

## Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección

### Microbiological Isolation of *Salmonella* spp. And Molecular tools for detection

Jose Gonzalez Pedraza<sup>1</sup>, Nicole Pereira Sanandres<sup>2</sup>,  
Zamira Soto Varela<sup>2</sup>, Enio Hernández Aguirre<sup>3</sup>, José Villarreal Camacho<sup>4</sup>

#### Resumen

*Salmonella* spp, es uno de los principales agentes causales de intoxicaciones alimentarias a nivel mundial, coloniza a la mayoría de los animales y el ser humano. No es detectable en muestras que tienen un bajo número de células y los métodos tradicionales para su aislamiento tienen baja especificidad, baja sensibilidad y consumen mucho tiempo. Esta revisión presenta un análisis sobre los métodos para la detección de *Salmonella* spp. y se profundiza en los estudios moleculares encaminados al diagnóstico de este microorganismo de importancia en salud pública. En los últimos años se han desarrollado diferentes protocolos utilizando métodos moleculares para la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras clínicas y alimentos. Los costos para la detección molecular de *Salmonella* spp. son elevados en comparación con los métodos tradicionales, pero la alta sensibilidad y especificidad que ofrece la PCR, los beneficios al sector salud al lograr un diagnóstico rápido y preciso, la relación costo beneficio que otorga al sector productivo permitiendo liberar productos alimenticios al mercado con mayor rapidez, justifican la implementación de estas técnicas. La revisión de las ventajas y desventajas de los métodos microbiológicos tradicionales y moleculares para detectar *Salmonella* spp. en diferentes matrices, permite establecer la mejor estrategia a seguir en la detección y diagnóstico de microorganismos de difícil aislamiento. Dada la complejidad de las diferentes metodologías que existen para la detección de *Salmonella* spp, dichas técnicas serán presentadas en forma independiente.

**Palabras clave:** *Salmonella*, PCR, diagnóstico.

<sup>1</sup> Biólogo, Ms.C. Docente, Universidad Cooperativa de Colombia. Sede Santa Marta.

<sup>2</sup> Microbiólogo, Joven Investigador, universidad Libre Seccional Barranquilla.

<sup>3</sup> Médico y Cirujano, Docente Investigador Universidad Cooperativa de Colombia sede Santa Marta.

<sup>4</sup> Microbiólogo, Ms.C. Docente Investigador, Universidad Cooperativa de Colombia. Sede Santa Marta.

**Correspondencia:** José Bernardo González Pedraza, Universidad Cooperativa de Colombia, Programa de Medicina. Troncal Del Caribe Km.1 Vía Mamatoco. Santa Marta, Magdalena. josebernardogonzalezpedraza@hotmail.com Teléfono celular: 3016815627.

Fecha de recepción: 27 de enero de 2014  
Fecha de aceptación: 14 de marzo de 2014

### Abstract

*This review presents an analysis about the methods to identify Salmonella spp. and the molecular studies to diagnosis this microorganism is deepened. Is believed Salmonella to be responsible of the most of cases of food-borne disease worldwide. This bacterium colonizes the most of the animals and the humans. It is not detectable in foods that has a low number of cells and the traditional methods for their detection have low specificity, sensitivity and consume long time. A systematic bibliographical search was developed in web sites, available data bases and original article. in the last year several protocols have seen developed using molecular methods to Salmonella spp. detection from clinical sample and food. The molecular detection of Salmonella spp. by PCR is more expensive than the traditional methods, but the high sensitivity and specificity that the PCR offers, the benefits to the health sector when obtaining a fast and accurate diagnosis, the relation cost benefit that grants to the productive sector allowing to release nutritional products to the market really fast way and the saving of costs, justify the implementation of that technique. The possibility of detecting microorganisms of difficult isolation in different matrices exists, using proper molecular methods and of applying them in epidemiological sanitary controls.*

**Key words:** *Salmonella*, PCR, diagnosis.

## INTRODUCCIÓN

A pesar de los estrictos controles exigidos a la industria alimentaria, se ha calculado que cada año mueren aproximadamente 1.8 millones de personas como consecuencia de enfermedades diarreicas, siendo la causa principal el consumo de agua o alimentos contaminados (1-4). En la actualidad se han descrito más de 250 enfermedades diferentes transmitidas a través de los alimentos (4, 5), dentro de este grupo de enfermedades se encuentra la salmonelosis, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6-9), representa uno de los principales problemas en salud pública, reportándose anualmente millones de casos en todo el mundo con aproximadamente 1000 muertes (10). La detección de *Salmonella* spp. por métodos de cultivo microbiológicos tradicionales, se dificulta por el bajo número de células bacterianas y el alto grado de injuria después de los procesos tecnológicos aplicados para la producción de alimentos que determinan sus

características fisicoquímicas, como la escasa actividad de agua ( $a_w$ ). Estas técnicas tienen muchas desventajas: Tardan entre 4-5 días para confirmar los resultados (11), además, requieren de muchos medios de cultivos. Dada la complejidad de las diferentes metodologías que existen para la detección de *Salmonella*, dichas técnicas serán presentadas en forma independiente.

### Características generales de *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, está integrada por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. Para su crecimiento no requieren cloruro de sodio pero pueden crecer en concentraciones que van desde 0.4% al 4%. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una

temperatura óptima de 35°C-37°C, algunas pueden llegar a crecer a 2°C o 4°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9 con un óptimo entre 6.5 y 7.5. Se desarrollan bien a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94, pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con un aw de <0.2. Su crecimiento se inhibe completamente a temperaturas

inferiores a 7°C, pH <3.8 y un aw <0.94. Se caracterizan por ser de amplia distribución, altamente patógenos y de difícil aislamiento, con más de 2500 serotipos identificados en el actual sistema de Kauffmann-White, siendo *Salmonella enterica serovar typhimurium*, *Enteritidis* y *Newport* los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial (12, 13).

**Tabla 1.** *Salmonella* especies, subespecies, serotipos y su hábitat usual. Sistema de Kauffmann-White

Especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	No. de serotipos dentro de la especie	Habitat usual
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
<b>Total</b>	<b>2579</b>	

**Fuente:** Antigenic formulae of the salmonella serovars . WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella and Institut Pasteur. 9 th edition.2007

Actualmente, basados en la comparación del ARNr 16S, filogenéticamente *Salmonella* se clasifica en dos grupos: *Salmonella entérica*, compuesta por 6 subespecies y *Salmonella bongori*. Este sistema de clasificación es el usado por Organización mundial de la Salud (OMS), el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y otras organizaciones Ver tabla 1.

### Diagnóstico Microbiológico de *Salmonella* spp.

Los métodos microbiológicos tradicionales para la detección de *Salmonella*, no van encaminados al conteo de esta bacteria, se considera una técnica cuyo resultado se expresa cualitativamente, determinando su

presencia o ausencia en diferentes matrices. La detección está basada en el empleo de medios de cultivo selectivos y posterior caracterización de las colonias mediante pruebas bioquímicas y serológicas. El método estándar o prueba de oro en clínica es el coprocultivo, el cual tiene gran valor en estudios epidemiológicos, pero, por su carga de trabajo, costo y volumen, suele ser de bajo rendimiento y bajo costo-efectividad, siendo la positividad de 1.8% a 4.4 %, además, el porcentaje de recuperación de los medios de cultivos (Mac Conkey-Hektoen) es de 4% a 10%, esta baja sensibilidad es debido al número de microorganismos presentes en las heces, la competencia presente con otros microorganismos y a los cambios físico-químicos

del medio de cultivo y/o del ambiente (pH, temperatura y actividad acuosa) (14). Sin embargo, recientemente las evaluaciones de riesgos microbiológicos requieren de datos cuantitativos para estimar el riesgo de que una población contraiga salmonelosis por consumo de un determinado alimento contaminado. La Association of Official Analytical Chemist (AOAC) (15), describe los pasos a seguir para obtener buenos resultados, los cuales pueden demorar entre 4 a 5 días. El aislamiento e identificación de *Salmonella* en una muestra requiere de cuatro etapas que se precisan a continuación:

#### a. Etapa de Pre-enriquecimiento.

Según la AOAC (15), el objetivo de esta etapa es normalizar metabólicamente las células de *Salmonella spp.* que se encuentren en determinada matriz para su perfecto desarrollo y todos los microorganismos compiten por los nutrientes. Se realiza a partir de medios de cultivo no selectivos como agua peptonada (16, 17), caldo nutritivo, caldo lactosado (18) o agua destilada estéril adicionada con solución de verde brillante al 0,1% en el caso de leche en polvo (19, 20). Es necesario una incubación a 37° Celsius durante 18 a 24 horas.

