ethidium (0.5 mg/mL) y visualizó usando un transilluminator de UV.

Se probaron ocho cebadores (tabla 1), donde se informan tres de ellos en varias referencias sobre la caracterización genética de *Salmonella Enteritidis* y cinco del Equipo UN, Tecnología de Operon, EE.UU. (Akopyanz et al., 1992).

Una cepa de cada brote (1251: Santiago de Cuba y 1152: Villa Clara), 1156 cepa genéticamente diferente del resto de cepas de los brotes, dos cepas de *Salmonella* usadas para el roenticida y la de referencia se analizaron usando la técnica RAPD genéticamente con ocho cebadores.

Basado en el perfil de RAPD de las bandas individual anotado como uno presente o ausente (1 o 0) para cada uno de los aislamientos, el coeficiente de similitud de Jaccard inverso (Sj como modificado por Sneath, 1957) fue usado como:  $S_j = 1 - \frac{un}{(el\ a+b+c)}$  donde a: representa el número de bandas compartido, b: representa el número de bandas presentes; y c: representa el número de bandas ausentes.

Las relaciones filogenéticas fueron determinadas por la estrategia de agrupamiento mediante el método de UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages (Sneath & Sokal, 1973), que usan un SINTAX 5.0 software (Ponadi, 1993).

Tabla 1. Los cebadores RAPD

CÓDIGO	SECUENCIAE (5'–3')
7682	CCG CAG CCA A
7683	GAG TCA GCA G
7685	TCA CGA TGC A
OPA -4	AAT CGG GCT G
OPA -5	AGG GGT CTT G
OPA -6	GGT CCC TGA C
OPA -7	GAA ACG GGT G
OPA -10	GTG ATC GCA G

## RESULTADOS

### Serotipificación y Biotipado

Las 16 cepas analizadas fueron identificadas como salmonella enterica, serotipo enteritidis. Las cepas usadas para el control de roedores y la cepa de referencia fueron identificadas como lisina negativa.

### Susceptibilidad antimicrobiana

Todas las cepas analizadas fueron susceptibles frente a todos los antibióticos testados, excepto las cepas para el control de roedores que mostraron una susceptibilidad intermedia frente a la tetraciclina.

### Perfil plasmídico

Las cepas usadas para el control de roedores portan tres bandas de 3,0; 4,0; 59Md (patrón A). Las cepas que provocaron brotes portan solo una banda de 38 Md (patrón B), (datos no mostrados).

### DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD)

De los 16 aislamientos de cepas de *S. enteritidis* utilizando tres cebadores (7682, 7683 y 7685) generaron 32 bandas reproducibles de RAPD; dos de ellos (7682 y 7683) mostraron polimorfismo entre los aislamientos analizados. El dendograma confeccionado mediante el coeficiente de Jaccard's (figura 1), mostró que los resultados de RAPD indican polimorfismo genético entre las cepas (datos no mostrados). Las cepas fueron agrupadas en tres grupos : cepas 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1159, 1160, 1291, 1296, 1298, 1299 y 1301 dentro del grupo I relacionadas con el brote de salmonelosis humana en (Villa Clara y Santiago de Cuba). Principal perfil: cepas 071, 073 y 56.29 dentro del grupo II, correspondiendo a las cepas usadas para el control de roedores y en el grupo III: la cepa 1156 relacionadas con el brote de Villa Clara.

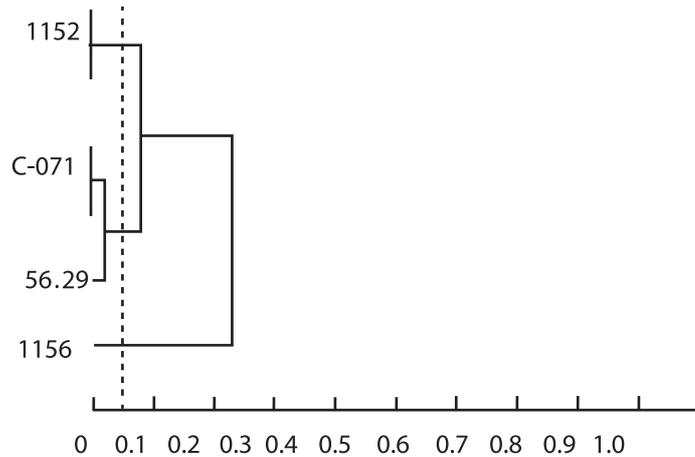


Figura 1. Dendrograma de 16 cepas *S. enteritidis* basados en los datos del RAPD-PCR.

