

# Detección e identificación de *Salmonella* spp. en huevos para consumo humano, provenientes de diferentes localidades de Bogotá, Colombia, 2015

Rubiela Castañeda-Salazar<sup>1,\*</sup>, Adriana del Pilar Pulido-Villamarín<sup>1</sup>, María Fernanda Mendoza-Gómez<sup>1</sup>, Ana Karina Carrascal-Camacho<sup>2</sup>, Karen Lizeth Sandoval-Rojas<sup>1</sup>

## Resumen

**Objetivo:** Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp. en muestras de huevos para consumo humano en localidades de Bogotá.

**Materiales y métodos:** Se obtuvieron 96 muestras en tiendas y plazas de mercado de 4 localidades de la ciudad. Se procesó de forma separada la cáscara y el contenido interno mediante métodos microbiológicos y moleculares para aislamiento e identificación *Salmonella* spp.

**Resultados:** Se determinó una prevalencia total de *Salmonella* spp. de 9,4% (n=9), de ésta el 55% (n = 5) provenían del contenido interno y 44% (n = 4) de cáscara, sin embargo no se logró tipificar el serovar de *Salmonella enterica* presente. Las localidades con mayor presencia del patógeno fueron Usaquén y Fontibón.

**Discusión:** Estudios realizados en Colombia evidencian bajas prevalencias de *Salmonella* spp. (0 – 1,74%) en muestras de huevos, sin embargo los hallazgos de este estudio evidencian una mayor recuperación, lo que podría asociarse con inadecuadas condiciones de manejo y/o almacenamiento del producto.

**Conclusión:** Se estableció la presencia de *Salmonella* spp. en las muestras de huevo evaluadas, lo que implica un riesgo potencial para la salud pública, por lo que es necesario ampliar este tipo de estudios para conocer la situación real a nivel nacional frente a este patógeno.

**Palabras clave:** *Salmonella* spp.; huevos; Bogotá-Colombia.

## *Salmonella* spp. isolation and identification in eggs for human consumption from different urban areas in Bogotá, Colombia, 2015.

## Abstract

**Objective:** To determine the prevalence of *Salmonella* spp. presence in eggs for human consumption in urban areas in Bogotá.

**Materials and methods:** 96 samples were collected from convenience stores and markets in 4 urban areas in the city. The eggshells were separated from the egg's internal content and both were processed separately using microbiological and molecular techniques to isolate and identify *Salmonella* spp. strains.

**Results:** A *Salmonella* spp. prevalence of 9.4% (n=9) was found. *Salmonella* spp. was isolated from the egg's internal content in 55% (n=5) of samples and 44% (n=4) from the eggshells. The *Salmonella enterica* serovar could not be identified. The pathogen was more frequently isolated in samples from Usaquén and Fontibón urban areas.

**Discussion:** Studies of *Salmonella* spp. prevalence in eggs done in Colombia have shown it to be low (0-1.74%); However, this study determined a higher prevalence. These results suggest that inadequate handling/storage conditions could have been associated with them.

**Conclusion:** *Salmonella* spp. was isolated from the egg samples from 4 different urban areas in Bogotá. These findings suggest the existence of a public health risk; therefore, there is a need to perform wider and more complete studies to determine the actual situation of *Salmonella* spp. egg contamination in the country.

**Keywords:** *Salmonella* spp.; eggs; Bogotá-Colombia.

## Introducción

*Salmonella* spp. es el agente etiológico de la Salmonelosis, una de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) con importantes repercusiones en salud pública<sup>1</sup>, que produce síntomas gastrointestinales como diarrea. Anualmente,

esta enfermedad ocasiona 2,2 millones de muertes a nivel mundial, siendo los niños la población más vulnerable<sup>2</sup>.

Los alimentos que con mayor frecuencia se han asociado a la transmisión de este microorganismo son el huevo, pollo y productos lácteos, entre otros<sup>3,4</sup>; el huevo es un alimento impor-

1 Unidad de Investigaciones Agropecuarias – UNIDIA – Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.

2 Grupo de Biotecnología – GBAI - Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.

\* Autor de correspondencia

Correo electrónico: castaneda.r@javeriana.edu.co

Teléfono: 3208320 extensión: 4068. Fax: 3208320 extensión: 4023. Dirección postal: Carrera 7ª No. 43 – 82. Edificio 52, oficina 607. Departamento de Microbiología.

