

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la identificación de bacterias patógenas en productos cárnicos

Polymerase Chain Reaction (PCR), for the identification of pathogenic bacteria in meat products

Roger Alberto Rabelo Flórez¹

Gutiérrez de Piñeres-Ramírez, Gloria Isabel²

Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Colombia

Resumen

La carne y sus derivados son los alimentos de mayor producción y consumo que se presentan a nivel mundial, siendo también los más implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA); y las bacterias *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, son las más implicadas en los brotes transmitidos por alimentos y las responsables del mayor retiro de lotes de productos alimenticios del mercado. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiene gran importancia en el análisis de alimentos porque ha permitido la identificación de patógenos de una manera rápida y confiable a diferencia de los métodos microbiológicos convencionales. Al revisar la base de datos de Scopus y Web Of Science (WoS), a nivel internacional desde el año 2000 hasta la fecha, se encontraron pocas revisiones bibliométricas acerca del uso de la PCR para la identificación de algunos de los microorganismos mencionados o de manera general, por lo tanto, se evidenció que no se han realizado suficientes revisiones referentes a la utilización de la PCR en la detección de los principales patógenos en carne y sus derivados. El presente documento pretende realizar una revisión, sobre las técnicas de PCR, utilizadas en la identificación de las principales bacterias patógenas en carnes y sus derivados. Este estudio se realizará revisando las principales bases de datos como son Scopus y Web Of Science, el cual brindará información sobre las actualizaciones de la técnica, mostrará lo que se ha investigado en el tema y lo que hace falta por investigar, además permitirá generar nuevo conocimiento, y a partir de los resultados, se proyectarán nuevas investigaciones que propendan para la solución del problema.

Palabras clave: bacteria, ADN polimerasa, toxina, gen, cebador.

Abstract

Meat and its derivatives are the most produced and consumed foods worldwide, being also the most implicated in foodborne diseases (FBD); *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, are the most implicated bacteria in foodborne outbreaks and the ones responsible for the largest recall of batches of food products from the market. The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique is of great importance in food analysis because it has allowed the identification of pathogens in a rapid and reliable manner unlike conventional microbiological methods. When reviewing the Scopus and Web Of Science (WoS) databases, at the international level from 2000 to date, few bibliometric reviews were found about the use of PCR for the identification of some of the mentioned microorganisms or in general, therefore, it was evidenced that there have not been enough reviews regarding the use of PCR in the detection of the main pathogens in meat and its derivatives. The present document aims to review the PCR techniques used in the identification of the main pathogenic bacteria in meat and meat by-products. This study will be carried out by reviewing the main databases such as Scopus and Web Of Science, which will provide information on the updates of the technique, will show

¹ <https://orcid.org/0000-0002-5247-8888/> roger.rabelo@unad.edu.co

² <https://orcid.org/0000-0001-6268-3933/> isabell.gutierrez@unad.edu.co

what has been researched on the subject and what still needs to be researched, and will also allow generating new knowledge, and from the results, new researches will be projected for the solution of the problem.

Keywords: Bacteria, DNA polymerase, toxin, gene, primer.

1. Introducción

Según datos de producción a nivel mundial, la población consume principalmente productos cárnicos, los cuales son los más implicados en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA); por esto, la presencia de bacterias en carnes representa una amenaza para la salud de los consumidores (López *et al.*, 2018). *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7, son las bacterias principalmente implicadas en los brotes transmitidos por alimentos (Fan *et al.*, 2022; Stingl *et al.* 2021; Khan, 2017). Las ETA son de interés para la salud pública debido a las tasas de morbilidad y mortalidad que generan (Lopes *et al.*, 2018), también poseen implicaciones económicas ya que disminuyen la productividad social (López *et al.* 2018). Por esta razón, garantizar la inocuidad en alimentos como las carnes y sus derivados juega un papel importante en la disminución de infecciones e intoxicaciones alimentarias.

Por esta razón, garantizar la inocuidad en alimentos como las carnes y sus derivados juega un papel importante en la disminución de infecciones e intoxicaciones alimentarias.

