

Variabilidad genética de aislamientos de *Salmonella typhimurium* (grupo B) obtenidos de hígados de pollo destinados para consumo humano

Genetic diversity of *Salmonella typhimurium* (Group B) isolates from chicken livers intended for human consumption

Martín Talavera Rojas^a, Nydia Edith Reyes Rodríguez^a, Salvador Lagunas Bernabé^a, Pomposo Fernández Rosas^a, Vladimir Morales Erasto^a, Edgardo Soriano Vargas E.^a

RESUMEN

Se determinó la frecuencia de aislamientos de *Salmonella* spp en hígados de pollo para venta, en cuatro mercados del área metropolitana de la ciudad de Toluca, México. El aislamiento bacteriológico se realizó de acuerdo a la norma NOM-114-SSA1-1994 para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Se realizó la prueba de ERIC-PCR para determinar la variedad genética de las cepas de *Salmonella* aisladas. De un total de 520 muestras incluidas en el estudio, 7 (1.34 %) resultaron positivas a *Salmonella* serogrupo B (*typhimurim*). En el ERIC-PCR se observaron cuatro perfiles, encontrando similitud entre cepas de diferentes mercados, lo cual podría indicar que el manejo que se les da a las canales y vísceras es de suma importancia, además que la presencia en hígados de pollo para consumo humano debe ser considerado como una fuente importante de infección, ya que cualquier serovariedad de esta bacteria representa un potencial de infección para el humano.

PALABRAS CLAVE: Hígados de pollo, *Salmonella*, Variabilidad-genética.

ABSTRACT

Frequency of *Salmonella* spp in chicken livers for sale, in four markets of the metropolitan area of Toluca, Mexico, was determined. The bacteriological isolation was carried out according to the Norma Oficial Mexicana-114-SSA1-1994 for *Salmonella* assessment in food. The ERIC-PCR test was carried out to determine genetic diversity of isolated *Salmonella* strains. Out of 520 samples included in the study, seven (1.34 %) were positive to *Salmonella* serotype B (*typhimurium*). Four profiles were observed in ERIC-PCR, finding similarity among strains from different markets, which may indicate that management of carcasses and viscera is of great importance, also that presence of chicken liver for human consumption must be considered as an important source of infection, since any serotype of this bacterium represents a potential infection for humans.

KEY WORDS: Chicken livers, *Salmonella*, Genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

Desde la década de los ochentas, la incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en el mundo industrializado y ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países^(1,2,3). En México se han encontrado porcentajes elevados de contaminación en la carne

INTRODUCTION

Since the 80s, food origin salmonellosis incidence has considerably increased in the industrial world and has reached epidemic proportions in several countries^(1,2,3). In Mexico, a high percentage of contamination in chicken and pork meat (21.3 to 36.4 %) has been found⁽⁴⁾. In the United States of

Recibido el 26 de noviembre de 2010. Aceptado el 11 de marzo de 2011.

^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. Carretera Panamericana Toluca-Atlaconulco km 15.5, Toluca, México. 50200. Teléfono/Fax: 722 2965555. mtr0035@yahoo.com.mx. Correspondencia al primer autor.

de pollo y cerdo (21.3 a 36.4 %)⁽⁴⁾. En Estados Unidos durante el 2007 se presentaron 65 casos de *S. montevideo* asociados a la exposición de pollos vivos y tiendas de alimento⁽⁵⁾. Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en la práctica del manejo de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos^(4,6).

La salmonelosis es una infección de importancia en salud animal y en salud pública, debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en países que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene adecuados⁽²⁾. Al hablar de *Salmonella* como posible riesgo de infección por el consumo de productos de origen animal, se debe hacer referencia única y exclusivamente a *S. typhimurium* y *S. enteritidis*^(1,5-11), las cuales causan la mayoría de los brotes que afectan a personas, y constituyen uno de los principales problemas en muchos países. En humanos afecta a todos los grupos de edades, con mayor frecuencia en personas menores de cinco y mayores de 60 años^(2,7).