Los patrones de RAPD obtenidos con el cebador 7683 mostraron la existencia de polimorfismo de los grupos de cepas de acuerdo a los marcadores genéticos específicos en los grupos II y III. Un marcador genético de 1110 bp fue observado en todos los aislamientos de cepas *Salmonella* utilizadas para el control de roedores y la cepa de referencia (grupo II); y un marcador genético de 1325 bp fue observado en la cepa 1156 (grupo III).

## DISCUSIÓN

Estos resultados refieren que dos cepas de *S. enteritidis* genéticamente diferentes circularon y estuvieron relacionadas con los brotes en humano en las provincias de Villa Clara y Santiago de Cuba, respectivamente. Seis cebadores (7682, 7683, OPA4, OPA 5, OPA 6 and OPA 7) demostraron la existencia de polimorfismo genético entre las cepas. Sin embargo, con los cebadores 7685 y OPA 10 no se observó diferencia entre las cepas analizadas.

De acuerdo con la distancia Jaccard's, estas cepas fueron agrupadas en tres nuevos grupos, muy similar al agrupamiento previo con el resultado cuando se utilizaron tres cebadores al ser analizadas las 16 cepas. Al grupo I corresponden con los brotes de salmonelosis humana; grupo II corresponden las cepas usadas para el control de roedores, grupo III corresponde la cepa 1156 una cepa genéticamente diferente dentro del brote de Villa Clara.

La distancia fue calculada utilizando inverso del coeficiente de Jaccard's coefficient. Dashed line reports court value. Los cebadores (7683, OPA 5, OPA 6 and OPA 7), mostraron polimorfismo entre los brotes y las cepas utilizadas para el control de roedores. El cebador OPA 7 mostró polimorfismo entre cepas de *Salmonella* usadas para el control de roedores. Un marcador genético de 1500 bp fue obtenido de cepas de salmonella utilizadas para el control de roedores y la cepa de referencia en el grupo II. Un marcador genético de 800 bp g solo se presentó en la cepa de referencia y un marcador genético fue de 1170 bp claramente observado en la cepa 1156, la cual perteneció al brote de villa clara.

En esta investigación se evaluaron las diferencias en las características metabólicas de los microorganismos bajo investigación. Estos microorganismos son salmonella enteritidis variedad de Danysz, lisina negativa, fagotipo 6a (componente activo del rodenticida Biorat ®), salmonella entérica subespecie entérica, serotipo enteritidis 7/30, grupo D; cepa de referencia (Salmonella entérica, subespecie entérica, serotipo enteritidis) y cepas de salmonella enteritidis que causaron 2 brotes de salmonelosis en Cuba.

Thelfall et al., (1996), en un estudio de caracterización de salmonella entérica subespecie entérica serotipo enteritidis, variedad Danysz, fagotipo 6a, lo informó como el decarboxilasa de la lisina negativa, coincidiendo con los resultados obtenidos.

Acerca de las cepas salmonella enteritidis que causaron los brotes de salmonelosis en los humanos, Edward-Edwing (1971), refieren a salmonella enteritidis responsables de brotes en humanos, la mayoría del tiempo con una conducta bioquímica de lisina decarboxilasa positiva (Ewing & Eward 1971).

La presencia de salmonella atípicas a partir de muestras clínicas y las muestras de alimentos han reportado por varios autores como Falcao y Blackburn (Falcao, Trabulsi, Hickman & Farmer, 1998; Blackburn & Ellis 1998; Leiva, Valdes, Rolascocharon y Perez, 1998). En esta investigación, la conducta bioquímica de Salmonella enteritidis, (componente activo del rodenticida Biorat ®), Salmonella entérica subespecie entérica, serotipo enteritidis 7/30, grupo D; cepa de referencia (salmonella entérica subespecie entérica serotipo enteritidis), al comportarse como lisina decarboxilasa negativa, entonces estas cepas clasifican como salmonellas atípicas.

Todas las cepas salmonella enteritidis analizadas in vitro mostraron susceptibilidad a los antibióticos probados. En Francia, por ejemplo, hasta hace unos años no se había informado ningún caso de salmonella antibiótico-resistente en la práctica clínica (Brevil, Berger, Dublanchet, 1996).

La aparición de salmonella con resistencia a los antibióticos se reconoció debido a su uso preventivo por veterinarios (Hohmann, 2001), pero los porcentajes altos de susceptibilidad a los antibióticos también se ha informado para salmonella spp (Surita, 2000). También se ha usado en la discriminación de ciertos phagotypes de Salmonella typhimurium, pero ha mostrado un valor limitado en salmonella enteritidis como la mayoría de los aislamientos que presentan un plásmido de 38 Md (Jelesic, Kulauzov & Kozoderovic, 2000).

