



Ejes

# Aplicaciones de las técnicas moleculares en inocuidad alimentaria

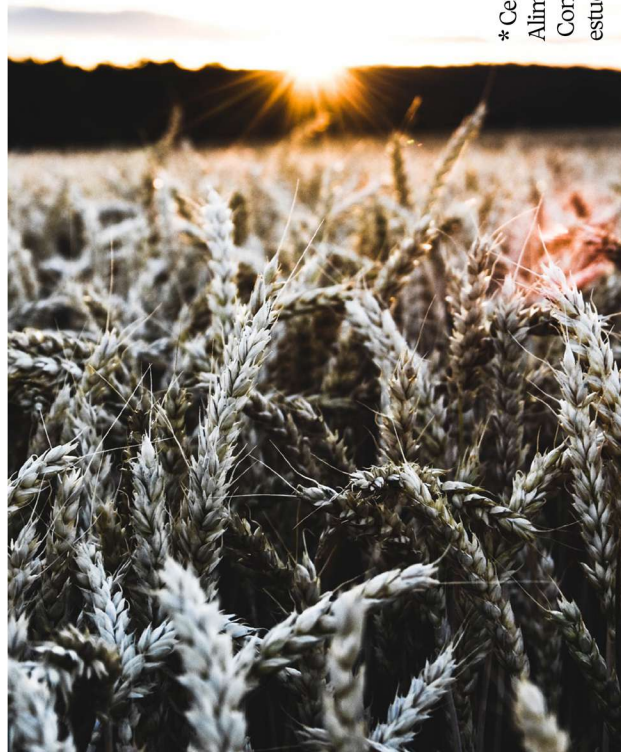
YESSICA ENCISO MARTÍNEZ\*, ALBANI ITZIGUERI RIVERA ORTEGA\*

La inocuidad de los alimentos es la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores. Los peligros transmitidos por los alimentos pueden ser de naturaleza microbiológica, química o física. Y es fundamental mantener la inocuidad en cada etapa de la cadena alimentaria, desde la producción agrícola hasta el consumo (CDC, 2018). Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades transmitidas por los alimentos constituyen una importante causa de morbilidad, mortalidad y un significativo impedimento al desarrollo socioeconómico en todo el mundo (OMS, 2017).

Los métodos microbiológicos utilizados comúnmente en la detección de estos patógenos tienen varias limitaciones, por ejemplo, requieren mucho tiempo, son laboriosos, carecen de especificidad y existe la falta de discriminación entre cepas patógenas y no patógenas (Gui y Patel, 2011). La detección y enumeración de microorganismos en los alimentos son una parte esencial de cualquier control de calidad o plan de seguridad alimentaria (López-Campos *et al.*, 2012). Esta situación ha conducido al desarrollo de nuevas tecnologías para obtener resultados más precisos y rápidos, como el uso de métodos moleculares para caracterización microbiológica.

Las técnicas moleculares sirven para comparar el orden de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos, es decir, las características o polimorfismos genéticos. Esta composición permitirá reconocer las características específicas de cada microorganismo, cómo se relacionan y diferencian de otros. La hibridación de una sonda específica, el análisis de ADN<sub>r</sub> y la reacción de cadena de polimerasa fueron las primeras técnicas moleculares utilizadas, y a través del tiempo han sido perfeccionadas para ser más eficientes y accesibles (Angarita *et al.*, 2017). Por lo cual, ha ido en aumento su uso para la caracterización de microorganismos patógenos que representan un problema a nivel mundial.

\* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.  
Contacto: yessica.enciso.mcl8@estudiantes.ciad.mx



# ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS: UN PROBLEMA A NIVEL MUNDIAL

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un problema global, son la causa de enfermedades y morbilidad, lo cual genera perjuicios a los consumidores, un gasto económico para las familias y gobiernos y un impacto en la comercialización globalizada de productos. Esto ha generado un costo de 95,200 millones de dólares en pérdidas totales de productividad al año y 15,000 millones de dólares anuales en tratamiento de dichas enfermedades (Banco Mundial, 2018). En 2015, los alimentos contaminados ocasionaron 600 millones de casos a nivel mundial y 420,000 muertes (OMS, 2019). En México, en 2017, se presentaron 8,285 casos de intoxicación alimentaria bacteriana (Secretaría de Salud, 2017).

