

## Nuevos Perfiles Genéticos de *Salmonella* Enteritidis identificados en Luján, Argentina

Ricardo J. Anselmo\* y Hebe A. Barrios

Univ. Nacional de Luján, Depto. de Ciencias Básicas, Casilla 221, (6700) Luján, Buenos Aires-Argentina (e-mail: anselmoricardoj@msn.com)

\* autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

*Recibido Sep. 12, 2011; Aceptado Nov. 08, 2011; Versión final recibida Ene. 10, 2012*

---

### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue aislar y seleccionar bacteriófagos salvajes de aguas del río Luján en Argentina, contra *Salmonella* Enteritidis, fagotipificar 86 cepas de esta serovariedad y evaluar los perfiles genéticos de representantes de los grupos de especificidad surgidos. La concentración de bacteriófagos de agua de río se realizó mediante el hisopo de Moore con 60 minutos de exposición a la corriente de agua. El aislamiento y purificación se efectuó por la técnica de doble capa de agar. Al fagotipificar los 86 aislamientos por metodología estandarizada surgieron cuatro grupos de especificidad. La subtipificación por electroforesis en campo pulsado realizada a un representante de cada grupo, estableció que dos grupos correspondieron al fagotipo PT4, predominante en Latinoamérica. Los dos grupos restantes presentaron dos perfiles genéticos que no se habían encontrado antes en la base de datos de la Red PulseNet de América Latina y el Caribe.

*Palabras clave: perfiles genéticos, Salmonella Enteritidis, bacteriófagos salvajes, fagotipificación*

## New Genetic Profiles of *Salmonella* Enteritidis identified in Lujan, Argentina

### Abstract

The aim of this study was isolating and selecting wild bacteriophages from waters of the Lujan river in Argentina, against *Salmonella* Enteritidis, phage typing 86 strains of this serovariety and evaluating the genetic profiles of samples from the emerged specific groups. Bacteriophages concentration of river water was performed using the Moore swab with 60 minutes of exposure to water flow. Isolation and purification was carried out by the technique of double-layer agar. Eighty six isolates were phage-typed by standardized methodology and four groups of specificity appeared. Subtyping by pulsed field gel electrophoresis conducted on one sample of each group, establishing that two phage group corresponded to PT4 phagotype, which is the most common in Latin America. The other two groups had two genetic profiles that were not previously found in the database Latin America and the Caribbean PulseNet Network

*Keywords: genetic profiles, Salmonella Enteritidis, wild bacteriophages, phage typing*

## INTRODUCCIÓN

La infección debida a serovariedades no tíficas de *Salmonella* spp. representa un problema de salud pública a nivel mundial, que se ha agudizado con la apertura económica y la globalización, debido a que el consumo de carne de pollo, huevos y subproductos se ha incrementado en todo el mundo, existe sustancialmente un mayor riesgo de infección. “Se ha demostrado en la literatura (Betancor et al., 2010; Braden, 2006) que casi todas las canales de aves pueden estar infectadas; el número de microorganismos puede ser bajo en un principio y aumentar como resultado del manejo. Los huevos se pueden contaminar por transmisión vertical (transovárica), durante la postura o durante la manipulación o el almacenamiento. La infección en los seres humanos se adquiere por consumo de pollo, huevo crudo o parcialmente cocido, o alimentos preparados con estos”.

“Un dramático incremento de la salmonelosis en humanos producida específicamente por *Salmonella* Enteritidis, ocurrió a finales de la década de 1980 y principios de la década de 1990. En 1995 del total de informes recopilados por los sistemas de vigilancia de los países miembros de la Organización Mundial de la Salud se encontró que 76.1% de los aislamientos correspondieron a la *Salmonella* serovariedad Enteritidis, Typhimurium, y Typhi. *S. Enteritidis* fue más frecuente en 35 países seguido por *S. Typhi* (12 países) y *S. Typhimurium* (8 países). Las principales serovariedades aisladas globalmente para 1995 incluyeron Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Infantis, Newport, Typhi, Agona, Virchow y Heidelberg. Los aislamientos de *S. Enteritidis* se aumentaron de 25.6% en 1990 a 36.5% para el año de 1995” (Herikstad et al., 2002).