Recibido: 21/06/2016; Aceptado: 03/02/2017

Cómo citar este artículo: R. Castañeda-Salazar, et al. Detección e identificación de *Salmonella* spp. en huevos para consumo humano, provenientes de diferentes localidades de Bogotá, Colombia, 2015. Infectio 2017; 21(3):154-159

tante en la canasta familiar colombiana, con alto valor nutricional y debido a su bajo costo es asequible a gran parte de la población, viéndose esto reflejado en un consumo per cápita de 252 unidades para el 2015 y una proyección de 266 para el 2016<sup>5</sup>. Adicionalmente, se ha presentado un crecimiento en la producción mundial anual del 4%<sup>6</sup>, por su parte, en Colombia se evidenció un aumento en la producción del 3,61% para el 2014 (691.756 toneladas) con respecto al año inmediatamente anterior que fue de 667.649 toneladas; para el 2015 el aumento fue del 9,12% con una producción reportada de 728.555 toneladas<sup>5</sup>, este comportamiento también se ha evidenciado en el crecimiento en la producción mundial anual<sup>6</sup>.

Pocos son los países a nivel mundial que informan estadísticas detalladas sobre la prevalencia de *Salmonella* spp. en subproductos de origen aviar, uno de ellos es Estados Unidos, en donde a pesar de establecer controles rigurosos en la industria alimentaria se reportó un brote en 2010 cuya fuente más probable fueron huevos con cáscara contaminada<sup>7</sup>. Por otra parte Colombia no cuenta con datos detallados sobre la prevalencia de infecciones por *Salmonella* spp. originada a partir de productos de origen aviar.

Para la detección e identificación de este microorganismo se utilizan diferentes metodologías, como el cultivo microbiológico en medios selectivos y diferenciales, además de pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Polimorfismo de Longitud en los fragmentos de Restricción (RFLP- REA) y PCR en tiempo real (qPCR), entre otras<sup>8</sup>. Reconociendo la implicación de este microorganismo en la salud pública, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Salmonella* spp. en huevos destinados para consumo humano provenientes de plazas de mercado y expendios de barrio de cuatro localidades de Bogotá – Colombia, mediante cultivo e identificación microbiológica y PCR-REA.

## Materiales y Métodos

**Población de estudio.** Se seleccionaron cuatro localidades de Bogotá, ubicadas en cada uno de los extremos de la ciudad (Tabla 1); luego se procedió a seleccionar al azar tiendas de ocho barrios (una por cada barrio) y una o dos plazas de mercado de cada localidad.

**Definición y recolección de las muestras.** Una muestra correspondió a una mezcla (pool) de 5 huevos. En cada tienda de barrio se recolectaron dos muestras y en las plazas de mercado cuatro; se realizaron dos muestreos por localidad obteniendo 24 muestras en cada una de ellas, para un total de 96 muestras procesadas. Los huevos que presentaban fisuras o rupturas que pudiesen afectar la calidad interna fueron excluidos del estudio.

Las muestras fueron transportadas en condiciones de refrigeración hasta las instalaciones de la Pontificia Universidad Javeriana donde fueron procesadas.

**Tabla 1.** Distribución de la población de estudio por localidad

| Zona      | Localidad      | Tienda de Barrio                                                                                          | Plaza de mercado            |
|-----------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Norte     | Usaquén        | Codito verbal, La Calleja, Orquídeas, Santa Bárbara, Barrancas, Redil, Cedro golf, San patricio           | Codabas                     |
| Oriente   | Mártires       | Ricaurte, Voto Nacional, Santa Isabel, Santa Fe, Pepita, Usatama, Estanzuela, Eduardo Santos.             | Paloquemao y Samper mendoza |
| Occidente | Fontibón       | Kazandra, Modelia, El Tapete, La Aldea, Atahualpa, Jericó, Cofradía, Villamar.                            | Fontibón                    |
| Sur       | Ciudad Bolívar | San Fernando, La Primavera, Candelaria la Nueva, Madelena, Arbozadora Alto, Perdomo, Galicia, Candelaria. | Lucero                      |

**Aislamiento e Identificación Microbiológica.** Las muestras fueron procesadas siguiendo la norma NTC 4574: Microbiología de alimentos y de alimentos para animales y la metodología Oxoid *Salmonella* Preci<sup>TM</sup>, validada y aprobada por AFNOR según la norma ISO 16140.

