

Presencia de secuencias ERIC en *Chlamydia trachomatis*

Cecilia Hernández-Cortez¹, Cristina Majalca-Martínez², José Tomás Hernández-Méndez¹, Silvia Giono-Cerezo¹, Ma. Guadalupe Aguilera-Arreola¹, Graciela Castro-Escarpulli¹

¹ Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. ² Laboratorio de Pruebas Especiales, Sección Bacteriología, C.M.N. "20 de noviembre", ISSSTE, México, D.F.

RESUMEN

Introducción. Uno de los métodos empleados para la tipificación y el estudio de la diversidad genética bacteriana es la ERIC-PCR. La presencia de las secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC) se ha descrito en la mayoría de las bacterias Gram negativas, pero no se ha investigado su presencia en bacterias como *Chlamydia trachomatis*.

Objetivo. Realizar la búsqueda *in silico* e *in vitro* de las secuencias ERIC en el genoma de *Chlamydia trachomatis*.

Materiales y Métodos. En el estudio *in silico*, las secuencias ERIC se buscaron mediante la herramienta bioinformática FASTA y empleando los genomas de *C. trachomatis* D/uw-3/cx, *C. trachomatis* 434/Bu, *C. trachomatis* L2b/UCH-1/proctitis, *C. trachomatis* A/har-13, *C. muridarum* Nigg, *C. pneumoniae* Tw-183, *Aeromonas hydrophila* y *Escherichia coli* K12, depositadas en la base de datos del NCBI. *In vitro*, se estandarizó la PCR empleando cepas de *C. trachomatis* serovariedades D, L2 y L3.

Resultados. Se obtuvieron el número de alineamientos, la región de alineamiento de cada iniciador ERIC y los valores de expectación (E) y *score* (S) de cada genoma estudiado. Posteriormente, se determinó la presencia de las secuencias ERIC en las cepas de *C. trachomatis* serovariedades D, L2 y L3, siendo 44°C la temperatura óptima de alineamiento en la PCR.

Conclusiones. Con los resultados obtenidos, podemos sugerir que en el genoma de *C. trachomatis* existen las secuencias ERIC; si este hallazgo se reproduce en todas las serovariedades, se podría establecer un nuevo método de tipificación para esta bacteria.

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, PCR, tipificación, FASTA

ABSTRACT

ERIC sequences in *Chlamydia trachomatis*

Introduction. One of the methods used for the typification and for bacterial genetic diversity study is ERIC-PCR. The presence of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences (ERIC) has been described in most Gram negative bacteria, but their presence in bacteria, such as *Chlamydia trachomatis*, has not been investigated.

Objective. To search *in silico* and *in vitro* for ERIC sequences in the *Chlamydia trachomatis* genome.

Materials and Methods. *In silico*, ERIC sequences were searched with the bioinformatics tool called FASTA, downloading the genomes of *Chlamydia trachomatis* D/uw-3/cx, *Chlamydia trachomatis* 434/Bu, *Chlamydia trachomatis* L2b/UCH-1/proctitis, *Chlamydia trachomatis* A/har-13, *Chlamydia muridarum* Nigg, *Chlamydia pneumoniae* TW-183, *Aeromonas hydrophila*,

Autor para correspondencia: Graciela Castro-Escarpulli, Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Esq. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Plutarco Elías Calles. Deleg. Miguel Hidalgo. CP 11340. México, D.F. E-mail: chelacastro@hotmail.com

Recibido: el 17 de abril de 2012 **Aceptado para publicación:** el 20 de agosto de 2012

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb122333.pdf>

Hernández-Cortez *et al.*

and *Escherichia coli* K12 deposited in the NCBI database. *in vitro*, the ERIC-PCR technique was standardized with strains of *Chlamydia trachomatis* serovars D, L2, and L3.

Results. Were obtained the number of alignments, the alignment region of each ERIC primer, and the expectation (E) and score (S) values of each genome. Afterwards, the presence of ERIC sequences in strains of *Chlamydia trachomatis* serovars D, L2, and L3 was determined, being 44 °C the optimal alignment temperature in the PCR.

