



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

METODOLOGÍA DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Alumno: Juan Carlos Balboa Torres

Junio, 2022



Trabajo Fin de Grado

Metodología de detección e identificación de patógenos en alimentos

Firma del alumno:

Alumno: Juan Carlos Balboa Torres

Jaén, Junio, 2022

Índice	Páginas
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).....	5
1.2. Principales patógenos transmitidos por los alimentos alimentos...	8
1.3. Detección e identificación de los patógenos.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4. RESULTADOS.....	18
4.1. Métodos tradicionales.....	18
4.1.1. Métodos basados en el cultivo de microorganismos.....	19
4.1.2. Técnicas de caracterización bioquímica.....	22
4.1.3. Técnicas inmunológicas.....	23
4.2. Técnicas moleculares.....	26
4.2.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	26
4.2.2. Técnicas de hibridación.....	29
4.2.3. Otras técnicas moleculares.....	30
4.3. Otras técnicas.....	32
5. DISCUSIÓN.....	34
6. CONCLUSIONES.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un problema mundial en seguridad alimentaria y en salud, debido al aumento considerable de estos últimos años, por consiguiente, ha aumentado la demanda de los métodos de detección e identificación de patógenos en alimentos que han tenido un gran avance debido a las mejoras tecnológicas. En este estudio se describen las diferentes técnicas de detección e identificación, como pueden ser las técnicas convencionales, técnicas moleculares y otras técnicas, así como sus ventajas y desventajas de cada una. Las técnicas convencionales permiten una caracterización sobre todo fenotípica del patógeno con un bajo coste, sin embargo, son métodos laboriosos que necesitan de demasiado tiempo de detección. Las técnicas moleculares permiten la caracterización genotípica o molecular de los microorganismos patógenos con una gran especificidad y rapidez de detección, pero con la necesidad de equipos especiales y un alto coste. Como reto futuro, se pretende realizar una mayor investigación sobre este tema y desarrollar métodos más eficaces, baratos y fiables.

Palabras clave: Patógenos, alimentos, enfermedades ETA, seguridad alimentaria, detección, identificación, convencional, molecular.

ABSTRACT

Foodborne diseases (ETA) are a mundial problema in food safety and health due to considerable increase in recent years, therefore, the demand for methods of detection and identification of pathogens in food has increased, which has had a great advance due to technological improvements. This study describes the different detection and identification techniques, such as conventional techniques, molecular techniques and other techniques, as well as their advantages and disadvantages. Conventional techniques allow a cheap phenotypic characterization of the pathogen, however, these are laborious methods that require a long time to detect. Molecular techniques allow the genotypic or molecular characterization of pathogenic microorganisms with high specificity and speed of detection, but with the need for special equipment and high cost. As a future challenge, they intend to carry out more research on this topic and develop more efficient, cheap and reliable methods.

Keywords: Pathogens, foods, ETA diseases, food safety, detection, identification, conventional, molecular.

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos son sustancias imprescindibles que ingiere el ser humano con el fin de obtener nutrientes (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales) y energía a través del proceso de digestión, de ahí que sean sustancias imprescindibles, ya que una deficiencia o carencia de estos puede dar a una malnutrición y enfermedades que afecta a la salud del ser humano; una buena alimentación sana y equilibrada ayuda a mejorar la salud y calidad de vida de las personas. Los microorganismos se definen como organismos microscópicos que se pueden encontrar en multitud de sitios como el suelo, agua, tierra, objetos, en nuestro propio cuerpo, en los alimentos o incluso se pueden encontrar en lugares y ecosistemas inimaginables como la Antártida (Madigan, 2015), sin los microorganismos no sería posible la vida, ya que llevan a cabo reacciones químicas importantes para organismos superiores y además forma parte de la cadena trófica de prácticamente cualquier ecosistema. Los microorganismos se clasifican en bacterias y *Archaea* (procariotas) y *Eukaria* (todos los eucariotas), por último, los virus también son microorganismos y se encuentran excluidos de la clasificación anterior debido a que carecen de una estructura celular típica y de metabolismo propio (Carroll et al., 2016). Los alimentos consumidos por los humanos tienen una gran cantidad de microorganismos (microbioma de los alimentos) algunos beneficiosos como *Lactobacillus* o *Actinomycetaceae* y otros perjudiciales como *Listeria monocytogenes*; los alimentos que contienen microorganismos vivos no patógenos se denominan alimentos probióticos (ej:yogur). Una microbiota alta de un alimento no debe de relacionarse directamente con que el alimento esté contaminado, dado que puede estar formado en su totalidad por microorganismos no patógenos. El crecimiento de un microorganismo en los alimentos va a depender de una gran cantidad de factores bióticos como la cantidad de nutrientes, la disponibilidad de agua, etc; también depende de factores abióticos ambientales como la temperatura, presencia de oxígeno (excepto anaerobios o aeróbios facultativos), pH, humedad, etc (Caballero Torres, 2008). Existen microorganismos de todo tipo, más sensibles o más resistentes a determinadas condiciones u otras.