Se analizó tanto la cáscara como el contenido interno de cada una de las muestras, para lo cual se realizó pre-enriquecimiento no selectivo en caldo peptonado, enriquecimiento selectivo en Caldo tetratationate y cultivo en agares selectivos y diferenciales (Hektoen y XLT4)<sup>9,10,11</sup>. La metodología Preci<sup>TM</sup> elimina el pre-enriquecimiento no selectivo, mediante el uso del caldo *Salmonella* Brilliance<sup>TM</sup> como medio de enriquecimiento selectivo con posterior cultivo en el medio cromogénico *Salmonella* Brilliance<sup>TM</sup>. Una vez se detectaron colonias presuntivas de *Salmonella* spp. se realizaron pruebas bioquímicas básicas como Oxidasa, TSI y Urea<sup>11,12,13</sup>; para la confirmación se utilizaron galerías Rapid One<sup>TM</sup>, las cuales se incubaron a 35°C durante 4 horas, la lectura se realizó en el software de identificación ERIC- Rapid<sup>TM</sup> System.

**Control de Calidad.** Se utilizaron las cepas de referencia: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *S. Pullorum* ATCC 13036.

**Identificación Molecular.** La cepas que bioquímicamente correspondieron a *Salmonella*, fueron sometidas a identificación molecular, para ello la extracción de DNA fue realizada según lo descrito por Paiva et al. (2009), 1 ml del caldo de cultivo de *Salmonella* spp. de 24 h de crecimiento se dispensó en tubos eppendorf y fueron centrifugados 3 min a 13000xg, luego el sedimento fue lavado dos veces con 500 µl de buffer TAE 1X, se centrifugó durante 3 min a 13000x g

y finalmente fue resuspendido en 200 µl de agua ultra pura, se llevó a ebullición por 8 minutos y se almacenó a -20°C<sup>14</sup>. Posteriormente se realizó una PCR utilizando el estuche comercial de CorpoGen BM-00007®, que permitió realizar la amplificación de un fragmento de 284 bp específico para el gen *invA* de *Salmonella* spp.

Para la identificación de los serovares *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. pullorum* y *S. gallinarum* se utilizaron tres juegos de cebadores<sup>14,15,16,17,18</sup> (Tabla 2). En cada una de las reacciones se trabajó con un blanco y un control positivo de cepas ATCC.

Cada reacción se preparó a un volumen final de 25 µl, con 12,5 µl de master mix Promega®, 8,5 µl de agua grado molecular, 3 µl de DNA y 0,5 µl de cada cebador. La amplificación de cada reacción se realizó usando el termociclador T100 Biorad®.

Para *Salmonella typhimurium* se siguió la metodología descrita por Das Chagas et al., con una desnaturalización inicial de 94°C por 5', 35 ciclos de desnaturalización 94°C por 30", anillamiento 55°C por 30", extensión 72°C por 30", y una extensión final de 72°C por 7'<sup>17</sup>. La amplificación de *Salmonella Enteritidis* se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Akbarmehr con una desnaturalización inicial de 94°C por 5', 35 ciclos de desnaturalización 94°C por 60", anillamiento 65°C por 30", extensión 72°C por 30", y una extensión final de 72°C por 7'<sup>19</sup>. Finalmente las condiciones de reacción para *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum* fueron las descritas por Paiva et al. (2009): desnaturalización inicial de 94°C por 5', 35 ciclos de desnaturalización 94°C por 30", anillamiento 58°C por 30", extensión 72°C por 30", y una extensión final de 72°C por 7'<sup>14</sup>.

Las electroforesis de los productos de amplificación se realizaron en gel de agarosa al 1,5% teñido con SYBR® safe (Invitrogen).

Finalmente, para diferenciar entre *Salmonella gallinarum* y *pullorum* se realizó análisis de restricción enzimática (REA), según lo descrito por Paiva et al., brevemente: 5 µl del producto de la PCR, 1 µl de Hinp Buffer 10X, 0,1 µl de la enzima Hinp1I (New England, Biolabs) y 3,9 µl de agua grado molecular y se incubó a 37°C por 1 hora<sup>14</sup>. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 3% teñido con SYBR® safe (Invitrogen).

