



CIENCIAS EPIDEMIOLÓGICAS Y SALUBRISTAS
ARTÍCULO DE REVISIÓN

Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos
Molecular diagnosis: an alternative for the detection of pathogens in food

Carlos Huertas-Caro¹, Eliana Urbano-Cáceres^{1*}, María Torres-Caycedo¹

¹Universidad de Boyacá. Facultad de Ciencias de la Salud. Grupo de investigación del programa de Bacteriología y laboratorio clínico. Tunja, Colombia.

*Autor para la correspondencia: eliurbano@uniboyaca.edu.co

Cómo citar este artículo

Huertas-Caro C, Urbano-Cáceres E, Torres-Caycedo M. Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. Rev haban cienc méd [Internet]. 2019 [citado]; 18(3):513-528. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2352>

Recibido: 14 de mayo del 2018.

Aprobado: 28 de enero del 2019.

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un problema de salud pública, en ellas se ven implicados productos de origen animal, vegetal, fuentes de agua y alimentos listos para consumo, debido a su manipulación y posibilidad de trasmisión de microorganismos patógenos principalmente de tipo bacteriano.

Objetivo: Describir las diferentes técnicas de diagnóstico convencional y molecular empleadas en la industria alimentaria.

Material y Métodos: Se realizó una búsqueda de artículos de revisión, originales y tesis durante un periodo de tres meses en inglés, portugués y español que en su contenido mostrarán el uso de metodología convencional y molecular para la identificación de microorganismos en alimentos



Resultados: Los métodos convencionales para la identificación de estos microorganismos hacen uso de protocolos y normas que están bien establecidos, pero requieren demasiado tiempo para su identificación y aportan baja sensibilidad y especificidad en algunos casos; las técnicas moleculares se plantean como una alternativa para la evaluación microbiológica de los alimentos, al ser rápidas, sensibles y fiables.

Conclusiones: las técnicas moleculares se proponen como una nueva y más rápida

alternativa de detección de microorganismos, disminuyen el tiempo para la emisión de los resultados de días a horas, identifican factores de patogenia, virulencia y resistencia a fármacos con tan solo un montaje, lo que aporta alta sensibilidad y especificidad.

Palabras claves: patógeno, enfermedad, alimentos, transmisión, técnicas de diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Introduction: Foodborne diseases constitute a health problem in the world, involving products of animal origin, vegetables, water sources, and foods ready for consumption. The problem arises because of the inadequate manipulation of food and the possibility of transmission of pathogenic microorganisms, mainly of a bacterial type.

Objective: To describe the different conventional and molecular diagnostic techniques used in the food industry.

Material and Methods: A search was carried out through the analysis of review articles, original articles, and theses during a period of three months; these articles were written in English, Portuguese and Spanish. In their content, they demonstrated the use of conventional and molecular methodology for the identification of microorganisms in different types of food.

Results: The conventional methods for the

identification of these microorganisms make use of well-established protocols and norms, but require too much time for their identification and, in some cases, they provide low sensitivity and specificity. Molecular techniques are proposed as an alternative for the microbiological evaluation of food because they are fast, sensitive and reliable.

Conclusions: Molecular techniques are proposed as a new and faster alternative for the detection of microorganisms, reducing the time for the emission of results from days to hours; identifying pathogenesis factors, virulence and drug resistance with only one assemblage, thus providing high sensitivity and specificity.

Keywords: Pathogen, Diseases, Food, Transmission, Molecular Diagnostic Techniques.



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se definen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como todas aquellas sintomatologías producidas por la ingesta de agua o alimentos contaminados con agentes químicos o microbiológicos y en algunos casos originadas por la alteración de sus propiedades físicas,⁽¹⁾ constituyen un problema de salud pública en países en vía de desarrollo, en donde se considera una de las principales causas de morbilidad, en países desarrollados interfiere con la productividad, elevando los costos del servicio de salud.^(2,3)

En los últimos años se ha incrementado el número de casos de ETA en gran parte del mundo; la principal causa es el aumento del comercio internacional de los alimentos que posiblemente puedan estar contaminados, así como, el incremento en la migración de aquellas personas que estén infectadas favoreciendo la propagación, reemergencia y aparición de microorganismos patógenos en los alimentos con capacidad de generar brotes en la población; esta situación ha obligado a establecer normas que contemplen y describan la metodología para el control de la calidad de los productos alimenticios para el consumo humano.^(1,4)

Los productos de origen animal, vegetal, fuentes de agua y alimentos listos para consumo, constituyen uno de los principales causantes de ETA, debido a que representan una forma fácil y nutritiva para los consumidores; durante la producción esta materia prima es sometida a diferentes procesos térmicos muy cortos y un alto grado de manipulación, actividades que se

convierten en un riesgo potencial para la salud pública al tener gran probabilidad de adquirir patógenos durante la preparación;^(5,6) otra causa muy conocida de ETA es la contaminación fecal del agua utilizada para el riego o procesamiento de los productos frescos.⁽⁴⁾

La detección de patógenos en alimentos por métodos de diagnóstico convencional, implica varias etapas y en muchos casos son eficaces y con bajos costos, sin embargo, presentan la desventaja de aportar resultados en días o semanas, ser laboriosos en algunos casos y sólo permiten la identificación de género y en pocos casos la especie.^(7,8)