En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia, que les permite conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella* y otros patógenos causales de diarrea, así como el impacto de cada una de éstas en la morbilidad y mortalidad de la población^(12,13). En México no se cuenta con estadísticas nacionales de infecciones por *Salmonella* a causa de la falta de un sistema de vigilancia, lo que se impide se puedan identificar las principales serovariedades en las diferentes clases de alimentos, así como el riesgo que existe para la salud de los seres humanos. Esta información es indispensable para establecer las intervenciones necesarias para disminuir la morbilidad y mortalidad por las infecciones causadas por *Salmonella*⁽¹⁴⁾. En el valle de Toluca en un estudio transversal realizado en mataderos de aves, se observó una frecuencia de aislamiento de 3.5 % (3/85) obtenidas a partir de piel (1/85) y ciegos (2/85)⁽¹⁵⁾ y en rastros municipales de cerdos de 26.9 %⁽⁶⁾.

America, during 2007, there were 65 cases of *Salmonella* serotype montevideo, associated with the exposure of live chickens and food stores⁽⁵⁾. This increase is the result of a combination of factors related to industrialization development in all food production phases, changes in food management, as well as storage, distribution and preparation of the same^(4,6).

Salmonellosis is an infection of great importance for animal and public health, due to the socioeconomic impact on developed countries as well as on countries that have not reached adequate health and hygiene conditions⁽²⁾. Considering possible risk of *Salmonella* infection by consumption of foods of animal origin, it must be referred only and exclusively to *Salmonella* serotype typhimurium and *Salmonella* serotype enteritidis^(1,5-11) that cause the majority of outbreaks affecting people, and constitute one of the main problems in several countries. It affects all human ages, it is more frequently observed in people younger than 5 and older than 60^(2,7).

Surveillance systems have been established in industrialized countries that allow them to know with relative certainty, the incidence of infections caused by *Salmonella* and other pathogens that cause diarrhea, as well as the impact on each one of these in population morbidity and mortality^(12,13). In Mexico there are no national statistics of *Salmonella* infections due to the lack of a surveillance system, which hinders the identification of the main serotypes in different types of foods, as well as human health risk. This information is essential for establishing the necessary interventions to decrease morbidity and mortality due to *Salmonella* infections⁽¹⁴⁾. In the valley of Toluca, Mexico, a transversal study carried out in bird slaughterhouses showed an isolation frequency of 3.5 % (3/85) obtained from skin (1/85) and ceca (2/85)⁽¹⁵⁾ and 26.9 % in pig slaughterhouses located in municipalities⁽⁶⁾.

During the last years, new molecular typification techniques have been developed based on polymerase chain reaction (PCR). The ERIC-PCR (amplification of enterobacterial repetitive intergenic consensus),

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias), es una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gram negativas. Esta técnica está basada en la existencia de un elemento de ADN intergénico repetido a lo largo del genoma de muchas bacterias. Las secuencias de ERIC son de 126 pb de largo y parecen estar restringidas a regiones del genoma bacteriano, en regiones intergénicas de operones policistrónicos. Una secuencia consenso de estos elementos repetitivos fue usada para diseñar primers que han sido utilizados en muchas especies bacterianas desde entonces. Estos primers se usan para amplificar por PCR, fragmentos del genoma entre cada elemento repetitivo, generando un patrón diferente para cada cepa. Las diferentes bandas obtenidas son separadas por electroforesis en agarosa y visualizadas bajo luz ultravioleta después de realizar la tinción del ADN⁽¹⁶⁾. El objetivo de este estudio fue conocer la diversidad genética de *Salmonella* spp en aislamientos obtenidos en hígados de pollo destinados al consumo humano, expedidos en los mercados públicos de la ciudad de Toluca, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El tamaño de muestras se obtuvo utilizando la fórmula para poblaciones infinitas ($n = Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q / d^2$); donde: $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$ (nivel de confianza de 95%), $p =$ proporción esperada (3.5 % = 0.035)⁽¹²⁾, $q = 1 - p$ (1-0.035 = 0.965) y $d^2 = (0.05)^2$ ⁽¹⁷⁾. Una vez que se determinó el tamaño total de la muestra (520), se ponderaron de forma proporcional al número de locales establecidos en los cuatro mercados de la ciudad: el mercado J = 18 locales, S = 20 locales, M = 8 locales y H = 6 locales, de los cuales se obtuvieron 10 muestras de hígado de pollo por local.

