

# Brotos de enfermedades transmitidas por los alimentos estudiados mediante técnicas moleculares

## Foodborne disease outbreaks studied by molecular techniques

Elkin E. Hernández-Porras, Liliana E. Rosero-Torres, Eliana L. Parra-Barrera, Jaime A. Guerrero-Montilla, Adriana L. Gómez-Rubio y Jaime Moreno

Recibido 4 agosto 2015 / Enviado para modificación 21 mayo 2016 / Aceptado 28 febrero 2017

### RESUMEN

**Objetivo** Aplicar una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple en tiempo real para la detección de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, como herramienta de apoyo diagnóstico en la vigilancia de brotes de enfermedad transmitida por alimentos.

**Materiales y Métodos** Se aplicó la metodología molecular en muestras clínicas provenientes de individuos que estaban asociados a brotes de enfermedad transmitida por alimentos de dos departamentos de Colombia. Los resultados se compararon con los datos arrojados por la metodología convencional de cultivo. Adicionalmente a los aislamientos obtenidos se les evaluó relación clonal mediante la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE).

**Resultados** Se determinó un total de 123 casos de enfermedad transmitida por alimentos de los cuales 45 muestras biológicas fueron confirmadas por laboratorio y 88 mediante nexo epidemiológico. La metodología molecular detectó 35/45 muestras positivas frente a 17/45 muestras positivas detectadas mediante la metodología convencional. La PFGE demostró relación clonal en cada brote.

**Conclusión** Los resultados del estudio demuestran la aplicabilidad de la técnica molecular como herramienta útil de apoyo diagnóstico en la caracterización de brotes de enfermedad transmitida por alimentos, permitiendo una respuesta oportuna y confiable.

**Palabras Clave:** *Salmonella*; *listeria monocytogenes*; *yersinia enterocolitica*; reacción en cadena de la polimerasa; brotes de enfermedades; enfermedades transmitidas por los alimentos (*fuentes: DeCS, BIREME*).

### ABSTRACT

**Objective** To apply a multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) technique to detect *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Yersinia enterocolitica* as a diagnostic support tool for the surveillance of foodborne disease outbreaks.

**Materials and Methods** Molecular methodology was applied on clinical samples taken from individuals who were associated with foodborne disease outbreaks in two departments of Colombia. The results were compared with the data obtained by conventional culture methodology. In addition, the clonal relation of the isolations was evaluated using the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique.

**Results** 123 cases of foodborne disease were determined, of which 45 biological samples were confirmed by laboratory and 88 by epidemiological link. The molecular methodology detected 35/45 positive samples versus 17/45 positive samples detected by conventional methodology. PFGE demonstrated a clonal relation during each outbreak.

**Conclusion** The results of the study demonstrate the applicability of the molecular technique as a useful diagnostic support tool to characterize foodborne disease outbreaks, allowing a timely and reliable response.

EH: MD. M. Sc. Microbiología. Grupo de Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica. Instituto Nacional de Salud. Bogotá. Colombia.

*elkineh@yahoo.com*

LR: Bacterióloga. M. Sc. Ciencias Biológicas. Grupo de Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica. Instituto Nacional de Salud. Bogotá. Colombia.

*pilirosero17@hotmail.com*

EP: Bióloga. Grupo de Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia. *elipabarrera@yahoo.es*

JG: Químico de Alimentos. Esp. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Dirección de Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Bogotá. Colombia. *jguerrero@ins.gov.co*

AG: Microbióloga. M. Sc. Microbiología. Grupo de Microbiología, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica. Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

*agomez@ins.gov.co*

JM: Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. M. Sc. Microbiología. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica. Bogotá, Colombia.