Thelfall et al., (1996), estudió salmonella enteritidis variedad Danysz, phagotype 6<sup>a</sup>, donde se encontraron tres plásmidos de 3,0; 4,0; y 59 Md. Las cepas para el control de roedores llevan 3 plásmidos de los mismos tamaños.

Desde el punto de vista epidemiológico, esta investigación reveló el alto valor del perfil del plásmido en la diferenciación de cepas de salmonella enteritidis usadas en el rodenticida con cepas que provocaron salmonelosis humanas en Cuba donde Biorat se usa ampliamente para el control de la peste roedor.

Una variedad de métodos basados en amplificación de ADN se ha aplicado para identificar las especies de salmonella, incluso el plásmido biotiping (Dorn, Silapanuntakul, Angrick & Shipman 1992; Baker & Old, 1998), ribotyping (Olsen, Skov, Threlfall, Chart & Rowe, 1994), RAPD (Del Tufo & Tingey, 1994), PFGE (Olsen et al., 1994) y enzima del multilocus perfilan análisis (Selander et al., 1992). Cada uno de estos acercamientos ha proporcionado las visiones útiles en las relaciones evolutivas y epidemiológicas de varios serovar de la salmonella. RAPD-PCR, ha sido aplicado con éxito al tomar las huellas dactilares moleculares, pues solo usa cebadores de sucesión del

nucleótido arbitraria capaz acceder segmentos aleatorios de ADN genómico para revelar polimorfismo (LABIOFAM, 1998). En el caso de la huella digital genética resultante puede ser de valor epidemiológico (Shangkuan & Lin, 1998).

RAPD es una técnica rápida por estudiar epidemiología genética molecular de especies de Salmonellas con un mismo o diferente serovars. RAPD también es muy útil la identificación de otras las especies de microorganismos (Pichel, Binsztein, Gutkind & Vibout, 2001). El uso combinado del perfil de plásmido y el RAPD, ha demostrado ser fiable para la caracterización de salmonella, incluyendo aquellos del mismo serotipo.

Finalmente, aunque las cepas están genéticamente relacionadas, fueron bien distinguidas. Con la aplicación tecnológica, pudo concluirse que la cepa de salmonella enteritidis, variedad Danysz, fagotito 6a, lisina negativa no fue la responsable de los brotes de salmonelosis ocurridos en Cuba durante el año 2003.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S. & Berg, D.E. (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR. Based finger printing. *Nucleic Acids Res*, 20, 5137-5142.
2. Baker, R.M. & Old, D.C. (1998). The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of Salmonellae. *J. Med. Microbiol*, 29, 81-88
3. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. & Truck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 45, 493-496.
4. Blackburn, B.O. & Ellis, E.M. (1998). Lactose-fermenting. *Salmonella* from dried milk and milk-drying plants. *Appl. Microbiol*, 26, 672-674.
5. Brevil, J., Berger, N. & Dublanquet, A. (1996). Sensibilité aux antibiotiques de 280 Souches de Salmonelles entériques isolées en France en 1994. *Med. Mal. Infect*, 26, 420-425.
6. Caetano-Anolles G., Bassam B.J. & Gresshoff, P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Molecular Reporter*, 16, 294-307.
7. Del Tufo, J.P. & Tingey, S. (1994). RAPD assay. *Methods. Mol. Biol*, 28, 237-241.
8. Dorn, C.R., Silapanuntakul, R., Angrick, E.E. & Shipman, L.D. (1992). Plasmid analysis and Epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in three commercial layer flocks. *Avian Dis*, 36, 844-851.
9. Ewing, W.H. & Eward, P.R. (1971). Identificación de Enterobacteriaceae. La Habana: Edición Revolucionaria.
10. Falcao, D.P., Trabulsi, L.R., Hickman, F.W. & Farmer, J.J. (1998). Unusual enterobacteriaceae; lactose-positiva *Salmonella* Typhimurium which endemic in Sao Paulo. *J. Clin. Microbiol*, 1, 2-8.
11. Hohmann, E.L. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* (32): pp 263-269.
12. Jelesic, Z., Kulazov, M. & Kozoderovic, G. (2000). Analysis of the plasmid profile of various *Salmonella* serotypes. *Med Pregl*, 53, 564-567.
13. Kado, C.I. & Liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol*, 145, 1365-1373.
14. Laboratorios Biológico Farmacéuticos. (1995). Importancia socioeconómica del Rodenticida Biorat para el control de roedores dañinos. Folleto.