Las muestras se tomaron aleatoriamente y conservadas en refrigeración (4 °C); posteriormente se transportaron al Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) en el Área de Bacteriología; de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

is a typification method utilized for studying the clonal relation in several gram-negative bacteria. This technique is based on the existence of repetitive intergenic DNA sequences throughout the genome of many bacteria. The sequences of ERIC are 126 bp long and appear to be restricted to transcribe regions of the bacterial genome, in intergenic regions of polycistronic operons. A consensus sequence of these repetitive elements was used to design primers that have been utilized in many bacterial species since then. These primers are used to amplify by PCR, genome fragments between each repetitive element, generating a different pattern for each strain. The different bands are separated by agarose gel electrophoresis and observed under ultraviolet light after DNA staining⁽¹⁶⁾. The aim of this study was to know the genetic diversity of *Salmonella* spp in isolates obtained from chicken livers destined for human consumption, sold in public markets in the city of Toluca, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

The size of samples was obtained utilizing the infinite population formula ($n = Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q / d^2$); where: $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$ (level of confidence 95%), $p =$ expected proportion (3.5 % = 0.035)⁽¹²⁾, $q = 1 - p$ (1-0.035 = 0.965) and $d^2 = (0.05)^2$ ⁽¹⁷⁾. Once the sample total size was determined (520), it was pondered proportionally to the number of business premises in the four city markets: market J = 18 business premises, S = 20 business premises, M = 8 business premises and H = 6 business premises, of which 10 samples were obtained from chicken liver per unit.

Samples were randomly obtained and refrigerated (4 °C); subsequently, they were transported to the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) in the Area of Bacteriology of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Autónoma del Estado de México.

The bacteriological isolation and biochemical identification were carried out according to the Norma Oficial Mexicana-114-SSA1-1994⁽¹⁸⁾. *Salmonella* isolates were seeded in blood agar-based (BAB) incubated at 37 °C for 18 to 24 h. A

El aislamiento bacteriológico e identificación bioquímica se realizaron de acuerdo a la Norma oficial Mexicana-114-SSA1-1994⁽¹⁸⁾. Los aislamientos de *Salmonella* fueron sembrados en placas de agar base sangre (BAB) incubados a 37 °C durante 18 a 24 h. Se preparó una suspensión densa de crecimiento en la placa de BBA en 0.5 ml de solución salina. La concentración del antígeno fue aproximadamente igual a la turbidez del tubo 3 del nefelómetro de Mac Farland; y se probaron con los cinco antiseros (sero- grupos B, C1, C2, D y E) más frecuentemente encontrados en México⁽⁶⁾.

La extracción de ADN se realizó utilizando un Kit comercial Genomic DNA Purification, el cual a partir de 2×10^9 UFC, se obtuvo un rendimiento de 30 ng en 100 μ l (MBI Fermentas Inc.).

Para la prueba ERIC-PCR, los iniciadores utilizados fueron ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATT CAC- 3') y ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGG GTGAGCG-3')⁽¹⁹⁾. La reacción final fue 50 μ l el cual contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de Dntp (c/u), 0.5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA), y 5 ng de ADN. Los ciclos de amplificación usados fueron: una desnaturalización inicial 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (1 min a 94 °C), hibridación (1 min a 52 °C), extensión (6 min a 74 °C) y extensión final a 74 °C durante 6 min⁽¹⁶⁾ (Termociclador de gradientes serie TC-5000). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, se utilizó un marcador de peso molecular de 100-2072 pb (Invitrogen), las condiciones de la electroforesis fueron 80 V durante 1 h en Tris-Borato-EDTA con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml), se visualizó y capturó la imagen con un foto-documentador (UV Transilluminator UVP Mod. M-20E y Kodak digital-science Electrophoresis documentation and analysis system 120).

Los resultados fueron evaluados por medio de la prueba de Ji cuadrada⁽¹⁷⁾. Para el análisis de patrones de bandas se elaboró un registro de patrones de bandeo, y a cada banda se le asignó en una matriz binaria como ausente "0" o presente "1". Para conocer las relaciones genéticas y la

growth-inhibited dense suspension was prepared in the BAB glass plate in 0.5 ml saline solution. The antigen concentration was approximately equal to turbidity of McFarland nephelometer tube 3, and they were tested with the five antisera (serogroups B, C1, C2, D and E) more frequently found in Mexico⁽⁶⁾.

The DNA extraction was carried out using the Genomic DNA Purification Kit wherefrom 2×10^9 CFU, a yield of 30 ng in 100 μ l was obtained (MBI Fermentas Inc.).

