

MÉTODOS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

MOLECULAR METHODS FOR THE DETECTION OF PATHOGENS IN FOODS

Lianet Jiménez Soto^{a,*} (0009-0008-0387-6936)
Yamila Puig Peña^b (0000-0003-2404-123X)

^a Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

^b Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología, Plaza. La Habana, Cuba

* lianetjimenezsoto@gmail.com

Recibido: 20 de diciembre de 2023;

Aceptado: 21 de mayo de 2024;

RESUMEN

Para la prevención y el control de las enfermedades transmitidas por alimentos, en muchos países tienen establecido dentro de su legislación “tolerancia cero” para determinados patógenos alimenticios, en función de esto, son necesarias técnicas rápidas y modernas para la detección, los métodos moleculares permiten satisfacer tales características. Con el objetivo de describir la utilidad de las técnicas de biología molecular en el análisis de alimentos, se realizó una revisión documental de diferentes métodos, se realizaron búsquedas en Google académico, Medscape, Scielo y se incluyó la información actualizada. Entre las pruebas empleadas con mayor frecuencia para el análisis de muestras de alimentos se encuentran: reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, microarreglos, biosensores, secuenciación de ácidos nucleicos de alto rendimiento (pirosecuenciación) y electroforesis en gel de campo pulsado; dichas técnicas varían según el propósito de la investigación y el tipo de muestra que se analiza. Las técnicas de diagnóstico molecular representan una alternativa prometedora en el campo de análisis microbiológico de los alimentos, debido a su rapidez, elevada sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de microorganismos patógenos.

Palabras clave: biología molecular, bacterias, alimentos.

ABSTRACT

For the prevention and control of foodborne diseases, many countries have established within their legislation “zero tolerance” for certain food pathogens. Based on this, rapid and modern techniques are necessary for detection; molecular methods allow us to satisfy such characteristics. With the aim of describing the usefulness of molecular biology techniques in food analysis, a documentary review of different methods was carried out, searches were carried out in Google Scholar, Medscape, Scielo and the most up-to-date information was included. Among the most frequently used tests for the analysis of food samples are: polymerase chain reaction, real-time polymerase chain reaction, microarrays, biosensors, high-throughput nucleic acid sequencing (pyrosequencing), and electrophoresis pulsed field gel; these techniques vary depending on the type of sample being analyzed and the purpose of the research. Molecular diagnostic techniques represent a promising alternative in the food field, due to their speed, high sensitivity and efficiency for the early detection of pathogenic microorganisms.

Keywords: molecular biology, bacteria, food.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades ocasionadas por alimentos contaminados son una causa importante de morbimortalidad a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) dichas enfermedades están dadas por un conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua o productos alimenticios que contienen agentes biológicos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de un grupo de personas (OMS, 2005).

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Entre los desafíos actuales para la prevención de las ETAs están, la elaboración de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso cada vez más difundido de sistemas centralizados de distribución rápida y el aumento del comercio internacional. También los riesgos asociados a los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles debido al envejecimiento, la desnutrición, personas inmunocomprometidas, entre otros (Casado, 2021).

Para la prevención y vigilancia las ETAs, se requiere la aplicación de controles microbiológicos, como parte de los programas de aseguramiento de la calidad con la premisa para minimizar el riesgo de infección en los consumidores. Los métodos microbiológicos utilizados comúnmente en la detección de microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, son laboriosos y consumen mucho tiempo. Esta situación, aunada a la demanda de resultados inmediatos y a los avances tecnológicos, ha conducido al desarrollo de una amplia gama de ensayos moleculares alternativos, rápidos y sensibles para la detección, identificación y cuantificación de patógenos transmitidos por alimentos, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el método más frecuente utilizado (Alvarado, 2017).