En los últimos años se han implementado diferentes métodos de detección de patógenos en alimentos basado en el análisis por medio de espectrofotometría, detección de ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico ADN y ácido ribonucleico ARN) y biosensores, los cuales aportan alta sensibilidad y especificidad en períodos cortos de procesamiento, eliminan las limitaciones de los métodos convencionales para la detección e identificación de patógenos transmitidos por los alimentos, ahorran mano de obra y reducen errores humanos, al contar con un proceso automatizado; sin embargo, cada uno de estos métodos presenta sus propias ventajas;⁽⁹⁾ y limitaciones como el alto costo y el difícil acceso de todos los laboratorios de análisis alimentario.⁽¹⁰⁾

En Colombia el Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos (INVIMA) coordina la red nacional de laboratorios y realiza el proceso de análisis de inspección, vigilancia y control



microbiológico de alimentos y bebidas, para ello aplica métodos convencionales e inmunológicos; hasta la fecha solo se están estandarizando algunas técnicas moleculares para su posterior aplicación en el campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la presente exploración se realizó una búsqueda de artículos de revisión originales y tesis durante un periodo de tres meses en inglés, portugués y español que en su contenido mostrarán el uso de metodologías convencionales y moleculares para la identificación de microorganismos en alimentos; se estableció como intervalo las publicaciones entre los años 2006 y 2017, en bases de datos:

DESARROLLO

Microorganismos patógenos presentes en Alimentos

Las ETA representan un importante problema de salud pública a nivel mundial;⁽¹¹⁾ entre los microorganismos principalmente involucrados como contaminantes de alimentos se encuentran bacterias, parásitos, virus, hongos y levaduras, que pueden causar el deterioro de los alimentos o enfermedades asociadas a su consumo.⁽¹²⁾

Las bacterias implicadas en este tipo de enfermedades se clasifican en dos grupos, el primero causante de infecciones, que se multiplican dentro del tracto gastrointestinal, sus principales representantes son *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio parahemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, especies termófilas de *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*

Así pues, el **objetivo** de esta revisión es comparar y describir los distintos métodos utilizados para la detección e identificación de microorganismos patógenos presentes en los alimentos.

Scielo, Doaj, Pubmed, Plos, American Society for microbiology, Elsevier y Lancet, empleando palabras claves en inglés validadas en DeCS (Descriptores en Ciencias de la Salud) y MeSH (descriptores de Ciencias de la Salud). Se efectuó un análisis bibliométrico de los artículos encontrados para su clasificación por tema de interés, autores y fechas de publicación

enteropatógena, *Streptococcus* spp, entre otros; y el segundo grupo causantes de intoxicación por producción de toxinas como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*.⁽¹³⁾ Los géneros bacterianos de los dos grupos pueden contaminar el alimento de forma directa mediante un mal almacenamiento con otros productos contaminados o por deficiencia de servicios sanitarios, e indirectamente por su presencia en materiales, equipos de producción o por encontrarse dispersos en el ambiente;⁽¹⁴⁾ los alimentos principalmente involucrados con estos métodos de contaminación son aquellos que en cuyo procesamiento requieren de una alta manipulación y los considerados listos para el consumo. (Tabla 1 y 2)



Tabla 1. Bacterias causantes de infección

Agente	Alimentos indicados	Enfermedad que origina
<i>Campylobacter spp</i>	Carne de aves, res y ovina,	Gastroenteritis ⁽¹³⁾
<i>Cronobacter sakazaki</i>	Trigo, arroz, hierbas, especias, fórmulas lácteas	Meningitis infantil, bacteremia y enterocolitis necrosante ⁽¹⁵⁾
<i>Escherichia coli</i>	Carne de res, leche cruda, productos lácteos	Diarrea acuosa, colitis hemorrágica, Síndrome urémico hemolítico ^(16,17)
<i>Listeria spp</i>	Apio, tomates, lechuga, pepino, patatas, rábanos, leche, quesos blandos	Listeriosis ^(18,19)
<i>Salmonella spp</i>	Carne de aves, res, huevos, productos lácteos	Enteritis, infección sistémica, fiebre tifoidea y paratifoidea ^(20,21)
<i>Shigella spp</i>	Mayonesa, vegetales crudos, leche, aves, productos lácteos	Disentería bacilar, fiebre, calambres ⁽¹²⁾
<i>Streptococcus spp</i>	Leche, productos cárnicos	Escarlatina, angina de pecho ⁽¹³⁾
<i>Vibrio cholerae</i>	Ostras crudas, pescado	Cólera ⁽¹²⁾
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Bacalao, sardinas, mejillones, pulpo, camarón, cangrejo, langosta, ostras y algas marinas	Intoxicación alimentaria, gastroenteritis, erupciones cutáneas, sepsis ⁽²⁰⁾
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Carne de cerdo y res, leche, pescado, agua	Yersiniois ⁽¹³⁾