The primers used for ERIC-PCR were: ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATT CAC-3') and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGT GAGCG-3')⁽¹⁹⁾. The final reaction was 50 μ l, which contained 10 mM of Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM of KCl, 3 mM of MgCl₂, 0.2 mM of Dntp (each), 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 5 ng of DNA. The amplification cycles were: an initial denaturalization 94 °C per 5 min, followed by 35 denaturalization cycles (1 min at 94 °C), hybridization (1 min at 52 °C), extension (6 min at 74 °C) and final extension at 74 °C for 6 min⁽¹⁶⁾ (Gradient Thermal Cycler serial No. TC-5000). The amplification products were separated by agarose gel electrophoresis at 1%, a molecular weight marker of 100-2072 bp (Invitrogen) was used and electrophoresis conditions were 80 V for 1 h in Tris-Borate-EDTA with ethyl bromide (0.5 μ g/ml), the image was observed and captured by means of a photo-documentation (UV Transilluminator UVP Mod. M-20E and Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 120).

The results were evaluated by chi-squared test⁽¹⁷⁾. For the banding pattern analysis, a banding pattern record was elaborated, and each band was assigned in a binary matrix as absent "0" or present "1". In order to know the genetic relations and clusters of isolates, a dendrogram was made using POPGENE program (ver. 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta and Center for International Forestry Research, AB, Edmonton, Canada^(20,21)), using the UPGMA method (NEIGHBOR modified process of PHYLIP,

agrupación de los aislamientos se hizo un dendograma usando el programa POPGENE (ver. 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for international Forestry Research, AB, Edmonton, Canada)^(20,21), usando el método UPGMA (Modificado del procedimiento NEIGHBOR de la versión 3.5 de PHYLIP)⁽¹⁸⁾, basado en la matriz de distancias genéticas de Nei⁽²²⁾.

RESULTADOS

De un total de 520 muestras (hígado de pollo), se obtuvieron 7 (1.34 %) aislamientos de *Salmonella* serogrupo B (*typhimurim*). El porcentaje de aislamiento para cada Mercado fue: J= 0.56, S= 0.5, M= 2.5 y H= 5.0 % ($P > 0.05$; Cuadro 1). En el ERIC-PCR, se identificaron cuatro patrones de banda: el primer patrón es del mercado M-A y S-A con un 86 % de similitud, el segundo patrón es H-B y H-C con el 100 % de similitud, el tercer patrón es M-B y H-A el cual tiene el 100 % de similitud, y el ultimo patrón es J-A (Cuadro 2, Figura 1), y se muestra en el dendograma de las cepas de *Salmonella typhimurium* aisladas (Figura 2).

DISCUSIÓN

La salmonelosis es una enfermedad fundamentalmente de origen alimentario, donde la fuente más frecuente de infección son los alimentos

version 3.5)⁽¹⁸⁾, based on the matrix of Nei's genetic distances⁽²²⁾.

RESULTS

From a total of 520 samples of chicken liver, 7 (1.34 %) *Salmonella* serogroup B (*typhimurium*) isolates were obtained. The isolation percentage for each market was: J=0.56, S=0.5, M=2.5 and H=5.0 % ($P > 0.05$; Table 1). Four banding patterns were identified by means of ERIC-PCR: the first pattern belongs to market M-A and S-A with 86 % of similarity, the second pattern is H-B and H-C with 100 % of similarity, the third pattern is M-B and H-A with 100 % of similarity,

Cuadro 1. Frecuencia de aislamiento de *Salmonella typhimurium* (grupo B) en mercados municipales

Table 1. Frequency of *Salmonella typhimurium* (group B) isolates in municipal markets

Market	Number of samples	Isolation frequency n	%
J	180	1	0.56
S	200	1	0.50
M	80	2	2.50
H	60	3	5.00
Total	520	7	1.35

J= Benito Juarez ; S= 16 de septiembre; M= Jose Maria Morelos; H= Miguel Hidalgo.

Cuadro 2. Estimación de las distancias genéticas (debajo de la diagonal) y similitud genética (encima de la diagonal), según la fórmula de Nei⁽²²⁾, para los siete aislamientos de *Salmonella typhimurium*

Table 2. Estimation of genetic distances (under the diagonal) and genetic similarity (above the diagonal), according to Nei's formula⁽²²⁾, for the seven *Salmonella typhimurium* isolates

	1	2	3	4	5	6	7
1	*****	0.3333	0.3333	0.7333	0.7333	0.6000	0.8667
2	1.0986	*****	1.0000	0.4667	0.4667	0.7333	0.4667
3	1.0986	0.0000	*****	0.4667	0.4667	0.7333	0.4667
4	0.3102	0.7621	0.7621	*****	1.0000	0.6000	0.8667
5	0.3102	0.7621	0.7621	0.0000	*****	0.6000	0.8667
6	0.5108	0.3102	0.3102	0.5108	0.5108	*****	0.6000
7	0.1431	0.7621	0.7621	0.1431	0.1431	0.5108	*****

contaminados. A pesar de todos los controles que se han puesto en práctica, las infecciones por *Salmonella* debidas al consumo de alimentos contaminados continúa siendo un problema serio, con millones de casos que ocurren anualmente en todo el mundo, provocando grandes pérdidas económicas junto con otro tipo de bacterias patógenas como *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*.

