

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS: VENTAJAS Y LIMITACIONES

Carolina Palomino-Camargo^{1,a,b}, Yuniesky González-Muñoz^{1,2,c}

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos, ocasionadas por microorganismos patógenos, constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial. Los métodos microbiológicos utilizados comúnmente en la detección de estos patógenos, de origen alimentario, son laboriosos y consume mucho tiempo. Esta situación, aunada a la demanda por resultados inmediatos y a los avances tecnológicos, ha conducido al desarrollo de una amplia gama de métodos rápidos en las últimas décadas. En base a esto, la presente revisión describe las ventajas y limitaciones de los principales métodos moleculares utilizados en la detección e identificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. Para ello, se consideró la actualidad de la información consultada, el análisis objetivo de la temática y su alcance. La literatura reciente reporta un número significativo de técnicas moleculares, alternativas, sensibles y selectivas para la detección, enumeración e identificación de microorganismos patógenos en alimentos, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la plataforma más popular, mientras que la secuenciación de alto rendimiento se perfila como una técnica de gran aplicabilidad a futuro. Sin embargo, aun con todas las ventajas que ofrecen estas novedosas metodologías, no se deben pasar por alto sus limitaciones. Así, por ejemplo, los métodos moleculares no constituyen protocolos estandarizados, lo que dificulta su utilización en algunos casos. Por esta razón se debe trabajar arduamente para superar tales limitaciones y mejorar la aplicación de estas técnicas en matrices tan complejas como los sistemas alimenticios.

Palabras clave: Técnicas de diagnóstico molecular; Inocuidad de los alimentos; Enfermedades transmitidas por los alimentos; Microbiología de alimentos; Epidemiología molecular (fuente: DeCS BIREME).

MOLECULAR TECHNIQUES FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENS IN FOOD: ADVANTAGES AND LIMITATIONS

ABSTRACT

Foodborne diseases, caused by pathogenic microorganisms, are a major public health problem worldwide. Microbiological methods commonly used in the detection of these foodborne pathogens are laborious and time consuming. This situation, coupled with the demand for immediate results and with technological advances, has led to the development of a wide range of rapid methods in recent decades. On this basis, this review describes the advantages and limitations of the main molecular methods used in detection and identification of foodborne pathogens. To this end, we considered how recent the information was published, the objective analysis of the topic and its scope. Recent literature reports a significant number of alternative, sensitive and selective molecular techniques for detection, enumeration and identification of pathogenic microorganisms in food. Polymerase chain reaction (PCR) is the most popular platform, while high performance sequencing is emerging as a technique of wide applicability for the future. However, even with all the advantages of these new methodologies, their limitations should not be overlooked. For example, molecular methods are not standardized protocols, which hinders its use in some cases. For this reason, hard work should be done to overcome these limitations and improve the application of these techniques in complex matrices such as food systems.

Key words: Molecular diagnostic techniques; Food safety; Foodborne diseases; Food microbiology; Molecular epidemiology (fuente: DeCS BIREME).

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

² Ministerio del Poder Popular para la Alimentación. Caracas, Venezuela.

^a Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos; ^b licenciada en Biología; ^c licenciado en Ciencias de los Alimentos.

Recibido: 11-01-14 Aprobado: 23-07-14

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un problema de salud pública en todo el mundo y una causa importante de morbilidad, lo cual supone una carga económica significativa para las naciones, perjuicios para los consumidores y un impacto al comercio internacional de productos alimenticios⁽¹⁻⁴⁾. Más de 250 enfermedades conocidas se transmiten a través de alimentos. Su incidencia ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas por la rápida globalización del mercado de alimentos y por los profundos cambios en los hábitos alimenticios. Además, este problema se acrecienta con el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, y el aumento de la resistencia a los compuestos antimicrobianos en los microorganismos patógenos^(2,3).

Se sabe que alrededor de 40 diferentes patógenos de origen alimentario causan enfermedades humanas⁽²⁾. Más del 90% de los casos confirmados y las muertes causadas por dichos patógenos han sido atribuidos a bacterias⁽⁵⁾. Entre las bacterias más comunes se encuentran; *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, y *Campylobacter jejuni*⁽³⁾. No obstante, aproximadamente el 98% de los microorganismos encontrados en los productos alimenticios no son patógenos⁽⁶⁾. Por esta razón, se requiere desarrollar pruebas de diagnóstico que puedan detectar específicamente el microorganismo de interés⁽⁶⁾.

La inocuidad de los alimentos es un concepto inherente a la seguridad alimentaria, y está relacionada con muchos aspectos de las tecnologías de producción agraria, a la manipulación y elaboración de alimentos, constituyendo una importante prioridad política en todo el mundo^(2,4). Por lo tanto, el desarrollo y la optimización de alternativas novedosas para el seguimiento, caracterización y enumeración de patógenos en alimentos es uno de los aspectos clave en la microbiología de alimentos⁽⁷⁾, y se vuelve cada vez más importante para la agricultura, la industria alimentaria y los consumidores.

Los métodos microbiológicos clásicos implican, generalmente, el uso de un apropiado cultivo de preenriquecimiento y enriquecimiento, el aislamiento en medios selectivos y la posterior confirmación mediante pruebas bioquímicas morfológicas y/o serológicas. Todo esto es laborioso, la obtención de resultados puede tomar días o semanas y, adicionalmente, presentan baja sensibilidad. Aunado a ello, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VPNC), debido

al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Una serie de métodos moleculares alternativos, rápidos y sensibles para la detección, identificación y cuantificación de patógenos transmitidos por alimentos han sido desarrollados para superar estos inconvenientes^(2,6,8,9).

El objetivo de la revisión es describir los distintos métodos moleculares utilizados para la detección, e identificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, haciendo particular énfasis en sus ventajas y limitaciones.

METODOLOGÍA

Se realizó una revisión de tipo narrativa, no sistemática, referente a las técnicas moleculares utilizadas actualmente en la detección e identificación de patógenos en alimentos, destacando a la vez, sus aplicaciones, ventajas y limitaciones. La recolección de la información se efectuó durante noviembre y diciembre de 2013. La búsqueda se llevó a cabo en las bases de datos Science Direct, Springer Journal y Medline. La estrategia de búsqueda estuvo caracterizada por los siguientes criterios: actualidad de la información consultada, análisis objetivo de la temática y alcance de la misma. Los términos de búsqueda aplicados fueron: *Molecular diagnostic techniques, food safety, foodborne diseases, molecular epidemiology y advantages and limitations of molecular diagnostic techniques*. Se incluyeron artículos en inglés y español.

MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

Los principales avances en los ensayos de detección de patógenos en alimentos, basados en ácidos nucleicos, se produjeron a partir de 1980⁽¹⁰⁾. Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación. En contraste con las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional^(10,11).