Tabla 2. Bacterias causantes de intoxicación

Agente	Alimentos indicados	Enfermedad que origina
<i>Arcobacter spp</i>	Carne de aves, res y cerdo, leche, agua	Diarrea, bacteriemia, endocarditis, peritonitis ⁽²²⁾
<i>Bacillus cereus</i>	Arroz, especias, productos lácteos y cárnicos	Diarrea, vómitos ⁽¹²⁾
<i>Clostridium botulinum</i>	Conservas de legumbres y hortalizas, pescados, frutas, productos cárnicos, miel	Botulismo ⁽¹¹⁾
<i>Clostridium perfringens</i>	Carne de res y aves, salsas	Diarrea, dolor abdominal ⁽¹²⁾
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leche cruda, productos lácteos	Choque tóxico, alergias, enfermedades autoinmunes ⁽²³⁾



Diagnóstico convencional

Los métodos de aislamiento microbiológico actualmente son los más utilizados en el campo de la detección de microorganismos en alimentos, sin embargo, presentando una gran desventaja, debido a su incapacidad de detección de células bacterianas en diferentes fases de crecimiento.⁽²⁴⁾

La microbiología tradicional hace uso de diferentes métodos para el diagnóstico de detección de patógenos, como el pre enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos, identificación bioquímica y, en algunos casos, caracterización antigénica;⁽²⁵⁾ el aislamiento e identificación bacteriana se realiza en medios de cultivo partiendo de diluciones seriadas, según el alimento y los posibles microorganismos presentes en la muestra que se va a analizar.⁽²⁶⁾

Para ello existen estándares y políticas internacionales que proponen criterios de cumplimiento, como la norma ISO 22000 que describe la gestión de seguridad alimentaria; en Colombia el INVIMA establece las características físicas, químicas y microbiológicas mínimas para el expendio de alimentos, contemplando los diferentes parámetros microbiológicos como la identificación de aerobios mesófilos (indicador del nivel higiénico sanitario del alimento), se usa el agar para recuento de colonias Difco,⁽²⁷⁾ de mohos y levaduras (indicador de contaminación ambiental), sembrando por profundidad en agar Potato Dextrose Agar (PDA) suplementado con cloranfenicol,⁽²⁸⁾ coliformes totales y fecales (indicador de contaminación fecal) por medio del Numero Más Probable (NMP) en caldo LMX

Fluorocult que detecta la presencia de coliformes por un viraje a color azul verdoso y de *Escherichia coli* (*E. coli*) por medio de fluorescencia.⁽²⁹⁾

Según el alimento a que se analizar se realizan pruebas complementarias para la identificación de microorganismos como *Staphylococcus aureus* (indicador de contaminación por manipuladores), *Salmonella spp.*⁽²⁹⁾ *Listeria monocytogenes*;⁽³⁰⁾ los métodos de identificación de microorganismos exigentes como los mencionados anteriormente, requieren demasiado tiempo además de la baja sensibilidad y especificidad al basarse únicamente en aspectos físicos y el costo elevado por la necesidad del uso de cantidades considerables de insumos de laboratorio.

Pruebas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas se basan en la interacción entre un antígeno presente en el alimento y los anticuerpos (Ac`s) específicos policlonales o monoclonales incluidos en el Test de detección; a lo largo del tiempo se ha elaborado gran variedad de Ac`s para detectar patógenos transmitidos por los alimentos y las toxinas microbianas por medio de diferentes tipos de ensayo. La adecuada unión Ag (antígeno) - Ac depende principalmente de la especificidad de los Ac`s, la mayoría de los Ac`s policlonales, son extraídos de conejo o suero de cabra de diferentes orígenes celulares que le confieren diferentes tipos de especificidad; los Ac`s monoclonales se dirigen solo contra un Ag específico más sensible, reproducible y fiable al momento de detectar patógenos en alimentos; las principales técnicas inmunológicas basadas en



este principio son el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que emplea marcadores enzimáticos para evidenciar la unión entre el antígeno y el anticuerpo fijado en la placa, y el inmunoensayo de flujo lateral, en el cual migra el microorganismo en un sustrato sólido por acción de capilaridad uniéndose a los anticuerpos específicos y generando una banda colorimétrica; estas técnicas aportan gran sensibilidad y especificidad.^(9,31,32)

Técnicas con Espectrometría de masas

MALDI-TOF MS

La técnica de MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight – mass spectrometry), en los últimos años se ha utilizado como una alternativa muy fiable para la detección de microorganismos, a partir del análisis de las proteínas principalmente ribosomales (2-20KDa), por medio de la creación de un espectro de masas específico para cada género y especie⁽³³⁾. MALDI-TOF MS se ha empleado para la detección de diversos microorganismos en alimentos como fuente de investigación, un ejemplo de ello es Bohme Karola y colaboradores que en el año 2012, a partir de productos lácteos aislaron 36 cepas de *S. aureus* y obtuvieron su clasificación proteogenómica determinándose como biomarcadores específicos para la identificación rápida y fiable de esta bacteria.^(33,34)

