



Fecha de recepción: Junio 17 de 2020

Fecha de aceptación: marzo 8 2022

ARTÍCULO DE REVISIÓN

<https://dx.doi.org/10.14482/sun.38.3.641.39>

Biomarcadores moleculares del género *salmonella* aislada en alimentos

Molecular biomarkers of the gender salmonella isolated in food

CLAUDIA PATRICIA JAIMES-BERNAL¹, MARÍA INÉS TORRES-CAYCEDO²,
DIEGO ALEXANDER HERRERA GONZÁLEZ³

¹ Bacterióloga y laboratorista clínico, UIS. Magister Science en Genética humana - UNAL. Doctorado en Biología Molecular y celular. Universidad de Jaén. Docente Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Boyacá (Colombia). cpjaimes@uniboyaca.edu.co. Orcid: 0000-0002-8034-190X. CvLAC: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000162930&lang=es

² Bacterióloga y laboratorista clínico, Pontificia Universidad Javeriana (Colombia). Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) Sede Tunja. Candidata a doctorado en Seguridad de los Alimentos. Universidad de Jaén. Docente Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Boyacá (Colombia). mitorres@uniboyaca.edu.co. Orcid: 0000-0003-0690-3182 rh=0000206334&lang=es. CvLAC: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_

³ Bacteriólogo y laboratorista clínico, Universidad de Boyacá (Colombia). Laboratorista daherrera@uniboyaca.edu.co. Orcid: 0000-0001-8348-4618

Correspondencia: Diego Alexander Herrera González. daherrera@uniboyaca.edu.co

RESUMEN

Introducción: El género *Salmonella* está conformado por patógenos alimentarios causantes de salmonelosis, una enfermedad de distribución cosmopolita, que afecta a todos los grupos poblacionales, tanto en los países desarrollados como en los que están en vía de desarrollo, siendo un problema de salud pública. Con relación a esto, los biomarcadores moleculares se convierten en una herramienta útil para su diagnóstico y seguimiento.

Objetivo: Describir los marcadores moleculares del género *Salmonella* y las diferentes técnicas moleculares empleadas para su detección en la actualidad.

Metodología: Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos Science direct, PubMed, Proquest y Ovid, utilizando 5 palabras clave, las cuales se combinaron de diferentes maneras para finalmente obtener 50 referencias bibliográficas.

Resultados: Se evidencia gran variedad de biomarcadores del género *Salmonella*, los cuales son detectados por pruebas moleculares, como la técnica de PCR, que permite la detección directa de genes que codifican para los antígenos somáticos O y flagelares H de *Salmonella* y la determinación de los posibles serovares implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos, de una manera rápida y precisa. Cabe resaltar las ventajas de los métodos moleculares frente a la serotipificación en cuanto al costo-beneficio, estandarización óptima, alta sensibilidad, especificidad y rapidez en la obtención de los resultados.

Conclusiones: Los biomarcadores moleculares se consideran una herramienta de referencia para la identificación de serovares de *Salmonella* y su serotipificación, a través de la PCR, con un alto nivel de especificidad y sensibilidad en los resultados, aportando información relevante a nivel epidemiológico.

Palabras clave: alimentos, molecular, patógeno, PCR, *Salmonella*.

ABSTRACT

Introduction: The *Salmonella* genus is composed of food pathogens that cause salmonellosis, a disease of cosmopolitan distribution that affects all population groups, both in developed and developing countries, being a public health problem. In this regard, molecular biomarkers become a useful tool for its diagnosis and monitoring.

Objective: Describe which are the molecular markers of the *Salmonella* genus and their determination through different molecular techniques currently used.

Methodology: A bibliographic search was performed in databases such as Pubmed, Science direct, Elsevier, NCBI, Proquest and Ovid, using 5 keywords, which were combined in

different ways to finally obtain 50 bibliographic references from the year 2005 to currently, selecting articles in English and Spanish.

Results: A great variety of biomarkers of the *Salmonella* genus are evident, which are detected by molecular tests such as the PCR technique, this allows the direct detection of the genes that encode the somatic O and flagellar H antigens of *Salmonella* and quickly allows the determination of the possible serovars involved in food-borne diseases, in a fast and precise way, in addition to highlighting the advantages of the described molecular methods compared to serotyping in terms of cost-benefit, optimal standardization, high sensitivity, specificity and speed in the results.

Conclusions: Molecular biomarkers are considered a reference tool for the identification of *Salmonella* serovars and their serotyping, through molecular techniques such as PCR, with a high level of specificity and sensitivity in the results, which are of epidemiological importance.

Keywords: food, molecular, pathogen, PCR, *Salmonella*.

INTRODUCCIÓN

Se considera la *Salmonella* como un género variado de bacilos gramnegativos y un importante patógeno alimentario, responsable de una alta morbilidad y mortalidad en un rango amplio de huéspedes, entre ellos, humanos, aves y mamíferos. Esta bacteria causa en humanos la enfermedad conocida como salmonelosis, que se presenta con diarrea leve, aunque puede llegar a ser mortal dependiendo del estado inmune del individuo, de la dosis de infección y la cepa infectante. Es de distribución cosmopolita y afecta a todos los grupos de edades, tanto en los países desarrollados como en los que están en vía de desarrollo, constituyéndose en un importante problema de salud pública, con impacto a nivel económico tanto en humanos como animales (1).