En la Argentina, según el Boletín Epidemiológico Periódico (2006) “las 5 serovariedades prevalentes, en el período 2004-2005 fueron: *S. Enteritidis* (36.0%), *S. Typhimurium* (20.5%), *S. Infantis* (8.7%), *S. Newport* (5.3%) y *S. Agona* (4.9%); siguiendo la misma tendencia que en los años 2002-2003, donde *S. Enteritidis* (30,3 %) ocupó también el primer lugar, seguida por *S. Typhimurium* (12.8%) y *S. Infantis* (11.5 %), mientras que se invirtió el orden de frecuencia con respecto a *S. Agona* (11.3%) y *S. Newport* (6.5%). Entre todos los aislamientos analizados, se identificaron 43 serovariedades, entre las cuales *S. Enteritidis* (36.0%) fue la más ampliamente distribuida y se encontró con mayor frecuencia en la mayoría de las jurisdicciones. *S. Typhimurium* (20.5%) ocupó el primer lugar en Córdoba, fue la segunda serovariedad en Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Mendoza, Río Negro y Santa Fe y se encontró también, en menor frecuencia en otras provincias. Tanto *S. Newport* como *S. Agona* estuvieron distribuidas en el país, en 12 y 11 jurisdicciones respectivamente”.

Las cepas pertenecientes a un mismo serotipo de *Salmonella*, pueden diferenciarse en función de sus patrones de sensibilidad, frente a un grupo seleccionado de bacteriófagos. El fagotipo o lisotipo es de gran valor en el estudio epidemiológico de *Salmonella*, ya que existe un alto porcentaje de correlación entre fagotipo y origen epidémico. “Aunque algunos de los recursos serológicos pueden utilizarse para distinguir cepas de serotipos como Typhimurium, las diferencias se evaluarán con mayor precisión mediante el fagotipado, permitiendo ampliar la información necesaria para establecer posibles relaciones epidemiológicas” (Rabsch et. al., 2002).

“Se ha demostrado en la literatura (Nygård et. al., 2004) que ochenta y seis porciento (10.049) de los aislamientos de *S. Enteritidis* desde 1997 al 2001 fueron fagotipados, aumentando desde 75% en 1997 al 95% en 2001. Los tipos fagos más comunes en este período fueron PT4 y PT1, considerando el 35% y 16% de todos los casos, respectivamente. En los viajeros que vuelven de la mayoría de los países de Europa Occidental, PT4 era el tipo de fago dominante. En Europa Oriental, PT1 era el dominante, y este tipo de fago también era común entre viajeros que vuelven de la Península ibérica. PT8 parecía ser más común entre los viajeros que vuelven de los países europeos centrales”.

La tipificación fágica de aislados nacionales de *S. Enteritidis* es de interés debido a que esta técnica de marcación ha estado restringida a unos pocos países, en su mayor parte desarrollados. Ello ha impedido conocer cuáles poblaciones bacterianas están involucradas en las nuevas zonas

afectadas. Más aún, esta técnica de marcación podría indicar si solo unos pocos fagotipos están asociados con la actual epidemia o si, como se sospecha, varios tipos podrían estar circulando a partir de diferentes fuentes infectantes. Además, “la comparación de aislados clínicos, alimentarios y avícolas podría mostrar la relación epidemiológica de estos. Por último, la comparación de los fagotipos que actualmente circulan con los que se han observado en épocas anteriores podría indicar el posible origen local de la epidemia o su importación del exterior” (Prat et al., 2001).

El objetivo del presente trabajo fue fagotipificar cepas de *Salmonella* Enteritidis de distintos orígenes con bacteriófagos salvajes obtenidos de aguas del río Luján; establecer grupos de especificidad entre ambos y caracterizar genéticamente por electroforesis en campo pulsado cepas de *S. Enteritidis* representantes de cada grupo de especificidad.

La elección de la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis) para estudiar los perfiles genéticos de las cepas de *Salmonella* Enteritidis a analizar surgió debido a que es el “método habitualmente utilizado por la Red PulseNet de Latinoamérica, Caribe y Europa; a fin de lograr resultados comparables entre sí” (Peters et al., 2007).

“El sistema utiliza 3 sets de electrodos distribuidos hexagonalmente alrededor del gel, que aplican corriente primero desde uno de los sets de electrodos, luego desde el segundo en un corto periodo de tiempo (pulso) y luego desde el tercero. Esto causa que el DNA se mueva en el gel hacia adelante y hacia atrás consecutivamente, aumentando el poder de resolución de la electroforesis y permitiendo así separar fragmentos de más de 1000 Kb. El genoma bacteriano, que contiene entre 2000 y 5000 Kb, es clivado con enzimas de restricción de bajo número de sitios de corte, generando entre 10 y 30 fragmentos de 10 a 800 Kb que se resuelven en un gel de agarosa sometido a campo pulsado” (Pang et al., 2005).