#### b. Etapa de Enriquecimiento selectivo.

Esta etapa estimula y favorece el crecimiento de *Salmonella spp.* inhibiendo el crecimiento de la flora acompañante; los medios de cultivo utilizados son: Caldo Tetrionato-Bilis-Verde Brillante según Mueller-Kauffmann (21), Caldo Rappaport-Vasiliadis (RV) (22-25) y Selenito Cistina (SC).

En el medio selectivo caldo tetrionato-Bilis-Verde Brillante: el tetrionato inhibe el crecimiento de coliformes y otras bacterias

intestinales, la bilis estimula el crecimiento de *Salmonella* e inhibe la flora competitiva, el verde brillante impide el desarrollo de la flora gram positiva y el carbonato cálcico actúa como tampón para mantener el pH.

En el caldo SC, la selenita inhibe el crecimiento de gran parte de la flora intestinal competitiva (*E. coli*, *Enterococos*), sin afectar a *Salmonella*, *Shiguelia*, *Pseudomonas* o *Proteus*, mientras que la Cistina actúa favoreciendo el crecimiento de *Salmonella*. En el medio RV, el verde malaquita inhibe el crecimiento de la flora competitiva, los fosfatos monopotásico y dipotásico mantienen estable el pH del medio durante el almacenamiento y el cloruro magnésico enriquece el caldo favoreciendo el desarrollo de *Salmonella* (26). En la actualidad, el BAM (Bacteriological Analytical Manual) recomienda el uso del medio Rappaport-Vasiliadis para los alimentos con niveles altos o bajos de carga microbiana. El caldo RV reemplaza al Selenito Cistina para el análisis de todos los alimentos, excepto para goma Guar. La temperatura de incubación del Tetrionato varía dependiendo de la carga microbiana del alimento, si es muy alta se recomienda utilizar una temperatura de 43°C y si la carga microbiana es muy baja, emplear una temperatura de 35°C (27). La AOAC recomienda utilizar simultáneamente dos de ellos, puesto que difieren en su selectividad (15).

#### c. Etapa de Aislamiento en medios selectivos.

Esta etapa permite la diferenciación de colonias de *Salmonella* de otras bacterias, esta diferenciación radica en la composición de los distintos medios que permiten el crecimiento de las colonias con aspectos característicos. Para aislar y diferenciar las colonias de *Salmonella*, los medios de cultivo

contienen sustancias inhibitorias tales como: antibióticos, sales biliares, desoxicolato, verde brillante, bismuto de sulfito (19), los medios más empleados son: agar Entérico Hektoen (EH) (28), agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) (29) y agar Bismuto sulfito (BS) (19). En estos medios, las colonias típicas de *Salmonella* se aprecian de la siguiente manera:

**En Agar enterico Hektoen (HE):** Colonias azules o verde azuladas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella sp* pueden producir colonias con un centro negro grande brillante o colonias casi completamente negras.

**En Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD):** Colonias rosadas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella sp* pueden producir colonias con un centro negro grande brillante o colonias casi completamente negras.

**En Agar Bismuto Sulfito (BS):** Colonias marrones, gris o negras, a veces con brillo metálico. El medio es usualmente marrón al principio se torna negro conforme se incrementa el tiempo de incubación, produciéndose el llamado efecto “halo”.

**d. Pruebas bioquímicas diferenciales.**

En esta etapa se diferencian las bacterias por su actividad metabólica. La identificación o confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella*, se lleva a cabo en dos medios diferenciales usados simultáneamente como el agar triple azúcar hierro (TSI) (30) y el agar Lisina hierro (LIA) (31,32), también se realizan pruebas bioquímicas complementarias como urea, fermentación del dulcitol, crecimiento en caldo KCN, utilización del malonato de sodio y producción del indol (ver tabla 2).

**Tabla 2.** Características bioquímicas diferenciales de especies de *Salmonella* y Subespecies

Especie	Salmonella enterica						Salmonella bongori
	enterica (I)	salamae (II)	arizonae (IIIa)	diarizonae (IIIb)	houtenae (IV)	indica (VI)	
Subespecie							
Dulcitol	+	+	-	-	-	D	+
ONPG (2hrs)	-	-	+	+	-	D	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	-/+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
D-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
B-glucoronidasa	D	D	-	+	-	D	-
Mucato	+	+	+	-0,7	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-0,75	0,75	-	D	-

D, diferentes reacciones por serovars distintos. +,90% o más cepas positivas. -,90% o menos cepas negativas.

**Fuente:** Instituto nacional de enfermedades infecciosas departamento bacteriología, Manual de Procedimientos *Salmonella* Parte I Aislamiento, identificación y serotipificación. 2003.

La mayoría de las serovariedades aisladas en el hombre y los animales, pertenecen a *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, poseen características bioquímicas semejantes, lo cual contribuye a su identificación. Sin embargo, un serotipo denominado *S. typhi*, presenta características bioquímicas únicas que lo diferencian de otros serotipos, destacándose un metabolismo muy lento en comparación con los demás, una baja producción de H<sub>2</sub>S, y reacciones negativas para el Citrato de Simmons, ornitina descarboxilasa; gas de glucosa; fermentación del dulcitol, arabinosa y rhamnosa y utilización de mucato y acetato (33).

### Nuevas tendencias de diagnóstico

El surgimiento de nuevas tecnologías y la tendencia global de la industria alimenticia por mejorar y establecer mejores controles durante el proceso de elaboración y transporte de los productos hasta llegar al consumidor. Han desarrollado nuevos métodos de diagnóstico microbiológicos orientados a garantizar la seguridad alimentaria y a optimizar los procesos de vigilancia epidemiológica reduciendo los tiempos de detección del agente patógeno y aumentando la especificidad y sensibilidad de la técnica. En general, estos ensayos pueden ser agrupados en tres categorías: Métodos inmunológicos, ensayos basados en el ácido nucleico y biosensores.

### Métodos serológicos.

La unión de anticuerpos con su antígeno particular, la velocidad y la simplicidad de su interacción, han desarrollado una gran variedad de ensayos con utilización de anticuerpos y formatos basados en inmunoquímica. Los resultados obtenidos siempre son considerados como presuntos positivos y se

hace necesario la confirmación por métodos tradicionales. Entre las técnicas se encuentran los ensayos de aglutinación, ensayos de inmunoprecipitación e inmunoenzimáticos como el ELISA (Ensayo por inmunoabsorción Ligado a Enzima) o el Ensayos de Flujo Lateral y la técnica de Inmunoseparación Magnética (ISM).

### a. Prueba de ELISA.

Esta fase resalta el punto de vista epidemiológico y permite distinguir las serovariedades prevalentes en distintas zonas geográficas. Se fundamenta en la detección de los antígenos somáticos de superficie y antígenos flagelares en cada serovariedad por el uso de anticuerpos unidos de manera específicas a un antígeno determinado. Los aislamientos de *Salmonella* son clasificados según el esquema de Kauffman-White (K-W) así un serotipo de *Salmonella* es determinado sobre la base de la variabilidad antigénica del lipopolisacárido, llamado antígeno O, la proteína flagelar H y el lipopolisacárido Vi. Hasta la fecha han sido identificados más de 2.500 diferentes serotipos de *Salmonella* (12, 34, 36). *Salmonella* es el único miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, que tiene dos distintos antígenos flagelares, regulados coordinadamente, de tal forma que solo un antígeno es expresado al tiempo (37). Bajo este principio inmunológico, Fernand Widal prestigioso médico francés en 1886, desarrollo la técnica denominada "Reacción de Widal" que determina la presencia de anticuerpos contra el antígeno O y H de *Salmonella typhi* para el serodiagnóstico de fiebre tifoidea (38), empleada en la actualidad debido a su bajo costo y rapidez, sin embargo, tiene limitaciones como baja especificidad y sensibilidad (39,40). La identificación de cepas de *Salmonella* por aglutinación con un set completo de

sueros consume mucho tiempo y requiere del uso de unos 167 sueros específicos, además de un personal entrenado para tal propósito (41). Debido a los inconvenientes presentados con la técnica tradicional de aglutinación, y con el fin de mejorar el diagnóstico en una población de Nigeria, Smith *et al.* 2011, tomaron muestras de sangre de pacientes con cuadro febril y sospecha clínica de fiebre tifoidea las cuales fueron examinadas usando el test de widal y la prueba rápida “S. typhi dri dot”. Los resultados arrojaron una alta especificidad cerca al 97.8%, esta técnica emplea una tira de nitrocelulosa impregnada con un antígeno específico ubicado en la membrana externa de *Salmonella typhi* que reacciona con los anticuerpos IgM e IgG presentes en la muestra de suero generando un complejo antígeno-anticuerpo. Para visualizar el complejo las tiras se incuban con la adición de una peroxidasa conjugada con anticuerpos anti IgG e IgM y un sustrato cromogénico. Una coloración azul intensa o de igual color al control, indica una lectura positiva (42,43). Cai *et al.* 2005, desarrollaron una novedosa técnica de serotipificación de cepas de *Salmonella* entérica usando pozos cubiertos con resina super epoxy teñidas con anticuerpos ajustados al sistema de Kauffmann-White. El modelo utiliza 35 anticuerpos para la identificación de las 20 serovariedades más comunes en Canadá y evalúa 117 marcadores específicos para cepas de *Salmonella* y 73 para cepas no relacionadas. El ensayo permitió la identificación de 86 cepas y la identificación parcial de 30, excluyendo a las 73 cepas no relacionadas. En este ensayo la reacción antígeno-anticuerpo se desarrolla en microvolúmenes seguido de un marcaje fluorescente de la cepa investigada. La detección emplea un scanner común de fluorescencia. La técnica ofrece la reducción del tiempo de análisis, la estandarización de la reacción

por aglutinación y la detección simultánea de los antígenos O y H, omitiendo la fase de inversión debido a la alta sensibilidad de la técnica, además, de ser extendida para la serotipificación y detección de otras bacterias (44).