El cuerpo humano constituye en su tracto intestinal una gran cantidad de microorganismos (principalmente bacterias y sobre todo la mayor parte en el colon

del intestino grueso) que forman la flora intestinal, por eso cuando se ingieren determinados antibióticos se produce la alteración de la microbiota provocando problemas estomacales. Estos microorganismos se encuentran en simbiosis con el intestino del ser humano y son beneficiosos (no patógenos), presentan funciones importantes en el tracto digestivo (Priyanka et al., 2016), como la defensa contra otros microorganismos, la mejora del sistema inmune intestinal o la ayuda en la digestión de sustancias no digeribles (ejemplo: fibra), y otras funciones metabólicas de interés. A su vez, el cuerpo humano también le presenta beneficios a los microorganismos que viven en él, como la obtención de nutrientes y la realización de su metabolismo.

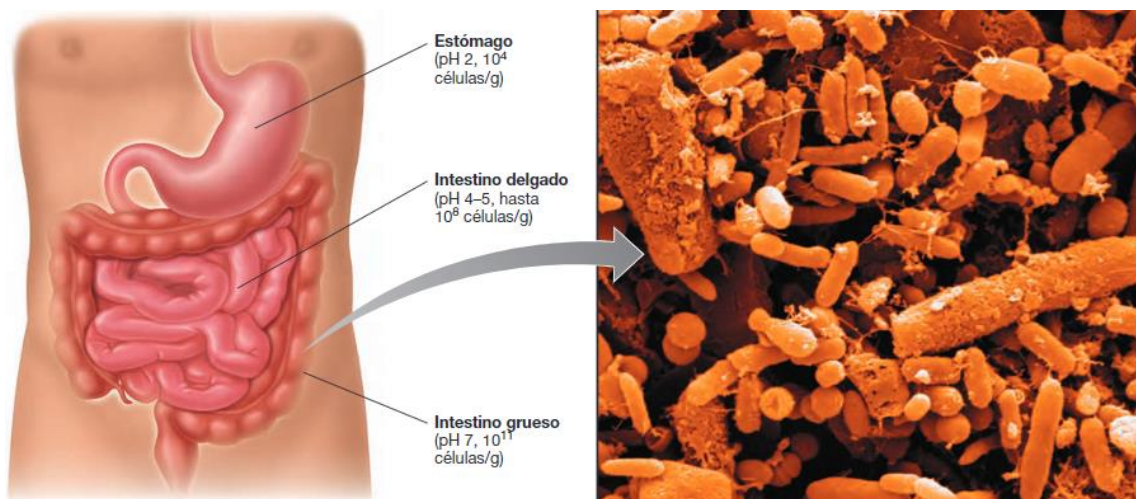


Figura 1: Fotografía de microscopía electrónica de los microorganismos que se encuentran en el colon del intestino grueso y cantidad que refleja la gran diversidad microbiana del tubo digestivo humano. (Tomado del libro: Brock biología de los microorganismos).

Existen alimentos denominados alimentos prebióticos que actúan como nutrientes de la microbiota intestinal (normalmente alimentos que contienen fibra). Sin embargo, a pesar de que existen microorganismos en alimentos beneficiosos que son necesarios para un buen funcionamiento del cuerpo humano, también existen microorganismos que son patógenos (bacterias, virus, hongos, parásitos) y producen patologías en un organismo hospedador (Priyanka et al., 2016). Hay que saber distinguir entre un microorganismo patógeno y un microorganismo alterante. Un microorganismo patógeno es aquel que produce enfermedades en el ser humano, y un microorganismo alterante es aquel que produce alteraciones organolépticas del

alimento (olor, sabor, textura, etc), pero que no siempre perjudica a la salud del consumidor.