Se han identificado más de 250 enfermedades transmitidas por alimentos, la mayoría de ellas son infecciones producidas por una variedad de bacterias, virus o parásitos que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos y pueden ser de carácter infeccioso o tóxico. Entre los principales agentes causales de este tipo de enfermedades se encuentran *Campylobacter* spp., *E. coli* y

*Salmonella* entérica no tifoidea (OMS, 2015). En México, las principales enfermedades transmitidas por alimentos son la salmonelosis, la fiebre tifoidea y las intoxicaciones alimentarias por bacterias (Secretaría de Salud, 2017).

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un problema de salud pública en todo el mundo. La incidencia ha ido en aumento debido a la globalización, los cambios de hábitos alimenticios, surgimiento de nuevas formas de transmisión, el aumento de la resistencia de los patógenos a los antimicrobianos y la heterogeneidad dentro de una misma especie (Sousa y Pereira, 2013). Las poblaciones más vulnerables son niños, mujeres embarazadas, ancianos y personas de escasos recursos, además se generan pérdidas económicas y grandes costos a los servicios de salud (Forero *et al.*, 2017). Por esto es importante la identificación de cepas causantes de brotes infecciosos, detectar la transmisión cruzada de patógenos, determinar la fuente de infección y reconocer cepas particularmente virulentas de cada especie (Rodríguez *et al.*, 2009).



## DESVENTAJAS DE LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS

Los métodos de diagnóstico convencionales se basan en la capacidad de crecimiento de los microorganismos en condiciones artificiales. En general, las muestras implican el cultivo en medios de preenriquecimiento y enriquecimiento, o placas de agar selectivas, para detectar o aislar especies microbianas específicas, y se complementan con pruebas bioquímicas, morfológicas o serológicas para su confirmación (Dinesh y Ambarish, 2009; Mandal *et al.*, 2011). Estos métodos son muy sensibles, fácilmente adaptables, económicos y se puede obtener información cualitativa y cuantitativa sobre las poblaciones microbianas presentes en la muestra (Sousa y Pereira, 2013). Sin embargo, las muestras provienen de cultivos mixtos de microorganismos que pueden incluir varias especies patógenas, pero también flora normal. En la mayoría de los casos se deben realizar procedimientos de aislamiento para obtener cultivos puros y los resultados se obtienen en 1-3 días y hasta 7-10 días para la confirmación (Dinesh y Ambarish, 2009; Mandal *et al.*, 2011). Por lo tanto, se requiere mucha mano de obra y mucho tiempo para la identificación de microorganismos.