*jmoreno@ins.gov.co*

**Key Words:** *Salmonella*; *listeria monocytogenes*; *yersinia enterocolitica*; polymerase chain reaction; disease outbreaks; foodborne diseases (source: MeSH, NLM).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) representan un problema para la salud pública mundial, siendo la causa más común la infección bacteriana; se estima que aproximadamente 76 millones de casos ocurren en Estados Unidos cada año (1) y generan un considerable costo económico (2). Se ha descrito a *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, y *Yersinia enterocolitica* entre los principales agentes etiológicos de las ETA. *Salmonella* se clasifica en más de 2 500 serotipos patógenos, de los cuales los serotipos Enteritidis y Typhimurium se constituyen como los más comunes a nivel mundial y la infección resulta de la ingestión de carne, cerdo, huevos o leche contaminados con esta bacteria (3). *L. monocytogenes* es transmitida principalmente por alimentos contaminados; asociados al consumo de leche, alimentos procesados y carnes, entre otros. Clínicamente la infección por *Listeria* incluye gastroenteritis febril, meningitis, bacteriemia y puede llegar a ser fatal (4,5). La infección por *Yersinia*, se ha hecho más frecuente en los últimos años debido a la transmisión al humano por el consumo de animales de granja que pueden ser fuente de infección. La patogénesis es una infección aguda que se inicia en el intestino y continúa con la infección en los nódulos linfáticos (6).

La rápida identificación del agente causal de brotes de ETA es importante en la disminución de la morbi-mortalidad, y reduce los costos económicos asociados a las enfermedades transmitidas por los alimentos. Los métodos convencionales de cultivo son laboriosos y demandan de mucho tiempo para emitir un resultado (aproximadamente tres a cinco días), además el transporte de muestras afecta la conservación de microorganismos viables en la muestra, lo cual puede verse reflejado en una baja sensibilidad. El desarrollo de técnicas diagnósticas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) permite mayor eficiencia, sensibilidad y rapidez en el tiempo de detección de microorganismos en muestras clínicas y de alimentos frente a los métodos convencionales, superando la detección de casos positivos obtenidos por cultivo (7).

En Colombia, el sistema de vigilancia ha notificado que la enfermedad transmitida por alimentos incrementó de 2 983 a 11 836 casos, desde el año 2000 al 2012, respectivamente (8). Sin embargo, estos datos no reflejan la incidencia real de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Colombia debido a las limitaciones del sistema de información epidemiológica, en donde no todos

los casos son notificados, y entre los notificados, algunos no son investigados. Considerando que la investigación de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos es necesaria para identificar las posibles causas y factores de riesgo, para prevención y control de brotes, como objetivo este estudio aplicó una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple en tiempo real (PCR-TR) para la detección de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, como herramienta de apoyo diagnóstico en la vigilancia de brotes de enfermedad transmitida por alimentos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estandarización de la PCR-TR múltiple

Se emplearon como controles positivos cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *Y. enterocolitica* ATCC 33114. El ADN genómico de cada bacteria fue extraído empleando el estuche Wizard (Promega, USA) de acuerdo a las especificaciones de casa matriz. El ADN fue cuantificado usando el espectrofotómetro NanoDroop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, DE).

Se emplearon iniciadores y sondas Taqman para amplificar los blancos genéticos utilizados en la detección de *Salmonella* spp., gen *invA* (9), *L. monocytogenes* (*hly*) (10), y *Y. enterocolitica* (*ail*) (11). Para la reacción de amplificación se empleó el estuche LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y se utilizó el equipo LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Los volúmenes y concentraciones estandarizadas fueron: 10 µl de Probes Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); 600 nM de iniciadores para *Salmonella* spp., 300 nM para *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica*; 400 nM de cada sonda; 0,2 µl de agua y 7,4 µl del extracto purificado del ADN de la muestra, para un volumen final de 20 µl por reacción. Los parámetros de termociclado fueron: un ciclo de preincubación a 95°C por 10 minutos, seguido de 42 ciclos de 95°C por 10 segundos, 58°C por 20 segundos, extensión de 72°C por 20 segundos y un ciclo final de enfriamiento de 3 minutos. La sensibilidad analítica se determinó mediante diluciones seriadas del ADN de las cepas utilizadas a partir de suspensiones de concentración conocida de 20 pg.

La especificidad analítica se realizó a partir de cepas bacterianas presentes en el tracto gastrointestinal, relacio-

nadas filogenéticamente a nivel de género o especie, o productoras de enfermedades transmitidas por los alimentos.

### Aplicación de la PCR-TR múltiple en estudio de brotes de ETA

La PCR-TR múltiple se empleó para la identificación del agente causal en cuatro brotes de enfermedad transmitida por alimentos, identificados en las ciudades de Cali (Valle del Cauca) y Pasto (Nariño) ciudades situadas a una distancia de 440 y 798 Km, respectivamente de Bogotá.