En el mejoramiento de los procesos diagnósticos, las técnicas inmunológicas se han combinado con técnicas moleculares (45, 46). Luk *et al.*, 1997; describieron un procedimiento para detectar, luego de una PCR, a los productos (amplicones) con el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Los oligonucleótidos fueron marcados con digoxigenin (DIG)-11'-dUTP, el cual fue incorporado al producto de PCR. El amplicón fue capturado en fase sólida, vía interacción con avidin-biotin y anticuerpos anti-digoxigenin. Para obtener resultados visibles este ensayo tomó aproximadamente 6 horas en total (4 horas en PCR y 2 horas en ELISA), antecedido de un breve preenriquecimiento 16 horas para un total de 22 horas, ofreciendo un rápido, exacto y semicuantitativo método para detectar *Salmonella spp.* con el propósito de ser implementado como análisis de rutina en laboratorios clínicos o diagnóstico epidemiológico. El uso un plato de 96 pozos, permite automatizar el proceso y analizar muchas muestras simultáneamente. Por otro lado, un inconveniente de la técnica DIG-ELISA para el análisis de productos de PCR, es la inhabilidad para confirmar la identidad del ADN amplificado, es decir, no determina de qué especie de *Salmonella* proviene, convirtiéndose inespecífico para la determinación de especie (47).

## **b. Ensayo de Flujo Lateral (LFAs)**

Una modificación de la técnica de ELISA es el Ensayo de Flujo Lateral (LFAs) o Ensayo In-

munocromatográfico de flujo lateral, método que emplea una membrana de nitrocelulosa en la cual se inmoviliza una proteína, por lo general un anticuerpo o un antígeno. Como en el ELISA, el LFA puede ser desarrollado en un formato tipo sándwich, pero el segundo anticuerpo es conjugado con perlas de látex coloreadas, oro coloidal o carbón en lugar de una enzima. Un pequeño volumen de la muestra migra a través de una serie de cámaras por acción capilar; reaccionando con el conjugado y los anticuerpos inmovilizados obteniéndose un resultado positivo visible por la formación de un patrón o línea (48,49).

### c. La inmunoseparación magnética (ISM)

Es aplicada para capturar, separar, concentrar y purificar, en presencia de un campo magnético, antígenos solubles, ácidos nucleicos o microorganismos viables a partir de diferentes matrices (48-53). Para tal propósito se emplean perlas de diferentes tamaños que contienen material paramagnético el cual es capaz de magnetizarse en presencia de un campo magnético externo o de no hacerlo en ausencia de este. En el 2011, Petrola *et al*, comparó la efectividad de esta técnica frente al método convencional para la detección de *Salmonella spp* en leche pasteurizada contaminada intencionalmente con 50 cel/mL de *Salmonella spp* mas un pool de  $1 \times 10^3$  cel/mL de otras enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella boydii* y *Enterobacter cloacae*). Con la técnica de ISM se logro acortar el tiempo de recuperación de *Salmonella spp* a partir del caldo de pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo del método convencional, sin embargo no se pudo a partir de la muestra pura, además se demostró que el factor de dilución de la muestra no influye en los resultados, pero si el número

de lavados. La eficiencia de la técnica está determinada por la cantidad y calidad de la flora asociada, generándose mayor número de uniones inespecíficas entre mayor sea esta en el momento de la inmunocaptura, además, estas técnicas de concentración al ser optimizadas para una matriz determinada o microorganismo pueden no ser aplicables para otros alimentos. (54- 58). Alfonso *et al*, 2012, desarrollaron un electroinmunoensayo rápido y específico para la detección de *Salmonella spp* en muestras de alimentos empleando nanopartículas de oro (AuNPs) fáciles de obtener, modificar y detectar. La bacteria detectada es pre-concentrada por ISM y marcada con AuNPs modificadas con anticuerpos policlonales anti-*Salmonella*. Este inmunosensor fue capaz de detectar hasta  $143^{-1}$  UFC/mL en hora y media (1:30 minutos) y la interacción entre el inmuno-ensayo y las partículas magnéticas dan lugar a una mejora en la sensibilidad y la eliminación de interferencias por parte de otras especies (59). La tecnología de ISM permite aislar cepas de *Salmonella spp*. que poseen antígenos específicos de superficies y utilizarlo en combinación con la PCR reemplaza el paso de enriquecimiento selectivo, acorta el tiempo en 24 horas e incrementan la especificidad y sensibilidad de la prueba. Esos productos de PCR pueden ser secuenciados y obtener datos en un tiempo inferior a las 24 horas (37, 43, 45,46, 60,61).

A pesar de que el uso de los métodos basados en la detección por anticuerpos son considerados "Prueba de oro o Gold Standard" tanto en análisis clínicos, como ambientales y de alimentos, el uso de anticuerpos tiene ciertos inconvenientes relacionados con su estructura molecular y los métodos usados para su síntesis (48, 62). Debido a estos inconvenientes han surgido otros métodos

de captura por afinidad como el uso de Bacteriófagos. La alta especificidad de los fagos es debida a las proteínas asociadas en su cola que reconocen moléculas específicas presentes en la superficie de la bacteria. Su uso pueda estar encaminado a favorecer el crecimiento selectivo de *Salmonella spp.* en un medio enriquecido, atacando y reduciendo la microflora acompañante o ser utilizados para detectar específicamente *Salmonella spp* e inducir lisis celular, mediando la transformación de ADP en ATP, el cual es detectado como luz visible por medio de una reacción de bioluminiscencia) (62-64). La sensibilidad de la técnica mejora al aplicar anticuerpos específicos que detecten los fagos unidos a las bacterias, además se han empleado fagos que actúan como mensajeros de genes reporteros, por ejemplo, que sintetizan proteínas verde fluorescentes, que pueden ser fácilmente detectadas y cuantificadas (62).

### Métodos basados en ácidos nucleicos

Entre las técnicas moleculares aplicables a la detección de patógenos como *Salmonella spp* en alimentos, encontramos: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR), pirosecuenciación, amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico

(NASBA), Hibridación de ADN con sondas y microensayos, entre otras. La más utilizada es la PCR, cuyo objetivo principal es la multiplicación *in Vitro* de uno o varios segmentos de ADN, por acción una enzima ADN polimerasa, ADN dependiente termoestable. Para esto, el ADN bicatenario debe estar desnaturalizado para formar cadenas lineales en presencia de altas concentraciones de oligonucleótidos y cloruro de Magnesio, entonces dos cadenas nuevas del dúplex original deben ser formadas (65, 66, 67, 68,69). Esta técnica es simple, reproducible, rápida y flexible. Desde entonces se presentan muchas variantes de este método como la PCR múltiple y la PCR en Tiempo Real (qPCR) (70, 71, 72,73) además se ha implementado junto con técnicas como, la hibridación de ADN (74), el uso de biochips (75) y de enzimas de restricción, entre otras, que facilitan el diagnóstico microbiológico molecular de patógenos en diferentes matrices. Desde 1992 muchas investigaciones están encaminadas al diagnóstico molecular de *Salmonella* a través de la técnica de PCR empleando diversos sets de oligonucleótidos, en las que se ha evaluado la selectividad (76), la especificidad y la sensibilidad de estos frente a la prueba microbiológica, considerada como la *prueba de oro* (ver tabla 3).

**Tabla 3.** Tiempo y limite de detección de la técnica microbiológica tradicional para la detección de *Salmonella spp.*

TÉCNICA MICROBIOLÓGICA	TIEMPO DE TÉCNICA	LIMITE DE DETECCIÓN UFC*	AUTOR, AÑO
Cultivo estándar-tradicional	5 DIAS	2 UFC	Conde et al, 2006
Cultivo estándar-tradicional	5 DIAS	2 UFC	Villareal et al, 2008
Cultivo estándar-tradicional USDA+/FSIS‡	4 - 5 DIAS	1 UFC	Gallegos et al, 2008

\*Unidades formadoras de colonias.