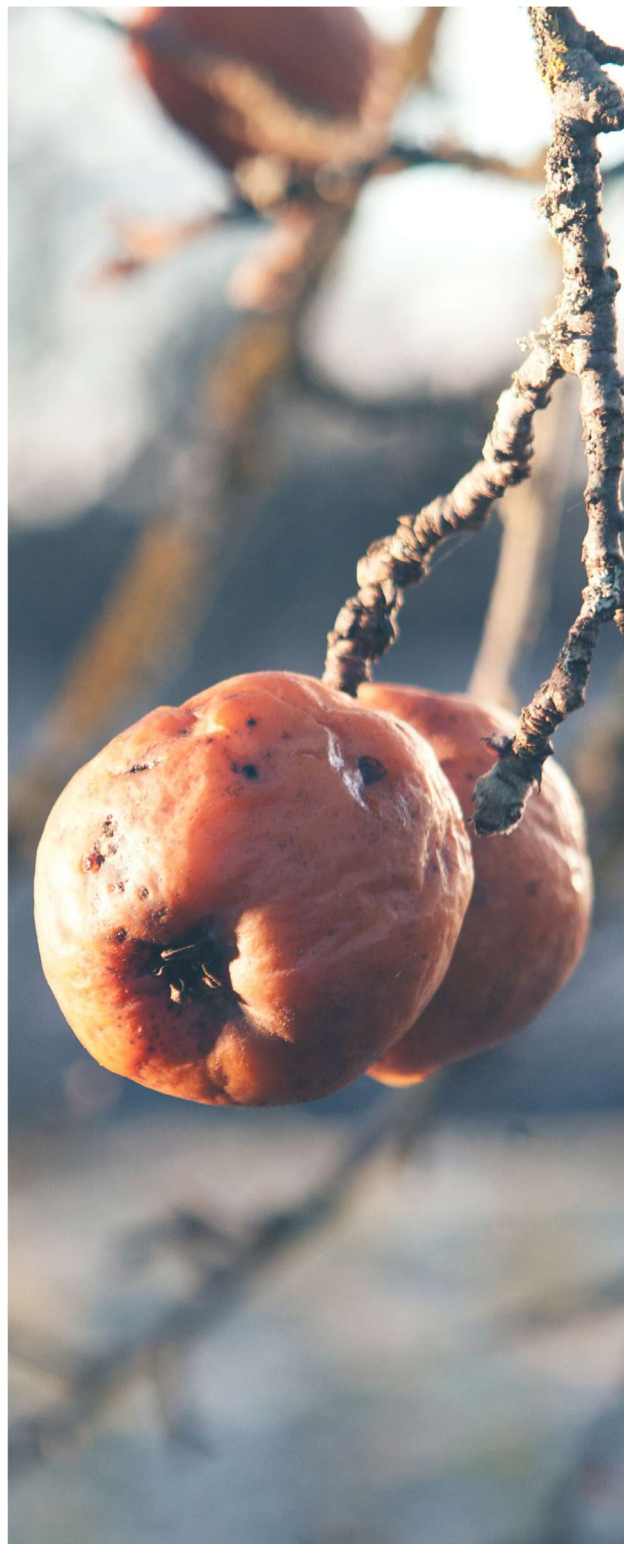
El análisis microbiológico de los alimentos sigue siendo una tarea difícil para prácticamente todos los ensayos y tecnologías, especialmente para las especies patógenas particulares. Los problemas pueden deberse a la complejidad de las matrices y composición de los alimentos, la distribución heterogénea de bajos niveles de patógenos, el estrés sufrido por los microorganismos durante el procesamiento de los alimentos, la presencia de bacterias de la microbiota normal, especialmente en alimentos crudos, y las poblaciones microbianas pueden abarcar células senescentes o latentes que son viables pero no cultivables, debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico (López *et al.*, 2012; Palomino y González, 2014). Por lo que el uso de métodos moleculares puede ayudar a contrarrestar estos inconvenientes, esto representa alternativas rápidas y sensibles para la detección de microorganismos.



## MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

En la actualidad, los métodos moleculares para la identificación de microorganismos patógenos en alimentos son muy importantes debido a que presentan gran especificidad, sensibilidad, rapidez y, además, pueden ser automatizadas. El uso de métodos moleculares ha permitido la identificación de nuevos microorganismos presentes en los alimentos, así como el estudio de poblaciones microbianas sin aislamiento previo y la detección de microorganismos altamente patógenos. Las técnicas moleculares son de gran utilidad para el reconocimiento de brotes originados por alimentos contaminados con patógenos, las cuales permiten la identificación de las probables fuentes de contaminación, hasta llegar a su reservorio y las vías de transmisión (Boric, 2008).

Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación con una sonda específica, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación ADN-ADN y el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. La identificación por medio de técnicas moleculares se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos. Cabe mencionar que hay otras técnicas que han demostrado buenos resultados en la detección e identificación de microorganismos patógenos en los alimentos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), biosensores, electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE), microarreglos, la pirosecuenciación 454, entre otros (Palomino y González, 2014). Cada vez es más fácil la utilización de este tipo de técnicas, algunas además de ser utilizadas en el laboratorio también pueden usarse en sitios de observación, lo cual les da una gran ventaja frente a las técnicas convencionales para la identificación de los microorganismos patógenos en los alimentos.



# APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN INOCUIDAD ALIMENTARIA

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En el diagnóstico molecular microbiológico es utilizada para el recuento de patógenos transmitidos por alimentos. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica en la cual, a partir de una copia de ADN a amplificar, se obtienen millones de copias, lo cual permite su detección; actuando varias proteínas necesarias para la síntesis de nuevas hebras de ADN. Es una técnica fácil y rápida de utilizar, se requieren de 2 a 3 horas para llevarla a cabo. Existen varios tipos de PCR que son utilizados en la identificación de microorganismos patógenos en alimentos entre los que se encuentran PCR-estándar, PCR-anidada, PCR-*in situ*, PCR-ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (PCR-ELISA), PCR-transcripción reversa (PCR-RT), entre otras (Mas, 2016).