El descubrimiento de la PCR, la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a una gran cantidad de información en la web ayudó al desarrollo de nuevas herramientas

moleculares, cuyo uso ha aumentado enormemente la habilidad para detectar y cuantificar bacterias patógenas en agua y alimentos, entre estas, muchas bacterias emergentes, como por ejemplo; *Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., las cuales han representado una seria amenaza para la salud pública mundial. La segunda generación de métodos moleculares para la detección e identificación de géneros y especies son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR múltiple, la secuenciación de genes específicos, el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado, entre otros ^(11,12).

Recientemente, se ha dado un paso hacia las plataformas moleculares más sofisticadas para la identificación de microorganismos patógenos, incluyendo sistemas de amplificación *in vitro* en tiempo real, biosensores y microarreglos ⁽⁹⁾, los cuales han sido desarrollados o se están desarrollando para su uso como métodos rápidos en la detección de patógenos en alimentos. Algunos de los actuales métodos de detección molecular pueden ser empleados, además, en laboratorios o establecimientos clínicos, en sitios de observación, tales como la granja o el campo, en forma de kit todo en uno.

APLICACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La enumeración de patógenos transmitidos por alimentos es un aspecto principal del diagnóstico molecular microbiológico, especialmente si quiere utilizarse para la evaluación cuantitativa del riesgo. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica de diagnóstico molecular más ampliamente utilizada debido a su protocolo rápido y de fácil uso (Figura 1). Por lo general, 2-3 h son necesarias para completar una PCR, pero hoy en día se están desarrollando sistemas de PCR más avanzados para generar un resultado en cuestión de minutos ⁽²⁾. A continuación se presentan varios ejemplos de las aplicaciones de los distintos tipos de PCR en alimentos.

Existen muchas pruebas de PCR que se han descrito para patógenos relacionados a alimentos (*Salmonella*, *E. coli* O157, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* y varios otros). Estas se encuentran disponibles comercialmente (certificado por la FDA y AOAC). Para *Campylobacter* spp. se han desarrollado distintas investigaciones en alimentos, utilizando la técnica PCR dirigida a los genes *flaA*, *CadF*, *ceuE* y *cdt* y la región 16S del ARNr ⁽¹³⁾. De esta manera, una única célula de *Campylobacter jejuni*

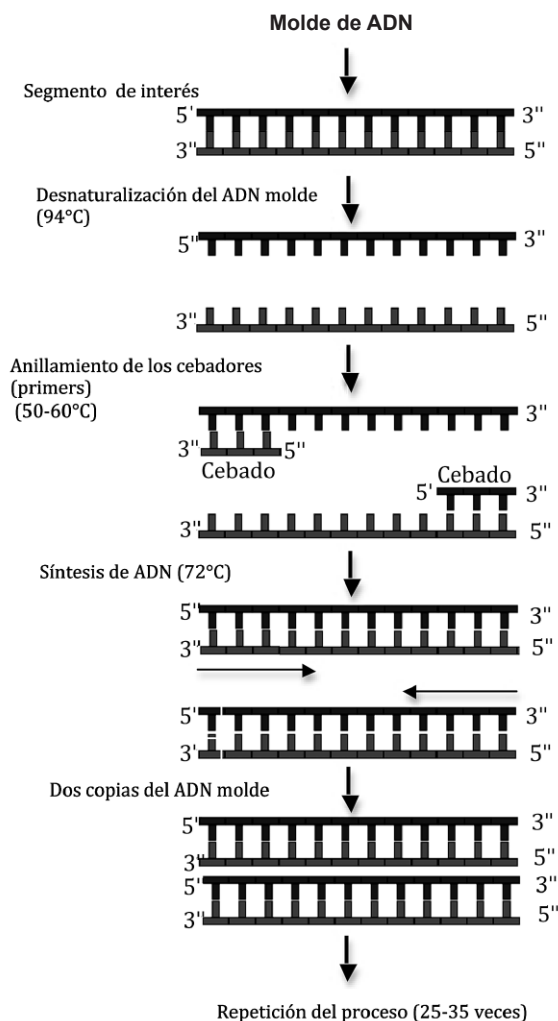


Figura 1. Etapas de la PCR*

*La técnica de PCR se basa en el principio de complementariedad de bases del ADN y en la participación de la enzima polimerasa que permite la extensión del fragmento a amplificar, agregando nucleótidos en secuencia complementaria al ADN molde por medio de un proceso cíclico que comprende tres pasos: desnaturalización, hibridación y extensión ⁽²⁰⁾.

en leche y en muestras de agua (utilizada para el lavado del pollo) fue identificada a través de la PCR, en conjunto con una técnica de separación inmunomagnética (IMS). El tiempo de ensayo fue de 8 h, sin el enriquecimiento de la muestra ⁽¹⁴⁾. Una PCR-ELISA fue empleada para la detección de *C. jejuni* en muestras de aves de corral. Este ensayo, dirigido al gen *ceuE*, fue aplicado directamente sin el paso de enriquecimiento previo, reportándose un límite de detección de 40 ufc/mL ⁽¹³⁾.

Asimismo, se han utilizado pruebas basadas en la PCR para la identificación de *Listeria* spp y *L. monocytogenes* en distintas muestras de alimentos, leche y productos lácteos. Por ejemplo, Gouws y Liedemann (2005) ⁽¹⁵⁾ utilizaron un ensayo de PCR específico para la detección del gen *hly* de *L. monocytogenes* y los métodos de cultivo

convencionales para la identificación de *Listeria* spp. De los 27 productos analizados, 74% fueron presuntamente positivos para *Listeria* en agar Oxford (Oxoid) y 44% identificados como *L. monocytogenes* en agar RAPID' L. mono agar (Bio-rad). La PCR se utilizó como prueba de confirmación e identificó a *L. monocytogenes* en el 37% de la muestras analizadas. Los autores concluyeron que la PCR fue capaz de eliminar los resultados falsos positivos que se observaron por los métodos de cultivo.

Para la detección e identificación de *Salmonella* spp. en alimentos también se han desarrollado varios ensayos PCR. Un ensayo específico para la especie *Salmonella typhimurium*, basado en la amplificación del gen *OgdH*, se ha descrito con un límite de detección de 100 UFC a partir de cultivos puros y de 200 UFC a partir de las muestras positivas de carne de pollo ⁽¹⁶⁾.

Para los serogrupos O174 y O177 de *E. coli* se han desarrollado ensayos de PCR basados en los genes *wzx* y *wzy* ⁽¹⁷⁾. Paton y Paton (1998) ⁽¹⁷⁾ desarrollaron dos estrategias de PCR múltiple para la detección de *stx*₁, *stx*₂, *eaeA* y *hlyA* en un caso y para regiones del operón *rfb* de *E. coli* O111 y O157 en el otro. Ambos ensayos fueron efectivos para la detección directa y caracterización de 52 cepas de *Escherichia coli* Shiga Toxigénica (serotipos O), aislados de heces humanas, animales domésticos y alimentos. La sensibilidad de ambos ensayos fue de 10³ UFC.