## **MATERIALES Y METODOS**

De enero a diciembre de 2008 se tomaron un total de 120 muestras de agua, a razón de 10 mensuales. Las mismas se obtuvieron según la técnica del hisopo de Moore con 60 minutos de exposición al curso de agua (Anselmo et al., 1999). Fueron cultivadas dentro de las 2 h del momento de su extracción.

Cuatro puntos de los márgenes del río Luján, provincia de Buenos Aires, Argentina, confinados en los de mayor población urbana fueron los sitios de muestreo elegidos. Surgieron de la evaluación estadística de los resultados obtenidos durante investigaciones anteriores realizadas en el río Luján durante los años 1987 a 1993 donde se obtuvo mayor positividad de muestras así como mayor cantidad de serovariedades detectadas / muestra.

Se seleccionaron un total de 86 cepas de *Salmonella* Enteritidis que procedieron de la colección de cepas de *Salmonella* existentes en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Luján conservadas en caldo nutritivo con 7 g/L de agar-agar a temperatura ambiente. Las mismas han sido aisladas en trabajos anteriores desde 1987 a 2010 e identificadas bioquímica y antigénicamente en su oportunidad.

El conjunto de cepas se hallaba integrado por 23 recuperadas de aguas del río Luján durante el período comprendido de 1987 a 1990, de investigaciones anteriores (Anselmo et al., 1999); 58 de brotes alimentarios (Anselmo et al., 1990; 1991a; 1991b; 1993; Viora et al., 1994) y 5 procedentes de casos esporádicos ocurridos en la ciudad de Luján en 2009 y 2010.

Para el enriquecimiento de bacteriófagos salvajes se seleccionaron las 23 cepas obtenidas del río Luján y 13 representativas de las restantes, un pool de 3 mensuales. A cada uno de los 10 hisopos de Moore se les adicionó 100 mL de Phage Assay Broth (PAB) (Kott, 1966) y 1 mL de cultivo en PAB de cada una de las tres *S. Enteritidis* de 24 h a 35°C y se incubó durante 15 horas a 35°C (McLaughlin y Brook, 2008).

Para la descontaminación se trasvasaron 10 mL del cultivo a un tubo de 15 x 150 mm con tapa a rosca y se añadieron 5 mL de cloroformo. Se agitó enérgicamente 60 segundos y se conservaron a 4°C.

Para confirmar la presencia de bacteriófagos, se aplicó la prueba de la gota (Spot test) del cultivo enriquecido de bacteriófago. Se incubó durante 4 a 15 horas a 35°C efectuando lecturas a intervalos frecuentes (McLaughlin y Brook, 2008). La presencia del bacteriófago se visualizó en la aparición de calvas o placas de lisis.

El aislamiento y purificación de los bacteriófagos se realizó mediante la técnica de doble capa de agar en tres pases sucesivos a fin de tener la certeza que cada placa de lisis se debe a la acción de un sólo bacteriófago (Ward et al., 1987).

De la totalidad de bacteriófagos obtenidos se llegó a un número reducido que cumpliera los criterios de selección basados en estabilidad lítica, reproducibilidad, conservación del Rutine Test Dilution, diferencias en la lectura, tipabilidad y poder discriminatorio.

La tipificación fágica se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por la doctora L. R. Ward del Centro Colaborador de la OMS de Referencia e Investigación de *Salmonella* en Londres. Esta metodología se ha estandarizado y su descripción se ha publicado previamente (Ward et al., 1987).

Entre las cepas de *S. Enteritidis* y los fagos hallados surgieron grupos de especificidad y; una cepa de *S. Enteritidis* representativa de cada grupo fue caracterizada genéticamente utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsado en el Servicio Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán"; donde además se compararon sus perfiles genéticos con la base de datos de la República Argentina y de otros países latinoamericanos.

## **RESULTADOS**

De las 120 muestras de agua, 60 (50%) dieron resultado positivo, aislándose 600 bacteriófagos con morfología diferente.