Técnicas moleculares para la detección de patógenos en alimentos

Las técnicas en biología molecular se basan en el aislamiento y extracción del ADN bacteriano con la mayor pureza, visualizando su estado al fraccionarlo, amplificarlo y determinando la

ganancia o pérdida de sitios de restricción con el fin de identificar genes que permitan establecer etiología, patogenia y posibles resistencias a antibióticos,⁽³⁵⁾ permitiendo el análisis a partir de células en diferentes estadios intermedios (ejemplo: células viables pero no cultivables).⁽²⁴⁾

Las industrias alimentarias y los laboratorios de vigilancia requieren métodos rápidos y sensibles por el gran número de muestras que deben evaluar, los microorganismos tienen que ser detectados en presencia de la flora acompañante, cuya composición y abundancia variará y dependerá del tipo de muestra y del alimento implicado; las técnicas moleculares permiten la detección de ADN directamente del alimento sin la necesidad de medios selectivos para su aislamiento ahorrando tiempo en el procesamiento, aunque para obtener mayor concentración de ADN se recomienda realizar una etapa de pre-enriquecimiento, aportando mayor sensibilidad al analizar las muestras.^(24,25,36)

Entre las pruebas empleadas con mayor frecuencia para el análisis de muestras de alimentos se encuentran: PCR (reacción en cadena de la polimerasa), qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), microarrays, biosensores, secuenciación de ácidos nucleicos de alto rendimiento (pirosecuenciación) y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE); dichas técnicas varían según el tipo de muestra que se analiza, las cuales se describen a continuación:

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico molecular de los diferentes



patógenos en alimentos, fue desarrollada hace más de 30 años con el fin de amplificar secuencias de ADN cromosomal y plasmídico específico de cada microorganismo para obtener millones de copias;^(35,37) la PCR minimiza el tiempo de detección e identificación de microorganismos de difícil recuperación, análisis de diferentes tipos de muestras, alta especificidad y sensibilidad con disminución de tiempo para la emisión del resultado, consistente en el paso de días a horas si se compara con los métodos convencionales, por esto, es una alternativa práctica para los laboratorios clínicos e industriales por lo que se toma como una herramienta de diagnóstico en los de brotes y control de calidad de los alimentos.^(10,25)

Se han realizado varios estudios utilizando PCR convencional para detectar la presencia de *Arcobacter* spp en carne aviar, identificación de los genes asociados a la virulencia de las diferentes especies⁽³⁸⁾ e identificar *E. coli* enterotoxigénica amplificando las enterotoxinas (LT y ST); se ha demostrado el porcentaje de sensibilidad y la rápida obtención de resultados de la PCR; al compararlo con técnicas microbiológicas convencionales, la identificación puede tardar aproximadamente de 5-8 días, en los que sólo se llega a identificar el género del patógeno, pero se siguen desconociendo los genes asociados a su virulencia.⁽³⁹⁾

Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

Esta técnica es una evolución de la PCR en la cual se suprime el paso de evaluación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida; combina la amplificación de

secuencias específicas de ADN aportada por esta última y fluoróforo con afinidad por el ADN o sondas marcadas con fluorescencia; para el marcaje de estas sondas se han desarrollado diferentes productos químicos, entre los más importantes encontramos el SYBR Green y las sondas de hidrólisis (TaqMan).⁽⁴⁰⁾ Una de las ventajas más grandes que tiene esta variación de la PCR es la realización en condiciones libres de contaminación y poco o nada manipulación del operario en el caso de ser automatizado el ensayo.

En comparación con la PCR convencional la qPCR genera resultados cuantitativos en menor tiempo, aporta mayor sensibilidad y seguridad para el operario al evitar el uso de reactivos cancerígenos como el bromuro de etidio;⁽¹⁶⁾ la qPCR según la norma ISO 16140 del 2003 y la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) es un método de cribado alternativo para la evaluación de patógenos en alimentos.⁽²⁴⁾

En diversos estudios se ha empleado la qPCR para comparar diferentes protocolos de identificación de las especies termófilas de *Campylobacter* de muestras obtenidas en animales y alimentos, identificando y cuantificando las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*,⁽⁴¹⁾ también se han analizado alimentos de venta en la vía pública y de plantas de beneficio, encontrando *Salmonella* spp; se concluye así, que esta técnica aporta gran sensibilidad y especificidad, además de rapidez en la identificación de patógenos en alimentos, considerándose como una técnica de gran elección para el análisis de calidad, gracias a la emisión de resultados cuantitativos.⁽⁴²⁾



Microarrays

Los microarrays presentan un gran potencial para su uso en el diagnóstico, debido a la capacidad de analizar simultáneamente un gran número de secuencias de ácidos nucleicos y la detección de múltiples dianas genéticas o genomas de múltiples patógenos en un solo montaje, diferenciando los microorganismos que presentan una marcada similitud entre sí; un microarrays debidamente diseñado es capaz de identificar los genes asociados a los factores de virulencia y a la resistencia a antibióticos; las sondas deben presentar una elevada complementariedad para que se produzca la unión con la secuencia diana a fin de permitir la detección de concentraciones bajas en muestras complejas con alta sensibilidad,^(43,44) lo que permite analizar ácidos nucleicos en forma de ADN y ARNm (ácido ribonucleico- mensajero), por lo que es considerada una prueba de alta validez, reproducibilidad y sensibilidad.^(11,23,45)