Las muestras clínicas se colectaron de las personas que cumplían con la definición de brote de ETA, que se define como un incidente por el que dos o más personas experimentan una enfermedad similar que resulta de la ingestión de un alimento común al inicio de los síntomas (12), posteriormente las muestras fueron enviadas a los respectivos Laboratorios de Salud Pública Departamentales (LSPD) en los medios de transporte Cary Blair (*Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*) y Amies (*L. monocytogenes*), para la detección e identificación de bacterias por la metodología convencional de cultivo (13,14). Las muestras clínicas recolectadas se sembraron en caldos de enriquecimiento Selenito (Becton Dickinson) y *Listeria* Enrichment Broth Base (BLEB) (Becton Dickinson) y se incubaron a 37°C durante 18 y 24 horas respectivamente. Se tomaron alícuotas de los caldos y se procesaron siguiendo el Manual de Procedimientos para el Diagnóstico Bacteriológico de Enfermedad Diarreica Aguda e identificación de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* (13). El volumen restante de cada caldo de enriquecimiento (Selenito y LEB) se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, el sedimento bacteriano se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se almacenaron a -20°C para procesamiento por la metodología molecular. Posteriormente, los LSPD remitieron al Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) los sedimentos de las muestras de materia fecal enriquecidas para procesamiento por la metodología molecular y los aislamientos recuperados de las muestras clínicas para confirmación y serotipificación de acuerdo al esquema establecido de Kauffmann-White – Le Minor (13,14). En los casos en los cuales fue posible tomar muestras de alimentos, estos se procesaron en el LSPD y los aislamientos obtenidos fueron confirmados y serotipificados en el Laboratorio de Alimentos del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) de acuerdo al Manual de Técnicas para el Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para Consumo Humano (15).

En el grupo de Microbiología del INS, los sedimentos (Selenito y LEB) de cada paciente se mezclaron y procesaron como una sola muestra para la extracción y purifi-

cación de ADN empleando el estuche DNeasy blood and tissue (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) con modificaciones menores: ebullición a 95°C durante 10 minutos y volumen final de elución de la columna en 50µl. Estos aislamientos fueron testeados por la PCR-TR múltiple. En cada prueba se incluyeron controles negativos de extracción de ADN, reactivos, adición de ADN (uno por cada cinco muestras procesadas) y dos controles positivos.

### Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

A los aislamientos de *Salmonella* spp. obtenidos se les evaluó relación genética mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) de acuerdo con la metodología estandarizada por la Red PulseNet, usando la enzima de restricción *Xba*I (Promega, USA) y la cepa *S. Braenderup* H9812 como marcador de peso molecular (16). En el análisis se utilizó el coeficiente de Dice, y el algoritmo UPGMA mediante el programa Gel Compare 2® V.4.0 (Applied Maths, Sint Martens-Latem, Belgium).

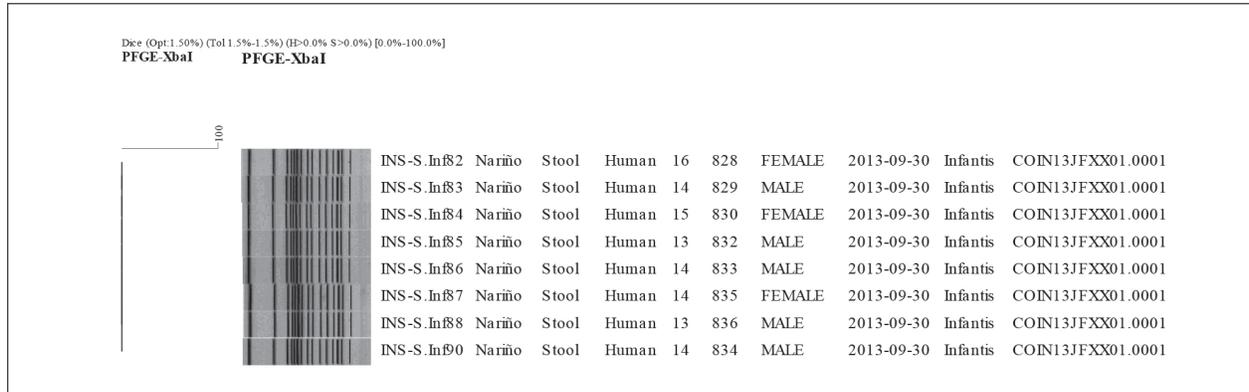
## RESULTADOS

La sensibilidad analítica de la técnica de PCR-TR múltiple para *L. monocytogenes* fue de 20 fg (4 equivalentes genómicos), de 200 fg (40 eg) para *Salmonella* spp., y 200 fg (39 eg) para *Y. enterocolitica*. En el ensayo de especificidad analítica no se observó amplificación ni reacciones cruzadas con ninguna de las bacterias evaluadas.