Las técnicas frecuentemente utilizadas en la identificación de patógenos en alimentos están basadas en métodos microbiológicos convencionales, que requieren de tiempos de ensayos largos (Khan, 2017). En el caso de *Salmonella* toman de cuatro a seis días (Rodríguez Sánchez & Barrera Saldaña, 2004), en la detección de *L. monocytogenes* pueden requerir hasta 7 días, para detectar *Campylobacter* se necesitan de 4 a 16 días (Khan, 2017). Además, los resultados pueden llegar a ser contradictorios, porque se pueden detectar especies similares a la de interés; el aislamiento de microorganismos patógenos en cajas de Petri no es tan eficiente, porque el microorganismo está en baja concentración y para recuperarlo requiere pasos laboriosos (Petsios *et al.*, 2016).

Lo anterior no permite la toma de decisiones rápidas, lo que aumenta el riesgo de comercializar alimentos que no cumplen con la inocuidad, además aumenta pérdidas financieras significativas de productos perecederos, por lo tanto, la industria de alimentos debería fortalecer el uso de metodologías que faciliten el análisis de los alimentos cárnicos de una manera más rápida y confiable a través de las técnicas moleculares como la PCR (Petsios *et al.*, 2016; De la Rosa Zariñana, 2017). El propósito de este documento es revisar las diferentes técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizadas para la identificación de bacterias patógenas en productos cárnicos.

2. Metodología

Se realizó una búsqueda bibliográfica del tema, a través de la base de datos de la producción científica registrada en Scopus, Web of Science y en el motor de búsqueda de Google Académico. Seguidamente, se realizó un análisis de red que facilitó identificar los escritos más importantes acerca de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la identificación de bacterias patógenas en productos cárnicos. Se revisó los resúmenes de cada documento científico y luego fueron seleccionados los que cumplían con la temática.

2.1 Mapeo científico

Con el propósito de realizar un estudio de la producción científica del tema, se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de búsqueda

Base de datos	Scopus	Web of Science
Periodo de consulta en años	2000 al 2022	
Fecha de consulta	16 de noviembre de 2022	
Tipo de documento	Artículo, libro, capítulo de libro, documento de conferencia	
Tipo de revista	Todos los tipos	
Campos de búsqueda	Título	
Términos de búsqueda	"Polymerase Chain Reaction" or "PCR" and "Salmonella" or "Campylobacter" or "Listeria monocytogenes" or "Escherichia coli" or "pathogenic* microorganism*" or "pathogen*" and "meat" or "processed meats" or "sausage*" or "ham" or "mortadella" or "food**"	
Idioma	Todos	
Resultado	445	531
Total	619	

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: estudios originales y de revisión acerca de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la identificación de bacterias patógenas en productos cárnicos. Por otro lado, se excluyeron estudios publicados antes del 2000, se prescindió del material periodístico o de opinión. De los registros en Scopus y Web of Science fueron extraídas las referencias (bibliografía). En los parámetros de búsqueda, en cuanto a idiomas, se observó que la mayor cantidad de publicaciones está en inglés. Como resultado se obtuvo en Scopus y en Web of Science 445 y 531 documentos respectivamente. Luego, al excluir los documentos duplicados en las dos bases de datos, se obtuvo un total de 619 documentos científicos.

3. Resultados

3.1 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa más conocida como PCR, es una técnica molecular que consiste en la amplificación enzimática *in vitro* de una secuencia de ADN objetivo, basada en la síntesis de ADN dirigida por cebadores de oligonucleótidos y por un ADN polimerasa; se utilizan dos cebadores complementarios a los extremos 3' de cada cadena sentido y anti-sentido del ADN diana para flanquear la secuencia de ADN que se va a amplificar. De este modo la reacción se da en una mezcla tamponada donde se suministran dos cebadores, ADN polimerasa, cuatro dNTP, cofactores como el Mg²⁺ y la plantilla de ADN de interés (Chen *et al.*, 2017). La anterior definición concuerda con la expresada por (Sharma *et al.*, 2016) definen a la PCR como una técnica que se utiliza para la amplificación de ADN mediante ciclos de temperatura entre 45 y 95 °C y de 30 a 40 ciclos; es uno de los métodos más sensible y específico para la detección y cuantificación de concentraciones extremadamente bajas de ADN y también se utiliza para amplificar genes virulentos de bacterias transmitidas por los alimentos.