Los microarrays de ADN han sido ampliamente utilizados en el campo de la detección de patógenos transmitidos por alimentos como *Yersinia pestis* y *Bacillus anthracis*,⁽⁴³⁾ además de bacterias como *Sallmonella* spp y *Escherichia coli* con una gran sensibilidad de detección en concentraciones de 1,0 ng de ADN genómico; se concluye que esta técnica es un método prometedor para aplicaciones en microbiología básica, diagnóstico clínico, la seguridad alimentaria, y la vigilancia epidemiológica.⁽²¹⁾

Biosensores

Los biosensores son dispositivos usados para la detección de proteínas, ácidos nucleicos, microorganismos, organelos, o tejidos,

desarrollados en los años 60 y han evolucionado con el tiempo;⁽³⁵⁾ pueden ser ópticos, electroquímicos, basado en masas, termométricos, micro mecánicos o magnéticos, el más usado para la detección de patógenos en alimentos son los biosensores ópticos por su alta especificidad y sensibilidad,^(9,31) esta técnica se ha convertido en una gran opción para identificar patógenos en la industria alimentaria por su selectividad, especificidad, amplio espectro, poca cantidad de muestra y fácil manejo.⁽⁴⁶⁾

Pirosecuenciación

Esta técnica fue elaborada por Mostaza Rognaghi y colaboradores a finales de los años 90, como una variante de la secuenciación de alto rendimiento de segunda generación, con el fin de aumentar el rendimiento y disminuir su costo; hoy en día su aplicación se basa en el análisis de agua potable, mutaciones de microorganismos de interés clínico, resistencia genética, transferencia de genes y detección de patógenos en alimentos.⁽⁴⁵⁾

La Pirosecuenciación se ha utilizado en un gran número de estudios cuyo objetivo se basa en la caracterización de comunidades microbianas de productos lácteos, incluyendo leche cruda y pasteurizada y varios tipos de queso; también se ha probado en la inhibición contra el crecimiento de bacterias psicrotróficas empleando CO₂ como tratamiento, identificando las bacterias principalmente involucradas en la contaminación, con un alto rendimiento y porcentaje de acierto.⁽⁴⁷⁾



Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)
 Técnica desarrollada por Schwartz y Cantor en 1984, que permite la comparación epidemiológica de los microorganismos encontrados en un brote; se basa en la migración del ADN por polaridad a través de un gel de agarosa concentrado, influido por dos campos eléctricos mediante distintas enzimas de restricción;^(48,49) su aplicación en alimentos se basa en subtipificar los microorganismos implicados en ETA discriminando entre los diferentes agentes bacterianos epidemiológicamente relacionados.⁽⁵⁰⁾

Se han realizado varios estudios empleando la PFGE, con el fin de caracterizar la relación entre *Salmonella* spp causante de infecciones humanas y sus reservorios animales, identificando algunos genes de resistencia a antibióticos,⁽⁵¹⁾ y caracterizando genéticamente la toxina Shiga producida por *E. coli*, aisladas de leche y criaderos de cabras; se concluye que esta técnica por medio de patrones relaciona las similitudes moleculares de las cepas patógenas de un microorganismo asociándolas a las causas de su transmisión.⁽⁵²⁾

Tabla 3. Ventajas y Limitaciones de las técnicas moleculares

Técnica Molecular	Ventajas	Limitaciones
PCR simple	Mayor rapidez (4-24 h Vs 5-7 días). Alta especificidad y sensibilidad. Automatizado.	Inhibidores de PCR. Requiere purificación de ADN. Alto costo.
PCR Tiempo Real	Específica y sensible. Amplificación monitoreada en tiempo real. Ciclos rápidos. Reproducible. No requiere de post-procesamiento de los productos de amplificación.	Alto costo. Inhibidores de la PCR. Requiere personal capacitado. La contaminación cruzada.
Microarreglos	Rapidez. Análisis múltiple. Alta sensibilidad y especificidad. Caracterización de cada cepa.	Requiere kits o PCR para marcar los genes blancos. Alto costo. Pocas plataformas para estudio de patógenos en alimentos.
Biosensores	Alta selectividad y sensibilidad. Automatizables y miniaturizables. Reproducibilidad, velocidad en el análisis y ejecución en tiempo real. Análisis múltiple de patógenos en alimentos perecederos y semiperecederos.	Ciertos biosensores pueden requerir extensos y pre-tratamiento de las muestras. Existen pocas plataformas de biosensores individuales, disponibles comercialmente.