Los métodos moleculares para la identificación de microorganismos patógenos en alimentos presentan alta especificidad, sensibilidad, rapidez y, además, pueden ser automatizadas permiten la identificación de nuevos microorganismos potencialmente patógenos presentes en los alimentos, así como el estudio de poblaciones microbianas sin aislamiento previo y la detección de toxinas. Las técnicas moleculares son de gran utilidad para el reconocimiento de brotes originados por alimentos, la identificación de las probables fuentes de contaminación, hasta llegar a su reservorio y las vías de transmisión (Jiménez *et al*, 2016). En base a esto, el objetivo de la presente revisión fue describir los distintos métodos moleculares utilizados para la detección e identificación de estos microorganismos patógenos en alimentos.

Se realizó una revisión narrativa entre los meses de enero a septiembre de 2023. La búsqueda bibliográfica se llevó a cabo en las bases de datos Google Académico (Google, Palo Alto, California Estados Unidos), Medline (Washington DC, Estados Unidos), Latindex (Ciudad México, México), Scielo (Sao Paulo, Brasil), y Medscape (WebMD, Estados Unidos). Los términos de búsqueda aplicados fueron “uso de metodologías moleculares para la identificación de microorganismos en alimentos”, “reacción en cadena de la polimerasa microbiología de los alimentos”, “ventajas de métodos de biología molecular en el análisis de alimentos”, y “estudios microbiológicos genotípicos en alimentos”. En la búsqueda se incluyeron artículos en inglés y español.

RESULTADOS

Los laboratorios de las industrias alimentarias y los que realizan vigilancia requieren métodos microbiológicos rápidos y sensibles para evaluar un gran número de muestras además, deben ser de alta especificidad pues los microorganismos de interés sanitario en ocasiones deben ser detectados en presencia de una microbiota acompañante, cuya composición y abundancia variará dependiendo del tipo alimento implicado; las técnicas moleculares permiten la detección de ADN directamente del alimento sin la necesidad de aislamiento, ahorrando tiempo en el procesamiento, en algunos métodos para obtener mayor concentración de ADN se recomienda realizar una etapa de pre-enriquecimiento, aportando mayor sensibilidad al realizar los análisis (Castañeda, 2017). Los principales avances en los ensayos de detección de patógenos en alimentos, basados en ácidos nucleicos, se produjeron a partir de 1980. Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ADN r16S, la hibridación con una sonda específica, el análisis de ribotipificación, entre otros. Estos métodos moleculares se han utilizado a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional. En general la mayoría de estas técnicas requiere alta capacidad analítica, personal altamente capacitado y son costosas (González, 2015).

Entre los factores que han limitado la aplicación de 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 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. En los métodos basados en la PCR, la ADN polimerasa es probablemente el sitio blanco más importante de las sustancias inhibitorias. También 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 (Marcillo, Murillo, Ortiz, 2019).

No obstante, las ventajas son múltiples las técnicas moleculares son utilizadas en la detección e identificación de bacterias causantes de ETA, tales alcances presentan rapidez, buen límite de detección, especificidad y sensibilidad, fácil automatización y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras. En algunos microorganismos que requieren condiciones especiales o de difícil cultivo, la PCR tiene ventajas como, no requiere condiciones anaeróbicas en comparación con el método de cultivo clásico. Adicionalmente, a través de los métodos moleculares se identifican microorganismos de difícil estudio por técnicas convencionales o que no pueden cultivarse en sustratos artificiales como algunos virus (Quesada, Reginatto, Ruíz, 2016).

Así mismo, 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. Por lo tanto, la seguridad alimentaria debe ser vista como un proceso continuo, influenciado por factores ambientales, socioeconómicos y culturales. En este sentido, los métodos moleculares, sin duda alguna, pueden ayudar en la detección de patógenos en alimentos. 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 PCR ha generado resultados muy específicos y sensibles (Law, Mutalib, Chan, 2015).

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), microarreglos, 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 y el propósito de la investigación, las cuales se describen a continuación:

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se basa en la replicación de ADN *in situ* que permite la amplificación exponencial del ADN diana en presencia de cebadores de oligonucleótidos sintéticos y ADN polimerasa termoestable. Una nueva versión de la técnica es la PCR en tiempo real (RT-PCR, del inglés “real time-PCR”), permite rastrear en tiempo real las ampliaciones obtenidos después de cada ciclo de la reacción de amplificación. La utilización de la RT-PCR reduce el riesgo de contaminación de la muestra y acorta el tiempo de análisis (Manfredi, Leotta, Rivas, 2010).