Estos bacteriófagos obtenidos se sometieron a los criterios de selección ya mencionados, llegándose a un juego de 24 bacteriófagos identificados con números romanos del I al XXIV. Estos se utilizaron para fagotipificar las 86 cepas de *S. Enteritidis*. Se consideró un resultado positivo cuando presentaban alguno de los tipos de lisis siguientes es decir semiconfluente, confluyente, menor que semiconfluente, menor que confluyente y lisis opaca.

En la tabla 1 se muestran los grupos de especificidad surgidos después de la evaluación de los resultados de la fagotipia de *Salmonella* Enteritidis al enfrentarlas con el juego de bacteriófagos y las características morfológicas de las placas de lisis observadas.

De los resultados de la fagotipificación surgieron cuatro grupos de especificidad identificados 1; 2; 3 y 4 como puede apreciarse en la tabla 1.

El grupo de especificidad 1 constituido por 81 cepas provenientes del río y de los 5 brotes investigados, dieron resultado negativo los fagos XV; XXI; XXII; XXIII y XXIV.

El grupo de especificidad 2 abarca dos cepas aisladas de una misma muestra de agua, difiere del grupo de especificidad 1 en que ambas cepas dieron además resultado positivo el fago XV.

El grupo de especificidad 3 constituido por una sola cepa aislada del río, dio negativo solamente los fagos XXII y XXIV. Cabe destacar que dicha cepa fue utilizada como huésped original para detectar el fago XV a partir de aguas del río Luján.

Tabla 1: Constitución de los grupos de especificidad

Fagos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total
I	ol	ol	ol	—	84
II	cl	ol	ol	Cl	86
III	ol	ol	ol	—	84
IV	ol	ol	ol	—	84
V	ol	ol	ol	—	84
VI	ol	ol	ol	—	84
VII	ol	ol	ol	—	84
VIII	cl	cl	cl	—	84
IX	ol	ol	ol	—	84
X	ol	ol	ol	—	84
XI	ol	ol	ol	—	84
XII	<scl	<scl	<scl	—	84
XIII	ol	ol	ol	—	84
XIV	ol	ol	scl	—	84
XV	—	scl	scl	Cl	5
XVI	<scl	<scl	<scl	—	84
XVII	<scl	<scl	<scl	—	84
XVIII	<scl	scl	<scl	—	84
XIX	scl	scl	ol	—	84
XX	scl	ol	ol	—	84
XXI	—	—	ol	OI	3
XXII	—	—	—	Cl	2
XXIII	—	—	ol	OI	3
XXIV	—	—	—	Cl	2
Nº de cepas patrones	81	2	1	2	86

Tipo de lisis: lisis semiconfluente “scl”; lisis confluyente “cl”; Lisis menor que semiconfluente “<scl”; lisis menor que confluyente “<cl”; lisis opaca “ol”.

El grupo de especificidad 4 integrado por dos aislamientos de pollo cocido involucrados en un brote de origen alimentario, acontecido en un comedor escolar de la ciudad de Luján, provincia de Buenos Aires, con unas cuarenta personas afectadas, en marzo de 1990 (Anselmo et al., 1990). Ambas cepas habían sido aisladas de una presa de pollo cocido que provenía de un servicio de viandas sito en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Dieron resultado positivo solamente en los fagos II; XV; XXI; XXII; XXIII y XXIV. Cabe destacar que los últimos cuatro fagos mencionados fueron aislados utilizando como hospederos originales estas dos cepas de *S. Enteritidis*, no así los fagos II y XV.

Cuatro cepas de *S. Enteritidis*, dos aisladas de aguas del río Luján, una de un alimento cocido y la restante de un enfermo de un brote, se caracterizaron genéticamente. Como puede apreciarse en la figura 1, los patrones de bandas obtenidas al digerir el ADN total con una enzima *XbaI* se compararon con los de aislamientos correspondientes a casos esporádicos y de brotes del país, disponibles en la Base Nacional de Datos. Las cepas que correspondieron al patrón de PFGE identificado ARJEGX01.0001 pertenecían al subtipo predominante (70,5 %) de *S. Enteritidis* en todo el país, que ha sido asociado a brotes de enfermedad transmitida por alimentos en diferentes provincias. Las cepas que correspondieron a los patrones identificados ARJEGX01.0033 y ARJEGX01.0034 respectivamente, no se encontraban presentes en la Base Nacional de Subtipificación molecular, que cuenta con 31 patrones de *XbaI*-PFGE, correspondientes a 288 aislamientos como así tampoco en la base latinoamericana.