## Resultados

### Aislamiento e Identificación Microbiológica

De las 96 muestras obtenidas en las cuatro localidades, se detectó un 9,4% (n=9) de muestras positivas para *Salmonella* spp.; de éstas, el 55% (n=5) provenían del contenido interno y 44% (n=4) de cáscara. Respecto a los aislamientos por localidad, en Usaquén se detectaron muestras positivas en el primer y segundo muestreos, mientras en Fontibón hubo positividad solamente en el segundo. Los datos detallados por localidad y por muestreo se presentan en la figura 1. La identificación presuntiva con las galerías de Rapid One indicó que un 1% (n=1) fue presuntivo para *S. pullorum*, el resto de los aislamientos se clasificaron como *Salmonella* spp.

### Identificación molecular

El 100% de las muestras (n=9) fueron identificadas mediante el estuche comercial de CorpoGen® BM-00007 como *Salmonella* spp. mediante la visualización del fragmento de 284pb en gel de electroforesis como se observa en la figura 2.

Del total de aislamientos identificados como *Salmonella* spp. en ninguno se obtuvo productos de amplificación con los cebadores específicos para *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis* observándose únicamente la banda correspondiente al control positivo lo que permitió la validación de la prueba.

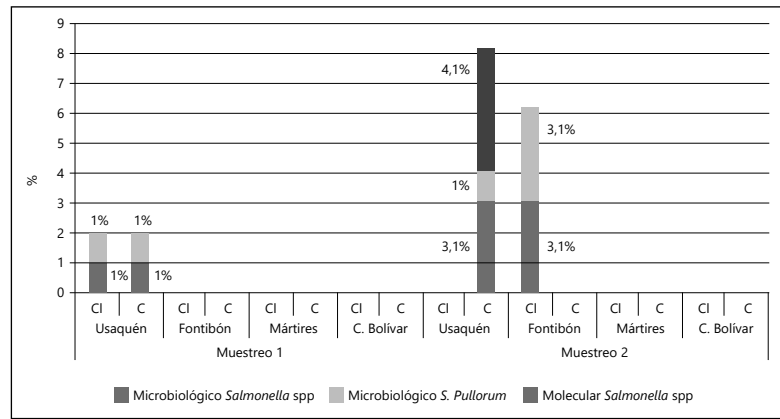
Se evidenció coincidencia en las dos pruebas de identificación utilizadas para la detección de *Salmonella* spp, como se ilustra en la figura 1.

## Discusión

El presente estudio determinó la presencia de *Salmonella* spp. en huevos, con una prevalencia del 9,4%, que resulta ser similar a las reportadas por Suresh et al., Singh et al. y Betancor et al. en Uruguay e India donde se encontraron prevalencias del 5,5%, 7,7% y 9,4% respectivamente<sup>20,21,22</sup>, mientras otros reportes evidencian prevalencias cercanas a cero, como lo determinado para Canadá, Polonia, México, USA, Francia e Irán<sup>23,24,25,26,27,28</sup>. En Colombia, un estudio realizado en granjas de ponedoras de la Sabana de Bogotá en 1994 evidenció una prevalencia del 32,1%<sup>29</sup>, más recientemente en ciudades como Medellín y Tunja se reportaron prevalencias de 0% y 1,74%

**Tabla 2.** Cebadores usados para la identificación de *S. typhimurium* (1), *S. enteritidis* (2), *S. pullorum* y *S. gallinarum* (3).

| Primer          | Longitud | Secuencia Primer (5'- 3')                   | T°           | Producto amplificación | Referencia |
|-----------------|----------|---------------------------------------------|--------------|------------------------|------------|
| <i>fliC</i> (1) | 22<br>16 | CGGTGTTGCCAGGTTGGTAAT<br>ACTGGTAAAGATGGCT   | 63°C<br>48°C | 620 pb                 | 15, 16, 17 |
| <i>SefA</i> (2) | 0<br>20  | GCAGCGTTACTATTGCAGC<br>TGTGACAGGGACATTAGCG  | 59°C<br>57°C | 310 pb                 | 16, 18.    |
| <i>fliC</i> (3) | 20<br>20 | CTGGTGATGACGGTAATGGT<br>CAGAAAGTTTCGACTCTCG | 57°C<br>57°C | 197 pb                 | 14         |



**Figura 1.** Porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* spp. (coincidencia de identificación entre los métodos microbiológico y molecular) en los dos muestreos realizados a las diferentes localidades de Bogotá. CI: Contenido Interno, C: Cáscara.