Existen muchas pruebas de PCR que se han descrito para patógenos relacionados a alimentos (*Salmonella*, *E. coli* O157, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* y otros) en los que se llega a identificar el género del patógeno, pero se siguen la identificación de genes asociados a la virulencia. Se han utilizado pruebas basadas en la PCR para la identificación de *E. coli* en alimentos, se ha utilizado con mayor frecuencia en carnes y productos cárnicos para la detección de *Salmonella* spp., de *Listeria monocytogenes*. También se ha utilizado PCR-RT en conjunto con un pretratamiento para la detección de células viables, pero no cultivables (Marín, Rodríguez, Minier, 2020).

Se ha logrado el desarrollo de la técnica de PCR múltiple que, permite la detección simultánea de dos o más agentes patógenos asociados a alimentos (Mas, Poza, Ciriza, 2016). Esta técnica se ha aplicado a la detección de diferentes toxinas o genes de virulencia en varias especies bacterianas como; *V. cholerae*, *E. coli* y algunos aislados de estafilococos, por nombrar unos pocos (Vila, Dolores, Salavert, 2017).

PCR punto final o convencional

Es el método más difundido, debido a su menor costo y sencillez, el cual se basa en la amplificación de una región específica del microorganismo que se desea detectar, se puede aplicar a diferentes muestras de alimentos y se utilizan secuencias específicas de genes (Coello, 2020).

La desnaturalización a la que se somete inicialmente el ADN a temperaturas superiores a 90°C, hace menos exigente la selección del método para el tratamiento del ADN. A estas temperaturas se destruyen las nucleasas y también otras proteínas que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la acción de la ADN polimerasa (Japón, 2019).

Debido a ello, para la detección de agentes microbianos en alimentos se requiere de una simple desnaturalización mediante ebullición en presencia de algún detergente no iónico (como el Tritón X100) que ayude a la destrucción de la pared celular. No obstante, este tratamiento no garantiza la eliminación de otros posibles inhibidores que no son afectados por las altas temperaturas. Por ejemplo, el ión Ca⁺², presente en productos lácteos, puede inhibir al ADN polimerasa mediante competición con los iones Mg⁺² (Marcillo, Murillo, Ortiz, 2019).

Otra opción para la purificación del ADN obtenido es el empleo de resinas iónicas. Particular interés puede presentar la resina Chellex100 la cual atrapa muchas de las micromoléculas e iones presentes en la solución, lo que representa una purificación parcial del ADN (Chero *et al*, 2017).

PCR 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 y las sondas de hidrólisis (TaqMan) (de Armas, 2014).

Una de las ventajas 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 y en menor tiempo, aporta mayor sensibilidad y seguridad para el operario al evitar el uso de reactivos cancerígenos como el bromuro de etidio; la qPCR según la norma ISO 16140 y la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) es un método de cribado alternativo para la evaluación de patógenos en alimentos (Huertas, Urbano, Torres, 2019).

Esta variante de la PCR añade marcadores fluorescentes con el objetivo de saber la cantidad de ADN inicial en todo momento y detectar la presencia de variaciones genéticas. La emisión de fluorescencia es proporcional al número de moléculas producidas, haciendo que la técnica sea cuantitativa, Se puede utilizar para la identificación de virus, bacterias y hongos (Mullegama *et al*, 2019).

La velocidad de obtención de resultados y la sensibilidad en la PCR en tiempo real en el diagnóstico de enfermedades infecciosas son mayores que en la PCR convencional. Se pueden utilizar diferentes sondas fluorescentes para marcar genes de varios microorganismos distintos, de forma que se convierte en una PCR en tiempo real múltiple. En este sentido, la qPCR múltiple se puede utilizar para detectar, identificar y cuantificar entre otros, la presencia de patógenos en alimentos (*Campylobacter* spp, *Salmonella* spp, entre otros). Se considera una buena elección en el análisis de calidad de los alimentos (Garrido, García, Álvarez, 2017).