Conclusions. With the obtained results we can suggest that the ERIC sequences are present in the *Chlamydia trachomatis* genome, if this finding is reproduced in all the serovars, a new typing method for this bacterium could establish.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, PCR, DNA typing, FASTA

INTRODUCCIÓN

Chlamydia trachomatis es una bacteria intracelular obligada similar a las Gram negativas, agente etiológico del tracoma, de la cervicitis y del Linfogranuloma Venéreo (LGV); se consideran a estas dos últimas patologías como Infecciones de Transmisión Sexual (ITS). Se conocen 19 serovariedades clasificadas por su patología: de la A a la C, las cuales son causantes del tracoma; los serotipos de la D a la Ia agrupan a clamidias que están involucradas en ITS y las serovariedades L1 a L3 que producen LGV (1). En Estados Unidos de Norteamérica, se presentan hasta 4 millones de casos nuevos al año (2) y, en México, la frecuencia de reporte varía desde 2.85% hasta 63% en la población en general, tanto asintomática como sintomática, lo que representa un problema de salud pública en México y en otros países (1, 3-6). En otros datos más recientes, se indica que, de acuerdo con la OMS, existen 92 millones de casos nuevos de infección clamidial que se diagnostican globalmente cada año. En México, aún se desconoce la prevalencia de infección clamidial puesto que ésta no es considerada de

importancia epidemiológica y los datos que se obtienen provienen, en su mayoría, de los trabajos de investigación y no de cifras oficiales (1,5).

Existen diversos métodos para el diagnóstico de esta bacteria, entre los cuales se encuentran aquellos que: i) ponen de manifiesto la presencia del cuerpo de inclusión (CI) o el cuerpo elemental (CE) en los cultivos celulares, ii) las pruebas serológicas y iii) los métodos genotípicos de entre los cuales la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es uno de las más importantes (1,6). Los métodos PCR son usados regularmente con propósito de identificación, tipificación bacteriana o monitoreo de cambios en la población microbiana (diversidad genética) (7,8). Una variedad de la PCR denominada rep-PCR (amplificación de elementos repetitivos) es un método que permite el estudio del genoma bacteriano completo, mediante el examen de patrones específicos obtenidos amplificando por PCR los elementos de DNA repetitivos de un genoma (9,10). Esta rep-PCR comprende dos tipos de elementos repetitivos: i) las secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP), por sus siglas en inglés “*Repetitive Extragenic Palindromics*” y ii) las secuencias Consenso Intergénicas Enterobacterianas (ERIC), por sus siglas en inglés “*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*” (10). El uso de estos métodos ha permitido el estudio del genoma bacteriano completo mediante el análisis de los patrones cepa específica que se generan; por lo anterior, su mayor utilidad se reporta en la tipificación bacteriana. Las secuencias ERIC son elementos de 126-127 pb que parecen estar restringidos a regiones transcritas del genoma; ya sea en regiones intergénicas de operones policistrónicos, o bien, en regiones no traducidas “río arriba” o “río abajo” de los marcos de lectura abierta (11,12). Las secuencias ERIC constituyen una clase de elementos de DNA repetitivos que contienen una repetición invertida central, altamente conservada del genoma bacteriano, y se han descrito en bacterias Gram negativas entéricas;

Secuencias ERIC en *Chlamydia trachomatis*

no obstante, actualmente la técnica ERIC-PCR se ha utilizado para el estudio de bacterias Gram negativas como *Aeromonas*, *Vibrio cholerae* y *Rhizobium* (6,13,14).

Dada la variabilidad genética característica de *Chlamydia* y a que se ha descrito a las secuencias ERIC como una herramienta útil para determinar la diversidad genética entre cepas de una misma especie con propósitos de tipificación bacteriana, se pensó en aplicar dicha técnica a *C. trachomatis*, con la posibilidad de que cada una de las serovariedades pudiera generar un patrón específico.

En la literatura nacional e internacional consultada, no se han descrito estudios al respecto para *C. trachomatis*; por lo tanto, se aplicó la técnica ERIC-PCR a *C. trachomatis* y a otras bacterias no relacionadas y los resultados se analizaron mediante el uso de herramientas y programas bioinformáticos.