Un total de 123 casos cumplieron con la definición de brotes de ETA, de los cuales 35 fueron confirmados por laboratorio y 88 fueron confirmados por nexo epidemiológico (Tabla 1). El primer brote se presentó en el mes de octubre de 2012 en el área urbana del municipio de Pasto (Nariño), el cual fue asociado al consumo de emparedado de pollo en un restaurante comercial. La tasa de ataque fue de 53 % (32/60) y ninguno de los casos requirió hospitalización. El 100 % de los casos presentaron: vómito, diarrea, fiebre, dolor abdominal, cefalea, malestar general. El grupo de edad más afectado fue el de 20 a 24 años (n=10). El período de incubación más corto y más largo fue 7 y 27 horas, respectivamente. Se procesaron 14 muestras de materia fecal por cultivo de las cuales se obtuvo un aislamiento (1/14) de *Salmonella* spp. En contraste, la metodología molecular identificó seis muestras positivas (6/14) para *Salmonella* spp. (Tabla 1). De los alimentos implicados en este brote se tomaron muestras de los ingredientes y se identificó *Salmonella* spp., en la muestra de salsa casera a base de huevo. El aislamiento clínico (INS-S.EN2012) y el del alimento fueron serotipificados como *S. Enteritidis*. Por la técnica de PFGE, ambos aislamientos presentaron el mismo patrón electroforético



Figura 2. Dendrograma de los aislamientos clínicos S. Infantis



do en todas las muestras *L. monocytogenes* por ambas metodologías y en la muestra que contenía albóndiga se identificó *Salmonella* spp. por PCR-TR múltiple.

El último brote ocurrió en el mes de octubre de 2013, en el área urbana del municipio de Cali (Valle) en un establecimiento militar. La tasa de ataque fue de 9.6 % (55/570) y ninguno de los casos requirió hospitalización. Los signos y síntomas presentados por los casos fueron: diarrea (78 %), náuseas (75 %), vómito (69 %), deshidratación (67 %), cefalea (56 %), escalofrío (40 %) y fiebre (33 %). El grupo de edad más afectado fue el de 15 a 19 años (n=31). El periodo de incubación más corto y más largo fue 1 y 23 horas, respectivamente. No se procesaron muestras de alimentos, sin embargo, la tasa de ataque por alimento consumido más alta fue para huevos y leche. Se procesaron 9 muestras clínicas de materia fecal, por cultivo no se obtuvo ningún aislamiento (0/9) mientras que por la metodología molecular todas fueron positivas para *L. monocytogenes* (9/9).

De acuerdo con los resultados del estudio, la metodología molecular empleada como herramienta de apoyo diagnóstico en brotes de ETA tuvo una sensibilidad del 77,7 % al identificar el agente causal en 35 muestras (35/45) frente a 37 % de sensibilidad de la metodología convencional donde solo en 17 muestras (17/45) se obtuvo aislamiento del agente bacteriano.

## DISCUSIÓN

La aplicación de la PCR-TR múltiple para la detección de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* demostró ser una herramienta útil de apoyo diagnóstico, en la caracterización de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, presentando mayor sensibilidad frente a la metodología convencional. También se logró evidenciar casos donde se obtuvo aislamientos de las muestras clínicas y de alimentos, la técnica de PFGE permitió confirmar la fuente del brote.

*S. Enteritidis* fue el principal agente causal identificado en los brotes estudiados. Esto concuerda con lo reportado en la literatura donde a nivel mundial, con excepción de Oceanía y Norte América, donde es clasificado como el serotipo más común en brotes de ETA con una proporción global del 43 % (17). El huevo y el pollo son fuentes frecuentes de infección y multiplicación de *Salmonella* spp. (17). Alimentos complejos que incluían huevo en su preparación, fueron relacionados como fuente de *S. Enteritidis* en brotes de ETA en Estados Unidos (18) y en Latinoamérica, información epidemiológica de veinte países obtenida del Regional Information System on foodborne diseases surveillance, implicaron a la carne, el pollo, el cerdo y el huevo como las principales fuentes de brotes por *Salmonella* spp. (19).