+ United States Department Agriculture.

‡ Food Safety and Inspection Service.

Los primeros estudios fueron realizados por *Rahn et al* en 1992 (77) amplificando el gen *invA* de *Salmonella*, técnica actualmente optimizada y estandarizada en países como Suecia (78) sur África (79) y Brasil (80) además se desarrolló un estudio multicéntrico para la validación, en el que participaron 16 laboratorios de los países de Dinamarca, Alemania, Bélgica, Austria, República Checa, España, Suecia, Francia, Grecia, Eslovaquia, Finlandia, Inglaterra e Italia. Actualmente las investigaciones buscan incrementar la confiabilidad del diagnóstico de *Salmonella spp* en alimentos, evaluando la especificidad y sensibilidad de la técnica de PCR después de una etapa previa de enriquecimiento de la muestra, demostrándose una alta probabilidad de detectar un bajo número de células.

#### a. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

*Rahn et al*, amplificaron una secuencia dentro del gen *invA* para la detección de *Salmonella*. Para determinar su selectividad se emplearon 630 cepas de *Salmonella* y 142 géneros de bacterias no relacionadas con *Salmonella*. Todas las cepas evaluadas fueron detectadas, excepto de *S. litchfield* y *S. senftenberg* y por el contrario ninguno de los géneros diferentes a *Salmonella spp* fue identificado (77). *Villarreal et al*, establecieron un límite de detección de hasta 10 pg de ADN en cultivos puros de *Salmonella typhi*. La PCR se basó en la exclusividad de los oligonucleótidos 139-141, los cuales amplificaron una banda de 284 pb para la identificación de género. Sus resultados demuestran que: (I) la adición de Novobiocina (45 mg/L) o de verde brillante (10 mg/L) como inhibidores de flora acompañante, después de las primeras tres horas del pre-enriquecimiento no selectivo de 6 horas, no influye significativamente

en la recuperación de las células bacterianas; (II) al obtener biomasa de la primera dilución en base 10 y emplear la técnica de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para la obtención de ADN, se pueden detectar 2 UFC/mL de *Salmonella spp*. en leche en polvo y reducir considerablemente el tiempo de detección (81). *Dos Santos et al.* en el año 2001, ratificaron el empleo de los mismos oligonucleótidos para la amplificación del gen *invA*, al comparar esta técnica con el método microbiológico tradicional. Ellos lograron la detección de *Salmonella spp*, mediante PCR, luego de la extracción del ADN por el método de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, en un total de 96 horas (82). *Soltani et al.* 2005, evaluaron la selectividad de otro set de oligonucleótidos: *malo2-F/malo2-Ra* que amplificaron el gen *invA* a través de un ensayo de PCR múltiple (PCRm), también se amplificó el gen *Prt* para identificar *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* y *S. enteritidis* empleando los oligonucleótidos *parat-s/parat-as*, al igual que el gen *Tyv* solo para *S. typhi* y *S. enteritidis*, utilizando los oligonucleótidos *tyv-s/tyv-as*, respectivamente, obteniendo un límite de detección de  $2.5 \times 10^2$  UFC/mL (83). Posteriormente, *Cohen et al.* en 1996, evaluaron otros oligonucleótidos para la amplificación del gen *fimA* de *Salmonella*, alcanzando un límite de detección de 5 pg (84).

La utilidad de la PCR para la detección de microorganismos en diferentes matrices está limitada por la presencia de sustancias que inhiben la DNA polimerasa tales como: sales biliares, bilirrubina, hemoglobina o derivados, compuestos polifenólicos, proteinasas, polisacáridos complejos y grasa, que también interfieren en la unión de la enzima con el cloruro de magnesio o que desnaturalizan el DNA. La sensibilidad se compromete al aplicarse directamente sobre muestras que

contienen inhibidores, siendo necesario la incorporación de un paso previo de preparación de la muestra y optimización de la técnica de extracción de ADN (48). Para el diagnóstico

molecular de *Salmonella* spp. también se ha combinado pruebas microbiológicas tradicionales con PCR en tiempo Real (qPCR) o PCR convencional, ver tabla 4 (85, 86).

**Tabla 4.** Diferencias entre sistemas comerciales de PCR y el método de cultivo tradicional para detectar *Salmonella* en alimentos.

Método	Método de ensayo/ Sistema y kit	Principio de detección del método	Requerimiento para confirmar resultados positivos	Tiempo de respuesta
Método de cultivo estándar	ISO 6579, HPA F13	Pre-enriquecimiento en medios no selectivos y luego en medios selectivos	Si, por pruebas bioquímicas y serológicas	Resultado negativo en 3 días, positivo en 5 días.
PCR automatizada	Sistema BAX PCR para la detección de <i>Salmonella</i>	Detección de amplicones de PCR empleando un colorante intercalante (SybrGreen)	Si, por análisis de curva de fusión, luego por cultivo y prueba bioquímica y serológica.	Resultado negativo en 24 horas incluyendo paso de pre-enriquecimiento. Resultado positivo confirmado en 5 días.
PCR a tiempo real	"Sistema BAX Q7 para <i>Salmonella</i> . Kit TaqMan para <i>Salmonella</i> entérica. Kit LightCycler para detectar <i>Salmonella</i> . Kit iQ-check <i>Salmonella</i> II	Uso de sondas para la detección de amplicones	Si, por cultivo y prueba bioquímica y serológica.	Resultado negativo en 20-24 horas incluyendo paso de pre-enriquecimiento. Resultado positivo confirmado en 5 días.

**Fuente:** *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. Food Research International. 2012.

Marathe *et al*, en el año 2012, detectaron *Salmonella* spp en leche, helado y jugo de frutas directamente de la muestra, sin paso previo de pre-enriquecimiento usando primers que detecten el gen *hilA* y empleando químicos rutinarios del laboratorio para reducir la contaminación en las muestras, aumentando la eficiencia de 3-4 horas y obteniendo un límite de detección de 5-10 UFC/mL (87).

El diagnóstico molecular por la técnica de PCR, se ha combinado con otros métodos como sondas fluorescentes (88), inmunoseparación magnética (46,48,60), filtración

(89), antes de cada ensayo o mediante el previo enriquecimiento selectivo con el medio Rappaport-Vassiliadis, BGA o XLD (90) para estimar la carga microbiana e identificar el riesgo que puede causar un agente patógeno y los factores que influyen en la seguridad alimentaria para (91). Una de las preocupaciones en la eliminación de la etapa de pre-enriquecimiento de la muestra es el riesgo de amplificar secuencias de bacterias no viables en la muestra, es así como las investigaciones se han encaminado en extraer y amplificar secuencias de ARNm de muestras de alimento para ser empleadas en RT-qPCR

(92). González *et al*, en su estudio, amplificaron el ARNm del gen *InvA* de *Salmonella*, los resultados obtenidos fueron comparables cuando a la técnica se le antepuso un paso de pre-enriquecimiento para mejorar el límite de detección (93), McCabe *et al*, desarrollaron y evaluaron una PCR usando el gen *hilA* para detectar *Salmonella* en muestras de carne, se emplearon muestras de ADN y de ARN evaluando eficiencia y límite de detección de la técnica, concluyendo que el ensayo de PCR con ADN es útil para alimentos en proceso de producción mientras que el ensayo de PCR con ARN es útil para productos listos para el consumo (94).

#### **b. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).**

Debido al alto costo del sistema de PCR (Termociclador, cámara de electroforesis, sistema de fotodocumentación, etc) y la contaminación por arrastre asociada con la mala manipulación y uso de los reactivos antes y después de la amplificación, surgió una nueva tecnología de PCR que emplea fluorómetros/fotómetros para la detección de amplicones fluorescentes denominada PCR en Tiempo Real (PCRq). Este nuevo desarrollo tecnológico eliminó la contaminación por arrastre al desarrollar toda la reacción y cuantificación en el tubo de PCR sin necesidad de abrirse. Cabe mencionar el desarrollo de un ensayo de PCR en Tiempo Real (PCRq) desarrollado por Josefsen *et al*, el ensayo fue optimizado para la detección de *Salmonella spp* en 12 horas en muestras de carne, en las que se incluye 8 horas de pre-enriquecimiento, seguida de una extracción automática de ADN y por último la amplificación. Se evaluaron diferentes alternativas de medios nutritivos como el agua peptonada, caldo BHI y tripticasa de soya, también se

estudió el efecto de agentes que promuevan el crecimiento como el piruvato de sodio, la yema de huevo y el efecto de agentes selectivos como la novobiocina, verde brillante, verde de malaquita, tergitol, dexosicolato de sodio y el sulfamandolato, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los ensayos aplicados (95).