La detección e identificación rápida y confiable de este patógeno en alimentos y demás ambientes es la clave para salvaguardar el suministro de alimentos y evitar su contaminación (2). Entre las patologías más importantes se presenta la salmonelosis no tifoidea, una de las enfermedades bacterianas transmitida por los alimentos más frecuente. Los miembros del género *Salmonella* son considerados el segundo patógeno bacteriano más prevalente, y ocasionan alrededor de 94 625 casos en personas, confirmados en 2015 en Europa, y representan el 22.5 % de los brotes reportados por contaminación en alimentos. En los Estados Unidos, *Salmonella* causa aproximadamente 1.1 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos cada año (3).

A nivel Colombia, se tiene un subregistro acerca del verdadero problema de *Salmonella*, tanto en identificación de reservorios como en infecciones, morbilidad y mortalidad asociada; además, el estudio más reciente sobre *Salmonella* aislada de alimentos se realizó en la Costa Atlántica y demostró la presencia de diversos serotipos circulantes (4).

El género *Salmonella* consta de dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori* (V), que incluye más de 2500 serotipos. Por su parte, *S. entérica* se subdivide en seis subespecies: entérica (I), salamae (II), arizonae (IIIa), diarizonae (IIIb), houtenae (IV) e indica (VI) (5).

La identificación de los serogrupos y serotipos de *Salmonella* se ha realizado a través del uso de antisueros (serotipificación); no obstante, el aislamiento microbiológico, las pruebas bioquímicas y la serotipificación llevan un tiempo considerable, son costosas y han mostrado limitaciones, en algunos casos han sido incapaces de establecer dichos serotipos (6). Estas dificultades han hecho que se desarrollen técnicas moleculares más precisas para la identificación, como por ejemplo, el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, para la amplificación de genes como invasina A (*invA*), siendo un ensayo selectivo y robusto (7).

Considerando la importancia del diagnóstico con certeza del género *Salmonella* y sus serotipos, se propone esta revisión con el objetivo de describir cuáles son los marcadores moleculares y las diferentes técnicas utilizadas para la determinación de este patógeno.

METODOLOGÍA

Para la elaboración de esta revisión de tema no sistemática se realizó una búsqueda bibliográfica en las siguientes bases de datos: Pubmed, Science Direct, Elsevier, Proquest y Ovid, utilizando los siguientes descriptores: Alimento (D005502), Molecular (D002850), Patógeno (D009676), PCR (D016133) y *Salmonella* (D012475), los cuales se combinaron de diferentes maneras para finalmente obtener 50 artículos. Los criterios de selección de los artículos fueron: [1] publicaciones en revistas indexadas; [2] publicaciones de los últimos quince años; [3] publicaciones que mencionaran análisis y técnicas moleculares. Los artículos seleccionados fueron tanto en inglés como en español, publicados entre 2005 y 2020, años en los que se encontró información indispensable para la construcción de esta revisión.

MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA*

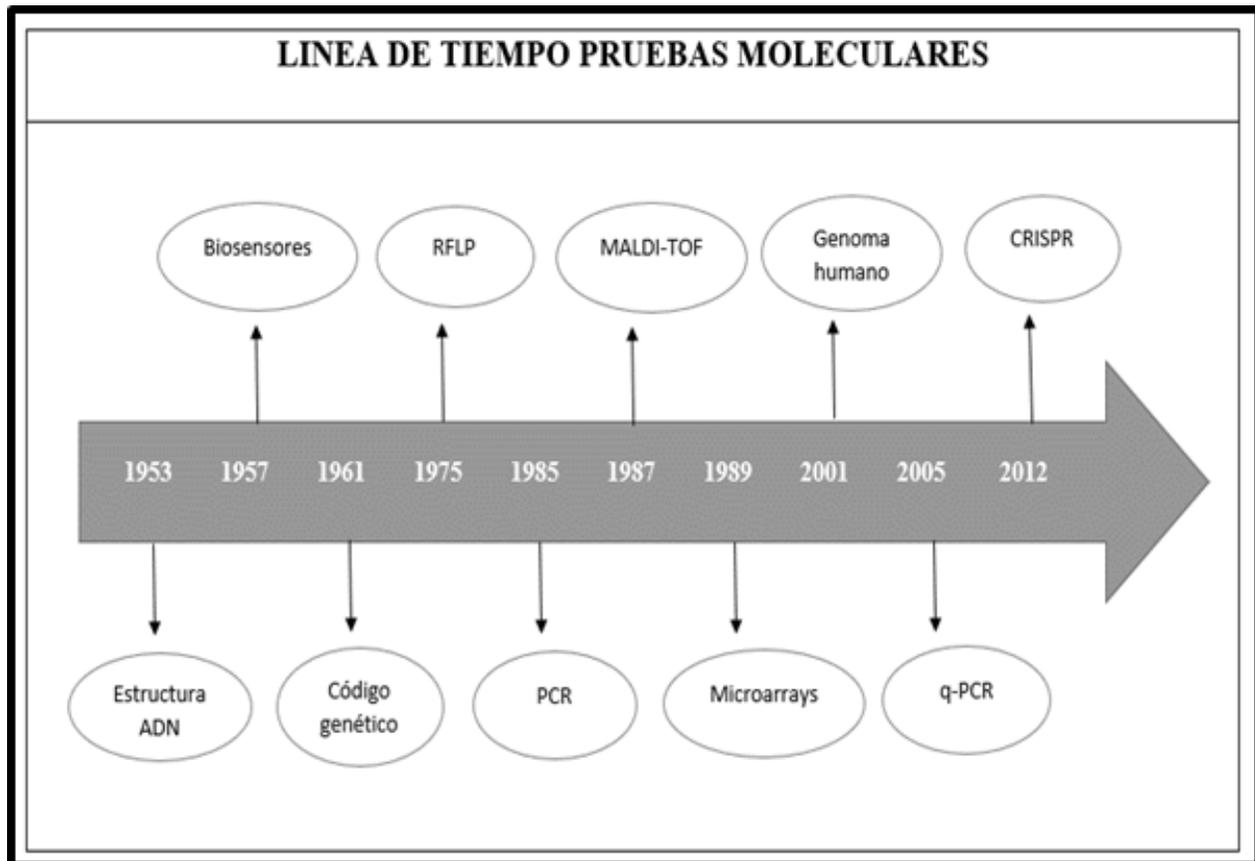
La detección de patógenos en alimentos por métodos de diagnóstico convencional implica varias etapas, y en muchos casos son eficaces y con bajos costos, sin embargo, presentan la desventaja de aportar resultados en días o semanas, ser laboriosos en algunos casos y solo permiten la identificación de género y en pocos casos la especie (8).

A través de la historia se tiene registro que los principales avances en los ensayos de detección de patógenos en alimentos, basados en ácidos nucleicos, se produjeron a partir de 1980 (9). Considerando lo mencionado, los primeros métodos de identificación molecular que se emplearon fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con sonda específica y el análisis de Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o ribotipificación (9).

Con el pasar de los años, descubrimientos como la PCR, la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a información en bases de datos, han aportado al desarrollo de nuevas herramientas moleculares, mostrando un incremento en su uso (8,9).

Se han desarrollado diferentes protocolos basados en métodos moleculares para la detección de *Salmonella* a partir de muestras clínicas y alimentos (10). Recientemente se ha dado un paso hacia las plataformas moleculares más sofisticadas para la identificación de microorganismos patógenos, incluyendo sistemas de amplificación *in vitro* en tiempo real, biosensores y microarreglos, los cuales han sido desarrollados o se están desarrollando para su uso como métodos rápidos en la detección de patógenos en alimentos (9,11).

Considerando lo referido, se observa que a través de los años se han venido desarrollando técnicas dependiendo de las necesidades que se requieran en cuanto a investigación, por eso se muestra la evolución con respecto a estos métodos. (figura 1)



Fuente: elaboración propia.

Figura 1. Línea de tiempo de las pruebas moleculares más relevantes a través de la historia. 1953: se realiza el descubrimiento de la estructura de ADN. 1957: se utilizan por primera vez los biosensores. 1961: se descifra el código genético. 1975: se da inicio a ensayos con la técnica RFLP (Polimorfismos de fragmentos de restricción). 1985: Kary Mullis inventa la técnica de biología molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). 1987: Se desarrolla la técnica MALDI-TOF en Japón. 1989: se realizan los primeros ensayos con Microarrays. 2001: se descubre el 99 % del genoma humano. 2005 se avanza en variantes de la PCR como la qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real). 2012: desarrollo de la técnica CRISPR.

TÉCNICAS PARA DETERMINAR PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Como ya se ha mencionado, para la determinación de *Salmonella* se han estandarizado una gran variedad de métodos, como los inmunosensores, pruebas bioquímicas (12), estudio microbiológico de control de alimentos (13), reacciones de amplificación de ADN basadas en PCR (14), repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas por su acrónimo en inglés, CRISPR (15), microarreglos e inmunoensayos (16), cada uno con sus características y campos de acción determinados.

En la actualidad las técnicas moleculares superan las limitaciones de las técnicas tradicionales y serológicas para la detección correcta de patógenos. Las pruebas moleculares permiten una identificación más eficiente y de mayor fiabilidad, además de ser muy variadas y aplicables en casi cualquier diagnóstico asociado con agentes biológicos y en cualquier campo de acción (17). Al respecto, entre las técnicas moleculares que se han utilizado para genotipificar microorganismos está la PCR. Este método es más rápido, más simple y más económico que otros métodos de tipificación genómica mencionados anteriormente (18).