Durante las operaciones de sacrificio se producen fenómenos de inter-contaminación, lo que provoca una proliferación de patógenos en las canales inicialmente sanas. Así, la carne y vísceras de pollo son las responsables de numerosas intoxicaciones alimentarias en México(2,6). La contaminación inicial de la piel es de especial importancia, pues se propaga de la piel a la carne durante el despiece y las transformaciones sucesivas del producto, por lo que la vigilancia de *Salmonella* en todas las etapas de la cadena de procesamiento de los alimentos constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonelosis transmitida por alimentos y en el desarrollo e implementación de estrategias eficientes de control de la misma, ya que es una zoonosis de distribución mundial(14). Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* en México pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60 al 80 % de los casos son esporádicos(2).

La frecuencia obtenida (1.54 %) en este trabajo se encuentra por debajo de lo reportado por Zepeda(14), quien encontró una prevalencia de 3.5 % en la misma zona de muestreo pero realizado en rastro. Otros países reportan 4.7 % en Zambia(23), España 11.3 %(24), Colombia 16.2 %(24), Francia 16.7 %(24), Brasil 20 %(3), Dinamarca 23 %(24), Etiopía 23.6 %(26), Venezuela 32.5 %(27), Estados Unidos 38 % (9), Japón 94.1 %(28). En la ciudad de Toluca sólo se ha realizado un estudio y el serovar encontrado fue *typhimurium*, aunque en estudios anteriormente realizados en México los serotipos con mayor frecuencia corresponden a *Salmonella enteritidis* y *Salmonella derby*(14). En otros países se ha observado *Salmonella*

Figura 1. Dendograma de siete aislamientos de *Salmonella typhimurium* obtenido con base en la distancia genética de Nei(22), método UPGMA

Figure 1. Dendogram of seven *Salmonella Typhimurium* isolates obtained based on Nei's genetic distance(22), method UPGMA

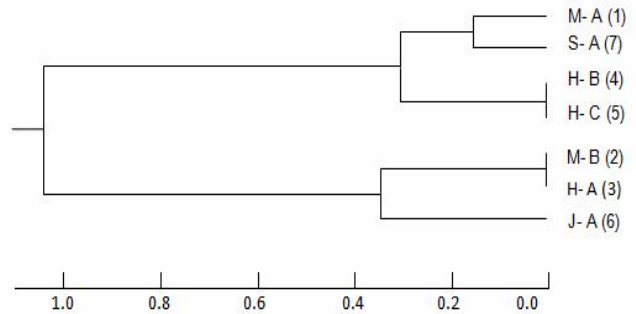
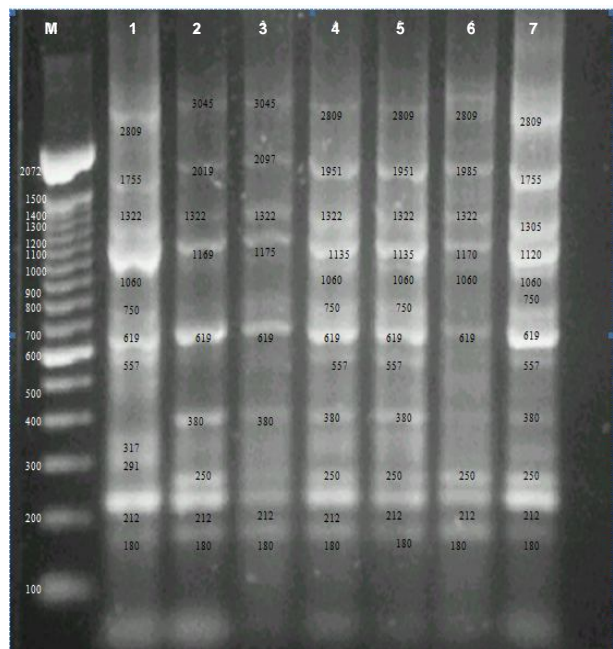