Otro ensayo de PCR en tiempo Real fue realizado por D'Ursoa y colaboradores, quienes evaluaron un método de filtración para la recuperación de bacterias viables de *Salmonella entérica* y además de *Listeria monocytogenes* en 30 minutos. El procedimiento de filtración consistió en pasar la suspensión bacteriana en un papel filtro de 0,2 µm de diámetro para *Salmonella entérica* y 0,4 µm para *Listeria monocytogenes*. Este tratamiento no mostró ningún efecto en la viabilidad de las células. En el caso de los alimentos la técnica fue capaz de detectar 10 bacterias por 10 g de Yogurt y además capaz de detectar células viables en la presencia de un amplio rango de células muertas (96). La selección de los primers y las sondas para los ensayos de PCRq, son elementos cruciales para el diseño de la metodología diagnóstica, es así como Chen *et al*, usando genómica comparativa diseñaron los oligonucleótidos para el desarrollo de la metodología el cual marca una secuencia dentro del gen de la sintetasa ATP del sistema de secreción tipo III (*ssaN*), así mismo diseñaron un control interno de amplificación con sus respectiva sonda. El ensayo demostró 100% de inclusividad para las 40 cepas de *Salmonella* ensayadas y un 100% de exclusividad para las 24 cepas no relacionadas (97).

Por otra parte se han diseñado sistemas rápidos como el EntericBioMultiplex PCR, que permite la detección simultánea de

bacterias entéricas incluyendo *Salmonella enterica*. El principio básico es la realización de un Preenriquecimiento seguida de una amplificación por PCR y detección por hibridación. Al comparar este sistema con el método de cultivo, en un estudio realizado por O'leary y colaboradores se evaluaron 733 muestras clínicas, de las cuales 4 fueron positivas para *Salmonella enterica* utilizando ambos métodos (98). Otros genes empleados para la detección de *Salmonella spp* son: *hilA*, gen regulador de invasividad (94), *ompf*, porina f de la membrana externa (99), *ttr*, enzima tetracionato reductasa (100), *iagA*,

gen activador de la expresión de genes de invasión (101), *ssaN*, sistema de secreción tipo III de la ATP sintetasa (102)

Aunque la PCR en tiempo Real elimino la contaminación por arrastre, el principal inconveniente de este método es que detecta la acumulación de productos de PCR tanto específicos como no específicos. Este inconveniente se soluciono empleando sondas marcadas con fluorocromos que detectan específicamente el producto deseado, entre las más conocidas están las sondas TAQMAN y las sondas Molecular Beacon (103,104).

**Tabla 5.** Comparación de diferentes métodos moleculares para la detección de *Salmonella spp.* en heces

MODALIDAD DE PCR	GEN	ESPECIFICIDAD (%)	SENSIBILIDAD (%)	TIEMPO	LIMITE DE DETECCIÓN	AUTOR, AÑO
Convencional	<i>hilA</i>	97	100	NE*	4x10 <sup>2</sup> UFC+	Sánchez et al, 2004
Convencional	<i>invA</i> , <i>invE</i>	98.6	80	24 h	NE*	Gentry – Weeks et al, 2002
Convencional	<i>hisJ</i>	85.6	93.9	24 h	NE*	Gentry – Weeks et al, 2002
Convencional	Gen operon transportador de histidina	39.1	100	NE*	NE*	Ward et al, 2005
Múltiple	<i>invA</i> , <i>spvA</i> , <i>hilA</i>	ND‡	100	NE*	3 pg de ADN y 350 UFC por muestra	Trafny et al, 2006
Cultivo-PCR múltiple	<i>invA</i> , <i>spvC</i>	10000%	NE*	NE*	200 bacterias por reacción (50µL)	Chiu et al, 1996
Cultivo-PCR-Hibridación	<i>invA-E</i>	100	100	2 h de incubación	9 UFC en cultivos puros 80 UFC en heces"	Stone et al, 1994
PCR tiempo real múltiple	<i>invA</i> , <i>prot6E</i> , <i>fliC</i>	100	100	8 horas	10 copias de DNA por 25 µL de reacción	Hadjinicolau et al, 2009
PCR múltiple	<i>invA</i>	NE*	NE*	NE*	2x10 <sup>4</sup> UFC/g de heces	Yang et al, 2007

\* No especificado, + Unidades formadoras de colonias, ‡ No determinado.

### c. Pirosecuenciación.

Es una técnica desarrollada por Mostaza Rognaghi y colaboradores (105) como método alternativo a la técnica convencional de secuenciación de ADN, dadas las limitaciones tanto en el rendimiento como en el costo para la mayoría de las aplicaciones actuales. Está fundamentada en la detección de Pirofosfato (PPi) libre durante la síntesis de ADN por la polimerasa, la luz visible generada es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La generación de luz se detecta en forma de pico y se graba gracias a un sistema de detección, reflejando la actividad enzimática en la reacción.

En la actualidad esta técnica es ideal para el análisis de la composición de las comunidades microbianas en sistemas complejos (Metagenómica), tales como: Sistemas de distribución de aguas potable (106), microorganismos del suelo (107), mutaciones en microorganismos de interés clínico como *Salmonella spp.* (108, 109, 110) resistencia genética y transferencia de genes, (111) y microorganismos de interés en la industria de alimentos (112, 113, 114, 115). Su importancia radica en sus numerosas aplicaciones en los distintos campos de la biología, entre los cuales destacan la filogenética, la secuenciación de transcriptomas y la secuenciación de genomas completos de eucariotas y procariotas (103).

### d. Amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA):

Es un método molecular que no está basado en la amplificación mediante PCR sino mediante una reacción isotérmica (37-42°C). Diseñado específicamente para detectar moléculas de ARN en vez de ADN y utilizado también en el análisis de alimentos para detectar *Campi-*

*lobacter spp.*, *Listeria monocitogenes*, *Salmonella spp.*, *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* y virus empleando las secuencias ARNr 16S y ARNm (48, 116, 117). La reacción consiste en ciclos continuos en donde una transcriptasa reversa media la síntesis de ADNc a partir de una secuencia de ARN, seguido por una transcripción in vitro por la ARN polimerasa. Se utilizan una transcriptasa inversa y una RNasa H para producir ADN complementario (ADNc) de doble cadena a partir de ARN. Este ADNc es transcrito mediante la T7 ARN polimerasa produciendo múltiples transcritos de ARN que serán utilizados como sustrato en los siguientes ciclos. No son necesarios los termocicladores ya que toda la reacción se produce a 37-42°C. El producto de ARN generado normalmente se suele detectar mediante sondas (68).

### e. Técnicas de hibridación y Microensayos.

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos emplean como sondas genes marcados, por lo general, con enzimas (biotina, avidina, fosfatasa alcalina) moléculas quimioluminiscentes o radioisótopos para facilitar la detección e identificación de patógenos en alimentos o muestras clínicas. Estas sondas son secuencias que van desde 15 hasta varias miles de pares de bases (pb) que se hibridan con la secuencia complementaria. Esta técnica es ideal para detectar sobre todo microorganismos de crecimiento lento o que no se cultivan tan fácilmente entre ellos *Mycobacterium tuberculosis*, complejo *Mycobacterium avium intracelular*, *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* y el virus del papiloma humano (HPV) (48, 53, 68).

La hibridación de ácidos nucleicos es una técnica con sensibilidad en el rango de  $10^4$  a  $10^6$  copias del gen diana, no compete con la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR y RT-PCR), cuyos límites de detección pueden ser en algunos casos de 10 fg, es decir, cerca de 10 veces superiores a los de hibridación y hasta mil veces superiores a los logrados por inmunoensayos. Sin embargo, en el balance entre ambas técnicas, la hibridación aventaja a la PCR en su aplicación rutinaria, en estos aspectos: a) escalabilidad, b) menores costos marginales (los costos disminuyen a medida que se aumenta el número de muestras analizadas), y c) mayor facilidad de aplicación (118).

Los microensayos o “microarrays” son un sistema miniaturizado basado en la tecnología de hibridación molecular, que analizan múltiples determinantes genéticos, convirtiéndose en una poderosa herramienta diagnóstica para la caracterización molecular y tipificación paralela de muchos aislados de *Salmonella* a la vez (119) y para la detección simultánea de patógenos en alimentos. La técnica emplea soportes que pueden ser de cristal, silicona o nylon, en los cuales se anclan en sitios específicos las sondas de oligonucleótidos conocidos. Las muestras son marcadas con fluorescencia o durante la amplificación en la PCR y luego hibridadas con su secuencia complementaria. La hibridación es detectada mediante un escáner de alta resolución. La información generada puede intercambiarse entre laboratorios y ser usada para hacer comparaciones de cepas (48, 63, 120, 121)

## CONCLUSION

En conclusión, los costos para la detección molecular de *Salmonella* spp. son elevados en comparación con los métodos tradicionales, pero la alta sensibilidad y alta especificidad que ofrece la PCR, los beneficios al sector

salud al lograr un diagnóstico rápido y preciso, la relación costo beneficio que otorga al sector productivo permitiendo la liberación de productos alimenticios al mercado con mayor rapidez y el ahorro de costos, justifican la implementación de esta técnica.