La PCR múltiple ha sido desarrollada para la detección simultánea de dos o más agentes patógenos asociados a alimentos. Un ensayo de PCR múltiple para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *E. coli* O157: H7, luego de un cultivo de enriquecimiento, tuvo un límite de detección de 1 UFC/g de carne de cerdo, en un tiempo total de ensayo de 30 h ⁽¹⁸⁾. Meng *et al.*, (2007) ⁽¹⁹⁾ detectaron la presencia de *H. pylori* a partir de distintas muestras de alimento, utilizando una novedosa PCR múltiple. La especificidad del ensayo fue probada utilizando 11 especies bacterianas distintas y a *H. pylori* como control positivo. Los autores señalaron las ventajas de este método frente a la PCR convencional, indicando que solo se requirieron 6 h para obtener resultados.

Muchos microorganismos patógenos, asociados a alimentos son capaces de producir toxinas. Entre ellos se puede mencionar a *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Bacillus cereus*, y *E. coli*. En base a esto se han desarrollado diferentes tipos de métodos dirigidos a la detección de genes para toxinas. Estos métodos incluyen; amplificación e hibridación con sondas ⁽¹⁰⁾.

Los métodos de PCR dirigidos a la detección de toxinas se han desarrollado para varias especies bacterianas como; *V. cholerae*, *E. coli* y algunos aislados de

estafilococos, por nombrar unos pocos. Muchos de los métodos basados en ácidos nucleicos utilizan la PCR para detectar toxinas diferentes o genes de virulencia que permiten que las bacterias se conviertan en patógenos. La Tabla 1 contiene una lista de cebadores

Tabla 1. Primers PCR para la detección de genes de toxinas bacterianas

ESPECIES	TOXINAS	GEN	SECUENCIA DEL PRIMER (5' 3')
<i>Bacillus cereus</i>	Hemolisina BL	<i>hblA</i>	AAGCAATGGAATACAATGGG
			AGAATCTAAATCATGCCACTGC
		<i>hblB</i>	AAGCAATGGAATACAATGGG
			AATATGTCCAGTACACCCG
		<i>hblC</i>	GATAC(T/C)AATGTGGCAACTGC
			TTGAGACTGCTCG(T/C)TAGTTG
	<i>hblD</i>	ACCGGTAACACTATTTCATGC	
		AGATCCATATGCTTAGATGC	
	Enterotoxina no hemolítica	<i>nheA</i>	GTTAGGATCACAATCACCCG
			ACGAATGTAATTTGAGTCGC
		<i>nheB</i>	TTTAGTAGTGGATCTGTACGC
			TTAATGTTCGTTAATCCTGC
<i>nheC</i>		TGGATTCCAAGATGTAAGG	
		ATTACGACTTCTGCTTGTGC	
Enterotoxina T	<i>bceT</i>	CGTATCGGTCTGTTCACTCGG	
Citotoxina K	<i>cytK</i>	CGTTGATTTCCGTAGCCTGGG	
		GAACTC(G/C)(A/T)AACTGGGTGGGA	
<i>Clostridium botulinum</i>	Toxina tipo A	<i>BoNT(A)</i>	AGCTACGGAGGCAGCTATGTT
			CGTATTTCCAAAGCTGAAAAGG
	Toxina tipo B	<i>BoNT(B)</i>	CAGGAGAAGTGAGCGAAAA
			CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG
	Toxina tipo E	<i>BoNT(E)</i>	CCAAGATTTTCATCCGCCTA
			GCTATTGATCCAAAACGGTGA
Toxina tipo F	<i>BoNT(F)</i>	CGGCTTCATTAGAGAACGGGA	
		TAACCTCCCTAGCCCCGTAT	
<i>Clostridium perfringens</i>	Enterotoxina	<i>cpe</i>	TTGTTAATACTTTAAGGATATGATCC
			TCCATCACCTAAGGACTG
<i>E. coli</i>	Toxina Shiga 1	<i>stx1</i>	AGTCGTACGGGGATGCAGATAAAT
			CCGGACACATAGAAGGAAACTCAT
	Toxina Shiga 2	<i>stx2</i>	TTCCGGAAATGCAAAATCAGTC
			CGATACTCCGGAAGCACCATTG
<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterotoxina A	<i>entA</i>	CCTTTGGAACCGTTAAAACG
			TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC
	Enterotoxina B	<i>entB</i>	TCCGATCAAAGTACAAAACG
			GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC
	Enterotoxina C	<i>entC</i>	CTCAAGACTAGACATAAAAGCTAGG
			TCAAAAATCGGATTACATTATCC
Enterotoxina D	<i>entD</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAGC	
		TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	
Enterotoxina E	<i>entE</i>	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC	
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina cólera	<i>ctxA</i>	TAACCTACCCTGGACCCTTC
			CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG
			CGATGATCTTGAAGCATTCCAC

Fuente: Foley y Grant, 2007 ⁽¹⁰⁾.

de PCR que se han empleado para la detección de genes que codifican toxinas microbianas ⁽¹⁰⁾.

Muchos ensayos de PCR en tiempo real se han desarrollado para patógenos de origen alimentario, ofreciendo una detección rápida, sensible y específica de una serie de agentes patógenos, tras el cultivo de enriquecimiento, así como su cuantificación ^(10,20). Las ventajas de estos ensayos, junto con su facilidad de uso y la susceptibilidad a la automatización los hacen muy atractivos para su aplicación en alimentos, con el fin de superar la larga etapa de cultivo de enriquecimiento. Es posible que la investigación y la evolución en este campo crezcan y conduzcan a ensayos de detección; rápidos, específicos y sensibles, que se puedan realizar directamente en muestras de alimentos en un futuro próximo ⁽¹⁰⁾.

Durante los últimos 5 años ha habido un número creciente de reportes en la literatura que describe el diseño y aplicación de la PCR en tiempo real para las bacterias patógenas comunes de transmisión alimentaria ⁽⁹⁾. Por ejemplo, este tipo de prueba (con SYBR Green) se ha aplicado para la detección de *Salmonella*, con tiempos de ensayo de aproximadamente 2 h, sin preenriquecimiento ⁽²¹⁾. La PCR en tiempo real (con sondas *TaqMan* o 5' exonucleasa) se han utilizado para la confirmación de los cultivos de *Salmonella* y para la identificación de *Salmonella* en muestras de alimentos

previamente cultivadas en caldos de enriquecimiento ⁽²²⁾. La detección de *Salmonella*, a partir de 600 g de una muestra de huevos revueltos, fue reportada por Seo *et al.*, (2004) ⁽²²⁾. En este caso, la PCR en tiempo real suministró resultados en 2 días, mientras que para el cultivo convencional se requirió de 5 días.

Existe un número creciente de kits de PCR en tiempo real, disponibles comercialmente para la detección de patógenos transmitidos por alimentos (Tabla 2).