La tipificación serológica y molecular de los microorganismos es importante en la investigación de brotes de ETA porque permite determinar la fuente de infección que facilita la toma de medidas de control y prevención de futuros brotes. En Colombia, los aislamientos de *Salmonella* spp. recuperados de pacientes, se remiten al Laboratorio de Nacional de Referencia en el INS para serotipificación y tipificación molecular por PFGE como parte del programa PulseNet de Latino América y el Caribe. El patrón electroforético COIN11.JEG.X01.0038 se identificó en dos brotes por *S. Enteritidis*, el cual se ha identificado como el segundo patrón más frecuente (23,5 %) en el país. (Datos no publicados, Grupo de Microbiología, INS).

*S. Infantis* COIN12JEGX01.0001 recuperada de albóndigas fue la causa de uno de los brotes incluidos en el estudio. *S. Infantis* es un serotipo común en la producción ganadera y pollos de engorde, que se ha asociado en baja frecuencia con brotes y casos esporádicos de salmonelosis humana (20, 21, 22). A nivel mundial, la proporción de aislamientos de *S. Infantis* en humanos oscila entre 1,5 % a 2,2 % y representa el quinto serotipo más común en la Comunidad Europea (17). En Israel, aumento de

3.8 % en el 2004 a 44.3 % en 2009, convirtiéndose en el serotipo más frecuente y recuperado principalmente de brotes (23) y es el sexto serotipo en Colombia con una frecuencia del 1.8 % (24).

Los aislamientos de *S. Infantis* estudiados fueron genéticamente idénticos estableciendo un origen común. Los análisis de PFGE sugieren la dispersión de *S. Infantis* por un reducido número de clones identificados en humanos y animales. En Serbia se identificó un clon resistente a ácido nalidíxico y tetraciclina (25) y en Alemania, se determinó la existencia de clones epidémicos con una alta estabilidad en el tiempo (20). Esto sugiere la aparición y dispersión de clones específicos en cada país, sin embargo, por MLST se han identificado aislamientos con mismo tipo de secuencia en diferentes países lo que evidencia la diseminación internacional de algunos grupos clonales (22, 26). Por lo tanto, la tipificación molecular no solo facilita la caracterización del brote, sino que permite la identificación y difusión de clones epidémicos de *Salmonella* spp. a nivel nacional e internacional.

En las muestras de alimentos asociadas al brote causado por *S. Infantis*, también se identificó *L. monocytogenes*, la cual se tomó como contaminante debido a que no fue recuperada de pacientes y a que este microorganismo es persistente en muestras ambientales de cocinas públicas y privadas (27). En Colombia, un estudio en manipuladores de alimentos cárnicos y lácteos, indicó una prevalencia de *L. monocytogenes* de 10,4 % (138/1322) e identificó como factor de riesgo el hecho de no practicar procedimientos de limpieza y desinfección adecuados (OR (IC 95 %)=1,292; p=0,005) (28). Otro factor que contribuye a la permanencia de *L. monocytogenes* en ambientes que entran o están en contacto con los alimentos, es la formación de biopelículas tanto en los equipos como en pisos, paredes, drenajes y tuberías, lo que dificulta su eliminación favoreciendo la re-contaminación del alimento (29,30).

*L. monocytogenes* se identificó como el agente causal de uno de los brotes. Debido a que la prevalencia de portadores en materia fecal de *L. monocytogenes* es de 1 % a 5 % (31), la identificación de este microorganismo en la materia fecal de nueve pacientes demuestra su implicación como agente causal del brote. Aunque con menor frecuencia y menor severidad la listeriosis también se puede presentar como gastroenteritis febril que normalmente es leve y autolimitada, no obstante, en algunas ocasiones la enfermedad invasiva puede ocurrir como una complicación de la enfermedad (31,32). Si bien no siempre se confirma, se ha informado en personas saludables con la aparición de fiebre, dolor muscular, dolor de cabeza, y diarrea que ocurren de 9-48 horas después

de la exposición, pero hay reportes del periodo de incubación hasta de 10 días (31,33,34). *L. monocytogenes* se encuentra comúnmente en los alimentos, especialmente en los productos lácteos y cárnicos, y la ingestión de un gran inoculó de la bacteria se ha postulado como uno de los factores en la patogénesis de la enfermedad (31,34). Debido a que muchas personas no buscan atención médica y no es un microorganismo considerado en el diagnóstico de ETA, es probable que se presente un subregistro de casos de enfermedad.