Si bien en la actualidad se han desarrollado nuevos métodos y combinaciones de técnicas que hacen del proceso de detección, un procedimiento menos engorroso, rápido, sensible y específico, la necesidad de realizar la confirmación por el método tradicional aun es vigente y obligatoria. Esto debido a los márgenes de error predominantes en cuanto a especificidad, ya sea en algunas técnicas en mayor proporción que otras, que se traduce en falsos negativos o falsos positivos. Es interesante como el desarrollo de las técnicas ha llegado a tal punto que, pueden discriminar entre microorganismos vivos o muertos, moléculas activas o inactivas, haciendo de esta capacidad una cualidad altamente atractiva principalmente a las empresas, que buscan comercializar productos cada vez más seguros y llevar controles sanitarios cada vez más estrictos durante los procesos industriales, sin embargo, el alto costo de los equipos y reactivos, limita su uso, al empleo de unos pocos con capacidad económica. La detección de *Salmonella* spp. en heces mediante PCR ha demostrado mayor eficiencia, sensibilidad, rapidez que el método convencional y se constituye como una herramienta alterna para confirmar diagnósticos clínicos (122, 123, 124); así como en casos sospechosos de salmonelosis pero con cultivos microbiológicos negativos, porque muchas muestras podrían tener números muy bajos de microorganismos debido al tratamiento previo con antibióticos. La PCR para *Salmonella* complementará pero no reemplazará las técnicas microbiológicas tradicionales que son

necesarias para propósitos epidemiológicos y para el desarrollo de antibiogramas.

Existe la posibilidad de emplear las diferentes metodologías para la detección de *Salmonella* spp. y de otros microorganismos de difícil aislamiento en diferentes matrices (125), empleando los oligonucleótidos apropiados para implementar controles sanitarios y epidemiológicos.

**Conflicto de intereses:** ninguno

**Financiación:** Universidad Cooperativa de Colombia

## REFERENCIAS

1. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyalethumi P, Noor Hidayah M.S, et al. *Salmonella*: A foodborne pathogen. I.F.R. J. 2011;(18): 465–473.
2. Woo YK. Genetic diversity of multi-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimutium isolates from animals and humans. J. Microbiol. 2006; (44): 106-112.
3. Garrido A, Chapela M, Román B, Fajardo P, Lago J, et al. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. Food Control. [Issue 1]. 2013; (30): 76–85.
4. Organización mundial de la Salud (OMS) Departamento de inocuidad de los alimentos, zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria. Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Ginebra [OMS]. 2007.
5. Centers for Disease Control and Prevention/ National Center for Immunization and Respiratory Diseases: Division of Bacterial Diseases. Enfermedades transmitidas por alimentos. [En línea]. [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections\\_g\\_sp.htm#2](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g_sp.htm#2) [Citado el 17 de Diciembre de 2012].
6. Keddy K, Sooka A, Letsoalo M, Hoyland G, Chaignat C, Morrissey A, et al. Sensitivity and specificity of typhoid fever rapid antibody tests for laboratory diagnosis at two sub-Saharan African sites. Bull W H Organ. 2011; (89):640–647.
7. Wattiau P, Boland C, Bertrand S. et al. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. Appl. Environ. Microbiol. 2011; 77(22): 7877–7885
8. Anonymous. Trends and sources: report on zoonotic agents in Belgium in 2006. Federal Agency for the Safety of the Food Chain, Working Group on Foodborne Infections and Intoxication. 2008. Brussels, Belgium.
9. Scallan E. Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. Emerg. Infect. Dis. 2011, (17):7–15.
10. Organización Mundial De La Salud Y Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación. Taller Conjunto FAO/OMS sobre *Enterobacter sakazakii* y otros Microorganismos en la Fórmula Infantil en Polvo, Ginebra: FAO/OMS, 10 Febrero; 2004.
11. Fricker C. R. The isolation of salmonellas and campylobacters. J. Appl. Bacteriol. 1987; (63): 99–116.
12. Grimont P, Weill F, et al. Antigenic formulae of the salmonella serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* and Institut Pasteur. 9<sup>th</sup>. ed. 2007
13. Hyeon J, Chon J, Park J, Kim M, Oh Y, Choi I, Seo K, et al. A Comparison of Subtyping Methods for Differentiating *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* Isolates Obtained from Food and Human Sources. Osong Public Health and Research Perspectives, 2013.
14. Urrutia M, Reyes E, Melo C, Henríquez M, Pineda J, Sakurada A. et al. Estandarización de una Técnica para la Detección de *Salmonella* spp. Útil para Manipuladores de Alimentos Mediante Técnica de Amplificación

- Molecular. Ciencia & Trabajo. 2006; (22): 164-166
15. Philip T F, Lienau Andrew H, Leung S C, Mui L A, Florence H, Bohnert M, Mooijman K. et al. Detection of Salmonella in Fresh Cheese, Poultry Products, and Dried Egg Products by the ISO 6579 Salmonella Culture Procedure and the AOAC Official Method: Collaborative Study. J. AOAC Int. 2003; (86): 275-295.
  16. Microbiology - General guidance on methods for the detection of Salmonella ISO 6579: 2002(E) 4rd. ed. Int.Org. Standard. Genève, Switzerland.
  17. International Standard Organization: Milk and Milk Products "Detection of Salmonella spp. ISO 6785 / IDF 93, 2001.
  18. American Public Health Association: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>rd</sup>. ed. 1992.
  19. Jeffries L. Novobiocin-tetrathionate broth: A medium of improved selectivity for the isolation of salmonellae from faeces. J. Clin. Path. 1959; (12): 568-571.
  20. Mackenzie E F W, Taylor W E, Gilbert W E, et al. Recent experiments in the rapid identification of *Bacterium coli* [type 1]. J. Gen. Microbiol. 1948; (2): 197-204.
  21. Muller L. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphiques. Comp. Rend. Soc. biol.1923; (89): 434-437.
  22. Rappaport F, Konforti N, Navon B. et al. A new medium for certain Salmonellae. J. Clin. Path. 1956; (17): 261-266.
  23. Rappaport F, Konforti N. et al. Selective enrichment medium for Paratyphoid bacteria: inhibitory and growth promoting factors. Appl. Microbiol. 1959; (7): 63-66.
  24. Vassiliadi, P. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: [overview]. J. Appl. Bact. 1983; (54): 69-76
  25. Vassiliadis P, Kalapothaki V, Mavrommati CH, Trichopoulos D. et al. A comparison of the original Rappaport medium (R medium) and the Rappaport-Vassiliadis medium (RV medium) in the isolation of salmonellae from meat products. J. Hyg. Comb. 1984;(93): 51-58.
  26. Pascual M, Calderón V. et al. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. [Editorial]. Díaz de Santos, 1999.
  27. Food and Drug Administration. Bacteriol. A. M, [cap.5]. Salmonella. Ed.2007.
  28. King S, Metzger W J. et al. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen Enteric Agar. [Appl]. Microbiol. 1968; (16): 557-578.
  29. Taylor W J. Isolation of Shigellae. I. Xylose lysine agars: new media for isolation of enteric pathogens. Am. J. Clin. Path. 1965; (44): 471-475.
  30. Sulkin E S, Willett J C. A Triple Sugar-Ferrous Sulphate Medium for use in identification of enteric organisms. J. Lab. Clin. Med. 1940; (25): 649-653.
  31. Johnson J G, Kunz L J, Barron W, Ewing W H. et al. Biochemical differentiation of the Enterobacteriaceae with the aid of Lysine-iron-Agar. [Appl]. Microbiol. 1966; (14): 212-217.
  32. Ewing W H, Davin B R, Edwards P R. et al. The decarboxylase reactions of Enterobacteriaceae and their value in taxonomy. Publ. Hlth. Lab. 1960; (18): 77-83.
  33. Koneman E, Allen S, et al. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. 6th. [Editorial]. Philadelphia: Lippincott Williams amp; Wilkins. 2006.
  34. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Departamento Bacteriología, (M.P.S). [Parte 1] Aislamiento, identificación y serotipificación. 2003.
  35. Torpdahl M, Lauderdale T, Liang S, Li I, Wei S, Chiou C. et al. Human isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Taiwan displayed significantly higher levels of antimicrobial resistance than those from Denmark. Int. J. F. Microbiol, Vol. 161, [Issue 2], 2013, pp: 69-75
  36. Cheung P, Kam K. et al. Salmonella in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. F. R. Int. 2012; (45): 802-808