PCR de viabilidad (v-PCR)

Desde 2006, Biotium ha sido pionero en el campo de la v-PCR con el desarrollo de PMA (monoazida de propidio) y el tinte mejorado PMAxx™ v-PCR. Estos colorantes fotorreactivos, impermeables a la membrana y que se unen al ADN ofrecen una selectividad de células muertas superior a los métodos tradicionales basados en cultivos y al uso anterior del colorante v-PCR EMA (etidio monoazida). La v-PCR se ha utilizado más ampliamente en bacterias, pero también hay publicaciones sobre la utilización de v-PCR en levaduras, hongos, virus y una variedad de otros tipos de células como arqueas, amebas y parásitos. Permite el estudio de ciertos organismos que no pueden cultivarse con la tecnología actual, en consecuencia, estas especies viables, pero no cultivables (VBNC) requieren detección molecular de viabilidad (Ríos *et al*, 2016).

El análisis de viabilidad en los microorganismos en alimentos es importante para determinar la inocuidad de los productos, pues el riesgo real está en la presencia de microorganismos con potencia de causar infección o intoxicación. La aplicación de v-PCR con PMA y PMAxx™ sensible y rápida sin cultivo, microscopía o recuento de colonias que consumen mucho tiempo, proporciona una gran ventaja. Es un procedimiento validado y publicado en cuanto al estudio de bacterias, hongos y especies virales. Compatible con aplicaciones de secuenciación de próxima generación, adecuado para tipos de muestras complejas, incluido suelo, heces, agua/aguas residuales, muestras biológicas y alimentos (Angarita, Torres, Díaz, 2017).

Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Técnica desarrollada por Schwartz y Cantor en 1984, ha permitidos la comparación epidemiológica de los microorganismos encontrados en un brote, es una técnica de laboratorio que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz. Los poros del gel o la matriz actúan como un tamiz, lo cual permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes. Para determinar el tamaño de las moléculas de una muestra, se usan estándares de tamaños conocidos que se separan en el mismo gel y luego se comparan con la muestra (Colello, Etcheverría, Padola, 2016).

Se pueden emplear sustancias coloreadas o fluorescentes que se unan a las proteínas o los ácidos nucleicos. En el primer caso suelen ser colorantes orgánicos que interaccionan con las proteínas de forma poco selectiva, principalmente electrostática. Ejemplos: azul brillante de Coomassie, negro amido, rojo Ponceau. Para los ácidos nucleicos se usa el azul de metileno o, más frecuentemente, compuestos fluorescentes e intercalantes, como el bromuro de etidio (Ventura, Bueno, Toledo, 2020).

Su aplicación en alimentos se basa en subtipificar los microorganismos implicados en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) discriminando entre los diferentes agentes bacterianos epidemiológicamente relacionados. Se han realizado varios estudios 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, 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 (Huertas, Urbano, Torres, 2019).

La electroforesis en gel de campo pulsado se ha utilizado para la caracterización de *Salmonella*, *Listeria* y otros patógenos de transmisión alimentaria. Esta técnica se ha utilizado satisfactoriamente en la tipificación de *Salmonella*, aislada a partir de alimentos de origen animal y pacientes humanos. 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 (Goudarzi *et al*, 2019).

Secuenciación

La secuenciación permite determinar el orden de las bases de los nucleótidos en una molécula de ADN. La secuenciación del gen ARNr 16S se considera el método más preciso y el “estándar de oro” en la actualidad para la identificación de microorganismos a nivel de específicas. Este método se caracteriza por una alta especificidad y sensibilidad (Diz, 2020).

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. 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, solo el ácido nucleico aislado. Esta secuenciación ha ampliado el repertorio de los genomas bacterianos secuenciados, incluyendo múltiples cepas patógenas, y ha ayudado a identificar los agentes potenciales, bacterianos, protozoarios o virales, asociados con enfermedades de etiología desconocida, las cuales constituyen una tercera parte de las enfermedades transmitidas por los alimentos en los Estados Unidos (Vila, Dolores, Salavert, 2017).