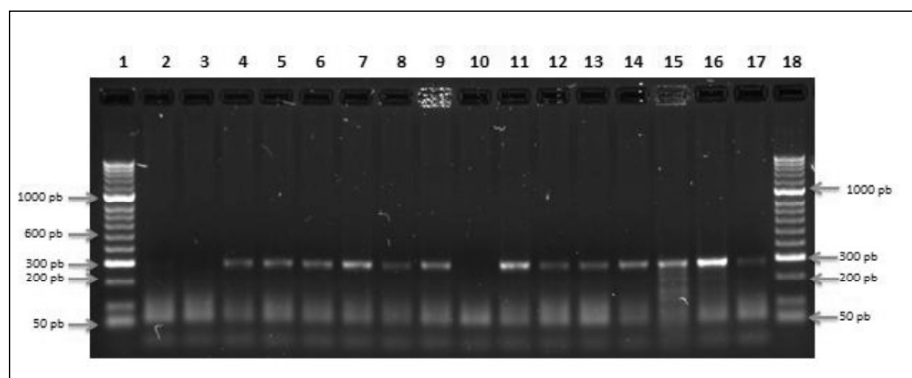
respectivamente<sup>12, 30</sup>. La variación en los datos observados puede estar relacionada con la implementación de normas estrictas de bioseguridad en granjas y un adecuado manejo de los productos avícolas durante los últimos años; así como al método de recuperación empleado en el laboratorio, sin embargo, a pesar de no haberse encontrado una alta prevalencia en el último decenio, si se evidencia la contaminación de este alimento que debería estar libre de patógenos.

De manera específica, con respecto a los hallazgos por localidad, solamente en Usaquén y Fontibón se presentó positividad, cabe resaltar que estos resultados constituyen un primer acercamiento al conocimiento de este patógeno transmitido por huevo en la ciudad capital, por lo que no es posible hacer una comparación objetiva de estos datos, salvo la recomendación de profundizar en este tipo de estudios.

La presencia de *Salmonella* spp., reportada en este estudio, puede estar relacionada con las condiciones de manejo y almacenamiento de los huevos en los diferentes expendios de la ciudad, en los que se encontraban a temperatura ambiente y expuestos a la contaminación ambiental lo que favorece la presencia de microorganismos patógenos, ya que según las buenas prácticas establecidas para el manejo, éste alimento debe permanecer refrigerado (4°C) para conservar

su buena calidad y disminuir la proliferación bacteriana<sup>31</sup>. Las deficientes condiciones de manejo están relacionadas con alta prevalencia de *Salmonella* spp. en cáscara, que para este estudio fue de 44%; en el caso del contenido interno la presencia fue de 55% donde la contaminación puede ocurrir por infección intraovarica cuando el ave se encuentra infectada por el patógeno sin presentar síntomas aparentes, también se puede relacionar con condiciones deficientes de manejo y almacenamiento, desde la postura hasta su distribución y comercialización<sup>20, 21, 30</sup>.

En cuanto a la identificación de los aislamientos de este estudio mediante PCR y REA, no fue posible determinar el serovar presente con los 4 pares de cebadores utilizados, lo que podría indicar la presencia de serovares menos comunes a lo reportado mundialmente, pues los serovares comúnmente asociados a ETA especialmente por alimentos de origen aviar son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*<sup>32</sup>. En India se reportó *S. enteritidis* en el 89,7% de las muestras obtenidas a partir de la cáscara y en el 100% de las muestras de contenido interno<sup>20</sup>, otro estudio identificó a *S. typhimurium* en el 35,3% de las muestras evaluadas<sup>21</sup>; en Francia el 18,2% de aislamientos correspondió a *S. typhimurium* y el 45,5% a *S. enteritidis*<sup>27</sup>, adicionalmente en Uruguay el 13,79% de los aislamientos fueron tipificados como *S. enteritidis*<sup>22</sup>.



**Figura 2.** Electroforesis de PCR para muestras de huevo positivas con el estuche comercial de PCR (CorpoGen BM-00007). (1: Marcador Hyperladder II. 2: Blanco. 3: Control negativo. 4-9: Muestras huevo. 10: Control negativo. 11-13: Muestras huevo. 16: Control Positivo. 18: Marcador Hyperladder I. 14,15 y 17: Muestras pollo).