	<p>Permite la existencia de varias configuraciones por la diversidad de las propiedades transductoras. Larga vida útil de los dispositivos (materiales estables y resistentes). En la mayoría de los casos es innecesario el pre-tratamiento de las muestras.</p>	
Pirosecuenciación	<p>Sensible, específica y precisa. Secuenciación sin electroforesis. Rápido (7-10 h). Se realiza en tiempo real. Costos de reactivos más bajos en comparación con otros métodos de secuenciación disponibles actualmente.</p>	<p>No hay detección de células viables sin pre-enriquecimiento. Las muestras necesitan estar preparadas y amplificadas. Bioinformática compleja. Alto costo inicial del equipamiento.</p>
Electroforesis en gel de campo pulsado	<p>Mayor poder de separación (separa moléculas inferiores a 50 Kb sin distorsión y hasta moléculas de 2 Mb). Los carriles electroforéticos son perfectamente rectilíneos y el patrón de separación es independiente de la posición del gel.</p>	<p>Asignación de bandas anormales para la interpretación de perfiles estrechamente relacionados.⁽⁴⁹⁾</p>

Modificada de: (7,9)

CONCLUSIONES

Los métodos de diagnóstico convencional si bien son procesos estandarizados, poseen esquemas de fácil interpretación, en su mayoría son fiables y de bajo costo, presentan su principal limitación al momento de requerir gran cantidad de trabajo, procedimientos largos y periodos de incubación que van de días hasta semanas contando desde el procesamiento de la muestra hasta, el cultivo y su posterior detección de Ags (antígenos) en algunos casos.

Con el avance de la ciencia se han descrito técnicas moleculares cuyo fin principal es obtener mejores resultados evaluándose por su

mayor sensibilidad y especificidad, además de reducir cantidad de tiempo invertido y la cantidad de muestra necesaria para generar un resultado, añadiendo una evaluación de patogenia, resistencia a antibióticos y nexo epidemiológico; al ser técnicas más novedosas y evaluar la parte molecular, presentan un elevado costo en equipos y reactivos, con requerimientos específicos de espacio y áreas para el procesamiento de las muestras.

La PCR y la qPCR son los métodos de diagnóstico molecular más aplicados en el área de patógenos en alimentos, han sumado ventajas adicionales a



esta técnica, entre las que se destaca una mayor velocidad en la obtención de resultados. Sin embargo, los equipos y reactivos resultan más costosos que aquellos empleados en los métodos tradicionales de cultivo. Esta desventaja es característica en la mayoría de las técnicas

moleculares descritas, lo cual sugiere una mayor investigación en el campo de los alimentos con el fin de generar protocolos de PCR o qPCR multilplex que favorezcan la detección simultánea de diferentes patógenos causantes de ETAs.

REREFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Daniel de Paula CM, Sopeña Casarin L, Tondo EC. Escherichia coli O157: H7-patógeno alimentar emergente. *Vigilância Sanitária em Debate Soc Ciência Tecnol*. 2014;2(4):23–33.
2. López Aday D, Rivero Álvarez E, Martínez Torres A, Milagros Alegret Rodríguez C. Enfermedades transmitidas por alimentos en villa clara. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. 2013 [cited 2016 Sep 12];51(2):203–13. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032013000200009
3. Olea A, Díaz J, Fuentes R, Vaquero A, García M. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Rev Chil infectología*. 2012;29(5):504–10.
4. Vital PG, Dimasuay KGB, Widmer KW, Rivera WL. Microbiological quality of fresh produce from open air markets and supermarkets in the Philippines. *Sci World J* [Internet]. 2014 [cited 2016 Sep 15]. 2014:7p Available from: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/219534/>
5. da Silva ÁS, Aragon CC, de Santana EHW, Destro MT, de Rezende Costa M, Alegro LCA. Listeria monocytogenes em leite e produtos lácteos no Brasil: Uma revisão. *Journal of Health Sciences* [Internet]. 2011 [cited 2016 Sep 12]. 13(1):10. Available from: <http://pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/1266/121>
6. Rodríguez-Cavallini E, Rodríguez C, Del Mar Gamboa M, Arias ML. Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Arch Latinoam Nutr* [Internet]. 2010 [cited 2016 Sep 12];60(2):179–83. Available from: http://www.scielo.org/ve/scielo.php?pid=S0004-06222010000200011&script=sci_arttext&lng=en
7. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;31(3):535–46.
8. de Freitas EI, de Lemos AA, Marin VA. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. *Cien Saude Colet* [Internet]. 2006 [cited 2016 Sep 13];11(4):1073–83. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232006000400028&lng=pt&lng=pt
9. Law JW-F, Ab Mutalib N-S, Chan K-G, Lee L-H. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*. 2015;5:770.
10. Rissato DP, Borgo AP, Moreira JP, Carolina A, Conti M. Detecção de Salmonella spp. em água de lavagem de carcaças de frango utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR). *Rev Saúde e Pesqui* [Internet]. 2011 [cited 2016 Sep 20];4(1):35–9. Available from: <http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/1665>
11. Puig Peña Y, Leyva Castillo V, Robert Maceo BA, Pérez Muñoz Y. Agentes bacterianos asociados a