Figura 2. Perfiles de ERIC- PCR obtenidos a partir de siete aislamientos de *Salmonella typhimurium*

Figure 2. ERIC- PCR profiles obtained from seven *Salmonella typhimurium* isolates



Lanes: M) molecular weight marker of 100-2072 bp. 1) isolation from market M-A. 2) isolation from market M-B. 3) isolation from market H-A. 4) isolation from market H-B. 5) isolation from market H-C. 6) isolation from market J-A. 7) isolation from market J-A.

typhimurium en Brasil y Venezuela^(3,27), *Salmonella enteritidis* en Japón y Zambia^(23,28), *Salmonella heidelberg* en Estados Unidos⁽⁹⁾, *Salmonella* spp en Camerún, España, Dinamarca y Francia⁽²⁴⁾, *Salmonella anatum* en Colombia⁽²⁵⁾, y *Salmonella saintpaul* en Etiopía⁽²⁶⁾. Sin embargo se debe de considerar que el tipo de muestreo que se realizó en el presente estudio fue con una duración de tres meses, realizándose el muestreo por mercado; los otros estudios realizados como en Zambia el periodo de observación no se reporta⁽²⁰⁾, en Colombia y Brasil se realizó durante un año^(3,6), en Etiopía en el periodo 1997-2002⁽²⁶⁾, en Venezuela se realizaron en toda una década⁽²⁷⁾, en Estados Unidos tuvieron una duración de dos años⁽⁹⁾, en Japón de tres años⁽²⁸⁾, y Dinamarca, España y Francia de recopilaciones de informes de la OMS durante 1995⁽²⁴⁾. Esto es importante señalarlo, ya que como se puede observar, la duración del muestreo y el tamaño de la muestra van en relación directa con el porcentaje de positividad, ya que entre más tiempo pasa, se puede obtener un mayor número de cepas.

Otro factor predisponente es el manejo desde la matanza hasta la venta al consumidor. La frecuencia de *Salmonella typhimurium* para cada mercado fue diferente debido al número de locales muestreados, pero se puede observar que uno de los mercados con menor número de locales tiene un porcentaje mayor de positividad, como es el mercado H. En los resultados obtenidos por medio de ERIC-PCR nos indica la similitud entre aislamientos del mercado M como el mercado H y S, lo que podría sugerir que posiblemente el distribuidor de los mercados sea el mismo, ya que la toma de muestras para cada mercado se realizó en periodos distintos; al contrario del Mercado J que se encontró en un perfil diferente, pero cada una de las cepas se encuentran con cierto porcentaje de similitud y distancias genéticas cercanas; esto nos indica que la procedencia y el manejo de las canales tiene mucha importancia.

Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante otras técnicas, y se caracteriza por su

and the last pattern is J-A (Table 2, Figure 1), and it is depicted in the dendrogram of *Salmonella typhimurium* isolated strains (Figure 2).

DISCUSSION

Salmonellosis is basically a food origin disease, where the most frequent source of infection is contaminated food. In spite of all types of control put in practice, infections by *Salmonella* due to consumption of contaminated foods continues to be a serious problem, with thousands of cases that occur annually in the whole world, causing great economic losses joined with other types of pathogen bacteria, such as: *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*.

During the slaughtering process, phenomena of inter-contamination are generated, which causes proliferation of pathogens in initially healthy carcasses. Thus, chicken meat and viscera are responsible for great number of food intoxications in Mexico^(2,6). The initial contamination of the skin is of main importance, since it propagates to the meat during quartering and further transformation of the product, for which *Salmonella* surveillance in all stages of the processing food chain constitute an important element in epidemiology research of salmonellosis transmitted by foods and in the development and implementation of efficacious strategies for its control, since it is a worldwide zoonosis⁽¹⁴⁾. Epidemiologically, *Salmonella* infections in Mexico may cause small outbreaks in the population in general; however, 60 to 80 % are sporadic cases⁽²⁾.