El objetivo del trabajo fue explorar, mediante un análisis *in silico*, si en el genoma de *C. trachomatis* se encuentran las secuencias ERIC, para utilizarlas como un método de tipificación de cepas de *Chlamydia* y para estimar su diversidad genética. Una vez comprobada su presencia, se procedió al análisis *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuencia estudiada. Se descargaron los genomas completos de las bacterias *Chlamydia trachomatis* D/uw-3/cx, *Chlamydia trachomatis* 434/Bu, *Chlamydia trachomatis* L2b/UCH-1/proctitis, *Chlamydia trachomatis* A/har-13, *Chlamydia muridarum* Nigg, *Chlamydia pneumoniae* Tw-183, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966^T y *Escherichia coli* K12 de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (15) (**Cuadro 1**).

Estudio bioinformático. Las secuencias de genomas bacterianos completos se analizaron para identificar la presencia de secuencias repetitivas en *C. trachomatis* mediante el alineamiento de los

Cuadro 1
Genomas disponibles y descargados del banco de genes del NCBI

Genoma	Tamaño	Número de acceso (Gen Bank)
<i>C. trachomatis</i> D/ UW-3/CX	1, 042, 519 pb	gb AE001273
<i>C. trachomatis</i> 434/Bu	1, 038, 842 pb	gb AM884176
<i>C. trachomatis</i> L2b/ UCH-1/proctitis	1, 044, 459 pb	gb AM884177
<i>C. trachomatis</i> A/ HAR-13	1, 044, 459 pb	gb CP000051
<i>C. muridarum</i> Nigg	1, 072, 950 pb	gb AE002160
<i>C. pneumoniae</i> TW-183	1, 225, 935 pb	gb AE009440
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 ^T	4, 744, 448 pb	gb CP000462
<i>E. coli</i> K12	4, 639, 675 pb	gb U00096

iniciadores; cuántas veces se presentan y en qué regiones del genoma se localizan.

Las secuencias de los iniciadores evaluados fueron las propuestas por Versalovic y colaboradores en 1991, cuyas secuencias son (16): ERIC-1 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA -3' y ERIC-2 5'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC -3'.

La alineación de los iniciadores se realizó con el programa FASTA versión 3.4t21, creado en 1998, ejecutado a través del símbolo del sistema (MS-DOS).

Material biológico. El trabajo experimental se realizó empleando el DNA de las cepas de *C. trachomatis* serovariedades D (ATCC 94-10 D885-VR UW-3/CX), L2 (ATCC 93-10 902B-VR LGVII4/34) y L3 (cepa tipificada no ATCC). El DNA de la cepa de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T fue empleado como control positivo de la reacción de amplificación y DNA de células McCoy para determinar si interfiere en la reacción, ya que a partir de éstas se lleva a cabo el aislamiento de los CE y CI. El DNA de *C. trachomatis* se extrajo mediante tratamiento con lisozima y proteinasa K (Sigma, México) a una concentración de 400 µg/mL. El DNA de la

Hernández-Cortez et al.

cepa de *A. hydrophila* y de las células McCoy se obtuvo mediante el empleo del kit InstaGene Matrix (Bio-Rad laboratorio, México), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Técnica ERIC-PCR (6,10,16). La amplificación de las secuencias ERIC mediante la PCR se realizó en el termociclador T Gradient (Whatman Biometra, México) en un volumen final de 50 µL conteniendo 50 ng del DNA genómico, Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM, 50 mM MgCl₂, 2 mM desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), iniciadores ERIC 1 y ERIC 2 0.3 µM de cada uno, 2.5 U de Taq polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron 30 ciclos de: 1 min a 94°C, 2 min a 52°C y 8 min a 65°C; una extensión final de 16 min a 65°C. Se corrieron 25 µL del amplificado en un gel de poliacrilamida al 10% w/v usando como regulador TBE 1X (Tris base 10 mM, ácido bórico 50 mM, y EDTA 2 mM, pH 8) a 56 mA durante 3 h. Los geles se tiñeron con

0.5 µg/mL de bromuro de etidio durante 25 min.