La PCR anidada comprende dos rondas de amplificación con diferentes pares de *primers* en cada una. Primero se realiza una reacción con los *primers* externos para amplificar una región de DNA más extenso, que contiene el segmento diana. Posteriormente, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los internos para amplificar la región específica. La especificidad aumenta porque los *primers* sólo hibridarán en un sitio dentro de la molécula y el resultado será una única banda (Camacho, 2017). La PCR *in situ* consiste en una reacción de PCR en secciones de células, donde los productos pueden visualizarse en el sitio de amplificación y se realiza sobre preparaciones fijas en un portaobjetos. En la técnica se efectúa una primera amplificación de ADN blanco y una detección mediante hibridación *in situ* convencional con sondas de ADN/ARN (Martínez y Silva, 2004). La PCR-RT se utiliza para estudiar la expresión de ciertos genes de interés realizando la amplificación partiendo del ARN. PCR-ELISA implica la incorporación de nucleótidos marcados químicamente en el amplificación de PCR y posteriormente la detección del producto de PCR con el complejo de anticuerpo-enzima que reconoce el marcador químico presente en los nucleótidos incorporados (Hong *et al.*, 2003).

Existen pruebas comerciales de PCR para patógenos relacionados a alimentos (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter*, entre otros). Se han utilizado pruebas basadas en la PCR en tiempo real para la identificación de *E. coli* en alimentos como hamburgue-

ras y brochetas de carne, la técnica se llevó a cabo en un promedio de 24 horas. A su vez, también la PCR-RT se ha utilizado en carnes y productos cárnicos para la detección de *Salmonella* spp. Asimismo, se han utilizado pruebas de PCR para la identificación de *Listeria monocytogenes* en leche y productos lácteos (Gouws y Liedemann, 2005). Kasturi y Drgon (2017) analizaron 1741 muestras de diferentes empresas dedicadas al procesamiento de alimentos, en las cuales lograron detectar, con PCR-RT, 55% más positivos de *Salmonella* spp. que utilizando el ensayo de enzimoanálisis (VIDAS-Vitek®). También se ha utilizado PCR-RT en conjunto con un pretratamiento para la detección de células viables, pero no cultivables de *E. coli* O157:H7 en agua embotellada y lograron excluir el efecto de las células muertas (Cao *et al.*, 2019). La técnica de PCR múltiple permite la detección simultánea de varios agentes patógenos en un alimento, por ejemplo, se utilizó este tipo de técnica en muestras de alimentos permitiendo la identificación de 11 especies bacterianas distintas y *Helicobacter pylori* (Kawasaki *et al.*, 2005). Esta técnica permite una identificación más rápida y específica de los patógenos asociados a los alimentos.

## Biosensores

Los biosensores están recubiertos con una capa de reconocimiento bacterial que puede ser un anticuerpo, ADN, enzima o combinaciones entre ellos. Los cuales se unen a los microorganismos de la muestra analizada, esto ocasiona modificaciones electroquímicas que pueden medirse como una señal. Su intensidad es directamente proporcional a los niveles de patógenos (Hakovirta *et al.*, 2008). Los biosensores han sido aplicados en la detección de patógenos presentes en alimentos debido a que pueden detectar varios tipos de bacterias patógenas. Se ha desarrollado un biosensor para la detección de patógenos en carne (*Campylobacter*, *E. coli* y *Salmonella*), el cual permite realizar pruebas de control rápidas y sensibles en la planta de procesamiento de dichos productos (Kawasaki *et al.*, 2005). Li *et al.* (2012) propusieron una estrategia rápida y sensible para la detección de *Salmonella* integrando la extracción simple de ADN y PCR con un sensor de ADN electroquímico basado en el gen *invA*, se logró detectar *S. Typhimurium* en un rango de 10 a 105 UFC/mL sin necesidad de preenriquecimiento. En 2018, Hashemi y Forouzandeh diseñaron un nuevo biosensor que puede detectar directamente el ADN de las bacterias, este método no requiere amplificación, tiene alta sensibilidad y es un sistema rápido en comparación con los métodos convencionales (4 h). Los biosensores pueden basarse en ADN, enzimas, anticuerpos y receptores, los cuales les permiten la detección de patógenos como *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, entre otros. Ha demostrado ser un método eficiente y rápido en la identificación de patógenos.