Entre otras variantes de la PCR se pueden citar: la RAPD-PCR, la ERIC-PCR y la REP-PCR. El RAPD-PCR ha sido utilizado en la detección de especies de *Listeria* en el entorno de procesamiento de aves de corral y en plantas de procesamiento de vegetales para identificar la fuente de contaminación y las vías de difusión ⁽⁶⁾. Igualmente, se ha empleado para la tipificación de *E. coli* y *Salmonella*, con resultados satisfactorios ⁽²⁶⁾.

La ERIC-PCR ha sido utilizada satisfactoriamente para la tipificación de algunos patógenos asociados con alimentos (*Y. enterocolitica* y *Salmonella*) ⁽²⁷⁾. La REP-PCR dirigida a los elementos BOX A1R de *E. coli* se ha utilizado por una serie de científicos para distinguir entre cepas bacterianas ⁽²⁸⁾. La búsqueda de secuencias IS200 también se ha utilizado en la metodología REP-PCR para los serotipos de *Salmonella* ⁽²⁹⁾.

Tabla 2. Ejemplos de kits PCR en tiempo real, disponibles para bacterias patógenas transmitidas por alimentos

Nombre del Kit	Bacteria	Fabricante	Referencia
LightCycler® Kit de detección del género <i>Listeria</i> (para alimentos)	<i>Listeria</i>	Roche	(-9,23)
LightCycler® Kit de detección para <i>Salmonella</i> (para alimentos)	<i>Salmonella</i>	Roche	(9,23,24)
LightCycler® Kit de detección de <i>E. coli</i> O157 (para alimentos)	<i>E. coli</i>	Roche	(9,23,24)
LightCycler® Kit de detección de <i>Campylobacter</i> (para alimentos)	<i>Campylobacter</i>	Roche	(-9,23)
Artus Kit PCR para <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Artus	(-9)
Artus Kit PCR para <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	Artus	(9)
Artus Kit PCR para <i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i>	Artus	(9)
<i>TaqMan</i> ® Kit de detección para <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Applied BioSystems	(9,23)
<i>TaqMan</i> ® Kit de detección para <i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	Applied BioSystems	(9,23)
<i>TaqMan</i> ® Kit de detección para <i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i>	Applied BioSystems	(9,23,24)
<i>TaqMan</i> ® Kit de detección para <i>Salmonella enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>	Applied BioSystems	(9,23,-24)
SureFood® <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i> spp.	Congen	(9)
SureFood® <i>Campylobacter</i> patógena	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. coli</i>	Congen	(9)
SureFood® <i>Listeria</i> patógena	<i>L. monocytogenes</i>	Congen	(9)
BAX® System para <i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Qualicon y Oxoid	(23)
BAX® System para <i>E. coli</i> O157	<i>E. coli</i> O157	Qualicon y Oxoid	(23,24)
BAX® System para <i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	Qualicon y Oxoid	(23,24,25)
BAX® System para <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Qualicon y Oxoid	(23,24)
R.A.P.I.D.® LT real-time PCR system	<i>Salmonella</i> spp.	Idahotech	(24)
R.A.P.I.D.® LT real-time PCR system	<i>E. coli</i>	Idahotech	(23,24)
R.A.P.I.D.® LT real-time PCR system	<i>Listeria</i> spp.	Idahotech	(23)

AMPLIFICACIÓN BASADA EN LA SECUENCIA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Aunque menos desarrollada que la PCR, hay una serie de reportes en la literatura sobre los ensayos de amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), incluyendo algunos que utilizan la metodología de tiempo real, para detectar ARNm de patógenos asociados a alimentos ⁽³⁰⁾. Otros informes sobre el uso de esta tecnología para la detección de patógenos en alimentos se prevén con mucho interés ⁽¹⁰⁾, debido a su capacidad para detectar organismos viables.

Sin embargo, en un trabajo realizado por Rodríguez (2004) ⁽³¹⁾ la sensibilidad del ensayo NASBA a tiempo real fue pobre, durante la detección de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras de leche artificialmente inoculadas. Se requirió más de 5×10^3 células, y la reacción tampoco diferenció el ARN del ADN, reduciendo así la ventaja principal del NASBA para la detección de células vivas solamente ⁽⁹⁾.

ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPO PULSADO

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se ha utilizado para la caracterización de *Salmonella*, *Listeria* y otros patógenos de transmisión alimentaria. La base de datos de estos patógenos se almacenan en Pulse-Net y Food Net, a las cuales puede accederse a través del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ⁽⁶⁾.

Esta técnica se ha utilizado satisfactoriamente en la tipificación de *Salmonella*, aislada a partir de alimentos de origen animal y pacientes humanos ⁽³²⁾. La PFGE también ha sido extensamente utilizada a nivel mundial para la vigilancia e investigación de los brotes de *E. coli* O157:H7, el trazado de las vías de transmisión y el rastreo de las fuentes de brotes de restaurantes, granjas, aguas contaminadas, animales, humanos, y/o equipos ⁽³³⁾.

Un ejemplo de la utilidad de las técnicas moleculares, durante la investigación epidemiológica, se puede evidenciar en diversos brotes de ETA que por asociación estadística llegan a ser significativos cuando se utilizan estas técnicas. El brote por consumo de hamburguesas en el año 2000, en EE. UU., solo fue significativo cuando se empleó la electroforesis en campo pulsado (PFGE). Mediante la investigación por métodos tradicionales no hubo probabilidad significativa, lo cual generó que se descartara el evento como un brote de ETA ⁽³⁴⁾. La PFGE también ha reportado gran utilidad en los estudios

epidemiológicos moleculares de *Y. enterocolitica* ⁽³⁵⁾ y varias especies de *Shigella* ⁽³⁶⁾.

Actualmente, la Pulse-Net EE. UU. ha estandarizado protocolos de PFGE para *E. coli* O157, *S. entérica*, *Shigella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. termotolerante y *V. cholerae* ⁽³³⁾.

BIOSENSORES

Varios métodos basados en biosensores se han aplicado exitosamente en la detección de patógenos alimentarios. Estos sensores se han desarrollado utilizando ADN, técnicas inmunológicas y péptidos de fagos (Tabla 3) ⁽⁵⁾.

El uso de biosensores en un estudio demostró que *E. coli* y *Salmonella* podrían detectarse en leche descremada, con límites de detección de 25 y 23 UFC/mL respectivamente ⁽³⁷⁾. El ensayo se llevó a cabo en un

Tabla 3. Métodos biosensores para la detección de patógenos en alimentos y otros compuestos relacionados con alimentos

Técnicas de detección	Organismos	Compuestos detectados
Biosensores basados en ADN	Patógenos	<i>Bacillus anthracis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
	Compuestos	Aflatoxinas, PCB, pesticidas
Biosensores basados en enzimas	Patógenos	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enterica</i> sv. <i>typhimurium</i>
	Compuestos	Pesticidas, antibióticos (leche), ácido benzoico (bebidas de soda), L lactasa ¹ (pasta de tomate), aminos biógenas ¹ (sauerkraut)
Biosensores basados en anticuerpos y receptores ²	Patógenos	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enterica</i> sv. <i>enteritidis</i> , <i>S. entérica</i> sv. <i>typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia pestis</i>
	Compuestos	Pesticidas, antibióticos (leche), solventes orgánicos, aflatoxinas, enterotoxina B estafilocócica

¹ Compuestos para indicar frescura en el alimento.