Los procedimientos de tipificación molecular como electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), rep-PCR (Repetitive Element Palindromic PCR) y tipificación de la secuencia multilocus (MLST) se han empleado de manera efectiva en investigaciones epidemiológicas y filogenéticas de los diferentes patógenos, especialmente *Salmonella* (19).

Existen otras técnicas más recientes, como la espectrometría de masas MALDI-TOF, que se posiciona como una metodología relevante para la identificación de microorganismos; esta se fundamenta en el análisis de proteínas, a través de la creación de un espectro de masas específico de género y especie (20).

Otro método de diagnóstico que se utiliza con frecuencia y que permite obtener resultados rápidos de detección de *Salmonella* y demás patógenos es la técnica inmunocromatográfica. Se trata de una prueba cualitativa en la cual la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos anti-*Salmonella*) (12).

Los inmunosensores electroquímicos son biosensores de ligando de afinidad basados en dispositivos de estado sólido en los cuales ocurren reacciones inmunoquímicas en la superficie del transductor para generar una señal electroquímica. El concepto de la metodología del inmunosensor

es similar a la prueba de ELISA convencional. La tecnología permite la determinación altamente sensible del inmunocomplejo (anticuerpo-antígeno) utilizando diferentes métodos (21,22).

El inmunodiagnóstico se aplica para la rápida detección de patógenos que no pueden identificarse fácilmente por otros métodos convencionales. El desarrollo del ensayo se considera como un hito importante en el avance del diagnóstico serológico de enfermedades causadas por virus (23). Sin embargo, cambios importantes en el ADN y las tecnologías de secuenciación están enfrentando un desafío en la detección e identificación de subtipos de *Salmonella* (24).

Las secuencias CRISPR han sido reportadas como posibles secuencias diana para el desarrollo de ensayos PCR específicos encaminados a la subtipificación de aislados de *Salmonella*. A pesar de los resultados no concluyentes reportados en diversos estudios, otros han hallado que estas consecuencias pueden ser prometedoras para la identificación de aislados de *Salmonella*. Estas regiones CRISPR están compuestas por una serie de repeticiones directas con secuencias de 21 a 37 nucleótidos, separadas por secuencias espaciadoras únicas de 20 a 40 nucleótidos específicamente (25).

La mayoría de las técnicas aplicadas para la determinación de patógenos se caracterizan por ser sencillas, rápidas, sensibles y versátiles (26,27), pero no todas cumplen estos requisitos, algunas son de alto costo y de un manejo complejo, como por ejemplo, la espectrometría de masas MALDI-TOF (28).

En virtud de las técnicas moleculares, se ha podido identificar que la contaminación de los alimentos, del medio ambiente (agua, roedores, insectos, aves) y de los productos de origen animal tienen un desempeño clave en el ciclo infeccioso de *Salmonella* por medio de los biomarcadores (29).

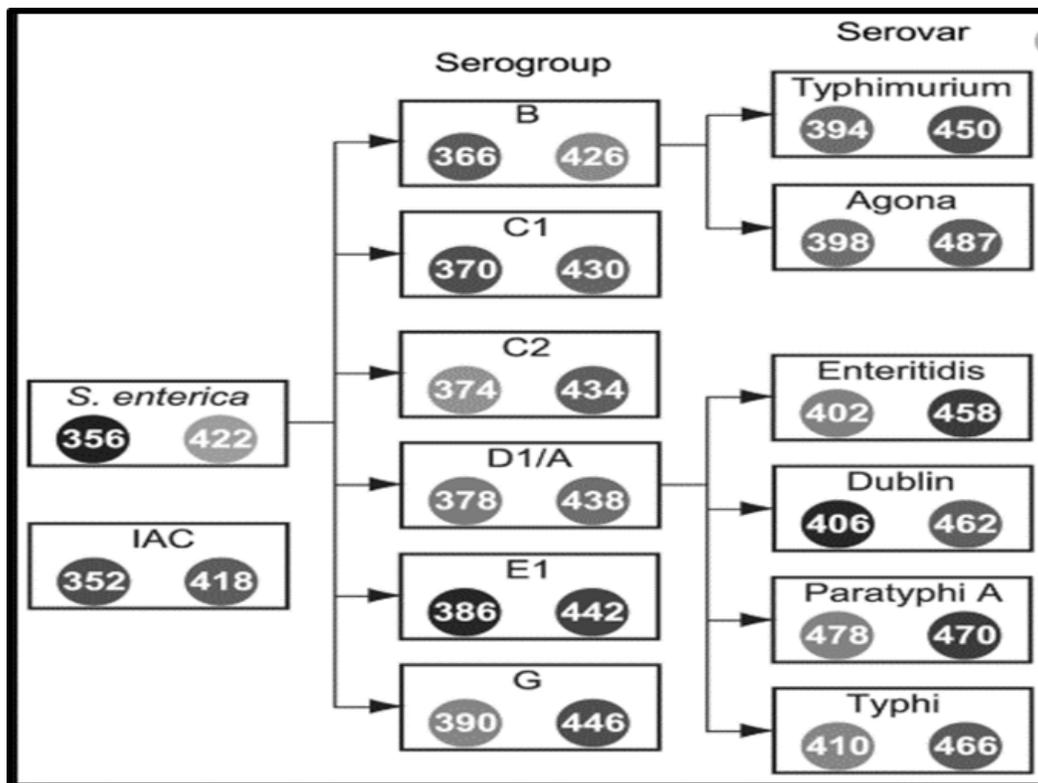
MARCADORES MOLECULARES DEL GÉNERO SALMONELLA

La identificación del serotipo y posterior clasificación de los aislados de *Salmonella* se han basado históricamente en estudios serológicos, reacciones de anticuerpos específicos con características del antígeno del aislado particular (5).