The frequency obtained (1.54 %) in this study is lower than the reported by Zepeda⁽¹⁴⁾, who found a prevalence of 3.5 % in the same area of sampling but carried out in slaughterhouses. Other countries report 4.7 % in Zambia⁽²³⁾, 11.3 % in Spain⁽²⁴⁾, 16.2 % in Colombia⁽²⁴⁾, 16.7 % in France⁽²⁴⁾, 20 % in Brazil⁽³⁾, 23 % in Denmark⁽²⁴⁾, 23.6 % in Ethiopia⁽²⁶⁾, 32.5% in Venezuela⁽²⁷⁾, 38 % in the United States of America⁽⁹⁾ and 94.1 % in Japan⁽²⁸⁾. In the city of Toluca only one study has been done and the serotype found was *typhimurium*, although in previous studies carried out in Mexico,

simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo costo⁽²⁹⁾. Con esto podemos concluir que la salmonelosis repercute fuertemente en la economía de los países en los que se presenta. Las pérdidas económicas producidas pueden resumirse como sigue: en salud pública por ausentismo laboral, así como los gastos en atención médica; en salud animal, por efecto de la enfermedad y mortalidad animal, lo cual incide en la eficiencia de conversión, costos de personal y medicamentos; en la industria de alimentos, se producen altas pérdidas por destrucción de productos contaminados, disminución de la confianza del consumidor, sanciones sanitarias, además la presencia de *Salmonella* spp. en las materias primas ocasiona un aumento de los gastos de la industria con el objeto de obtener un producto final libre de esta bacteria^(2,6,14,26).

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El número de aislamientos resultó ser bajo, pero estos resultados deben de ser tomados en cuenta desde el punto de vista epidemiológico, ya que la presencia de cualquier serovar de *Salmonella* representa un riesgo potencial como fuente de infección al humano; además de que es de los pocos estudios que se han realizado directamente de expendios de pollos de abasto en mercados.

LITERATURA CITADA

1. González FT, Rojas HRA. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud Publica Méx 2005;(47):388-390.
2. 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 Méx 2000;(42):490-495.
3. Silva EN, Duarte A. *Salmonella enteritidis* em aves: retrospectiva do Brasil. Rev Bras Cienc Avic 2002;(4):85-100.
4. Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-García MT, León V, Vázquez G, Figueroa G, López E, *et al.* Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp in Mexico. Emerging Infec Dis 2008;(14):429-435.
5. Davies R, Breslin M, Corry JE, Hudson W, Allen VM. Observations on the distribution and control of *Salmonella*

the most frequently found serotypes correspond to *Salmonella enteritidis* and *Salmonella derby*⁽¹⁴⁾. In other countries, the following have been observed: *Salmonella typhimurium* in Brazil and Venezuela^(3,27), *Salmonella enteritidis* in Japan and Zambia^(23,28), *Salmonella* Heidelberg in the United States of America⁽⁹⁾, *Salmonella* spp in Cameroon, Spain, Denmark and France⁽²⁴⁾, *Salmonella anatum* in Colombia⁽²⁵⁾, and *Salmonella* Saintpaul in Ethiopia⁽²⁶⁾. However, it must be considered that the type of sampling carried out in this study lasted 3 mo and sampling was done per market; there is no observation period reported on other studies, as is the case of Zambia⁽²⁰⁾. In Colombia and Brazil it was carried out for one year^(3,6); in Ethiopia it lasted from 1997 to 2002⁽²⁶⁾; in Venezuela it took a decade⁽²⁷⁾; in the United States of America it lasted 2 yr⁽⁹⁾; in Japan, 3 yr⁽²⁸⁾; and in Denmark, Spain and France, according to the WHO, it was carried out in 1995⁽²⁴⁾. This is important to highlight because, as it can be observed, there is a direct relationship between time sampling period and size of the sample with the positivity rate, since as more time passes the greater number of strains can be obtained.

Another predispose factor is management from slaughtering to retail. The frequency of *Salmonella typhimurium* for each market was different due to the number of sampled business premises, but it can be observed that one of the markets with smaller number of business premises has greater positivity rate, as market H. The results obtained by ERIC-PCR show the similarity between isolations of market M, and market H and S, which could suggest that probably the market distributor is the same, since the obtainment of samples from each market was carried out in different periods of time; contrary to market J that was found with a different profile, but each strain has a certain percent similarity and small genetic distances; this indicates that the provenance and carcass management have great importance.