² Biosensores que combinan técnicas inmunológicas y péptidos de fagos. Fuente: Hakovirta, 2008 ⁽⁵⁾

tiempo menor a 1 h. Los biosensores ópticos que utilizan una señal fluorescente son con frecuencia los más comunes⁽³⁸⁾. Sin embargo, los biosensores que utilizan transductores distintos a los ópticos se han desarrollado para la detección específica de *Salmonella*. Olsen *et al.*, (2006)⁽³⁹⁾ utilizaron bacteriófagos específicos para *Salmonella typhimurium*. En este biosensor, la captura de las bacterias por parte de bacteriófagos adsorbidos a un transductor piezoeléctrico dio lugar a un cambio de frecuencia en la resonancia, la cual fue medida con un dispositivo de onda acústica Maxtek. Su *et al.*, (2005)⁽⁴⁰⁾ utilizaron un anticuerpo enlazado a la superficie de un cristal de cuarzo recubierto con oro, con un electrodo de oro como biosensor. Después de la captura de *Salmonella*, los cambios en la impedancia de alta frecuencia fueron directamente relacionados con el número de células de *Salmonella* capturadas. Pathirana *et al.*, (2000)⁽⁴¹⁾ y Kim *et al.*, (2003)⁽⁴²⁾ también utilizaron un análisis de impedancia similar para crear biosensores útiles en la detección de *Salmonella typhimurium*. Por otro lado Farabullini *et al.*, (2007)⁽⁴³⁾ utilizaron sensores electroquímicos para la detección rápida de diferentes bacterias patógenas transmitidas por alimentos (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, y *Staphylococcus aureus*).

MICROARREGLOS

Los microarreglos consisten en un gran número de sondas (clones de ADN, productos de la PCR u oligonucleótidos sintéticos) inmovilizadas sobre una superficie sólida. Tras los pasos de hibridación y lavado, el ácido nucleico enlazado a las sondas genera un patrón de fluorescencia que es entonces registrado y analizado utilizando un escáner^(8,10). Con el rápido desarrollo de la tecnología de microarreglos se ha producido una acumulación de datos sin precedentes, recogidos por instituciones académicas y organizaciones industriales⁽⁸⁾. Varios microarreglos se han desarrollado para los patógenos asociados a alimentos. Un microarreglo particular, basado en el gen *gyrB*, fue utilizado para detectar e identificar rápidamente a *Salmonella* y *Shigella*⁽⁴⁴⁾. Las diferentes especies de *Listeria* también han sido discriminadas por el uso de un microarreglo basado en seis genes de virulencia determinantes⁽⁴⁵⁾.

Algunos progresos se han hecho con la identificación de patógenos de alimentos a partir de ADN genómico utilizando microarreglos⁽⁴⁶⁾. La identificación molecular por microarreglos se ha demostrado para *E. coli* O157: H7⁽⁴⁷⁾ y *Yersinia*⁽⁴⁸⁾ a partir de cultivos, tras la amplificación por PCR de los genes blanco. En el caso particular de este último microorganismo, la detección e identificación fue realizada en muestras de leche

completa pasteurizada adulterada, utilizando este enfoque.

Un ensayo que incorporaba señales de amplificación y la tecnología de microarreglos en suspensión fue reportado para la identificación y subtipificación de *L. monocytogenes* a partir de ADN genómico⁽⁴⁵⁾. Arreglos de microperlas han sido desarrollados para la identificación de *Salmonella* spp. Una PCR múltiple, para *E. coli* O157: H7 (genes *eaeA*, *hlyA*, *stx1* y *stx2*) y *Salmonella (invA)*, combinada con un sistema de microarreglos en suspensión mostró una elevada sensibilidad para ambas especies⁽⁴⁹⁾.

Wang *et al.*, (2008)⁽⁵⁰⁾ presentó un ensayo basado en arreglos para la identificación de 23 patógenos transmitidos por alimentos. Su arreglo fue diseñado para hibridar al gen 16S del patógeno blanco. Los autores encontraron una reactividad cruzada, esperada de manera teórica. Sin embargo, esta reactividad cruzada no obstaculizó la clasificación correcta del aislado, debido a los patrones de hibridación específica de los patógenos.

Wondwossen (2007)⁽⁵¹⁾ desarrolló microarreglos de oligonucleótidos para la detección rápida, el diagnóstico y la caracterización de bacterias patógenas (*Campylobacter*, *Salmonella* y *Yersinia*) y virus (Norovirus) más importantes presentes en la carne de cerdo. Este autor realizó la comparación entre dos microarreglos, cuyas diferencias se basaron en el diseño de la sonda, el montaje y la conformación de la sonda en la lámina de vidrio. Los resultados obtenidos indicaron que los microarreglos empleados pueden identificar un amplio rango de bacterias patógenas y ayudar a la caracterización de la resistencia antimicrobiana y los genes de virulencia presentes, lográndose de esta forma una gran sensibilidad y especificidad.

PIROSECUENCIACIÓN 454: UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA LA DETECCIÓN DE PATOGENOS EN ALIMENTOS Y MEDIOAMBIENTE

La tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos ha dado pasos increíbles en los últimos cinco años, con el desarrollo y comercialización de microrreactores para la rápida secuenciación de alto rendimiento, también conocido como pirosecuenciación 454⁽⁵²⁾. Con estas nuevas tecnologías, los genomas pueden ser completamente secuenciados en semanas (incluso en horas), en lugar de años, debido a que esta metodología no requiere bibliotecas de ADN, ni clones⁽⁵³⁾, solo el ácido nucleico aislado. Esta secuenciación ha ampliado el repertorio de los genomas bacterianos secuenciados, incluyendo múltiples cepas patógenas⁽⁵⁴⁾, y ha ayudado

a identificar los agentes potenciales, bacterianos, protozoarios o virales, asociados con enfermedades de etiología desconocida ⁽⁵⁵⁾, las cuales constituyen una tercera parte de las enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos ^(53,55).

Con el actual ritmo de los avances en la secuenciación de alto rendimiento, se espera que el costo asociado a esta tecnología se reduzca al máximo ⁽⁵³⁾. Esto significa, que dicha secuenciación será asequible y podría reemplazar algunas de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana existente, la serotipificación y métodos de caracterización de las cepas que se utilizan en los laboratorios de diagnóstico ⁽⁵⁵⁾.