## Microarreglos

Los microarreglos son un conjunto de sondas moleculares (oligonucleótidos sintéticos, clones de ADN o productos de PCR) fijadas sobre un soporte sólido (portaobjetos, Gene-chip o chips microelectrónicos). Se purifica el ácido nucleico, posteriormente se realiza su marcado (radioactivo o fluorescente), se procede a su hibridación y lavados, se realiza la medición de la señal utilizando un escáner (Doménech y Vila, 2014). Varios microarreglos se han desarrollado para los patógenos implicados en brotes transmitidos por alimentos. Se han utilizado microarreglos para la detección y caracterización de bacterias patógenas como *Yersinia*, *Campylobacter* y *Salmonella* en carne de cerdo (Palomino *et al.*, 2014). En otras investigaciones se han utilizado para identificar 23 patógenos presentes en alimentos, siendo una gran ventaja de este método que permite amplificar el ADN de diferentes microorganismos en una sólo muestra (Wang *et al.*, 2008). En un ensayo de microarreglos se distinguió a *Yersinia pestis* y *Bacillus anthracis* de otras especies bacterianas probadas experimentalmente y se identificaron correctamente las sondas de oligonucleótidos específicas de *Y. pestis* usando ADN extraído de muestras de leche inoculadas. Los resultados sugieren que puede ser una herramienta de diagnóstico potencialmente útil para detectar y confirmar la presencia de bacterias en los alimentos (Goji *et al.*, 2012).

## Electroforesis en gel de campo pulsado

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) se ha utilizado para la caracterización de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio cholerae*, entre otros patógenos transmitidos por alimentos. En la actualidad, la PFGE es considerada como el estándar de oro para la producción de huellas dactilares de ADN para un aislado bacteriano. Este método consiste en la separación de moléculas grandes de ADN alternando la dirección de la corriente eléctrica de una manera pulsada. Se han desarrollado protocolos de PFGE específicos para cierto tipo de bacterias, por ejemplo, en el *PulseNet* se pueden encontrar protocolos de bacterias patógenas transmitidas por alimentos (*Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157, *Salmonella*, entre otras). *PulseNet* es una red nacional de Estados Unidos que conecta los casos de enfermedades transmitidas por alimentos para detectar brotes, utilizando PFGE como una herramienta para la detección de las bacterias patógenas (CDC, 2019). Este método es útil en investigaciones de brotes transmitidos por alimentos. Se ha realizado la tipificación por medio de PFGE de cepas de *Campylobacter* aisladas de alimentos de origen animal (cerdo, aves de corral, pavo, ovejas y corderos) relacionadas con brotes originados por el consumo de este tipo de alimentos (Silva *et al.*, 2016; Lahti *et al.*, 2017).

## CONCLUSIONES

Las técnicas moleculares presentan mayor ventaja frente a las técnicas convencionales de cultivo para la detección e identificación de microorganismos patógenos presentes en alimentos, son más específicos, sensibles y se realizan en menor tiempo. Por lo cual han ido en aumento en los últimos años, permitiendo una mejor detección e identificación de los microorganismos patógenos en alimentos. Se ha incrementado el uso y diversificación de métodos moleculares en microbiología de los alimentos, permitiendo escoger cuál es el mejor en la identificación de un patógeno en particular. Por lo cual, se propone la estandarización y validación



de los métodos moleculares utilizados para la identificación de microorganismos patógenos en alimentos debido a que existen pocas investigaciones respecto a ello.