RESULTADOS

Análisis in silico. Se recopilaron 8 secuencias nucleotídicas correspondientes a los géneros *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Aeromonas* y *Escherichia*. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del NCBI (**Cuadro 1**). Con el programa FASTA versión 3.4t21, ejecutado a través del símbolo del sistema (MS-DOS), se determinó la complementariedad de las bases nucleotídicas entre las secuencias de la bacteria de nuestro interés y las secuencias de los iniciadores universales ERIC. Se observó el alineamiento de los iniciadores ERIC1 y ERIC2 en ambas cadenas del DNA, *forward* (+) y *reverse* (-). El número de veces que se alinean los iniciadores no indica el número de bandas ni su tamaño y tampoco es posible inferir la cantidad de bandas para *C. trachomatis*. El **Cuadro 2** presenta las veces que se alinearon los iniciadores, también se muestran los valores de E y del *Score* por separado mediante un guión; debido a que en cada alineamiento se generan diferentes valores, en donde el primer número indica el primer valor generado en la primera alineación y el segundo corresponde al de la última alineación.

Análisis in vitro. Para la amplificación de las secuencias ERIC, se utilizaron las cepas de *C. trachomatis* serovariedades D, L2 y L3. Las condiciones iniciales de reacción de la ERIC-PCR fueron previamente descritas en la sección de materiales y métodos. Se encontró, también, la presencia de secuencias ERIC en el DNA de la célula McCoy; por lo que se realizaron PCR en gradientes de temperatura en un intervalo de 40 a 50°C. Una vez obtenida la temperatura a la cual no se encontraron amplificaciones en DNA de células McCoy, se probaron las cepas de *C. trachomatis* serovariedades D, L2 y L3. Se determinó que la temperatura óptima de alineamiento de los iniciadores ERIC para *C. trachomatis* fue de 44°C y la concentración de DNA fue de 350 ng/µL. En las **Figuras 1 y 2** se muestran los electroferogramas de las secuencias ERIC-PCR

Cuadro 2

Número de veces que se alinean los iniciadores en los genomas de los microorganismos estudiados

Microorganismo	Iniciador	NA	S	E
<i>C. trachomatis</i>	ERIC1	14	68-41	0.31 – 3e+02
D/UW-3/CX	ERIC2	14	64-35	0.52 - 3e+02
<i>C. trachomatis</i> 434/Bu	ERIC 1	9	68-47	0.33 – 12
	ERIC 2	8	68-42	0.25 – 13
<i>C. trachomatis</i> / L2b UCH-1/ proctitis	ERIC 1	9	68-47	0.13 – 12
	ERIC 2	8	62-40	0.25 – 13
<i>C. trachomatis</i> A/HAR-13	ERIC 1	9	68-47	0.25 – 13
	ERIC 2	10	62-45	0.33 – 12
<i>C. muridarum</i> Nigg	ERIC 1	14	68-50	0.61 – 31
	ERIC 2	14	73-48	0.28 – 26
<i>C. pneumoniae</i> TW-183	ERIC 1	16	70-48	1.4 – 44
	ERIC 2	16	66-46	0.83 – 45
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 ^T	ERIC 1	60	67-49	0.19 – 1.6e+02
	ERIC 2	NR	NR	NR
<i>E. coli</i> K12	ERIC 1	59	105-42	0.13 – 3.5e+02
	ERIC 2	59	105-43	0.22 – 3.2+02

NA= número de alineamientos S=valor del *score* E=valor de expectación NR=no hay resultados

amplificadas en gradiente de temperatura (40-46°C) de las cepas de *C. trachomatis* serovariedad D y L2, respectivamente.

DISCUSIÓN

Chlamydia trachomatis es una bacteria de importancia médica, ya que es uno de los principales agentes causantes de Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), que en la mayoría de los casos cursa de manera asintomática.