3.2 Tipos de técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reacción en cadena de polimerasa simple: en esta reacción, se usa un conjunto de cebadores únicos que se unen a genes específicos para la detección microbiana; las bacterias se pueden detectar con o sin enriquecimiento previo en la muestra de alimento; sin embargo, en muestras de naturaleza turbia se pueden presentar falsos positivos por la detección de ADN de células muertas; para contrarrestar esta situación se ha propuesto la hibridación fluorescente *in situ* (FISH); la amplificación de los genes 16S ARNr de bacterias con cebadores universales ha contribuido a la identificación de especies bacterianas desconocidas o nuevas (Sharma *et al.*, 2016).

Los reactivos mezclados y el programa utilizado deberán ser suficientes y adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir la de las demás. Así

como también deberán tener una temperatura de hibridación similar para distinguir los amplicones después de un ciclo térmico (Jiménez *et al.*, 2021).

Reacción en cadena de la polimerasa múltiple: esta metodología se basa en el uso de varios cebadores específicos que se combinan en un solo ensayo, lo que permite la detección rápida de varios microorganismos en una sola reacción. Las concentraciones de los cebadores deben ajustarse para que no se presente interacción entre ellos y generar rendimientos fiables de todos los productos de PCR (Sharma *et al.*, 2016).

La PCR digital (dPCR), la cual se trata de una técnica en la que una muestra típica de PCR se diluye y se divide en varias partes (de 1000 a 10 millones de micropocillos según la plataforma) asegurando que cada pocillo contiene 1 molécula de ADN molde, aunque puede ocurrir que en algunos pozos no haya ADN molde o haya más de uno; luego se realiza una reacción de amplificación y después las secuencias amplificadas se detectan por fluorescencia de punto final con un escáner en el que se cuentan los pocillos positivos y negativos, lo que permite cuantificar de forma absoluta la cantidad de ADN en la muestra; la reacción se puede llevar a cabo en un microchip que contiene varios pocillos de volumen definido o en micropartículas de emulsión, cada una de las cuales actúa como un pequeño reactor (Tere Peña, 2020).

PCR cuantitativa (qPCR): también conocida como PCR en tiempo real, permite monitorear la formación del producto de PCR a lo largo de la reacción. Ofrece amplificación simultánea, detección rápida y basada en secuencias específicas de genes objetivo y se aplica mucho en microbiología alimentaria para detectar patógenos transmitidos por alimentos (Sharma *et al.*, 2016).

Existen otros tipos de PCR, como la PCR anidada, la cual es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con cebadores distintos en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección; “primero se realiza una reacción con los cebadores externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana; después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los cebadores internos para amplificar la región específica” (Jiménez *et al.*, 2021).

Taqman PCR: denominada así por el uso de sondas con esa denominación, “las sondas Taqman consisten principalmente en un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de la sonda de oligonucleótidos y un extintor en el extremo 3'. Están disponibles diferentes tipos de fluoróforos (por ejemplo, 6-carboxifluoresceína, acrónimo: FAM, o tetraclorofluoresceína, acrónimo: TET) y extintores (ejemplo tetrametilrodamina, acrónimo: TAMRA) (Sharma *et al.*, 2016).

3.3 Principales bacterias patógenas en carnes y derivados cárnicos

(Fan *et al.*, 2022; Stingl *et al.*, 2021; Khan, 2017), mencionan a *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7, como las bacterias mayormente implicadas en los brotes transmitidos por carnes y sus derivados a nivel mundial y también como las responsables del retiro de lotes de productos alimenticios del mercado. A continuación, se mencionan los aspectos más relevantes de cada una.

Salmonella spp., es un microorganismo intracelular facultativo, gramnegativo, de la familia Enterobacteriaceae, móvil gracias a la presencia de flagelos peritricos (Pilamunga & Martínez, 2020), y productor de sulfuro de hidrógeno; comúnmente causa salmonelosis, esta enfermedad se considera una infección del tracto gastrointestinal transmitida por los alimentos contaminados con *Salmonella* (principalmente pollo, cerdo y huevo), la cual posee altas tasas de incidencia; el organismo causante puede pasar de las heces de una persona o animal infectado a los sanos, “el mal lavado de manos y el contacto con mascotas infectadas son algunas de las vías de contaminación” (Ehuwa *et al.*, 2021).