## REFERENCIAS

- Angarita, M., Torres, M.I., y Díaz, A.K. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev Haban Cienc Méd.* 16(5):796-807.
- Banco Mundial. (2018). *Comunicado de prensa No. 2019/072/AGR*. Washington, EU. Disponible en: <https://www.bancomundial.org/es/news/press-release/2018/10/23/food-borne-illnesses-cost-us-110-billion-per-year-in-low-and-middle-income-countries>.
- Boric, V. (2008). Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Avances en Latinoamérica. BIOFARDO.* 16:92-97.
- Cao, Y., Zhou, D., Li, R., et al. (2019). Molecular monitoring of disinfection efficacy of *E. coli* O157:H7 in bottled purified drinking water by quantitative PCR with a novel dye. *Journal of Food Processing and Preservation.* 43(2):1-8.
- Camacho, S.F. (2017). Diagnóstico molecular en microbiología clínica. *PEDIATRIKA.* 7(1):1-8.
- CDC. (2019). *Microbios y enfermedades transmitidos por los alimentos*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html>
- Dinesh, P., y Ambarish, S. (2009). DNA Based Methods Used for Characterization and Detection of Food Borne Bacterial Pathogens with Special Consideration to Recent Rapid Methods. *African Journal of Biotechnology.* 8(9):1768-1775.
- Doménech, A., y Vila, J. (2014). Fundamento, tipos y aplicaciones de los arrays de ADN en microbiología médica. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 22(1):46-54.
- Forero, Y., Galindo, M., y Ramírez, G. (2017). Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. *Revista Chilena de Nutrición.* 44:325-332.
- Goji, N., MacMillan, T., y Amoako, K.K. (2012). A New Generation Microarray for the Simultaneous Detection and Identification of *Yersenia pestis* and *Bacillus anthracis* in Food. *Journal of Pathogens.* (5):627036.
- Gouws, P., y Liedemann, L. (2005). Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Technol Biotechnol.* 43(2):201-5.
- Gui, J., y Patel, R. (2011). Recent advances in molecular technologies and their application in pathogen detection in foods with particular reference to *Yersinia*. *Journal of pathogens.* (2):310135.
- Hakovirta, J. (2008). *Modern techniques in detection, identification and quantification of bacteria and peptides from foods*. Helsinki: Yliopistopaino.
- Hong, Y., Berrang M.E., Liu T., et al. (2003). Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni* and *Salmonella enterica* on Poultry Carcasses by Using PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Applied and Environmental Microbiology.* 69(6):3492-3499.
- Kasturi, K.N., y Drgon, T. (2017). Evaluation of a Real-time PCR Method for Detection of *Salmonella* spp in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology.* 83(14):1-33.
- Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., et al. (2005). Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. *J Food Prot.* 68(3):551-6.
- Lahti, E., Lofdahl, M., Agren, J., et al. (2017). Confirmation of a campylobacteriosis outbreak associated with chicken liver pate using PFGE and WGS. *Zoonoses Public Health.* 64:14-20.
- Li, Q., Cheng, W., Zhang, D., et al. (2012). Rapid and Sensitive Strategy for *Salmonella* Detection Using an *InvA* Gene-Based Electrochemical DNA Sensor. *International Journal of Electrochemical Science.* 7:844-856.
- López, G., Martínez, J., Aguado, M., et al. (2012). *Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens*. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition.
- Mandal, P., Biswas, A., Choi, K., et al. (2011). Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *American Journal of Food Technology.* 6(2):87-102.
- Martínez, A., y Silva, E. (2004). Métodos físico-químicos en biotecnología. *Analytical Chemistry.* 62(13):1202-1214.
- OMS. (2015). *WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne diseases Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015*. Switzerland.
- OMS. (2017). *Inocuidad de los alimentos*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Mas, E. (2016). Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP). *Revista AquaTIC.* 15.
- Palomino, C., y González, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 31(3):535-46.
- Rodríguez, R., Aguilar, C., Ayala, L., et al. (2009). Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. *AQM,* 1(1).
- Silva, D.T., Tejada, T.S., Blum, D., et al. (2016). *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. *Intl J Food Microbiol.* 217:189-94.
- Sousa, A., y Pereira, M. (2013). A prospect of current microbial diagnosis method. En I. A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them. Science, Technology and Education.* 3:1429-1438.
- Secretaría de Salud. (2017). *Notificación semanal de casos nuevos de enfermedades 2017*. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215342/3\\_Reporte\\_de\\_marzo\\_de\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/215342/3_Reporte_de_marzo_de_2017.pdf)
- Wang, L., Shi, L., Alam, M.J., et al. (2008). Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Res Int.* 41(1):69-74.