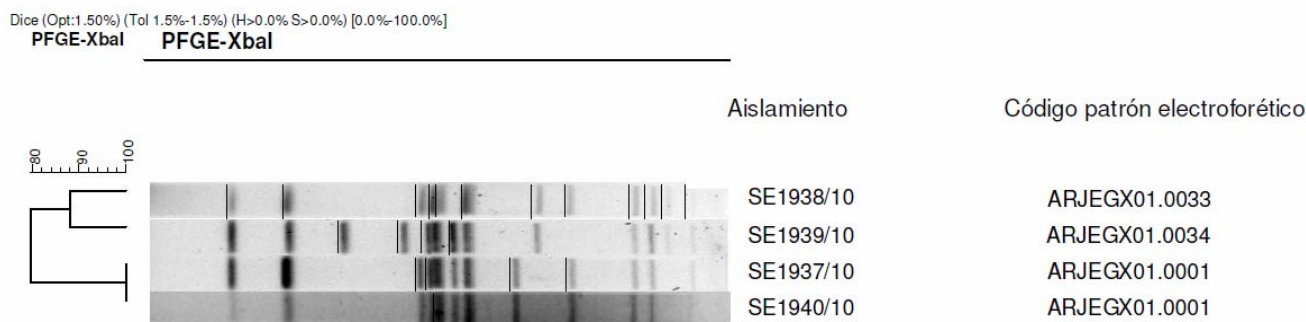


Fig. 1: Dendrograma de relación genética de los 4 aislamientos de *S. Enteritidis*. PFGE con la enzima *XbaI*.

## DISCUSIÓN

Betancor et al. (2009) “investigaron mediante electroforesis en campo pulsado la divergencia genómica y el potencial patogénico en aislamientos de *Salmonella* Enteritidis antes, durante y después de una epidemia acontecida en Uruguay. De 266 cepas analizadas el 96% correspondió también como en nuestro caso, al fagotipo PT4 y el 4% restante presentaron perfiles genéticos que tampoco se hallaban registrados en la base de datos de Latinoamérica y, estos investigadores concluyeron que los fagos juegan un rol crucial en la generación de la diversidad genética en *Salmonella* Enteritidis”.

“Se ha demostrado en la literatura (Pang et al., 2005) que de un total de 187 aislamientos de *S. Enteritidis* estudiados, más del 80% presentaba similitud genética por electroforesis en campo pulsado y el fagotipo predominante era PT4 y, concluyeron que las variantes serían derivadas de una línea clonal única pero su genoma se hallaría altamente conservado en el período de relevamiento de cepas de 13 años (1990 – 2002)”.

Cabe destacar que la fagotipificación de las 86 cepas de nuestro trabajo permitió distinguir 3 cepas “raras” (3,5%) de las prevalentes sin necesidad de efectuar la subtipificación molecular a la totalidad de cepas investigadas sino a representantes de cada grupo de especificidad.

Luego de fagotipificar 86 cepas de *Salmonella* Enteritidis provenientes de brotes y de muestras ambientales, como resultado se obtuvieron 4 grupos de especificidad diferentes: dos

prácticamente iguales y los dos restantes correspondieron, respectivamente, a una cepa procedente de agua de río y a dos cepas provenientes de una muestra de pollo cocido incriminado en un brote de origen alimentario.

Al realizarles la tipificación molecular por electroforesis en campo pulsado se determinó que 83 cepas pertenecían al fagotipo 4, como era de esperar, en la ciudad de Luján y zonas aledañas predomina *Salmonella* Enteritidis PT4. “A nivel mundial este fagotipo ocupa el 35%, mientras que en Argentina constituye el 70,5% que ha sido asociado a brotes de origen alimentario” (Boletín Epidemiológico Periódico (2006)).

En cambio una cepa proveniente de aguas del río Luján que se clasificó como grupo de especificidad 3 y dos cepas procedentes de la muestra de pollo cocido del brote alimentario que se clasificó como grupo de especificidad 4 presentaban dos perfiles genéticos que no se hallaban hasta el presente registrados en la base de datos de Subtipificación Molecular Latinoamericana.

## CONCLUSIONES

El juego de 24 bacteriófagos salvajes obtenido a través de este trabajo permitió fagotipificar el 100% de las cepas de *Salmonella* Enteritidis estudiadas; localizar las 83 cepas que correspondieron al fagotipo PT4 y concordaron con las prevalecientes en Latinoamérica y; detectar las 3 cepas “raras” es decir no halladas en Latinoamérica según los resultados obtenidos mediante los fagos XV; XXI; XXII; XXIII y XXIV y; confirmado por electroforesis en campo pulsado.