En cuanto a las limitaciones del estudio, no en todos los brotes se procesaron muestras de alimentos ni de superficies. De acuerdo con el protocolo de enfermedad transmitida por alimentos, se deben procesar junto a las muestras biológicas, muestras de alimentos y de las superficies que están en contacto con los alimentos, esto como parte de las acciones colectivas que se deben llevar a cabo para realizar una adecuada caracterización del brote (35).

Aunque en los brotes no se identificó a *Y. enterocolitica*, es importante contar con una herramienta molecular como la PCR para la detección de este patógeno, ya que es considerada como una de las causas frecuentes en ocasionar enfermedades transmitida por alimentos, principalmente en países de bajos y medianos ingresos, y las bajas tasas de recuperación de *Y. enterocolitica* pueden deberse a la sensibilidad limitada de métodos de cultivo (36). Adicionalmente, en nuestro país la vigilancia para *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* no está establecida como obligatoria.

Se han desarrollado varios métodos basados en PCR a partir del cultivo de enriquecimiento para detectar bacterias causantes de ETA (37,38). Una revisión sistemática sugiere que ensayos de diagnóstico rápido, especialmente con pruebas de PCR múltiple para detectar varios patógenos simultáneamente, puede resultar una medida costo efectiva para el estudio de brotes de ETA (39). El impacto clínico de la identificación del patógeno en menor tiempo permite ofrecer un tratamiento oportuno al paciente, reduce el gasto de recursos de control de infecciones y es útil en el manejo comunitario de los brotes. Nuestros resultados aportan evidencia de la aplicabilidad de las técnicas moleculares en la caracterización de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. La introducción de PCR proporciona una herramienta útil para la detección rápida de los agentes patógenos en muestras clínicas y de los alimentos, que permite dar una respuesta más precisa y oportuna para la delimitación, tratamiento y prevención de los brotes por enfermedades transmitidas por alimentos ■

**Conflicto de intereses:** Ninguno.

**Agradecimientos:** Los autores agradecemos la colaboración de Paula Díaz y Angeline Montañó del Grupo de Microbiología, del Instituto Nacional de Salud por el apoyo técnico en el laboratorio.