Campylobacter spp., son pequeños bacilos gramnegativos curvos, oxidasa positivos, microaerófilos, que exhiben motilidad en sacacorchos y colonizan el tracto intestinal de la mayoría de las especies de mamíferos y aves, en condiciones ideales, *Campylobacter* produce crecimiento visible después de 24 h a 37 °C, pero las colonias bien formadas hasta las 48 horas; sin embargo, pueden pasar hasta 72-96 horas de incubación para observar algunas cepas de crecimiento lento; las especies patógenas de *Campylobacter* crecen a 37-42 °C, con una temperatura óptima de crecimiento de 41,5 °C; son incapaces de crecer por debajo de los 30 °C, ya que carecen de los genes de la proteína de choque frío que desempeñan un papel en la adaptación a las bajas temperaturas; estas bacterias no formadoras de esporas, no fermentan ni oxidan los hidratos de carbono, sino que obtienen energía de la degradación de aminoácidos, o de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Natsos *et al.*, 2019).

Listeria spp., son pequeños bacilos grampositivos (de 0,5 a 4 µm de diámetro y de 0,5 a 2 µm de longitud), no forman esporas, anaerobios facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos; los alimentos o el entorno de producción de alimentos suelen estar contaminados con los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b; a temperatura óptima de crecimiento de *L. monocytogenes* es de 30–37 °C, pero puede sobrevivir entre 0 y 45 °C por lo tanto puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración, es resistente a los desinfectantes y se adhiere a diversas superficies. *L. monocytogenes* es la principal causa de listeriosis transmitida por alimentos en humanos, ésta puede causar gastroenteritis febril, pero en personas susceptibles como niños, ancianos, inmunocomprometidos y mujeres embarazadas puede provocar septicemia y meningitis; se ha informado de la prevalencia de *L. monocytogenes* en diferentes productos avícolas, tanto crudos como cocinados (Jamshidi & Zeinali, 2019).

Escherichia coli es uno de los microorganismos modelo mejor caracterizados; es anaerobio facultativo no esporulante gramnegativo, forma parte del microbioma intestinal de los vertebrados; entre las especies de huéspedes potenciales que *E. coli* puede colonizar, se encuentran los mamíferos, las aves y los reptiles (Yu *et al.* 2021). Es un bacilo gramnegativo de entre 1,1 - 1,5 x 2 - 6 μm perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. No forman esporas y son móviles gracias a flagelos peritricos. Son aerobios y anaerobios facultativos por lo que disponen de metabolismo respiratorio y fermentativo. Son oxidasa-negativos y forman ácidos y gas a partir de carbohidratos fermentables. Son mesófilos típicos, ya que pueden crecer a temperaturas comprendidas entre 7 °C y 50 °C, su crecimiento óptimo es de 37 °C, con valores de pH próximos a la neutralidad y un valor mínimo de actividad de agua de 0,95 (Rípodas *et al.*, 2017).

4. Discusión

(Levin, 2003), afirma que *L. monocytogenes* puede diferenciarse de otras especies de *Listeria* mediante la secuenciación del gen 16S rRNA y en caso de utilizar los genes de virulencia de dicha especie, la identificación será más específica y confiable. Por otro lado, (Shu *et al.*, 2013), desarrollaron un microsistema de PCR anidada de flujo continuo monofásico (SP-CF-NPCR) para la detección de *L. monocytogenes* en bajas concentraciones en la muestra; obteniendo como resultado la detección de 0,2 copias/ μL de ADN genómico de *L. monocytogenes*, el valor más sensible encontrado hasta ese momento en comparación con otros estudios donde se utilizó la misma técnica. Posteriormente, (Singh & Mustapha, 2015), estandarizaron dos ensayos de PCR en tiempo real con curva de fusión multiplex con controles de amplificación interna (IAC) para la detección de ocho serogrupos STEC; “el primer ensayo multiplex se dirigió a los serogrupos O145, O121, O104 y O157 de *E. coli*; mientras que el segundo conjunto detectó los serogrupos O26, O45, O103 y O111 de *E. coli*; la aplicabilidad de los ensayos se probó utilizando 11 muestras diferentes de carne y productos agrícolas” mediante la amplificación de los genes de virulencia; este estudio demostró que es posible detectar en menos de 11 horas los ocho serogrupos a través de la técnica mencionada a una concentración de 10 UFC en 325 gr de muestra.