La presencia de este microorganismo representa un riesgo importante para la salud pública, pues la salmonelosis es una entidad que ocasiona severos trastornos gastrointestinales caracterizados por la presentación de cuadros diarreicos y en algunas ocasiones enfermedad sistémica, manifestaciones clínicas que de acuerdo con los reportes de literatura ocasionan tasas de hospitalización hasta del 35% y altas tasas de mortalidad que pueden llegar al 28%<sup>33, 34</sup>, todo lo anterior se ve reflejado en los altos costos derivados de tratamiento y hospitalización que deben ser asumidos por el sistema de salud.

Las limitaciones del estudio están relacionadas con el muestreo, debido a que se escogieron cuatro localidades en relación a los puntos cardinales, lo que puede no reflejar la situación general de las demás localidades de la ciudad, adicionalmente el número de tiendas y plazas de mercado, así como el número de muestras analizadas fueron bajos, lo que puede limitar la validez externa del estudio; sin embargo, el haber escogido las localidades basados en los puntos cardinales y haber muestreado al azar las tiendas y plazas de mercado hace que la validez interna sea buena reflejando la calidad microbiológica del huevo para el consumo humano en relación a la presencia de *Salmonella* spp., siendo éste el primer estudio que indaga este aspecto en la ciudad de Bogotá.

Las dos técnicas utilizadas coincidieron en la identificación de *Salmonella* spp. evidenciándose que el 100% de los aislamientos microbiológicos fueron igualmente identificados mediante PCR; independientemente de no haberse identificado el serovar de *Salmonella enterica* presente tanto en cáscara como en contenido interno, la presencia de este patógeno sugiere un riesgo potencial en la salud pública, por lo que es necesario ampliar este tipo de estudios para conocer la situación real a nivel nacional frente a este patógeno.

## Agradecimientos

A la Pontificia Universidad Javeriana por el apoyo para el desarrollo del proyecto de investigación. Financiación Convocatoria Interna. ID Proyecto: 005590.

Al Programa Jóvenes Investigadores de COLCIENCIAS, "Convocatoria Nacional Jóvenes Investigadores año 2014 – 645-2014"

## Financiación

Financiación: Este proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Pontificia Universidad Javeriana, mediante Convocatoria Interna. ID Proyecto: 005590.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las nor-

mas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

**Conflicto de intereses.** Los autores no declaran conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. CDC. Estimaciones sobre enfermedades transmitidas por alimentos en los EE.UU. en el 2011. [Internet] 2011 [Consultado 2 Sept 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/Datos/EnfermedadesAlimentos/>
2. OMS. Enfermedades de transmisión alimentaria. [Internet] 2013 [Consultado 26 Sept 2015]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/es/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/es/)
3. Geimba M, Tondo E, Oliveira F, Canal C. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *J. Food Prot.* 2004; 67: 1229-1233.
4. Zaki S, Abd-El-Haleem D, El-Helow E, Mustafa M. Molecular and biochemical diagnosis of *Salmonella* in wastewater. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 2009;13: 83-92.
5. Fenavi. Estadísticas – producción público. [Internet] 2016 [Consultado 26 Marzo 2016]. Disponible en: [http://www.fenavi.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2472&Itemid=1330](http://www.fenavi.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2472&Itemid=1330)
6. Giacomozzi J. Situación actual de la industria del huevo. ODEPA [Internet] 2014 [Consultado 2 Sept 2015]. Disponible en: [http://www.odepa.cl/wp-content/files\\_mf/1403205233Huevos201406.pdf](http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1403205233Huevos201406.pdf)
7. CDC. Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. [Internet] 2010. [Consultado 12 Ene 2016]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/archive/092010.html#general>
8. Park SH, Aydin M, Khawar A, et al. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol.* 2014; 38: 250-262.
9. Levano G, Lopez C. Evaluación de la presencia de *Salmonella* en huevos frescos utilizando el medio Xilisa-Lisina-Tergitol 4 (XLT4). *Cienc Invest.* 2001; 4(1): 50- 56.
10. Durango J, Arrieta G, Mattar S. Presencia de *Salmonella* spp. En un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. *Biomédica.* 2004; 24:89-96.
11. Icontec Norma Técnica Colombiana (NTC) 4574: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Guía general sobre métodos para la detección de *Salmonella* spp. República de Colombia; (2007).
12. Loaiza JE, Sánchez M, Henao S, Cardona N. Detection of contaminant bacteria in eggs for consumption in Medellín and its Metropolitan area. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 2011; 6:20-28.
13. Parisi MA, Northcutt J.K, Smith D.P, Steinberg E.L, Dawson P.L (2014) Microbiological Contamination of Shell Eggs Produced in Conventional and Free-Range Housing Systems. *Food Control.* 2015; 47: 161- 165.
14. Paiva J, Cavallini J, Silva M, et al. Molecular differentiation of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. *Rev Bras Cienc Avic.* 2009; 11(4): 271- 276.
15. Oliveira S, Santos L, Schuch D, et al. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet Microbiol.* 2002; 87 (1): 25-35.
16. Nillian E, Ching C, Fung P, et al. Simultaneous Detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in Raw Salad Vegetables and Vegetarian Burger Patties. *Food Nutr Sci.* 2011; 2(10): 1077-1081.
17. Das Chagas F, Crispim B, Oliveira K, Grisilia A. Identification and detection of *Salmonella* strains isolated from chicken carcasses and environmental sources in Dourados, MS, Brazil. *AJMR.* 2013; 7(25): 3222- 3228.