Considerando lo mencionado previamente, para determinar los diferentes biomarcadores que ayudan en la detección de los serotipos del género *Salmonella*, existen diferentes técnicas, las cuales se pueden clasificar en las siguientes categorías: métodos basados en ácidos nucleicos como la PCR, métodos inmunológicos (ELISA) y métodos basados en biosensores, dando así un amplio campo para detectar y convertirse en una gran ayuda diagnóstica (30,31).

La posibilidad de confirmar los resultados obtenidos aplicando un método molecular mediante el cultivo no es adecuado, y esto podría deberse a reacciones inespecíficas que ocurren en los diferentes cultivos o caldos de enriquecimiento utilizados, ya que se puede presentar una reacción cruzada del ADN investigado con similares microorganismos taxonómicos (32).

Para llegar a la determinación efectiva de los biomarcadores del género *Salmonella* se han empleado diferentes métodos moleculares como principal herramienta diagnóstica (33), hasta llegar a un punto muy importante, los linajes de serogrupo / serovar, que se basan en la fórmula de Kauffmann-White (figura 2), cada categoría (en recuadro) es detectada por un marcador genético (34).



Fuente: Figura 2: Richmond G, Khine H, Zhou T, Ryan D, Brand D, McBride M, Killeen K. Mass-Code Liquid Arrays as a Tool for Multiplexed High-Throughput Genetic Profiling. PLOS ONE. 2011; 4 (6): 1-14.

Figura 2: Linajes de serogrupo / serovar basados en fórmulas de Kauffmann-White; esta clasificación se basa en un sistema que clasifica el género *Salmonella* en serotipos, basados en antígenos de superficie (51).

La clasificación por serotipos es el primer paso esencial en la caracterización de los aislamientos de *Salmonella* y es importante para la vigilancia, seguimiento de la fuente y detección de brotes en pro de frenar las ETA (35). Para mejorar la detección y reducir la carga de salmonelosis, se han desarrollado métodos moleculares de serotipos de *Salmonella* de alto rendimiento y a bajo costo (36).

Los serotipos *S. Enteritidis* y *S. Paratyphi* son los más prevalentes en los aislamientos de alimentos, los cuales también se identifican correctamente a través de PCR múltiple diseñados para la amplificación de genes, que permiten la identificación de serogrupo y serotipo, respectivamente (37). En los productos de PCR convencional la manera como se detecta si ocurrió la amplificación es por medio de electroforesis en gel de agarosa además, al incluir marcadores de peso molecular es posible determinar el peso del segmento amplificado, y así corroborar si realmente corresponde al tamaño del gen que se quiere identificar (38).

Algunos biomarcadores del género *Salmonella* permiten la detección directa de los genes que codifican para los antígenos somáticos O y flagelares H de *Salmonella* y posibilitan de manera rápida la determinación de los posibles serovares implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos (39).

DISCUSIÓN

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa comúnmente encontrada en personas alrededor del mundo (40). El género *Salmonella* es considerado uno de los causantes más frecuentes de diarrea aguda en las personas a través de los alimentos y la incidencia parece estar aumentando en varios países a nivel mundial; además, *Salmonella Typhimurium* es el serotipo más común identificado y considerado como uno de los más virulentos que afectan a las personas de todas las edades (41).

La detección de *Salmonella* en los alimentos es esencial desde la perspectiva clínica, epidemiológica y de control de infecciones (42); también la PCR es considerado un método rápido para la detección e identificación de patógenos como *Salmonella* (43). Estos métodos moleculares, como la PCR en tiempo real, son altamente sensibles, muy específicos, rápidos y reproducibles en todos los campos de acción que se desempeñen (44,45).

La virulencia de los diferentes serovares existentes de *Salmonella* probablemente no sea el resultado de un solo cambio genético, sino, más bien, de una serie de alteraciones en una gran cantidad de genes asociados a la virulencia (46).

Para llegar a este punto se pasó por varios métodos tanto moleculares como convencionales. El método de cultivo convencional es conocido por ser el estándar para la detección de bacterias en alimentos, pero generalmente lleva más tiempo y podría ser menos sensible en comparación con las técnicas de base molecular. Por lo tanto, el uso del método de PCR específico es un procedimiento útil para la identificación rápida de *Salmonella* en alimentos, ya sea en rutina pruebas o esfuerzos de investigación (47).