## REFERENCIAS

- Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? *Nutr Rev*. 2010; 68(5):257-69.
- McLinden T, Sargeant JM, Thomas MK, Papadopoulos A, Fazil A. Component costs of foodborne illness: a scoping review. *BMC Public Health*. 2014; 14:509.
- Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Hajja MA, Gómez-Duarte OG. Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis*. 2011; 9(6):263-77.
- Maertens de Noordhout C, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, Havelaar A, Speybroeck N. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14 (sup. 1) 70870-9.
- Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Mahon BE. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(1):1-9
- Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML, Chopra AK. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J Pathog*. 2011;182051.
- Hoorfar J. Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. *APMIS Suppl*. 2011; (133):1-24.
- Instituto Nacional de Salud. Informe final del evento enfermedades transmitidas por alimentos, año 2013. SIVIGILA.
- Muñoz N, Díaz-Osorio M, Moreno J, Sanchez-Jimenez M, Cardona-Castro N. Development and Evaluation of a Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Procedure to Clinically Type Prevalent Salmonella enterica Serovars. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2010; 12 (2):220-225.
- Long F, Zhu XN, Zhang ZM, Shi XM. Development of a quantitative polymerase chain reaction method using a live bacterium as internal control for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62(4):374-81.
- Rantsiou K, Alessandria V, Urso R, Dolci P, Coccolin L. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 2008; 121:99-105.
- Donnenberg MS, Narayanan S. How to Diagnose a Foodborne Illness. *Infect Dis Clin N Am*. 2013; (27):535-554.
- Realpe ME, Montañó LA. Manual de procedimientos para el diagnóstico bacteriológico de enfermedad diarreica bacteriana aguda, identificación de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*. Instituto Nacional de Salud MNL-R01.001.5030-002. 2011. Disponible en <https://goo.gl/twXmuw>. Consultado diciembre de 2014.
- Poppof, M.Y., 8ª Ed, WHO Centre for Reference and Research on Salmonella, Instituto Pasteur, París, Francia, 2007.
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA. Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Ministerio de Salud, Santa fe de Bogotá D.C.; 1998.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. 2006; 3(1):59-67.
- Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM, et al Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis*. 2011; 8(8):887-900.
- Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ, Griffin PM, et al. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19(3):407-15.
- Pires SM, Vieira AR, Perez E, Lo Fo Wong D, Hald T. Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. *Int J Food Microbiol*. 2012; 152(3):129-38.
- Miller T, Braun PG, Fehlhaber K, Prager R, Pfeifer Y, Rabsch W, et al. Typing of *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from 51 outbreaks in Germany between 1974 and 2009 by a novel phage-typing scheme. *Epidemiol Infect*. 2014; 142(1):75-83.
- Chironna M, Tafuri S, Gallone MS, Sallustio A, Martinelli D, Prato R, Germinario C, et al. Outbreak of *Salmonella* Infantis gastroenteritis among people who had eaten at a hash house in southern Italy. *Public Health*. 2014; 128(5):438-43.
- Almeida F, Pitondo-Silva A, Oliveira MA, Falcão JP. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2013; 19:145-51.
- Bassal R, Reifeld A, Andorn N, Yishai R, Nissan I, Agmon V, Peled N, Block C, Keller N, Kenes Y, Taran D, Schemberg B, Ken-Dror S, Rouach T, Citron B, Berman E, Green MS, Shohat T, Cohen D, et al. Recent trends in the epidemiology of non-typhoidal *Salmonella* in Israel, 1999-2009. *Epidemiol Infect*. 2012; 140(8):1446-53.
- Instituto Nacional de Salud. EDA microbiología Salm junio 2014. [Internet]. Disponible en: <https://goo.gl/DzNBL4>. Consultado noviembre de 2014.
- Velhner M, Kozoderović G, Grego E, Galić N, Stojanov I, Jelesić Z, Kehrenberg C, et al. Clonal spread of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Serbia: acquisition of mutations in the topoisomerase genes *gyr A* and *par C* leads to increased resistance to fluoroquinolones. *Zoonoses Public Health*. 2014; 61(5):364-70.
- Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Prager R, Schroeeter A, Rabsch W, Fruth A, Toboldt A, Malorny B, et al. Clonal dissemination of *Salmonella enterica* serovar Infantis in Germany. *Foodborne Pathog Dis*. 2012; 9(4):352-60.
- Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P, Stasiewicz MJ. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Prot*. 2014; 77(1):150-70.
- Muñoz AB, Chaves JA, Rodríguez EC, Realpe ME. *Listeria monocytogenes* in food handlers: a new approach to address the dangers in food industry. *Biomédica*. 2013; 33: 283-291.
- Gómez D., Ariño A, Carramiñana JJ, Rota C, Yangüela J. Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and Enterobacteriaceae in the meat industry. *Food Control*. 2012; 27(1):242-247.
- Neal, J. Comparative analysis of training delivery methods for new employees cleaning and sanitizing retail deli slicers: An exploratory study. *Food Control*. 2013; 29(1):149-155.
- Ooi ST, Lorber B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(9):1327-32.
- Leclercq A, Charlier C, Lecuit M. Global burden of listeriosis: the tip of the iceberg. *Lancet Infect Dis*. 2014; (14):1473-3099
- Frye DM, Zweig R, Sturgeon J, Tormey M, LeCavalier M, Lee

- I, Lawani L, Mascola L et al. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with delicatessen meat contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis*. 2002; 35(8):943-9.
34. Carrique-Mas JJ, Hökeberg I, Andersson Y, Arneborn M, Tham W, Danielsson-Tham ML, Osterman B, Leffler M, Steen M, Eriksson E, Hedin G, Giesecke J, et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese—an outbreak of listeriosis? *Epidemiol Infect*. 2003; 130(1):79-86.
35. Protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos. Grupo de Factores de Riesgo Ambiental. Instituto Nacional de Salud. 2011.
36. Rahman A, Bonny TS, Stonsaovapak S, Ananchaipattana C. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks. *J Pathog*. 2011; 239391.
37. Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *J Microbiol*. 2006; 44(1):92-7.
38. Hayashi M, Natori T, Kubota-Hayashi S, Miyata M, Ohkusu K, Kawamoto K, Kurazono H, Makino S, Ezaki T., et al. A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after a six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth. *Biomed Res Int*. 2013; 295050.
39. Abubakar I, Irvine L, Aldus CF, Wyatt GM, Fordham R, Schelenz S, et al. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technol Assess* 2007; 11(36):1-216.