Es importante conocer la diversidad genética que existe entre cepas de *C. trachomatis*, ya que nos permite saber si son las mismas o diferentes cepas las que causan infección en una cierta población, a pesar de que se conocen cuantas serovariedades existen. La técnica ERIC se ha descrito como herramienta útil para determinar la diversidad genética entre cepas de la misma especie y para tipificar bacterias; esta técnica se describió para el estudio de bacterias Gram negativas enterobacterianas, pero se ha utilizado en otras bacterias Gram negativas como *Vibrio cholerae*, en donde se utiliza para diferenciar cepas patógenas de no patógenas; en *Rhizobium meliloti* como probable herramienta para identificación; en *Agrobacterium* y *Pseudomonas aeruginosa* para una genotipificación rápida (13,14,17), por mencionar algunos; y por qué no usarlo en *C. trachomatis* si es considerada bacteria Gram negativa; por lo que se decidió estudiar este tipo de secuencias ERIC y ver si estaban presentes en la bacteria en estudio, que nos permitiera considerar esta técnica como una herramienta alternativa y mejor para el estudio de la diversidad en cepas de *C. trachomatis* aisladas de diferentes poblaciones y, quizás, también permita tipificarla, ya que como se mencionó en la introducción existen 19 serovariedades de *C. trachomatis*; pero esto último se lograría si se analizaran todas las 19 serovariedades se podría observar si existe alguna diferencia en el número de bandas y tamaños. Por el momento, el propósito de este estudio fue ver si estas bandas se encontraban presentes en *C. trachomatis*, observar los patrones generados y

Secuencias ERIC en *Chlamydia trachomatis*

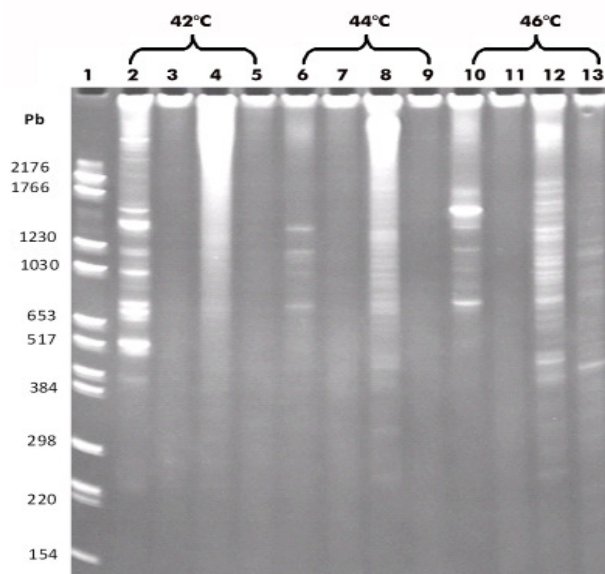


Figura 1. Electroferograma ERIC-PCR en gradiente (42, 44 y 46°C). Carril 1: Marcador de talla molecular VI. Carriles 2,6,10: Control positivo (DNA *A. hydrophila* ATCC 7966T). Carriles 3,7,11: Control negativo (agua estéril). Carriles 4,8,12: DNA *C. trachomatis* serovariedad D. Carriles: 5,9,13: DNA célula McCoy

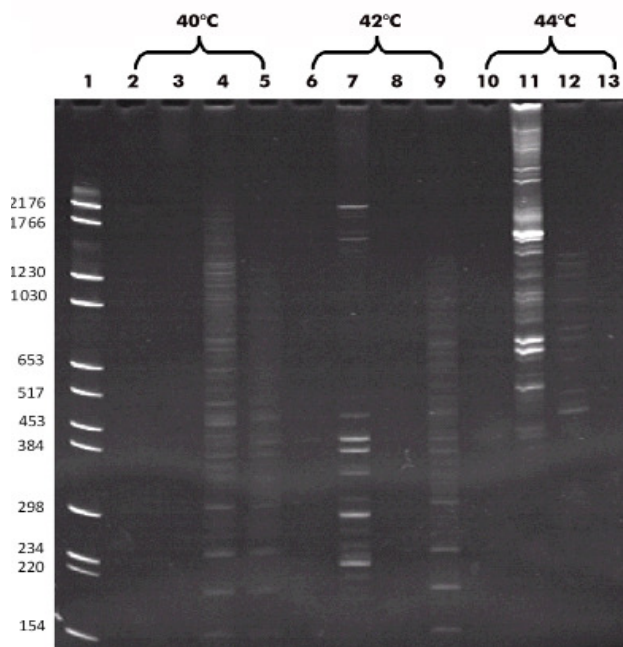


Figura 2. Electroferograma ERIC-PCR en gradiente (40, 42 y 44°C). Carril 1: Marcador de talla molecular VI. Carriles 2,6,10: Control negativo (agua estéril). Carriles 3,7,11: Control positivo (DNA *A. hydrophila* ATCC 7966 T). Carriles 4,8,12: DNA *C. trachomatis* serovariedad L2. Carriles 5,9,13: DNA célula McCoy