The DNA patterns obtained with ERIC-PCR are usually less complex than the ones generated by other techniques. This method is characterized by

- species in two integrated broiler companies. *Vet Rec* 2001;(149):227-232.
6. Talavera RM, Vázquez CJC, Flores BR, Robles GF, Lagunas BS, Alonso FMU. *GyrA* gene mutations and fluoroquinolone resistance in *Salmonella* isolates from pigs in central Mexico. *Vet Rec* 2007;(160):630-632.
 7. Barrow AP. *Salmonella* control past, present and future. *Avian Pathol* 1993;(22):651-669.
 8. Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodríguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *J Clin Microbiol* 2004;(42):1155-1162.
 9. Byrd JA, DeLoach JR, Corrier DE, Nisbet DJ, Stanker LH. Evaluation of *Salmonella* serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. *Avian Dis* 1999;(43):39-47.
 10. Castellán DM, Kinde H, Kass PH, Cutler G, Breitmeyer RE, Bell DD, Ernst RA, et al. Descriptive study of California egg layer premises and analysis of risk factors for *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* as characterized by manure drag swabs. *Avian Dis* 2004;(48):550-561.
 11. Gast KR, Guard-Bouldin J, Holt SP. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella heidelberg* and *Salmonella enteritidis*. *Avian Dis* 2004;(48):863-969.
 12. De Jong BK, Ekdahl. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. *BMC Public Health* 2006;10:6:4.
 13. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;(5):607-625.
 14. Zepeda EVL. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Lat Microbiol* 2006;48:2:121-125.
 15. Frecuencia de aislamiento de *Salmonella* spp durante el proceso de matanza del pollo de engorda en mataderos de la ciudad de Toluca, Estado de México. [tesis licenciatura]. Toluca, México, Universidad Autónoma del Estado de México; 1994.
 16. Soriano VE, Téllez G, Hargis M, Newberry L, Salgado-Miranda C, Vázquez C. Typing of *Haemophilus paragallinarum* Strains by Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Based Polymerase Chain Reaction. 2004;(48):890-895.
 17. Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. México: Ed. Limusa; 2006.
 18. NOM (Norma Oficial Mexicana)-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
 19. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;(19):6823-6831.
 20. Felsenstein J. *Phylogeny Manual*, version 3.3. University Herbarium, University of California, Berkeley, CA, USA. 1990.

its simplicity (it does not need use of restriction enzymes or special electrophoresis techniques), rapidness (less than 24 h) and its relative low cost⁽²⁹⁾.

It can be concluded that economy rebounds strongly in countries affected by *Salmonella*. The economic losses can be summarized as follows: in regard to public health for absenteeism, as well as medical attention expenses; in animal health for effect on sickness and mortality, which impinges on conversion efficiency, and personnel and drug expenses; in food industry, high losses for destruction of contaminated products, decrease in consumer confidence, health sanctions, besides the presence of *Salmonella* spp in raw material causes an increase in industrial expenses with the objective to obtain a final product free from this bacterium^(2,6,14,26).

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The number of isolates resulted low, but these studies must be taken into account from the epidemiological point of view, since the presence of any *Salmonella* serotype represents a potential risk as a source of human infection; besides, it is one of the few studies that have been carried out directly in broiler chicken for sale at retail markets.

End of english version

-
21. Yeh FC, Boyle TJB. Population genetics analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgium J Bot* 1999;(129):157.
 22. Nei M. Genetic distance between populations. *Am Naturalist* 1972;(106):282-283
 23. Hang'ombe BM, Sharma RN, Skjerve E, Tuchili LM. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in pooled table eggs and market-ready chicken carcasses in Zambia. *Avian Dis* 1999;(43):597-599.
 24. Uribe C, Suárez MC. Salmonellosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colomb Med* 2006;(37):1-9.
 25. Espinal MP, Prieto SD, Otero JV, Máttar VS. Presencia del gen de invasividad INV A en cepas de *Salmonella* spp. aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Rev Cubana Salud Pública* 2006;(32):1-6.

26. Molla B, Alemayehu D, Salah W. Sources and distribution of *Salmonella* serotypes isolated from food animals, slaughterhouse personnel and retail meat products in Ethiopia: 1997-2002. *Ethiop J Health Dev* 2003;(17):63-70.
27. Infante DM, Noguera C, León JA, Herrera JA, Valdillo P. Aislamiento de *Salmonellas* en aves y pollos beneficiados. *C.N.I.A.P.* 1991;(37):1-5.
28. Matsumoto A, Miyama M, Murakami S. Comparison of *Salmonella* isolation rates in different types of egg-layer hen houses in Chiba, Japan. *Avian Dis* 2001;(45):195-200.
29. Wei G, Pan L, Du H, Chen J, Zhao L. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. *J Microbiol Methods* 2004;59:91-108.