Más adelante, (Jantzen *et al.* 2006), utilizaron PCR para la identificación de *L. monocytogenes*, comparando la técnica microbiológica convencional, y los inmunoensayos con la técnica molecular, como resultado obtuvieron que la PCR en tiempo real es una técnica más rápida y específica. Posteriormente, (Siala *et al.*, 2017), mostraron que la qPCR pudo aumentar el nivel de detección de *Salmonella* spp. en diferentes matrices alimentarias hasta en un 27,2 % frente al 5 % obtenido por métodos de cultivo convencionales.

Sin embargo, (Zhang *et al.* 2018), utilizaron PCR convencional para identificar el gen A7P63_13850 que está presente únicamente en *Salmonella indiana*, pero no en otros serovares de *Salmonella* ni en ninguna otra bacteria; encontraron un límite de

detección de 100 unidades formadoras de colonias (UFC) por reacción; la PCR establecida amplificó todas las cepas de *S. indiana* (n = 56), pero ninguna de las otras serovariedades de *Salmonella* (n = 146) y especies distintas de *Salmonella* (n = 14); los autores afirman que la PCR es altamente sensible y específica para *S. Indiana* por lo tanto es una técnica adecuada y conveniente para la vigilancia y el control del patógeno.

(Lopes *et al.*, 2018), estandarizaron una qPCR multiplex para la cuantificación simultánea de fragmentos específicos de genes bacterianos, *ssf* (*Salmonella* spp.), *pho A* (*E. coli*) y *nuc* (*S. aureus*), en las matrices leche, carne molida de res y carne de ostra; el límite de detección de la técnica fue de 13, 10 y 12 copias de genes para *ssf*, *phoA* y *nuc*, respectivamente; los autores sugieren que la qPCR multiplex se puede utilizar como una técnica de detección rápida para el análisis de la calidad microbiológica de los alimentos en la detección simultánea de diferentes microorganismos. Seguidamente (Dmitric *et al.*, 2019), evaluaron dos protocolos de PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de *Salmonella* spp. en carne picada y piel de cuello de pollo, obteniendo como resultados sensibilidad y especificidad para la detección rápida de *Salmonella* spp. y donde no existió diferencia entre los protocolos de extracción utilizados; la duración del análisis para la qPCR fue de aproximadamente 24 h, en contraste con 4-5 días para el método de referencia.

Posteriormente, (Goma *et al.*, 2019), aislaron e identificaron por método tradicional y por PCR cepas de *E. coli* O157:H7 en 32 muestras de carne de cerdo, 32 muestras de heces de cerdo y 6 muestras de agua limpia, en un matadero; se encontró que el 25 % de muestras de cerdo eran positivas para *E. coli* O157:H7, un 31,25 % de positividad en las muestras fecales de cerdo y un 33,3 % de positividad para las muestras de agua limpia; los autores resaltan que el 75 % de las *E. coli* aisladas eran portadoras del gen *stx2a*. Luego, (Farhoumand *et al.*, 2020), utilizaron PCR para amplificar los genes *hly* y *uidA* en aislamientos de *L. monocytogenes* y *E. coli*, respectivamente; los hallazgos revelaron una alta contaminación en carnes de res y pollo con *E. coli* (68,89 % y 88,89 %, respectivamente) y *L. monocytogenes* (53,33 % y 46,67 %, respectivamente). Luego, (Zhanabayeva *et al.*, 2021), destacan en su estudio que a través de la PCR se pudo identificar *Salmonella enteritidis* en canales de pollo de tres empresas mediante la amplificación de los genes *invA* y el plásmido DT 104.