Las cadenas de ADN se secuencian independientemente, generándose la secuencia directa y la reversa (complementaria). Según el modelo de secuenciador, el tipo de capilar utilizado, y las variables en la secuenciación, es posible simplificar el proceso, reducir el tiempo de ensayo y el coste y aumentar el tamaño de la secuencia (Huertas, Urbano, Torres, 2019).

La pirosecuenciación es un método que 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, identificando las bacterias principalmente involucradas en la contaminación, con un alto rendimiento y porcentaje de sensibilidad (Huertas, Urbano, Torres, 2019).

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. 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 (Franco *et al*, 2019).

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. 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. 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*. Las diferentes especies de *Listeria* también han sido discriminadas por el uso de un microarreglo basado en seis genes de virulencia determinantes (Diz, 2020).

Algunos progresos se han hecho con la identificación de patógenos de alimentos a partir de ADN genómico utilizando microarreglos. La identificación molecular por microarreglos se ha demostrado para *E. coli* O157: H7 y *Yersinia* 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 (Mullegama *et al*, 2019).

Un ensayo que incorpora 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. Arreglos de micropérlas 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 (Carrillo, 2022).

Se han desarrollado microarreglos de oligonucleótidos para la detección rápida, el diagnóstico y la caracterización de bacterias patógenas (*Campylobacter*, *Salmonella* y *Yersinia*) y virus (Norovirus). 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 (Padola, 2018).

El gran potencial diagnóstico se debe 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 microarreglo 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, 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 (Diz, 2020).

Los microarreglos de ADN han sido ampliamente utilizados en el campo de la detección de patógenos transmitidos por alimentos como *Yersinia pestis* y *Bacillus anthracis*; además de bacterias como *Salmonella* spp y *Escherichia coli*, esta técnica es un método prometedor para aplicaciones en la seguridad alimentaria, y la vigilancia epidemiológica (Angarita, Torres, Díaz, 2017).

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. 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 en los diferentes estudios. 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, PCR de viabilidad han sumado ventajas adicionales a esta técnica, entre las que se destaca una mayor velocidad en la obtención de resultados. 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. 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, P. (2017). Tipificación molecular de aislados de *Salmonella entérica* subespecie *entérica* de muestras obtenidas de sistemas de producción avícola en Perú [Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario]. Perú. <https://repositorio.urp.edu.pe/handle/20.500.14138/1702>.
- Angarita, M., Torres, M., Díaz, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev Habanera Ciencias Médicas. 16(5):796–807.
- Casado, A. (2021). Revisión y análisis bibliográfico sobre *Salmonella* spp., [Trabajo de fin de grado en nutrición humana y dietética]. Valladolid. <https://uvadoc.uva.es/handle>.
- Castañeda, M. (1 de junio de 2017). Diagnóstico de *Salmonella typhimurium* en carne molida utilizando dos pruebas rápidas y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista]. Toluca, México.
- Chero, O. A; Rosadio, R; Marcelo, G; Díaz, G; Jiménez, R; Castro, Y; Maturrano, L. (2017). Identificación Molecular de *Salmonella Typhimurium* en Cuyes al Primer Parto mediante la Técnica de PCR Múltiple. Rev Inv Vet Perú. 28(3):679-686.
- Coello, Y. (2020). Implementación de una estrategia para la detección de *Salmonella* spp., en alimentos mediante Biología Molecular [Tesis de diploma]. Universidad de La Habana, Facultad de Biología. Cuba.
- Colello, R., Etcheverría, A., Padola, N L. (2016). Detección y caracterización molecular de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos en la cadena productiva porcina. UNCPBA, Argentina. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/handle>.
- De Armas, M. L A. (2014). Determinación de *Salmonella* en carnes y productos cárnicos por métodos fenotípicos y genotípicos. [Tesis en opción al Título en Licenciatura en Ciencias Alimentarias]. Universidad de La Habana. Instituto de Farmacia y Alimentos.