determinar si éstas se pudieran usar para ver la diversidad genética de aislados a partir de muestras clínicas y, por lo tanto, considerar o descartar a la técnica ERIC-PCR como una nueva herramienta útil en *C. trachomatis*.

En el presente estudio, se determinó *in silico* e *in vitro* la presencia de secuencias ERIC en *C. trachomatis*, la cual ha sido descrita como bacteria de difícil aislamiento y, por lo tanto, la técnica ERIC-PCR podría convertirse en un método potencial para tipificación, identificación y epidemiología de esta bacteria.

Se realizó el alineamiento de las secuencias de los iniciadores ERIC con los genomas de *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Aeromonas* y *Escherichia*, empleando la herramienta bioinformática FASTA versión 3.4t21. Para validar el método *in silico* se estudiaron los genomas de *E. coli* y *A. hydrophila*, con los iniciadores. El genoma de *C. muridarum* se estudió también para ver si existían diferencias en el número de alineamientos en bacterias del mismo género (*Chlamydia*); no obstante, el resultado mostró que el número de alineamientos para las dos bacterias *C. trachomatis* y *C. muridarum* fue el mismo (14 alineaciones); lo anterior no necesariamente indica que se genere la misma cantidad de bandas y del mismo tamaño. El genoma de *C. pneumoniae* se analizó para comparar con las que se presentan entre bacterias de diferentes géneros, pero que son de la misma familia.

En los alineamientos generados, se observó que en el extremo 3' no hubo apareamiento entre los primeros pares de bases; por lo tanto, era probable que experimentalmente tampoco se generaran estas bandas. No obstante, al hacer en el laboratorio la técnica ERIC-PCR (ver **Figura 1** y **2**), se observó que tal y como se predijo en el estudio *in silico*, *C. trachomatis* sí presentó secuencias repetitivas ERIC. Además, se encontró también la presencia de estas secuencias en el DNA de la célula McCoy, ya que a partir de ellas se realiza el aislamiento de esta bacteria y, por lo tanto, si los cuerpos elementales de *C.*

trachomatis no se purifican, el DNA de la célula eucarionte podría interferir dando amplificación con la técnica. Una vez obtenida la temperatura a la cual no se encontraron amplificaciones (44°C) en células McCoy, se probaron las cepas de *C. trachomatis* serovariedades D, L2 y L3.

Por lo anterior, se concluye que *C. trachomatis* posee este tipo de secuencias y que de existir éstas en otras especies y serotipos podría ser útil para tipificarla y conocer la diversidad genética, como se hace en otras bacterias Gram negativas en donde se ha empleado la técnica ERIC. Sin embargo, para establecer si la técnica ERIC-PCR es útil para tipificar a *C. trachomatis*, es necesario buscar si estas secuencias se obtienen en todas las 19 serovariedades para poder observar y comparar los fragmentos que se generen y, así, establecer los patrones y ver si existen diferencias entre el número de fragmentos generados y su tamaño.

A pesar de que no se determinó el tamaño de los productos generados, si se relacionan el **Cuadro 2** y la **Figura 2**, podemos observar que hubo una concordancia entre el número de alineamientos que fue de 14 y el número de bandas generadas que al contarlas también resultan ser aproximadamente 14, (ver carriles 8 y 12 de las **Figuras 1** y **2**, respectivamente); por lo que podemos señalar que realizar un estudio bioinformático antes del trabajo experimental ayuda y orienta a saber qué resultados, probablemente, se obtendrán en la práctica.