VENTAJAS DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

La identificación de los patógenos de transmisión alimentaria mediante métodos moleculares se ha vuelto cada vez más popular en aspectos de calidad y seguridad, y en la producción de alimentos, debido a que estas técnicas suelen ofrecer muchas ventajas (Tabla 4). La PCR, una de las técnicas más utilizadas en la detección e identificación de bacterias causantes de ETA, es fiel exponente de tales alcances; presenta rapidez, buen límite de detección, especificidad y sensibilidad, fácil automatización y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras ⁽²⁾. Para el caso

Tabla 4. Ventajas y desventajas de las técnicas moleculares ampliamente utilizadas para la identificación de patógenos en alimentos

TÉCNICA MOLECULAR	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PCR simple y múltiple	<ul style="list-style-type: none"> Mayor rapidez que los métodos basados en cultivos (4-24 h vs. 5-7 días). Alta especificidad y sensibilidad. PCR múltiple: detecta varios patógenos al mismo tiempo. Automatizados. Resultados precisos y exactos a partir de la detección genética específica. Diferenciación de varios serotipos de microorganismos. Ejemplo: en el caso de Salmonella se pueden detectar 5-6 en una sola reacción. 	<ul style="list-style-type: none"> Dificultad para distinguir entre células vivas y muertas. Técnicamente puede ser un reto optimizar las condiciones de PCR. Se requiere enriquecimiento para detectar células visibles. Se necesita procesamiento post-PCR de los productos (electroforesis).
PCR en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> Es más específica y sensible que los métodos de cultivo. No se encuentra influenciada por la amplificación no específica; la amplificación puede ser monitoreada en tiempo real. Confirmación de amplificación específica mediante curvas de fusión. 	<ul style="list-style-type: none"> Dificultad en ensayos múltiples. Labilidad del ARNm. Posibilidad de contaminación cruzada.
Microarreglos	<ul style="list-style-type: none"> Más rápido que los métodos basados en cultivo (2-4 h vs. 5-7 días). Análisis múltiple (hasta 100 perlas diferentes disponibles). Alta sensibilidad y especificidad, se pueden caracterizar cepas. Labor efectiva, puede aplicarse a un formato de 96 pocillos (pueden ensayarse 9600 muestras). Si debe ser incluido un blanco adicional en el ensayo, puede añadirse fácilmente un nuevo tipo de perla enlazada a la sonda. 	<ul style="list-style-type: none"> Dificultad para distinguir entre células vivas y muertas. Requiere kits ó PCR para marcar los genes blanco.
Biosensores	<ul style="list-style-type: none"> 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. 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. 	<ul style="list-style-type: none"> Ciertos biosensores pueden requerir extensos pretratamiento de las muestras. Existen pocas plataformas de biosensores individuales, disponibles comercialmente.
Pirosecuenciación	<ul style="list-style-type: none"> 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. 	<ul style="list-style-type: none"> No hay detección de células viables sin preenriquecimiento. Las muestras necesitan estar preparadas y amplificadas. Bioinformática compleja.

de algunos microorganismos, la PCR no requiere condiciones anaeróbicas en comparación con el método de cultivo clásico ⁽¹¹⁾. Adicionalmente, a través de los métodos moleculares se identifican microorganismos que no pueden ser estudiados por técnicas convencionales o que no pueden cultivarse en substratos artificiales ⁽⁹⁾.

Asimismo, no se puede pasar por alto que los microorganismos transmitidos por alimentos están cambiando constantemente, debido a su inherente capacidad de evolucionar y su sorprendente habilidad para adaptarse a las diferentes formas de estrés ⁽⁷¹⁾. Por lo tanto, la seguridad alimentaria debe ser vista como un proceso continuo, influenciado por factores ambientales, socioeconómicos, políticos y culturales. En este sentido, los métodos moleculares, sin duda alguna, pueden ayudar en la detección de patógenos en alimentos ⁽⁷²⁾. Muchas de estas técnicas son mejoradas con el fin de subsanar los inconvenientes encontrados, dando paso a nuevos y variados métodos. Por ejemplo, la nanotecnología se está convirtiendo en el estándar para los ensayos de diagnóstico y su combinación con anticuerpos monoclonales, junto a la técnica de la PCR, ha generado resultados muy específicos y sensibles ⁽⁶⁾.

LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

Entre las desventajas (Tabla 4) de los métodos moleculares se puede citar, en primer lugar, que aún no están ampliamente incorporados en los métodos estandarizados, por lo cual resultan inadecuados en algunos casos. Adicionalmente, requieren, en comparación con los métodos de cultivo, equipos y reactivos costosos ⁽⁷²⁾.

Estas técnicas también son relativamente complicadas; necesitan experticia y utilizan productos químicos peligrosos, por lo que el análisis rutinario de muchas muestras resulta poco práctico. Debido a la falta de protocolos estandarizados y a la calidad variable de equipos y reactivos, la metodología tiene dificultades para pasar de expertos a usuarios finales de los laboratorios ⁽⁷²⁾.

Otros factores que limitan la aplicación de PCR, y de otros métodos moleculares, en la detección e identificación de microorganismos patógenos en alimentos, destaca la presencia de sustancias que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la reacción. La existencia de tales inhibidores en alimentos, muestras clínicas y ambientales ha sido reportada por varios autores. Estos pueden actuar a diferentes niveles durante el proceso de extracción y

amplificación de los ácidos nucleicos y, en consecuencia, puede producir la subestimación de la carga bacteriana, así como resultados falsos negativos ^(2,20). En los métodos basados en la PCR, la ADN polimerasa es probablemente el sitio blanco más importante de las sustancias inhibitoras. La generación de resultados positivos por la amplificación *in vitro* de ADN procedente de organismos muertos, presentes en muestras de alimentos, es otra limitación potencial ^(6,9). No obstante, la utilización del ARNr como secuencia blanco puede ofrecer una solución a este inconveniente ⁽⁷³⁾.

CONCLUSIONES

Las técnicas de diagnóstico molecular representan una alternativa prometedora en el campo de los alimentos, debido a su rapidez, elevada sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de microorganismos patógenos. Por ello, el número de métodos moleculares con potencial utilidad en el área de microbiología de alimentos se ha ido incrementando y diversificando, cada uno con sus respectivas fortalezas y debilidades, las cuales deben tomarse en cuenta a la hora de cumplir con los objetivos planteados. La PCR destaca como el método de diagnóstico molecular más aplicado en el área de alimentos y, recientemente, variaciones de este, como la PCR en tiempo real, han sumado ventajas adicionales a esta técnica, entre las que se destaca una mayor velocidad en la obtención de resultados. 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.

La secuenciación de alto rendimiento, por su parte, se vislumbra como una herramienta novedosa con un futuro prometedor para la industria de los alimentos, debido, entre otras ventajas, a su rapidez y alta precisión. No obstante, la complejidad de la bioinformática requerida constituye una de las limitantes más notorias.