- Garrido-Cárdenas, JA., García-Maroto, F., Álvarez-Bermejo, JA., Manzano-Agugliaro, F. (2017). DNA sequencing sensors: An overview. *Sensors (Switzerland)*. Pub Med. 17(3):588.
- González, J. (2015). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Revista Salud Uninorte*. 30(1): 73-94. Barranquilla, Colombia.
- Goudarzi, H., Mirsamadi, ES., Ghalavand, Z., Hakemi, Vala M, Mirjalali, H., Hashemi A. (2019). Rapid detection and molecular survey of blaVIM, blaIMP and blaNDM genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* using new multiplex real-time PCR and melting curve analysis. *BMC Microbiol*. 19(1):1–7.
- Huertas, C., E. Urbano., M. Torres. (2019). Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Rev haban cienc méd*. 18(3):513-528.
- Japón, G. (2019). Aislamiento y Serotipificación de *Salmonella* en carcasas de pollo en percha en la ciudad de Quito [Trabajo de investigación previo a la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista]. Universidad central del Ecuador, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Jiménez, B., Maya, C., Velásquez, G., Torner, F., Arámbula, F., Barrios, J., Velasco, M. (2016). Identification and quantification of pathogenic helminth eggs using a digital image system. *Experimental Parasitology*, 166,164-172.
- Law, JW. F., A. Mutalib., K. Chan., L. Lee. (2015). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*. Vol 5:770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>.
- Manfredi, E. A., G.A. Leotta., M. Rivas. (2010). PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y seede *Staphylococcus aureus*. Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Rev Argentina de Microbiología*. 42: 212-215.
- Marcillo, C., Murillo, A., Ortiz, M., & Parrales, I. (2019). Síndrome diarreico infeccioso causado por *Salmonella* spp. *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*. 3(3):493-508.
- Marín, M. M., AR. Rodríguez., L. Minier., E. Zayas y R. Soler. (2020). Caracterización de agentes bacterianos aislados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *MEDISAN*. 24(2):235.
- Mas, V., J. Poza., J. Ciriza., P. Zaragoza., R. Osta y C. Rodellar. (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Laboratorio de Genética, Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza, España. *Bioquímica*, 27(1):3-7.
- Mullegama S V., Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V, et al. (2019). Nucleic acid extraction from human biological samples. In: *Methods in Molecular Biology*. Biobanking. vol 1897: 359–383. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_30
- OMS. (2005). World Health Organization. Drug-resistant *Salmonella*. Fact sheet No.139.
- Quesada, A., Reginatto, G., Ruiz, A., Colantonio, L., & Burrone, M. (2016). Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp., aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 33(1): 32-44.
- Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O., Martínez, A, et al. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Univ*. 26(4). <https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>.
- Ventura, GH., Bueno, AY., Toledo, GA., Díaz, KJ., Barcelos, RG. (2020). Detección de *Salmonella* spp, en carne bovina procedente de rastros tipo inspección federal (TIF) y rastros “No-TIF” en Nayarit, México. *Revista Bio Ciencias*, Vol. 7. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e902>.
- Vila J, Dolores M, Salavert M, Bosch J. (2017). Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica : necesidades clínicas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 35(1):41–46.
- Diz Mellado, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Revistas / NPunto: III*. (30). Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz.
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, KS., Salehi, B., Bevilacqua, A., et al. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. National Center for Biotechnology Information. Pub Med Central. *Microorganisms*. 7(5):130. Doi: 10.3390/microorganisms7050130.
- Carrillo, S. (2022). Verificación de los métodos moleculares para la detección de *Salmonella* spp, y *Listeria monocytogenes* mediante PCR en matrices alimentarias [TRABAJO DE FINAL DE GRADO en Ingeniería Alimentaria]. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Padola, NL. (2018). Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella* spp, en canales porcinos. *Rev. Colomb. Biotec*. 20 (2):117-123. Colombia.

Este artículo no presenta conflicto de intereses