Asimismo dicho juego de bacteriófagos permitiría saber en menos de 24 horas si *Salmonella* spp. determinada de distintas fuentes (enfermos esporádicos, brotes alimentarios, muestras de alimentos, ambientales, etc.,) si se trata de la serovariedad Enteritidis.

## AGRADECIMIENTOS

A las Dras. M. Pichel y M. I. Caffer del INEI-ANLIS “Dr. C. G. Malbrán” A. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, por su colaboración en la tipificación molecular de las cepas. A la Universidad Nacional de Luján y al Departamento de Ciencias Básicas por el apoyo recibido para la ejecución del proyecto.

## REFERENCIAS

Anselmo, R. J. y otros 7 autores, *Estudio de un brote de infección alimentaria por Salmonella Enteritidis*, Rev. Infect. Microbiol. Clín. 2:66–68 (1990).

Anselmo, R. J., S. Viora, H. Barrios y M. I. Caffer, *Brote de enfermedad transmitida por alimentos por Salmonella Enteritidis*, Rev. Infect. Microbiol. Clín. 3:90–91 (1991a).

Anselmo, R. J., S. Viora, H. Barrios, J. Tregoning y M. De Franceschi, *Infección por Salmonella Enteritidis en terneros*, Rev. Med. Veterinaria. 72:73–74 (1991b).

Anselmo, R. J., H. Barrios, S. Viora y M. De Franceschi, *Intoxicación masiva por Salmonella Enteritidis en la ciudad de Luján*, Rev. La Alimentación Latinoamericana. 194:55–57 (1993).

Anselmo, R. J. y otros 5 autores, *Serotipos de Salmonella aislados del Río Luján, Argentina*, Rev. Latinoam. Microbiol. 41:77–82 (1999).

Betancor, L. y otros 13 autores, *Genomic and phenotypic variation in epidemic-spanning Salmonella enterica serovar Enteritidis isolates*, BMC Microbiol. 9:237 (2009), <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/237>.

Betancor, L. y otros 14 autores, *Prevalence of Salmonella enterica in Poultry and Eggs in Uruguay during an Epidemic Due to Salmonella enterica Serovar Enteritidis*, J. Clin. Microbio. 48(7):2413-2423 (2010).

Boletín Epidemiológico Periódico, Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Nro. 30. Abril. Mayo. Junio (2006).

Braden, C. R., *Salmonella enterica Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States*, Clin. Infect. Dis. 43(4):512-517 (2006).

Kott, Y., *Estimation of low numbers of Escherichia coli bacteriophage by use of the most probable number method*, Appl. Microbiol. 14:141-144 (1966).

McLaughlin, M. R. y J. P. Brook, *EPA Worst Case Water Microcosms for Testing Phage Biocontrol of Salmonella*, J. Environ. Qual. 37:266-271 (2008).

Nygård, K. y otros 5 autores, *Emergence of new Salmonella Enteritidis phage types in Europe. Surveillance of infections in returning travellers*, BMC Medicine 2:32 (2004).

Pang, J. C. y otros 6 autores, *Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of Salmonella enterica serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan*, J. Appl. Microbiol. 99:1472-1483 (2005).

Peters, T. M. y otros 23 autores, *Phagetypes of Salmonella enterica serotype Enteritidis in Europa*, Epidemiol. Infect. 135:1274-1281 (2007).

Prat, S., A. Fernández, A. Fica, J. Fernández, M. Alexandre y I. Heitmann, *Tipificación fágica de aislamientos de Salmonella enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile*, Rev. Panam. Salud Pública. 9:7-12 (2001).

Rabsch, W. y otros 6 autores, *Salmonella enterica serotype Typhimurium and its host-adapted variants*, Infect. Immun. 70(5):2249-2255 (2002).

Viora, S., R. Anselmo, H. Barrios, S. Ferrarotti y M. De Francheschi, *Estudio de un brote familiar de origen alimentario por Salmonella Enteritidis*, Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos. La Habana, Cuba (1994).

Ward, L. R., J. D. H. De Sa y B. Rowe, *A phage typing scheme for Salmonella enteritidis*, Epidemiol. Infect. 99:291-294 (1987).