37. Jeníková G, Pazlarová J, Demnerová K. et al. Detection of Salmonella in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Int. Microbiol.* 2000; (3): 225-229.
38. Katime Z A. Reacción de Widal. [Interpretación clínica]. *Rev. Panam Infectol* 2006; 8(2):40-44
39. Smith SI, Odunukwe NN, Niemogha MT, Ahmed AO, Efiemokwu CA, Otuonye MN, Bankole M, Junaid M, Agomo C, Mafe AG. et al. Idigbe EO Diagnostic methods for typhoid fever in Nigeria. *Br. J. Biomed. Sci.* 2004; (61): 179-181.
40. Vásquez M, Alvarado P, Ponce R. et al. Diagnóstico compatible a fiebre tifoidea, El Porvenir, Trujillo-Perú, (2005). Dpto. Microbiol. P. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
41. Hagren V, Von Lode P, Syrjälä A, Korpimäki T, Tuomola M, Kauko O, Nurmi J. et al. An 8-hour system for Salmonella detection with immunomagnetic separation and homogeneous time-resolved fluorescence PCR. *Int. J. Food. Microbiol.* 2008; (125): 158-161.
42. Smith S, Bamidele M, Fowora M, Goodluck H, Omonigbehin E, Akinsinde K. et al. Application of a point-of-care test for the serodiagnosis of typhoid fever in Nigeria and the need for improved diagnostics. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2011; 5(7):520-526.
43. Integrated Disease Surveillance Project. Manual for laboratory diagnosis of Common epidemic prone diseases for district public health lab. (NCDICI). 2011.
44. Cai H, Lu L, Muckle C, Prescott J, Chen S. et al. Development of a novel protein microarray method for serotyping *Salmonella enterica* strains. *J.C. Microbiol.* 2005; pp. 3427-3430.
45. Mercanoglu B, Griffiths M W. et al. Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of Salmonella in milk, ground beef, and alfalfa sprouts. *J. food Prot.* 2005; 68(3):557-61.
46. Wang L, Li Y, Mustaphai A. et al. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J. food Prot.* 2007; 70(6):1366-72.
47. Luk, JM, Kingman U, Tsang RS, Lindberg AA. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(3): 714-718.
48. Goodridge L D, Fratamico P, Laurids S Ch, Hoorfar J., Griffiths M. et al. Strengths and Shortcomings of Advanced Detection Technologies .Inst. (RDCEF). *Pathog. ASM Press.* 2011. Vol. Chapter (2); pp. 15-46.
49. Ngom B, Guo Y, Wang X, Bi D. et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2010; 397 (3):1113-1135
50. Haukanes B L, Kyam C. Application of magnetic beads in bioassays. *Bio/Techn.* 1993; (11):60-63
51. Lea T, Vartdal F, Nustad K S, Funderud A B, Ellingsen T, Schmid R, Stenstad P, Ugelsstad J. et al. Monosized, magnetic polymer particles: their use in separation of cells and subcellular components, and in the study of lymphocyte function in vitro. *J. Mol. Recognit.* 1988; (1):9-18.
52. Ugelstad J, Stenstad P, Kilaas L, Prestvik W S, Herie R, Berge A, Hornes E. et al. Monodisperse magnetic polymer particles. New biochemical and biomedical applications. *Blood Purif.* 1993; (11):349-369.
53. Mandal P K, Biswas A K, Choi K, Pal U K. *Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview.* A. J. F. Techn. 2011; (6): 87-102.
54. Petrola M, Pinto A, Luigi S, Rojas T. et al. Comparación de la técnica de Inmunoseparación Magnética y el Método Convencional para el aislamiento de *Salmonella* spp, en leche pasteurizada contaminada artificialmente. *Salus.* 2011; vol.15, (3): 31-38.

55. Rojas T, Vásquez Y, Reyes D, Martínez C, Medina L. et al. Evaluación de la técnica de inmunoseparación magnética para la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche. *Arch. Latinoam Nutr* 2006; (56): 257-263.
56. Vermunt A, Franken A, Beumer R. et al. Isolation of *Salmonella* by Immunomagnetic Separation. *J. App. Bacteriol.*1992; (72): 112-118.
57. Stevens K, Jaykus L. et al. Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: [review]. *C. R. Microbiol.* 2004; (30): 7-24.
58. Kaˆrkkäˆinen R, Drasbek M, McDowall I, Smith C, Young N, Bonwick G. et al. Aptamers for safety and quality assurance in the food industry: Detection of pathogens. *Int. J. F. Sci. Techn.* 2011; (46): 445-454.
59. Alfonso A, Pérez B, Faria R, Mattoso L, Hernández M. et al. Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles. *Bios. Bioelect.* 2013; (40): 121-126.
60. Taban B, Mercanoglu U, Aytac S. Rapid detection of *Salmonella* in milk by combined immunomagnetic separation-polymerase chain reaction assay. *J. Dairy. Sci* 2009; (92): 2382-2388.
61. Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, Cudjoe KS, Hornes E, Ugelstad, J, Uhlén M. et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol.*1994; *Rev.* 7(1): 43-54.
62. Haq I, Chaudhry W, Akhtar M, Andleeb S, Qadri I. et al. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: rev. *Virology. J.* 2012; (9):9
63. Martínez B. I. Desarrollo de métodos de detección de salmonella basados en la reacción en cadena de la polimerasa y su validación en muestras alimentarias. [Editorial]. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitateko Argitalpen Zerbitzua. [Tesis doctoral]. 2011.
64. Tombelli S, Minunni M, Mascini M. et al. Aptamers- based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol Eng*, 2007; (24): 191-200.
65. Saiki, R.K. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Sci.* 1988; (239): 487-91.
66. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana H G. et al. Studies on polynucleotides. 96. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 1971; (56): 341-361.
67. Mullis K B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 1990; 262(4): 56 -61.
68. Chien A, D B Edgar, Trela, J. M. et al. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*1976; (127): 1550-1557.
69. Kaledin A S, Sliusarenko A G, Gorodetskii S I. Isolation and properties of DNA polymerase from extreme thermophilic bacteria *Thermus aquaticus* YT-1. *Biokhimiia.*1980; (45): 644-646.
70. Cardona C N, Sánchez-J M, Lavalett L, Muñoz N, Moreno J. et al. Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella* serogroups and serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2009; 65(3): 327-330.
71. Yuan Y, Xu W, Zhai Z, Shi H, Luo Y, Chen Z, Huang K. et al. Universal primer-multiplex PCR approach for simultaneous detection of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp. in food samples. *J. Food Sci.* 2009; 74(8): 446-452.
72. Lavalett L, Sánchez MM, Muñoz N, Moreno J, Cardona-C N. Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction for molecular identification of *Salmonella enterica* serogroups B, C2, D. *E. Biom.* 2009; 29(2):244-52.
73. Muñoz N, Díaz-O M, Moreno J, Sánchez-J M, Cardona-C N. et al. Development and evaluation of a multiplex real-time polymerase chain reaction procedure to clinically type prevalent *Salmonella enterica* serovars. *J. Mol. Diagn.* 2010; 12(2):220-5.
74. Taylor J M, Illmensee R, Summers J. et al. Efficient transcription of RNA into DNA by