- brotos de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana, 2006-2010. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. 2013 [cited 2016 Sep 28];51(1):74–83. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubhigepi/chi-2013/chi131h.pdf>
12. Carrillo-Inungaray ML, López González RC, Alvarado Sánchez B, Aguilar Zárte M. Comparación De Los Métodos Fenotípico Y Molecular Para Identificación De Patógenos En Alimentos. *Rev Acad Investig*. 2011;7:1–20.
13. de Toledo Pires CE. Principais bactérias presentes em doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Brazil: Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul; 2011. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/52521>
14. Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. *Organ las Nac unidas para la Agric y la Aliment* [Internet]. 2009 [cited 2016 Sep 15];18–109. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
15. Luján Medina GA, Treviño AL, Aguilar N. *Cronobacter sakazakii*: Un Patogeno Emergente *Cronobacter sakazakii*: A Food Borne Emergent Pathogen. *Rev Científica la Univ Autónoma Coahuila*. 2014;6(12):24–9.
16. Gómez D, Lavayén S, Nario F, Piquin A, Zotta CM. Detección de microorganismos potencialmente patógenos en hogares de Mar del Plata. *Acta bioquímica clínica Latinoam*. 2011;45(3):441–5.
17. Fratamico PM, Bagi LK. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef using the GeneDisc real-time PCR system. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012 [cited 2016 Oct 3];2:152. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00152/abstract>
18. Cao B, Liu X, Yu X, Chen M, Feng L, Wang L. A new oligonucleotide microarray for detection of pathogenic and non-pathogenic legionella spp. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2016 Oct 3];9(12). Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113863>
19. Herrera Perez IJ, Moreno Trigos Y, Ferrus Perez MA. Evaluación del comportamiento de los patógenos alimentarios *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* mediante técnicas moleculares y cultivo en matrices alimentarias. [Tesis de Maestría]. Universidad Politécnica de Valencia; 2013. 21p.
20. Araújo J De, Santiago S, Filipe P, Araújo R, Santiago AP. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados-revisão. *Arquivos de Ciência do Mar. Arq Ciência do Mar*. 2013;46(2):92–103.
21. Martín A. B. Evaluación Microbiológica De Alimentos Adquiridos En La Vía Pública En Un Sector Del Norte De Bogotá. *Rev UDCA Actual & Divulg Científica*. 2009;12(2):9–17.
22. Rojas Santana ZM. Evaluación de la especificidad de dos métodos moleculares para la identificación de especies pertenecientes al género *Arcobacter*. [Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas]. Universidad Astral de Chile; 2011. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2011/fcr7411e/doc/fcr7411e.pdf>
23. Faccioli PY. Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente. [Tesis Doctorado]. Universidad de Estadual Paulista; 2010. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en: https://repositorio.unesp.br/handle/11449/103802?locale-attribute=pt_BR
24. Bonilauri P, Bardasi L, Leonelli R, Ramini M, Luppi A, Giacometti F, et al. Detection of food hazards in foods: comparison of real time polymerase chain reaction and cultural methods. *Ital J Food Saf*



[Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 15];5(1). Available from:

<http://www.pagepressjournals.org/index.php/ijfs/article/view/ijfs.2016.5641>

25. Andrade RB De, Gemelli T, Onder LPD, Cristina K, Brito T De, Brito BG De. Métodos Diagnósticos Para Os Patógenos Alimentares: Campylobacter Sp., Salmonella Sp. E Listeria Monocytogenes. Arq Inst Biol (Sao Paulo). 2010;77(4):741–50.

26. Sobrino Gregorio L. Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios. España: Universidad Politécnica de Valencia; 2014. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/40282>

27. Lengua MD, Castillo PM, Díaz WF, de la Hoz VF, Rodríguez RC. Evaluación higiénico-sanitaria y acción antagónica de cepas de lactobacilos comerciales frente a microorganismos patógenos (Escherichia coli) presentes en el queso de capa del municipio de mompox. Rev Cient la Fac Ciencias Vet la Univ del Zulia [Internet]. 2010 [cited 2016 Oct 15];20(3):312–7. Available from:

http://www.scielo.org/ve/scielo.php?pid=S0798-22592010000300014&script=sci_arttext

28. Salamanca G G, Osorio T MP, Montoya LM. Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de Borojón (Borojoa patinoi Cuatrec). Rev Chil Nutr. 2010;37(1):87–96.

29. Cabrera A, Ospina E. Identificación De Microorganismos Indicadores Y Determinación De Puntos De Contaminación En Aguas Superficiales Provenientes Del Cementerio Jardines Del Recuerdo Ubicado En El Norte De Bogotá. [Tesis para optar al Título de Microbiólogo Industrial]. Pontificia Universidad Javeriana; 2006. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en:

<https://es.scribd.com/document/311645316/tesis263#>

30. Muñoz Á, Muñoz ÁB, Chaves JA, Rodríguez EC, Realpe ME. Listeria monocytogenes en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. Biomédica. 2013;33(2):283–91.