Por otro lado, (Chen *et al.*, 2021), a través del método de PCR múltiple lograron la detección de cinco genes de virulencia de bacterias patógenas en alimentos, los cuales corresponden al gen *nuc* para *Staphylococcus aureus*, el gen *hlyA* de *Listeria monocytogenes*, gen *ipaH* de *Shigella flexneri*, gen *lysP* de *Yersinia enterocolitica* y gen *tpi* de *Clostridium difficile*. También (Kariuki *et al.*, 2021), evaluaron la capacidad de los cebadores de los genes *staA*, *viaB* y *sopE* para detectar y diferenciar entre las tres *Salmonella* spp. más prevalentes en Kenia (*S. Typhi*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional;

hallaron que los cebadores *staA* y *viaB* eran específicos solo para las diferentes cepas de *S. Typhi*, produciendo productos de PCR de 585 pb y 540 pb, respectivamente; se demostró que los cebadores *sopE* son específicos para todas las *Salmonella* spp. produciendo un producto de PCR de 465 pb sin amplificación con cepas bacterianas de *E. coli* y *S. boydii*.

Por último, (Fan *et al.*, 2022), muestran los resultados de una innovadora técnica, PCR múltiple en tiempo real por separación inmunomagnética detectaron en muestras de alimentos, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 obtenidas por mIMS-multiplex qPCR fueron 23,1 % (37/160), 18,1 % (29/160) y 26,3 % (42/160), respectivamente.

5. Conclusión

Se logró revisar las diferentes técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizadas para la identificación de bacterias patógenas en productos cárnicos. Dentro de las bacterias patógenas objetos de este estudio, *Listeria monocytogenes*, es una de las más estudiadas en cuanto a su detección en cárnicos mediante la técnica de PCR. De las más utilizadas se encontró la PCR multiplex y PCR en tiempo real, porque muestran mayor sensibilidad y menor tiempo en resultados.

Referencias

- Stingl, K. *et al.*, (2021). Challenging the “gold standard” of colony-forming units - Validation of a multiplex real-time PCR for quantification of viable *Campylobacter* spp. in meat rinses. (2021). *International Journal of Food Microbiology*, 359, 109417.
- Chen, J.-Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z. (2017). PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(2), 39–59.
- Chen, Y., Wang, Z., Shi, Q., Huang, S., Yu, T., Zhang, L., & Yang, H. (2021). Multiplex PCR method for simultaneous detection of five pathogenic bacteria closely related to foodborne diseases. *3 Biotech*, 11(5), 1–8.
- De la Rosa Zariñana, R., & A. E. (2017). *Estandarización y validación de la técnica de PCR para la determinación de Listeria monocytogenes en carne de pollo, res y cerdo*. [\(Tesis de grado\). Colegio de Posgraduados, Montecillo.](#)
http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/3846/Rosa_Zarinana_AE_MC_Ganaderia_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Dmitric, M., Vidanovic, D., Matovic, K., Saric, L. J., & Karabasil, N. (2019). Real-time PCR methods for detecting *Salmonella* spp. in food after different DNA extraction procedures.

IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 333(1), 012041.

- Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*, 10(5), 907.
- Fan, W., Gao, X.-Y., Li, H.-N., Guo, W.-P., Li, Y.-Y., & Wang, S.-W. (2022). Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in meat using multiplex immunomagnetic separation and multiplex real-time PCR. *European Food Research and Technology = Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung. A*, 248(3), 869–879.
- Farhoumand, P., Hassanzadazar, H., Soltanpour, M. S., Aminzare, M., & Abbasi, Z. (2020). Prevalence, genotyping and antibiotic resistance of and in fresh beef and chicken meats marketed in Zanjan, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(6), 537–546.
- Goma, M. K. E., Indraswari, A., Haryanto, A., & Widiasih, D. A. (2019). Detection of O157:H7 and Shiga toxin 2a gene in pork, pig feces, and clean water at Jagalan slaughterhouse in Surakarta, Central Java Province, Indonesia. *Veterinary World*, 12(10), 1584–1590.
- Jiménez M. B., Martin, M. J. F., Belloso, M. S., Gómez, M. L., Molinos, A. C. M., & Negru, G. C (2021). Diagnóstico y tipos de PCR. Revisión bibliográfica. *RSI - Revista Sanitaria de Investigación*. <https://revistasanitariadeinvestigacion.com/diagnostico-y-tipos-de-pcr-revision-bibliografica/>
- Jamshidi, A., & Zeinali, T. (2019). Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. *International Journal of Food Science*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>
- Jantzen, M. M., Navas, J., Corujo, A., Moreno, R., López, V., & Martínez-Suárez, J. V. (2006). Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Spanish Journal of Agricultural Research = Revista de Investigacion Agraria*, 4(3), 235–247.
- Kariuki, F., Getanda, P., Nyachio, A., Juma, G., Kinyanjui, P., & Kamau, J. (2021). Evaluation of the detection of *staA*, *viaB* and *sopE* genes in *Salmonella* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Archives of Microbiology*, 204(1), 1–7.
- Khan, A. S. (2017). Biotechnology-based sensing platforms for detecting foodborne pathogens. In *Analysis of Food Toxins and Toxicants* (pp. 37–50). John Wiley & Sons, Ltd.
- Levin, R. E. (2003). Application of the polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: A review of methodology. *Food Biotechnology*, 17(2), 99–116.
- Lopes, A. T. S., Albuquerque, G. R., & Maciel, B. M. (2018). Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Quantification of *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* in Different Food Matrices: Advantages and Disadvantages. *BioMed Research International*, 2018.