- avian sarcoma virus polymerase. *Biochim. Biophys. [Acta]*.1976; (442): 324-330.
75. Suo B, He Y, Paoli G, Gehring A, Tu SI, Shi X. et al. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens. *Mol. Cell. Probes*. 2010; 24(2): 77-86.
76. Feldsine P, Abeyta C, Andrews W et al. AOAC International Methods Committee Guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *J. AOAC Int*. 2002; (85): 1187- 1200
77. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C. et al.
78. Löfström CH, Knutsson R, Engdahl CH, Radstrom P. Rapid and Specific Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feed Samples by PCR after Culture Enrichment. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004; (70): 69-75.
79. Moganedi K, Goyvaerts E, Venter S, Sibara M. et al. Optimisation of the PCR-invA primers for the detection of *Salmonella* in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. *Water SA*. 2007; (33): 195-202.
80. Ferraz S, Muller M, Macagnan M, Rodenbusch C, Wageck CL, Cardoso M. et al. Detection of *Salmonella* spp. from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. *Braz. J. Microbiol*. 2005; (36): 373-377.
81. Villarreal, J L, Soto Z, Pereira N, Varela P, Jaramillo R, Mendoza E, Villanueva D. et al. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Salmonella* spp. En leche en polvo: Optimización del método en 12 horas. *Salud. Univ. Norte*. 2008; 24(2): 216-225.
82. Dos Santos L, Nascimento V, De Oliveira S, Flores M, Pontes A, Ribeiro A, et al. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of salmonella in artificially inoculated chicken meat. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 2001; (43):247-250.
83. Soltani M, Shahhosseiny M, Shahbazzadeh D, Karimi V, Mirzahoseini H, Mahboudi F, et al. Selective Amplification of prt, tyv and invA Genes by Multiplex PCR for Rapid Detection of *Salmonella typhi*. *Iran. Biomed. J*. 2005; (9): 135-138.
84. Cohen H, Mechanda S, Lin W. et al. PCR Amplification of the fim. A Gene Sequence of *Salmonella typhimurium*, a Specific Method for Detection of *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol*. 1996; (62):4303-4308.
85. Hadjinicolau A , Demetriou V, Enmanuel M, Kakoyiannis C, Kostrikis L. Molecular beacon-based real time PCR detection of primary isolates of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella enteritidis* in environmental and clinical samples. *BMC Microbiol*.2009; 19(9): 97.
86. Sanchez M Cardona N. Validation of a PCR for diagnosis of typhoid fever and salmonellosis by amplification of the hilA gene in clinical samples from Colombian patients. *J. Med. Microbiol*. 2004; (53): 875-8.
87. Marathe S, Chowdhury R, Bhattacharya R, Govindasamy A. et al. Chakravorty. Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against hilA gene. *Food Control*. 2012; (23): 559-563.
88. Hagren V, Von Lode P, Syrjäla A, Soukka T, Lövgren T, Kojola H, Nurmi J. et al. An automated PCR platform with homogeneous time-resolved fluorescence detection and dry chemistry assay kits. *Anal. Biochem*.2008; (374): 411-416.
89. Wolffs P F G, Glencross K, Thibaudeau R, & Griffiths M W. et al. Direct quantitation and detection of *Salmonellae* in biological samples without enrichment, using two step filtration and real-time PCR. *Applied and Environm. Microbiol*, 2006; (72):3896-3900.
90. Schönenbrücher V, Mallinson E, Bülte M. et al. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. *Int. J. Food Microbiol*.2008; (123): 61-66.
91. Malorny B, Löfström C, Wagner M, Krämer N, & Hoorfar J. et al. Enumeration of *Salmonella* bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk

- assessment. *Applied and Environm Microbiol*, 2008; (74): 1299–1304.
92. Rump L V, Asamoah B, & González-Escalona N. et al. Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from *Salmonella* cells. *BMC Research*, 2010. [Notes]: pp.3, 211.
93. González N, Hammack T S, Russell M, Jacobson A P, De Jesus A J, Brown E W, et al. Detection of live *Salmonella* spp. cells in produce by a TaqMan based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting inv A mRNA. *Applied and Environm. Microbiol.*2009; (75): 3714–3720.
94. McCabe E, Burgess C, O'Regan E, McGuinness S, Barry T, Fanning S, Duffy G. et al. Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hilA* gene of *Salmonella enterica* subspecies enteric. *Microbiol.* 2011; (28): 447-456
95. 95. Josefsen M H, Krausen M, Hansen F, Hoorfar J. et al. Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-Based Method for Detection of *Salmonella* Bacteria in Meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; (73): 3040-3048.
96. D'Urso O, Poltronieri P, Marsigliante S, Storelli C, Hernández M, Rodríguez D. et al. A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food sample. *Food. Microbiol.*2009; (26): 311–316.
97. Chen J, Zhang L, Paoli G, Shi C, Tu S, Shi X. et al. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 2010;(137):168–174.
98. O'Leary J, Corcoran D, Lucey B. et al. Comparison of Enteric Bio Multiplex PCR System with Routine Culture for detection of Bacterial Enteric Pathogens. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 49, [N° 11]. Nov. 2009; pp. 3449-3453.
99. Tatavarthy A, Cannons A. et al. Real-time PCR detection of *Salmonella* species using a novel target: the outer membrane porin F gene (OMPFG). [Letters] *Applied Microbiol.* 2010; (50): 645–652.
100. Hyeon J, Park C, Choi I, Holt P, Seo K. et al. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *Int. J. Food. Microbiol.*2010. (144) 177–181
101. Almeida C, Cerqueira L, Azevedo N F, Vieira M J. et al. Detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples, *Int. J. Food. Microbiol.*2013; (161): 16–22
102. Chen J, Zhang L, Paoli G, Shi C, Tu S, Shi X. et al. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *Int. J. Food. Microbiol.* 2010; (137): 168–174.
103. Maurer J. Rapid Detection and Limitations of Molecular Techniques. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2011; (2):259–279.
104. Chen ., Zhang L, Paoli G, Shi C, Tu S, Shi X. et al. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. *Int. J. Food. Microbiol.*2010; (137):168–174.
105. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome [Res.]*. 2001; 11(1):3-11.
106. Kwon S, Moon E, Seung K, Hong S, Park H. et al. Pyrosequencing demonstrated Complex Microbial Communities in a Membrane Filtration System for a Drinking Water Treatment Plant. *Microbes Environ.* 2011; 26(2): 149–155.
107. Urich T, Lanzén A, Qi Ji, Huson D H, Schlepper C C, Schuster S. et al. Simultaneous Assessment of Soil Microbial Community Structure and Function through Analysis of the Meta-Transcriptome. *PLOS ONE*. 2008; 3(6): 1-13.
108. Stecher B, Chaffron S, Kappeli R, Hapfelmeier S, Friedrich S, et al. Like Will to Like:

- Abundances of Closely Related Species Can Predict Susceptibility to Intestinal Colonization by Pathogenic and Commensal Bacteria. *PLOS. Pathog.* 2010; 6(1): 1-15
109. Hopkins KL, Arnold C, Threlfall EJ. Rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing technology. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 68(1):163-71.
110. Guard J, Morales C, Fedorka-Cray P, Gast R. Single Nucleotide Polymorphisms that Differentiate Two Subpopulations of *Salmonella enteritidis* within Phage Type. *BMC Research [Notes]* 2011; (4): 2-14.
111. Kristiansson E, Fick J, Janzon A, Grabic R, Rutgersson C, Weijdegård B, et al. Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. *PLOS ONE* 2011; 6(2): 17-38.
112. Hui-fang T, Bao-hong X, Xiu-juan L, Bo L, Xiao-li W. et al. Application of PCR-Pyrosequencing technology for food poisoning of *Salmonella*. *Chinese. J. Health. Lab. Techn.* 2009; (11): 52.
113. Shanks OC, Kelty CA, Archibeque S, Jenkins M, Newton RJ, McLellan SL, et al. Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(9): 2992-3001.
114. Telias A, White J, Pahl D, Ottesen A, Walsh C. et al. Bacterial community diversity and variation in spray water sources and the tomato fruit surface. *BMC Microbiol.* 2011; 11(1): 81-93.
115. Nordentoft S, Mølbak L., Bjerrum L, Vylder J, Immerseel F, Pedersen K. et al. The influence of the cage system and colonization of *Salmonella enteritidis* on the microbial gut flora of laying hens studied by T-RFLP and 454 pyrosequencing. *BMC Microbiol.* 2011; (11):187.
116. Chen S, Wang F, Beaulieu J, Stein R, Ge B. et al. Rapid Detection of Viable *Salmonellae* in Produce by Coupling Propidium Monoazide with Loop-Mediated Isothermal Amplification. [Appl] *Environ Microbiol.* 2011; 77(12).
117. Wang F, Jiang L, Yang Q, Prinyawiwatkul W, Ge B. et al. Rapid and Specific Detection of *Escherichia coli* Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in Ground Beef, Beef Trim, and Produce by Loop-Mediated Isothermal Amplification. [Appl]. *Environ. Microbiol.* 2012; 78(8): 2727–2736.
118. Rangel E, Pantoja A, Rangel J, Centeno F. et al. Hibridación de ácidos nucleicos: una tecnología factible para la detección de virus de plantas en Venezuela. *UNIAHOY.* 2009.
119. Grønlund H, Riber L, Vigre H, Löfström C, Folling L, Huehn S, et al. Microarray-based genotyping of *Salmonella*: Inter-lab. Eval. *Reprod. Standard. Potent. Int. J. Food Microbiol.* 2011 ;( 145):S79–S85.
120. Rasooly A, Herold k. et al. Food Microbial Pathogen Detection and Analysis Using DNA Microarray Technologies. *Foodborne Pathogens and Disease.* 2008; (5): 4
121. Kim H, Park S, Lee T, Nahm B, Kim Y, Kim H. et al. Microarray detection of food-borne pathogens using specific probes prepared by comparative genomics. *Biosensors Bioelect.* 2008; (24)2, 15 pp. 238–246.
122. Trafny E, Kozłowska K, Zpakowska M. et al. A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enterica* serovars *enteritidis* in human feces. [Lett]. (*appl*) *microbiol.* 2006; 43(6): 673–9.
123. Chiu C, Ou J. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(10):2619-22.
124. Stone G, Oberst R, Hays M, McVey S, Chengappa M. Detection of *Salmonella* from Clinical samples by enrichment broth cultivation - PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(7):1742–9.
125. ICONTEC, *Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos de alimentos. Requerimientos específicos para el método general.* NTC 5158. ICONTEC. Bogotá, 2003.