El ensayo de PCR y demás técnicas moleculares constituyen una herramienta que agiliza y fortalece el diagnóstico de *Salmonella* en diferentes alimentos, lo cual permite liberar los productos alimenticios en un menor tiempo (48). La variación en los datos observados de los diferentes estudios realizados para la detección de *Salmonella* en alimentos está relacionada con la implementación de normas estrictas de bioseguridad en diferentes lugares de producción y fabricación de productos alimenticios y un adecuado manejo de estos productos durante los últimos años (49).

La mayoría de técnicas tienen limitaciones son relativamente complicadas; necesitan experticia y utilizan productos químicos peligrosos, por lo que el análisis rutinario de muchas muestras resulta poco práctico.

Los biomarcadores se consideran propiedades cuantificadas que pueden establecer una patología o, en este caso, una característica del microorganismo, siendo estos una herramienta diagnóstica, ya que pueden ser específicos de células, enzimas, genes y hormonas y por medio de las técnicas moleculares se llega al punto de reconocer estos biomarcadores. Para *Salmonella*, un ejemplo de biomarcadores son los antígenos O somático y H flagelar, los cuales tienen funciones diferentes y se encuentran en la capa lipídica y los flagelos de la bacteria; además de poder clasificar los serotipos y serovares por medio de ellos, se encuentra una característica única y es la medición de la virulencia de este patógeno en los humanos (39).

Las infecciones bacterianas del género *Salmonella* son responsables de una gran cantidad de enfermedades alrededor del mundo. Estas enfermedades causan pérdidas económicas significativas a los empresarios y demás productores de alimentos. Además, en los diferentes alimentos, especialmente productos cárnicos y avícolas, son los principales reservorios de *Salmonella* que pueden transmitirse a los humanos a través de la cadena alimentaria (50).

CONCLUSIONES

Las diferentes técnicas de diagnóstico molecular representan en la actualidad una alternativa prometedora en el campo de la investigación y en el control de calidad de los alimentos, debido a su rapidez, alta sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de microorganismos patógenos. Por esto mismo, el número de métodos moleculares con gran utilidad en el área de microbiología de alimentos se ha ido aumentando y diversificando, cada uno con sus respectivas fortalezas y debilidades, las cuales deben tenerse en cuenta en el momento de cumplir con los objetivos planteados en los diferentes campos de acción.

Los biomarcadores moleculares se consideran una herramienta de referencia para la identificación de serovares de *Salmonella* y su serotipificación, a través de técnicas moleculares, con un alto nivel de especificidad y sensibilidad en los resultados, un tiempo menor en los procesos, rendimiento en el costo-beneficio, además de obtener datos específicos los cuales son de importancia epidemiológica.

La PCR destaca entre todas las técnicas como el método de diagnóstico molecular más aplicado en el área de alimentos y, recientemente, variaciones de este, como la PCR en tiempo real, han sumado ventajas adicionales a esta técnica, entre las que se destaca una mayor velocidad en la obtención de resultados, especialmente en el aislamiento de *Salmonella* y la determinación de sus biomarcadores.

La detección de microorganismos patógenos en muestras de alimentos, o en materias primas utilizadas para la fabricación de los mismos, es uno de los principales retos en la industria alimenticia actual; por ello mismo es de gran ayuda y de apoyo las técnicas moleculares, para así obtener un gran control de calidad, evitando la contaminación de patógenos como *Salmonella*.

REFERENCIAS

1. Herrera B Y, Jabib RL. Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenicidad muy particular. *Rev Electrónica Vet.* 2015;16(1):1-19.
2. Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, Mcfarland MA, Brown EW. Recent and emerging innovations in *Salmonella* detection: A food and environmental perspective. *Microb Biotechnol.* 2016;9(3):279-92. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12359>

3. Bugarel M, Bakker H den, Grout J, Vignaud ML, Loneragan GH, Fach P et al. CRISPR-based assay for the molecular identification of highly prevalent *Salmonella* serotypes. *Food Microbiol.* 2018;71:8-16. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2017.03.016>
4. Espinal Marin P, Prieto Suárez E, Otero Jiménez V, Máttar Velilla S. Presencia del gen de invasividad INV A en cepas de *salmonella* SPP. aisladas de alimentos del caribe colombiano. *Rev Cuba Salud Pública.* 2006;32(2):115-20.
5. Ricke SC, Kim SA, Shi Z, Park SH. Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. *J Appl Microbiol.* 2018;125(2):313-27. <https://doi.org/10.1111/jam.13888>
6. Leader BT, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Boyle DS. High-Throughput Molecular Determination of *Salmonella enterica* Serovars by Use of Multiplex PCR and Capillary Electrophoresis Analysis. *J Clin Microbiol.* 2009;47(5):1290. <https://doi.org/10.1128/JCM.02095-08>
7. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(1):290. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.290-296.2003>
8. Huertas-Caro C, Urbano-Cáceres EX, Torres-Caycedo M. Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Rev Habanera Ciencias Médicas.* 2019;18(3):513-28.
9. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2014;31(3):535-46.
10. González Pedraza JB, Sanandrés NP, Soto Varela Z, Hernández Aguirre E, Villareal Camacho J. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte.* 2014;30(1):73-94. <https://doi.org/10.14482/sun.30.1.4316>
11. Marcelo M. G, Rosadio A. R, Chero O. A, Díaz O. G, Ciprian C. A, Maturrano H. L. Identification of *salmonella enteritidis* and *salmonella typhimurium* in Guinea pigs by the multiplex PCR. *Rev Investig Vet del Peru.* 2017;28(2):411-7. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13074>
12. Ruiz MJ, Ramallo G, Colello R, Villalobo C, Monteavaro C, Etcheverría A et al. Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella* spp. en canales porcinas. *Rev Colomb Biotecnol.* 2018;20(2):117-23. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.71680>