<https://doi.org/10.1155/2018/6104015>

- López, A., Burgos, T., Díaz, M., Mejía, R., & Quinteros, E. (2018). Contaminación microbiológica de la carne de pollo en 43 supermercados de El Salvador. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 1(2 (julio-diciembre)), 45–53.
- Natsos, G., Mouttotou, N. K., Ahmad, S., Kamran, Z., Ioannidis, A., & Koutoulis, K. C. (2019). The genus *Campylobacter*: detection and isolation methods, species identification & typing techniques. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 70(1), 1327–1338.
- Sharma, C., Sharma, AK y Aneja, KR (2016). *Fronteras en Biotecnología Alimentaria*. Nova Science Publishers, Inc.
https://bibliotecavirtual.unad.edu.co/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=nlebk&AN=1226152&lang=es&site=eds-live&scope=site&ebv=EB&ppid=pp_11
- Petsios, S., Fredriksson-Ahomaa, M., Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2016). Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 237, 55–72.
- Quishpe, P., & Bryan, P. (2020). *Identificación de Salmonella sp. en productos lácteos no pasteurizados comercializados en los mercados de Riobamba*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba.
<http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/6653>
- Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., & Macho Martínez, M. (2017). Investigación de *Escherichia Coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar*, 73(3), 147–152.
- Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).
http://eprints.uanl.mx/1584/1/art_cadena.pdf
- Shu, B., Zhang, C., & Xing, D. (2013). Highly sensitive identification of foodborne pathogenic *Listeria monocytogenes* using single-phase continuous-flow nested PCR microfluidics with on-line fluorescence detection. *Microfluidics and Nanofluidics*, 15(2), 161–172.
- Siala, M., Barbana, A., Smaoui, S., Hachicha, S., Marouane, C., Kammoun, S., Gdoura, R., & Messadi-Akrout, F. (2017). Screening and Detecting *Salmonella* in Different Food Matrices in Southern Tunisia Using a Combined Enrichment/Real-Time PCR Method: Correlation with Conventional Culture Method. *Frontiers in Microbiology*, 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02416>
- Singh, P., & Mustapha, A. (2015). Multiplex real-time PCR assays for detection of eight Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food samples by melting curve analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 101–108.

- Tere Peña, C. P. (2020). *Desarrollo de un candidato a material de referencia para la detección y cuantificación de Escherichia coli O157 H7 por PCR. (Tesis de grado).* [Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.](https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77923)
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77923>
- Yu, D., Banting, G., & Neumann, N. F. (2021). A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0508>
- Zhanabayeva, D. K., Paritova, A. Y., Murzakaeva, G. K., Zhanabayev, A. A., Kereev, A., Asauova, Z. S., & Zh. Aubakirov, M. (2021). PCR Diagnosis for the Identification of the Virulent Gene of *Salmonella* in Poultry Meat. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 21(3), 235–244.
- Zhang, P., Zhuang, L., Zhang, D., Xu, J., Dou, X., Wang, C., & Gong, J. (2018). Serovar-Specific Polymerase Chain Reaction for Detection of Serovar Indiana. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(12), 776–781.