Como trabajo futuro, se planea secuenciar los productos amplificados para confirmar si las secuencias ERIC corresponden a secuencias descritas para otras bacterias Gram negativas y si es posible rediseñar los iniciadores ERIC para obtener un nuevo y mejor alineamiento en *C. trachomatis*. Construir transformantes de las 19 serovariedades de *C. trachomatis*, con la finalidad de contar con las mismas y buscar secuencias ERIC y, así, establecer los diferentes patrones que se generen para cada una de ellas, aislar cepas de *C. trachomatis* de exudados cervicales

y uretrales de pacientes de diferentes poblaciones y aplicar la técnica ERIC-PCR para estimar/cuantificar la diversidad genética intraespecífica y plantear si es posible emplearlo como método de genotipificación en estudios epidemiológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados en este trabajo hacen parte de un estudio financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado, Instituto Politécnico Nacional (clave SIP 440, 553, 727). La estudiante CHC recibe apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y de CONACyT. MGAA, JTHM, SGC y GCE son becarios de COFAA, EDI, EDD y/o SNI.

Agradecimiento al Dr. Alfonso Méndez Tenorio por el programa bioinformático proporcionado y su orientación en el manejo del mismo y al Dr. Fernando Guerra Infante por la donación de las cepas de *Chlamydia trachomatis*.

REFERENCIAS

1. **Deleón-Rodríguez I, Hernández-Méndez JT.** *Chlamydia trachomatis* ¿Un problema de salud pública en México? IPN. México DF: 1ra Ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2000.
2. **Centers for disease control and prevention.** Sexually transmitted diseases www.cdc.gov/nchstp/dstd/chlamydia_facts.htm Abril 2001.
3. **Acosta CB.** Surgimiento de la *Chlamydia trachomatis*. Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 1996; 13:1-2.
4. **Canto de Cetina T, Polanco RL, Cupul YDG, Fernández GV, Piña CMR, Ballote ZM.** Prevalencia de infección cervical por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de una clínica de planeación familiar en Mérida, Yucatán. *Enf Infec Micro* 2001; 21:102-5.
5. **Deleón-Rodríguez I, Hernández-Méndez JT, Alonzo-Rojo H, Jiménez-Escalante Z, Escamilla-Avilés E, Fainzilber-Moldawska Z, et al.** El valor de la técnica de Papanicolaou en el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. *Bioquímica* 1994; 19:177-81.
6. **Reyes-Maldonado E, Díaz-Fuentes LA, González-Bonilla CV, Esquer-Mendivi M, Jiménez EZ, Deleón RI.** Detection of *Chlamydia trachomatis* by immunofluorescence, Papanicolaou and immunoperoxidase in women with leucorrhea. *Rev Lat Amer Microbiol* 1996; 38:65-73.
7. **Davin-Regli A, Bollet C, Chamorey E, Colonna DV, Cremieux A.** A cluster of cases of infections due to *Aeromonas hydrophila* revealed by combined RAPD and ERIC-PCR. *J Med Microbiol* 1998; 47:499-504.
8. **Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Zúñiga-Bérmudez G, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G.** *Aeromonas hydrophila* clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. *FEMS Microbiology Letter* 2005; 42:231-40.
9. **Belkum AV, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M.** Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol* 2001; 14:547-60.
10. **Aguilera-Arreola MG, Hernández-Rodríguez CH, Zúñiga Bérmudez G, Figueras MJ, Garduño R, Castro-Escarpulli G.** Virulence potential and genetic diversity of *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. veronii* clinical isolates from Mexico and Spain: A comparative study. *J Microbiol* 2007; 53:877-87.
11. **Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM.** ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol Microbiol* 1991; 5:825-34.
12. **Wilson LA, Sharp PM.** Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol* 2006; 23:1156-68.
13. **Bruijn FJ.** Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Env Microbiol* 1992; 58:2180-7.
14. **Rivera IG, Chowdhury MA, Huq A, Jacobs D, Martins MT, Colwell RR.** Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and the PCR to Generate Fingerprints of Genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and Non-O1 Strains. *Applied and Env Microbiol* 1995; 61:2898-904.
15. **National Center for Biotechnology Information.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
16. **Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR.** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:6823-31.
17. **Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell S, et al.** 2004. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol* 2004; 53:1089-96