13. Blanco-Ríos FA, Casadiego-Ardila G, Pacheco PA. Calidad microbiológica de alimentos remitidos a un laboratorio de salud pública en el año 2009. *Rev Salud Publica*. 2011;13(6):953–65. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642011000600008>
14. Bolívar AM, Rojas A, Lugo PG. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Av en Biomed*. 2014;3(1):25-33.
15. Navarro Brotons N. Detección e identificación de Salmonella entérica subsp. entérica en alimentos mediante CRISPR-PCR [Internet]. Valencia: Universitat Politècnica de València; 2011.
16. Braun SD, Ziegler A, Methner U, Slickers P, Keiling S, Monecke S et al. Fast DNA serotyping and antimicrobial resistance gene determination of salmonella enterica with an oligonucleotide microarray-based assay. *PLoS One*. 2012;7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046489>
17. Buitrón-Bustamante JL, Morillo-Velastegui LE. Estandarización de un método de detección molecular del Cucumber mosaic virus (CMV) en banano ecuatoriano. *Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu*. 2017;18(1):113-24. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num1_art:562
18. Fardsanei F, Nikkhahi F, Bakhshi B, Salehi TZ, Tamai IA, Soltan Dallal MM. Molecular characterization of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. *New Microbes New Infect*. 2016;14:24-30. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.07.016>
19. Kizil S. Genotyping results of Salmonella Infantis as a food poisoning agent in Turkey between 2013 and 2017. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2020;44:69-75. <https://doi.org/10.3906/vet-1909-4>
20. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018;22(1):35-45. <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>
21. Cinti S, Volpe G, Piermarini S, Delibato E, Palleschi G. Electrochemical biosensors for rapid detection of foodborne Salmonella: A critical overview. *Sensors (Switzerland)*. 2017;17(8):1910. <https://doi.org/10.3390/s17081910>
22. Shi C, Singh P, Ranieri ML, Wiedmann M, Moreno Switt AI. Molecular methods for serovar determination of Salmonella. Vol. 41, *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd; 2015. p. 309-25. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.837862>
23. Umesha S, Manukumar HM. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(1):84-104. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126701>

24. Littrup E, Torpdahl M, Malorny B, Huehn S, Helms M, Christensen H et al. DNA microarray analysis of Salmonella serotype Typhimurium strains causing different symptoms of disease. *BMC Microbiol.* 2010;10:96. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-96>
25. Karimi Z, Ahmadi A, Najafi A, Ranjbar R. Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies. *Open Microbiol J.* 2018;12(1):59-70. <https://doi.org/10.2174/1874285801812010059>
26. Bayona MA. Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. *Rev UDCA Actual Divulg Científica.* 2009;12(2):9-17.
27. Sobrino Gregorio L. Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios [Internet]. Valencia: Universitat Politècnica de València; 2014.
28. Soto-Varela ZE, Gutiérrez CG, de Moya Y, Mattos R, Bolívar-Anillo HJ, Villarreal JL. Molecular detection of Salmonella spp., Listeria spp. and Brucella spp. in fresh artisanal cheese marketed in the city of Barranquilla: A pilot study. *Biomedica.* 2018;38(Supl. 2):30-6. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3677>
29. Martínez Núñez CE. Prevalencia de Salmonella spp en muestras de leche cruda de empresas ganaderas doble propósito del departamento de Córdoba-Colombia [Internet]. Universidad de Córdoba; 2014.
30. Zhao X, Lin CW, Wang J, Oh DH. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol.* 2014;24(3):297-312. <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>
31. McAuley CM, McMillan K, Moore SC, Fegan N, Fox EM. Prevalence and characterization of foodborne pathogens from Australian dairy farm environments. *J Dairy Sci.* 2014;97(12):7402-12. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8735>
32. Bonilauri P, Bardasi L, Leonelli R, Ramini M, Luppi A, Giacometti F et al. Detection of food hazards in foods: Comparison of real time polymerase chain reaction and cultural methods. *Ital J Food Saf.* 2016;5(1):37-40. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5641>
33. Álvarez-Suárez ME, Otero A, García-López ML, Dahbi G, Blanco M, Mora A et al. Genetic characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int J Food Microbiol.* 2016;236:148-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.035>
34. Thung TY, Lee E, Wai GY, Pui CF, Kuan CH, Premarathne JMKJK et al. A review of culture-dependent and molecular methods for detection of salmonella in food safety. *Food Res.* 2019;3(6):622-7. [https://doi.org/10.26656/FR.2017.3\(6\).018](https://doi.org/10.26656/FR.2017.3(6).018)