Por último, se debe acotar que los esfuerzos de estandarización y normalización de estos métodos son un requisito indispensable para lograr la aplicación práctica y rutinaria de estas técnicas en la detección e identificación de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuentes de financiamiento: Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) Venezuela - Proyecto N.º 2013001876

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wallace DJ, Van Gilder T, Shallow S, Fiorentino T, Segler SD, Smith KE, *et al.* Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group. J. Food Prot. 2000 Jun;63:807-9.
- Rodríguez-Lázaro D, Hernández M. Molecular methodology in food microbiology diagnostics: trends and current challenges. IUFoST. 2006:1085-99. doi: 10.1051/IUFoST:20060643.
- González T, Rojas R. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud Pública Mexico. 2005 Sep-Oct;47(5):388-90.
- González-Muñoz Y, Palomino-Camargo C. Acciones para la gestión de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en un restaurante con servicio bufet. Rev Gerenc Polit Salud. 2012;11(22):123-40.
- Hakovirta J. Modern techniques in detection, identification and quantification of bacteria and peptides from foods. Helsinki: Yliopistopaino; 2008.
- Prasad D, Sharan A. DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. Afr J Biotechnol. 2009 May;8(9):1768-75.
- Stewart GS. Challenging food microbiology from a molecular perspective. Microbiology. 1997;143:2099-108.
- Gui J, Patel IR. Recent advances in molecular technologies and their application in pathogen detection in foods with particular reference to yersinia. J Pathog. 2011;2011:310135. doi: 10.4061/2011/310135.
- Glynn B, Lahiff S, Wernecke M, Barry T, Smith T, Maher M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. Int J Dairy Technol. 2006 May;59(2):126-39.
- Foley S, Grant K. Molecular techniques of detection and discrimination of foodborne pathogens and their toxins. En: Simjee S. Foodborne diseases. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 485-510.
- Ward P, Roy D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. Lait. 2005;85:23-32.
- Beneduce L, Fiocco D, Spano G. Development of PCR-based molecular tools for the detection of emerging food- and water-borne pathogenic bacteria. Badajoz: Formatex; 2007.
- Hong Y, Berrang M, Liu T, Hofacre CL, Sánchez S, Wang L. *et al.* Rapid detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni* and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-enzyme-linked-immunosorbent assay. Appl Environ Microbiol. 2003 Jun;69(6):3492-9.
- Waller DF, Ogata SA. Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. Appl Environ Microbiol. 2000 Sep;66(9):4115-8.
- Gouws PA, Liedemann L. Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. Food Technol Biotechnol. 2005;43(2):201-5.
- Jin UH, Cho SH, Kim MG, Ha SD, Kim KS, Lee KH, *et al.* PCR method based on the *ogdH* gene for the detection of *Salmonella* spp. from chicken meat samples. J Microbiol. 2004 Sep;42(3):216-22.
- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rffO111*, and *rffO157*. J Clin. Microbiol. 1998 Feb;36(2):598-602.
- Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. J Food Prot. 2005 Mar;68(3):551-6.
- Meng X, Zhang H, Law J, Tsang R, Tsang T. Detection of *Helicobacter pylori* from food sources by a novel multiplex PCR assay. J Food Safe. 2008;28(4):609-19.
- Elizalde M, Parra N, Palomino C. La Biotecnología desde la pedagogía: El aprendizaje por descubrimiento como una alternativa efectiva. 1era ed. Caracas: Editorial Académica Española; 2012.
- Jothikumar N, Wang X, Griffiths MW. Real-time multiplex SYBR green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. J Food Prot. 2003 Nov;66(11):2141-5.
- Seo KH, Valentin-Bon IE, Brackett RE, Holt PS. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. J Food Prot. 2004 May;67(5):864-9.
- Jasson V, Jaxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiol. 2010 Sep;27(6):710-30. doi: 10.1016/j.fm.2010.04.008.
- Manguiat L, Fang T. Evaluation of DASTM-kits for the detection of foodborne pathogens in chicken- and meat-based street-vended foods. J Food Drug Anal. 2013 Jun;21(2):198-205.
- AOAC International. BAX System for *Salmonella* Granted First Action Status— The First Sole-Source Method Approved by an AOAC Expert Review Panel [Internet]. Connecticut: AOAC International; 2011 [citado el 11 de enero de 2014]. Disponible en: http://www.aoac.org/imis15_prod/NEWS_OLD/NEWS2013/AOAC_OMA-ERP-05162013.htm
- Maré L, Dick LM, van der Walt ML. Characterization of south african isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. Int J Food Microbiol. 2001 Mar 20;64(3):237-45.
- Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A, Malaspina AC, Brocchi M. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. J Med Microbiol. 2006 Nov;55(Pt 11):1539-48.
- Mohapatra BR, Broersma K, Nordin R, Mazumder A. Evaluation of repetitive extragenic palindromic-PCR for discrimination of fecal *Escherichia coli* from humans, and different domestic and wild-animals. Microbiol Immunol. 2007;51(8):733-40.
- Amavisit P, Markham PF, Lightfoot D, Whithear KG, Browning GF. Molecular epidemiology of *Salmonella* Heidelberg in an equine hospital. Vet Microbiol. 2001 May;80(1):85-98.
- Gore HM, Wakeman CA, Hull RM, McKillip JL. Real-time molecular beacon NASBA reveals *hblC* expres-