18. Pan T, Liu Y. Identification of *Salmonella enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. *J Microbiol Immunol Infect.* 2002; 35(3): 147–151.
19. Akbarmehr J. A survey on the prevalence of poultry salmonellosis and detection of different *Salmonella* serovars isolated from poultry in broiler chicken farms. *AJMR.* 2011; 5(32): 5950-5954.
20. Suresh T, Hathab M, Sreenivasan D, Sangeetha N, Lashmanaperumalsamy P. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retail markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiol.* 2006; 23: 294- 299.
21. Singh S, Singh A, Mohan S, Bharti P. Prevalence of *Salmonella* in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. *Food Res Int.* 2010; 43: 2027–2030.
22. Betancor L, Pereira M, Martínez A, et al. Prevalence of *Salmonella enterica* in Poultry and Eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2413–2423.
23. Poppe C, Duncan CL, Mazzocco A. *Salmonella* Contamination of Hatching and Table Eggs: A Comparison. *Can J Vet Res.* 1998; 62: 191-198.
24. Radkowski M. Occurrence of *Salmonella* spp. in consumption eggs in Poland. *Int J Food Microbiol.* 2001; 64: 189–191.
25. Mancera A, Vázquez J, Ontiveros ML, et al. Identificación de *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2005; 43(2):229-237.
26. Jones DR, Musgrove MT. Pathogen Prevalence and Microbial Levels Associated with Restricted Shell Eggs. *J Food Prot.* 2007; 70(9): 2004-2217
27. Chemaly M, Huneau-salau A, Labbe A, et al. Isolation of *Salmonella enterica* in Laying-Hen Flocks and Assessment of Eggshell Contamination in France. *J Food Prot.* (2009); 72(10): 2071–2077.
28. Moosavy M, Esmaili S, Amiri F, Mostafavi E, Salehi T. Detection of *Salmonella* spp in commercial eggs in Iran. *Iran J Microbiol.* 2015; 7(1): 50- 54.
29. Rodríguez R, Galeano S, Herrera I, et al. Salmonellosis (*S. enteritidis*) en algunas granjas comerciales de postura en la Sabana de Bogotá. *ACOVEZ.* 1994; 19: 8-13.
30. Ramirez R, Rincon D, Vargas J. *Salmonella enteritidis* en huevos de gallina comercializados en Tunja (Colombia). *Salud Soc Uptc.* 2014; 1(2): 22-27.
31. FAO. Código de prácticas de higiene para los huevos y los productos de huevo. [Internet] 2007. . [Consultado 16 Ene 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/012/i1111s/i1111s01.pdf>
32. Pasquali F, Klein G, Reich F, Manfreda G, Valero A. Modelling survival behaviour of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, Typhimurium and Tennessee on table eggs during storage at different temperatures. *Food Control.* 2015; 59: 314- 319.
33. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17 (1): 7 – 15.
34. Painter JA, Hoekstra RM, Ayers T, Tauxe RV, Braden CR, Angulo FJ, Griffin PM. 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 – 415.