31. Zhao X, Lin C-W, Wang J, Oh DH. Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. J Microbiol Biotechnol [Internet]. 2014 [cited 2016 Oct 17];24(3):297–312. Available from:

<http://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1310.10013>

32. Martín de Santos R. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. In: Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia [Internet]. 2010 [cited 2016 Oct 20]. p. 67–98. Available from:

<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1108>

33. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. Infect [Internet]. 2018 [cited 2018 Apr 25];22(1):35–45. Available from:

<http://www.revistainfectio.org/index.php/infectio/article/view/703/739>

34. Böhme K, Morandi S, Cremonesi P, Fernández No IC, Barros Velázquez J, Castiglioni B, et al. Caracterización de Staphylococcus aureus aislado de productos lácteos por MALDI-TOF MS. Rev la Soc Española Proteómica [Internet]. 2012 [cited 2018 Apr 25];2012(8):122–122. Available from:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6311472>

35. Correa O A, Parra F H, Hoyos G K. Diagnóstico molecular y biosensores. Colombia: Universidad de Córdoba; 2015. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en: https://www.academia.edu/19329537/Diagnostico_molecular_y_biosensores

36. Kostić T, Sessitsch A. Microbial Diagnostic Microarrays for the Detection and Typing of Food- and



- Water-Borne (Bacterial) Pathogens. Microarrays [Internet]. 2011;1(3):3–24. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3905/1/1/3/>
37. Boric Bonifaz V. Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Avances en Latinoamérica. Biofarbo [Internet]. 2008 [cited 2016 Oct 5];16:92–7. Available from: <http://scielo.org.bo/pdf/rbfb/v16n1/v16n1a16.pdf>
38. de Oliveira MGX. Caracterização genotípica de Arcobacter spp. aislados de carnes de aves comercializadas no Município de São Paulo. [Tesis de maestría]. Universidad de São Paulo; 2015. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-23032016-105513/pt-br.php>
39. Peña Hidalgo M, Dávila Flores C, Tresierra Ayala Á, Castro Gómez J. Identificación molecular de Escherichia coli enterotoxigénica en niños con infecciones diarreicas agudas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Cienc Amaz. 2014;4(2):117–22.
40. Leal CAG. Desenvolvimento e otimização de protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico de patógenos emergentes para a aquicultura nacional. [Tesis Doctoral]. Universidad Federal de Lavras; 2011. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1594/1/TESE_Develop%20e%20otimiza%C3%A7%C3%A3o%20de%20protocolos%20de%20PCR%20em%20tempo%20real%20para%20o%20diagn%C3%B3stico%20de%20pat%C3%B3genos%20emergentes%20para%20a%20aquicultura%20nacional.pdf
41. Ugarte Ruiz M. Detección y Caracterización de “Campylobacter” procedentes de animales, alimentos y agua residual. [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid; 2015. [Citado 2016 Oct 3]. Disponible en: [https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-](https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-caracterizacion-campylobacter-procedentes-animales-alimentos-agua-residual.pdf)
- [caracterizacion-campylobacter-procedentes-animales-alimentos-agua-residual.pdf](https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-caracterizacion-campylobacter-procedentes-animales-alimentos-agua-residual.pdf)
42. Yáñez E, Máttar S, Durango A. Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Asoc Colomb Infectología [Internet]. 2008 [cited 2016 Oct 20];12(4):246–54. Available from: [http://www.revistainfectio.org/site/Portals/0/volumen12_4/Determinacióndesalmonella.pdf\npapers3://publication/uuid/D4A199DD-CCCD-479E-8183-EFD09C0DCCE2](http://www.revistainfectio.org/site/Portals/0/volumen12_4/Determinación%20de%20salmonella.pdf\npapers3://publication/uuid/D4A199DD-CCCD-479E-8183-EFD09C0DCCE2)
43. Goji N, Macmillan T, Amoako KK. A New Generation Microarray for the Simultaneous Detection and Identification of Yersinia pestis and Bacillus anthracis in Food. J Pathog [Internet]. 2012 [cited 2016 Oct 19];2012:627036. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3483683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Fang H, Xu J, Ding D, Jackson SA, Patel IR, Frye JG, et al. An FDA bioinformatics tool for microbial genomics research on molecular characterization of bacterial foodborne pathogens using microarrays. BMC Bioinformatics. 2010;11(SUPPL. 6):S4.
45. Gonzalez Pedraza JB, Sanandres NP, Varela ZS, Aguirre EH, Camacho JV. Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte. 2014;30(1):73–94.
46. Jiménez C, León DE. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. Vitae. 2009;16(1):144–54.
47. Lo R, Turner MS, Weeks M, Bansal N. Culture-independent bacterial community profiling of carbon dioxide treated raw milk. Int J Food Microbiol [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 25];233:81–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160516303087>



48. McMillan K, Moore SC, McAuley CM, Fegan N, Fox EM. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 26];16(1):169. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0789-1>
49. Cardozo-Bernal ÁM, Ramón LF, Poutou-Piñales RA, Carrascal-Camacho AK, Zambrano DC. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Univ Sci*. 2013;18(2):203–22.
50. Zamudio ML, Meza A, Bailón H, Martínez-Urtaza J, Campos J. Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2011;28(1):128–35. Available from: <http://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v28n1/a20v28n1.pdf>
51. Sandt CH, Fedorka-Cray PJ, Tewari D, Ostroff S, Joyce K, M'ikanatha NM. A comparison of non-typhoidal *Salmonella* from humans and food animals using pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility patterns. *PLoS One* [Internet]. 2013 [cited 2016 Oct 26];8(10):e77836. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077836>
52. Álvarez-Suárez ME, Otero A, García-López ML, Dahbi G, Blanco M, Mora A, et al. Genetic characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolates from goat's milk and goat farm environment. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2018 Oct 26];236:148–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160516303932>

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de autoría

Todos los autores participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final del artículo.