15. Laboratorios Biológico Farmacéuticos. (1998). Importancia socioeconómica del Rodenticida Biorat para el control de roedores dañinos. Folleto.
16. Laconcha, I., Lopez, M.N., Remeneria A., Audicana, A., Perales, I. & Gaizar, J. (1998). Phage typing Combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Almonella enteritidis* strains. *International J. Food Microbiology*, 40, 27-34.
17. Leiva, V., Valdes, E., Rolascocharon, T. y Perez, O. (1998). Aislamiento de *Salmonellas atípicas* en Camarones Congelados. *Rev. Cubana de Alimentación y Nutrición*, 12, 11-15.
18. Le Minor, L. & Popoff, M. Y. (1997). Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, 7ma rev. (32).
19. Mac Fadding, J.F. (1980). Pruebas Bioquímicas individuales En: Mac Fadding J.F. (1980). Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica (ed). Buenos Aires: Panamericana.
20. Melloroy, S.G. & R.M. MacCracken. (1990). The current status of the *Salmonella enteritidis* control program in the United Kingdom. *Epidemiol. Infect.*, 104, 450-462.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: ninth informational supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pennsylvania (19).
22. Olsen, J.E., Skov, M.N., Threlfall, E.J., Chart, H. & Rowe, B. (1994). Clonyng lines of *Salmonella* serotypes Enteritidis documented by IS200-ribo, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP Typing. *J. Med. Microbiol*, 40, 15-22.
23. Paungt, L.M., Vanoff, I.B., Wan, J. & Finlay, B. (1997). Typhoid Fever-Import issue still remain. *Trends Microbiol*, 6, 131-33.
24. Pichel, M., Binsztein, N., Gutkind, G. & Vibout, G. (2001). Identification of cluster of strains bearing a new adhesion among. Genetically Diverse Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates of serogroup O20. *J. Clin. Microbiol*, 1, 782-786.
25. Ponadi, J. (1993). SYN-TAX. Computer programs from multivariate data analisys in ecology and systematies. Version 5.0. Budapest. Scientific Publshing.
26. Sambrook, J., Frits, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Clonning a Laboratoty Manual* (2 ed). EE. UU: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
27. Sangweilu, A.R., Manges, Y., Hen X.U., Ferric, C.F. & Lee, W.R. (1999). Analysis of Clinical Isolates of *Salmonella Enteritidis* in vitro. *Infection and Inmunity*, 1, 651-57.
28. Selander, R.K., Smith, N.H., Li, J., Beltran, P., Ferris., Kapecko, D.J. & Rubin, F.A. (1992). Molecular evolutionary genetics of the cattle-adapted serovar *Salmonella* Dublin. *J. Bacteriolo*, 174, 3587-3592.
29. Shangkuan, Y, H. & Lin, H.C. (1996). Application of random amplified Polymorphism DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella Typhi* and other *Salmonella* species. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 693-702.
30. Shangkuan, Y.H. & Lin, H.C. (1998). Application on random amplified polymorphic DNA to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. *J. Appl. Microbiol*, 85, 693-702.
31. Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973). *Numerical Taxonommy*. San Francisco: W.H. Freeman y col.

32. Stubbs, A.D., Hickman, B. F.W., Cameron, D.N. & Farmer III. (1994). Differentiation of *Salmonella enteritidis* phage type 8 strains: evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. *J. Clin. Microbiol*, 32, 199-201.
33. Surita, J. (2000). Antimicrobial susceptibility surveillance in Ecuador En: Salvatierra, G.R. & Benguigui, Y. Antimicrobial resistance in America: Magnitude and Containment of problem. Washington, DC: Panamerican Health Organization.
34. Thelfall, E. J. (1986). Reportt on work carrie out on *Salmonella Enteritidis* fago 6a. Informe técnico.
35. Valdés, D.V.M. (2001). Enterobacterias. En: Llop Hernandez A, Valdes-Dapena Vivanco M.M., Zuazo Silvia, J.L. Microbiología y parasitología médica. Ciudad de la Habana: Ciencias Médicas.
36. Ward, I. R., Desa. J. D. & Rowe, B. (1987). A phage-typing scheme for *Salmonella Enteritidis*. *Epidemiol Infect*, 99, 291-294.
37. Welsh, J. & MacClelland, M. (1990). Finger printing genomes using PCR with arbitrary Primer. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213-7217.
38. Welss, J. & Mc Cielland, M. (1991). Genomic finger printing using arbitrarily primer PCR and matrix of pairwise combinations of pimers. *Nuceic Acids Res*, 19, 5275-5279.
39. Willians, J.G.K., Kubelyk, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primer are useful as genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18. 6531-6535.

email: rigobertofd@fts.vcl.sld.cu