- sion from *Bacillus* spp. in milk. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 14;311(2):386-90.
31. Rodríguez D. Development of molecular-based techniques for the detection, identification and quantification of food-borne pathogens. Tesis para obtener el grado de Doctor europeo. Department of Chemical and Agricultural Engineering and Food Technology. Universitat de Girona. Girona, España, 2004.
 32. Nayak R, Stewart T, Wang RF, Lin J, Cerniglia CE, Kenney PB. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *Int J Food Microbiol*. 2004 Feb 15;91(1):51-62.
 33. Gerner-Smidt P, Scheutz F. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathog Dis*. 2006;3(1):74-80.
 34. Boric V. Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Avances en Latinoamérica. Biofarbo*. 2008;16:92-7.
 35. Saken E, Roggenkamp A, Aleksic S, Heesemann J. Characterisation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroups by pulsed-field gel electrophoresis of genomic NotI restriction fragments. *J Med Microbiol*. 1994 Nov;41(5):329-38.
 36. Talukder KA, Dutta DK, Albert MJ. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Shigella dysenteriae* type 1. *J Med Microbiol*. 1999 Aug;48(8):781-4.
 37. Waswa JW, Debroy C, Irudayaraj J. Rapid detection of salmonella enteritidis and *Escherichia coli* using surface plasmon resonance biosensor. *J Food Process Eng*. 2006 Jul;29(4):373-85.
 38. Lazcka O, Del Campo FJ, Muñoz FX. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron*. 2007 Feb 15;22(7):1205-17.
 39. Olsen EV, Sorokulova IB, Petrenko VA, Chen IH, Barbaree JM, Vodyanoy VJ. Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of *Salmonella typhimurium*. *Biosens Bioelectron*. 2006 Feb 15;21(8):1434-42.
 40. Su XL, Li Y. A QCM immunosensor for *Salmonella* detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance. *Biosens Bioelectron*. 2005 Dec 15;21(6):840-8.
 41. Pathirana ST, Barbaree J, Chin BA, Hartell MG, Neely WC, Vodyanoy V. Rapid and sensitive biosensor for *Salmonella*. *Biosens Bioelectron*. 2000 Jun;15(3-4):135-41.
 42. Kim GH, Rand AG, Letcher SV. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor part II: *Salmonella typhimurium* detection using magnetic enhancement. *Biosens Bioelectron*. 2003 Jan;18(1):91-9.
 43. Farabullini F, Lucarelli F, Palchetti I, Marrazza G, Mascini M. Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. *Biosens Bioelectron*. 2007 Feb 15;22(7):1544-9.
 44. Kakinuma K, Fukushima M, Kawaguchi R. Detection and identification of *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella* by microarrays using the *gyrB* gene. *Biotechnol Bioeng*. 2003 Sep 20;83(6):721-8.
 45. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *J Clin Microbiol*. 2002 Dec;40(12):4720-8.
 46. Borucki MK, Reynolds J, Call DR, Ward TJ, Page B, Kadushin J. Suspension microarray with dendrimer signal amplification allows direct and high-throughput subtyping of *Listeria monocytogenes* from genomic DNA. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul;43(7):3255-9.
 47. Wu CF, Valdes JJ, Bentley WE, Sekowski JW. DNA microarray for discrimination between pathogenic O157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. *Biosens Bioelectron*. 2003 Oct 30;19(1):1-8.
 48. Myers KM, Gaba J, Al-Khaldi SF. Molecular identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from pasteurized whole milk using DNA microarray chip hybridization. *Mol Cell Probes*. 2006 Apr;20(2):71-80.
 49. Straub TM, Dockendorff BP, Quiñonez-Díaz MD, Valdez CO, Shutthanandan JI, Tarasevich BJ, et al. Automated methods for multiplexed pathogen detection. *J Microbiol Meth*. 2005 Sep;62(3):303-16.
 50. Wang L, Shi L, Alam MJ, Geng Y, Li L. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Res Int*. 2008;41(1):69-74.
 51. Wondwossen A. Development of a Microarray for the Rapid and Simultaneous Detection and Tracking of Bacterial and Viral Foodborne Pathogens. Columbus: The Ohio State University; 2007.
 52. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):376-80.
 53. Schloss JA. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1113-5. doi: 10.1038/nbt1008-1113.
 54. Gilmour MW, Graham M, Van Domselaar G, Tyler S, Kent H, Trout-Yakel KM, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*. 2010 Feb 18;11:120. doi: 10.1186/1471-2164-11-120.
 55. Maurer JJ. Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2011;2:259-79. doi: 10.1146/annurev.food.080708.100730.
 56. Yang Y1, Xu F, Xu H, Aguilar ZP, Niu R, Yuan Y, et al. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Microbiol*. 2013 Jun;34(2):418-24. doi: 10.1016/j.fm.2013.01.004.
 57. Park SH, Aydin M, Khatiwara A, Dolan MC, Gilmore DF, Bouldin JL, et al. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol*. 2014 Apr;38:250-62. doi: 10.1016/j.fm.2013.10.002.
 58. Marathe S, Chowdhury R, Bhattacharya R, Nagarajan A, Chakravorty D. Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against *hlyA* gene. *Food Control*. 2012 Feb;23(2):559-63.
 59. Fontanot M, Lacumin L, Cecchini F, Comi G, Manzano M. PorA specific primers for the identification of *Campylobacter* species in food and clinical samples. *LWT - Food Science Tech*. 2014 Sep;58(1):86-92.
 60. Ning P, Guo K, Cheng L, Xu L, Zhang C, Cui H, et al. Pilot survey of raw whole milk in China for *Listeria monocytogenes*.

- genes using PCR. *Food Control*. 2013 May;31(1):176-9.
61. Ibrahim W, El-Ghany W, Nasef S, Hatem ME. **A comparative study on the use of real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and standard isolation techniques for the detection of Salmonellae in broiler chicks.** *International Journal of Veterinary Science and Medicina*. 2014 Jun;2(1):67-71.
62. Ma K, Deng Y, Bai Y, Xu D, Chen E, Wu H, *et al.* **Rapid and simultaneous detection of Salmonella, Shigella, and Staphylococcus aureus in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation.** *Food Control*. 2014 Aug;42:87-93.
63. Kupradit C, Rodtong S, Ketudat-Cairns M. **Development of a DNA microarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat.** *World J Microbiol Biotechnol*. 2013 Dec;29(12):2281-91. doi: 10.1007/s11274-013-1394-1.
64. McGrath TF, Elliott CT, Fodey TL. **Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food.** *Anal Bioanal Chem*. 2012 Apr;403(1):75-92. doi: 10.1007/s00216-011-5685-9.
65. Arora P, Sindhu A, Dilbaghi N, Chaudhury A. **Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens.** *Biosens Bioelectron*. 2011 Oct 15;28(1):1-12. doi: 10.1016/j.bios.2011.06.002.
66. Park M, Li S, Chin B. **Detection of Salmonella typhimurium Grown Directly on Tomato Surface Using Phage-Based Magnetoelastic Biosensors.** *Food Bioprocess Tech*. 2013 March;6(3):682-9.
67. Amoako KK, Janzen TW, Shields MJ, Hahn KR, Thomas MC, Goji N. **Rapid detection and identification of Bacillus anthracis in food using pyrosequencing technology.** *Int J Food Microbiol*. 2013 Aug 1;165(3):319-25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.028.
68. Fakruddin MD, Chowdhury A, Hosain N, Bin K, Mohammad R. **Pyrosequencing- principles and applications.** *International Journal of Life Science & Pharma Research*. 2012 Apr-Jun;2(2):65-76.
69. Li X, Yang F, Gao W, Song H, Tian H, Xu B. **Application of pyrosequencing for Salmonella enterica rapid identification.** *J Microbiol Methods*. 2012 Apr;89(1):49-52. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.020.
70. Von Blankenfeld-Enkvist G, Brännback M. **Technological Trends and Needs in Food Diagnostics.** Helsinki: Tekes; 2002.
71. Jacoby A, Booyens E. **Molecular methods for the detection of food-borne pathogens an overview.** *Interim: Interdisciplinary Journal*. 2005;4(2):72-82.
72. Pfaller MA. **Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs.** *Emerg Infect Dis*. 2001 Mar-Apr;7(2):312-8.

Correspondencia: Carolina Palomino Camargo.
 Dirección: Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Urb. Colinas de Bello Monte. Calle Suapure, frente al Ramal 2. Caracas, Venezuela.
 Teléfono: +19-426-6043052.
 Correo electrónico: carolesth@gmail.com

Consulte la versión electrónica de la
 Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública en

www.pubmed.gov