35. Yoshida C, Gurnik S, Ahmad A, Blimkie T, Murphy SA, Kropinski AM et al. Evaluation of molecular methods for identification of salmonella serovars. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8):1992-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.00262-16>
36. Seel SK, Kabir SML, Islam MA. Molecular detection and characterization of salmonella spp. isolated from fresh fishes sold in selected upazila markets of Bangladesh. *Bangladesh J Vet Med.* 2016;14(2):283-7. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v14i2.31410>
37. Mogollón Vergaral DC, Rodríguez Gutiérrez VE, Verjan García N. Prevalence and molecular identification of Salmonella spp. isolated from commercialized eggs at Ibagué, Colombia. *Rev Salud Anim.* 2016;38(3):164-72.
38. Moussa I, Gassem M, Al-Doss A, Sadik W, Mawgood A. Using molecular techniques for rapid detection of Salmonella serovars in frozen chicken and chicken products collected from Riyadh, Saudi Arabia. *African J Biotechnol.* 2010;9(5):612-9. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1761>
39. Kumar P, Singh SP, Upadhyay AK, Kumar D. Biochemical, serological and molecular confirmation of Salmonella isolates. *bioRxiv.* 2017;14(7). <https://doi.org/10.1101/100917>
40. Zahraei Salehi T, Gharagozlou MJ, Shams N, Madadgar O, Nayeri Fasaei B, Yahyaraeyat R. Molecular characterization a Salmonella Typhimurium isolate from Caspian pony. *Iran J Biotechnol.* 2012;10(1):49-54.
41. Al-Jindeel TJ, Kumail IA. Molecular Detection and Evaluation of Some Immunological Parameter on Salmonellosis Patients in Al-Muthanna Province. *Vet Sci Med.* 2018;2(1):1-6.
42. Phumkhachorn P, Rattanachaikunsopon P. Detection of viable Salmonella typhi using three primer pairs specific to invA, ivaB and fliC-d genes. *Emirates J Food Agric.* 2017;29(4):312-6. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-12-1867>
43. Waturangi DE, Wiratama E, Sabatini A. Prevalence and molecular characterization of Salmone-lla enterica serovar Typhimurium from ice and beverages in Jakarta, Indonesia. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):45. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4065-y>
44. Yang SM, Kim E, Kim D, Kim HB, Baek J, Ko S et al. Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction for Salmonella Serotyping Based on Novel Unique Gene Markers by Pangenome Analysis. *Front Microbiol.* 2021;12:750379. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750379>
45. Barmak SM, Sinyavskiy YA, Berdygaliev AB, Sharmanov TS, Savitskaya IS, Sultankulova GT et al. Development and Evaluation of Alternative Methods to Identify the Three Most Common Serotypes of

- Salmonella enterica Causing Clinical Infections in Kazakhstan. *Microorganisms*. 2021;9(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112319>
46. Gan E, Baird FJ, Coloe PJ, Smooker PM. Phenotypic and molecular characterization of Salmonella enterica serovar Sofia, an avirulent species in Australian poultry. *Microbiology*. 2011;157(4):1056-65. <https://doi.org/10.1099/mic.0.047001-0>
 47. Anejo-Okopi J, Isa S, Audu O, Fagbamila I, Iornenge J, Smith I. Isolation and polymerase chain reaction detection of virulence invA gene in Salmonella spp. from poultry farms in Jos, Nigeria. *J Med Trop*. 2016;18(2):98. <https://doi.org/10.4103/2276-7096.192237>
 48. Martínez-García YA, Uffo-Reinoso O, Riverón-Alemán Y, Agüero-Fernández JA, Martínez-Vasallo A. Desarrollo de un ensayo de PCR dúplex para la detección de Salmonella spp. y Staphylococcus aureus en leche cruda. *Rev Salud Anim*. 2018;40(2):2224-4700.
 49. Castañeda-Salazar R, Pulido-Villamarín A del P, Mendoza-Gómez MF, Carrascal-Camacho AK, Sandoval-Rojas KL. Detección e identificación de Salmonella spp. en huevos para consumo humano, provenientes de diferentes localidades de Bogotá, Colombia, 2015. *Infectio*. 2017;21(3):154-9. <https://doi.org/10.22354/IN.V21I3.672>
 50. Henriques C, Silvana F, Camargo R. Análisis Enzimático de Restricción para la Caracterización de Salmonella en Pollos de Engorde. *Rev Científica la Fac Ciencias Vet*. 2020;30(3):1359-63.
 51. Richmond G, Khine H, Zhou T, Ryan D, Brand D, McBride M, Killeen K. MassCode Liquid Arrays as a Tool for Multiplexed High-Throughput Genetic Profiling. *PLOS ONE*. 2011; 4 (6): 1-14