Algunos microorganismos de los alimentos proceden directamente del entorno de donde se producen y otros desde su manipulación del propio consumidor o una manipulación industrial, por ejemplo, un aumento de microorganismos beneficiosos al alimento mediante la fermentación. Sin embargo, dicho anteriormente, algunos microorganismos pueden ser patógenos si el alimento se encuentra contaminado (solamente el 2% son patógenos) (Palomino et al., 2014), estos patógenos avanzan por el tracto digestivo produciendo en el cuerpo humano diferentes patologías y enfermedades que son negativas para este. También existen manipulaciones industriales para todo lo contrario, disminuir los microorganismos de un determinado alimento sometiendo a condiciones adversas para estos (ejemplos: pasteurización y esterilización). Además también se pueden utilizar bacterias que producen bacteriocinas como bioconservantes de alimentos, estas bacterias no son patógenas y producen unas sustancias denominadas bacteriocinas que impiden el crecimiento de otras bacterias patógenas. Las bacteriocinas más conocidas por su gran efecto y poder de actuación como bioconservantes naturales son producidas por las bacterias del ácido láctico (BAL).

Los patógenos de alimentos son aquellos que causan enfermedades en el ser humano pudiendo originar incluso la muerte, por esto es muy importante conocer los microorganismos que causan patogenicidad y desarrollar pruebas de diagnóstico e identificación específicas y eficaces, la microbiología se encarga de estudiar los microorganismos y la rama de esta disciplina que se encarga de desarrollar estas técnicas es la microbiología de los alimentos, aunque esta rama además se encarga de estudiar toda relación de los microorganismos con los alimentos. También es importante estudiar los microorganismos de los alimentos para conocer las fuentes de contaminación, modelar la capacidad y la curva del crecimiento, etc; para establecer unas normas óptimas de higiene, un control y una calidad de los alimentos adecuada y delimitar el periodo de conservación en los diferentes casos.

Las principales causas de contaminación de los alimentos son: contaminación durante el cultivo, cosecha, procesamiento o manipulación de estos, contaminación en alimentos poco cocidos o crudos, o contaminación fecal del agua. En general, el consumo de carnes, pescados o mariscos crudos o poco cocidos, huevos o

derivados, jugos sin pasteurizar, sidras, leche y productos lácteos, fiambres y embutidos son los alimentos con mayor posibilidades de contener microorganismos patógenos y por lo tanto, transmitir enfermedades cuando se ingieren (Mangal et al., 2016). El personal que trabaje en la industria alimentaria realizando manipulación de los alimentos debe seguir una normativa técnico-sanitaria sobre manipulación de alimentos (Segura Beneyto, 2010). Se deben de realizar una serie de medidas de prevención para evitar la contaminación de los alimentos, en primer lugar, protegiendo la contaminación de agentes patógenos mediante buenas prácticas de higiene. En segundo lugar, impedir el crecimiento de los microorganismos aplicando condiciones desfavorables de temperatura, humedad, etc. Por último, eliminar los microorganismos mediante técnicas de cocinado provocando la muerte de estos (Segura Beneyto, 2010).

Los alimentos se clasifican según su grado de alteración en alimentos perecederos (fácil alteración), semiperecederos (estables durante cierto tiempo) y alimentos estables (estables durante un tiempo alargado). Algunos alimentos perecederos son la leche, carne, huevos crudos, etc; unos cuantos alimentos semiperecederos son las semiconservas, productos congelados, etc; y por último, las conservas, pastas, azúcar son ejemplos de alimentos considerados estables (Anderson y Del Rosario, 2005). Los alimentos se pueden alterar por factores bióticos, como la acción de enzimas, microorganismos, insectos o roedores; o por factores abióticos como cambios químicos no enzimáticos o cambios físicos. El deterioro de los alimentos provoca grandes pérdidas económicas al año debido a las grandes pérdidas de cosechas y ganado (Madigan, 2015).

1.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA)

Las enfermedades se definen como cambios o alteraciones fisiológicas del organismo de un ser vivo a causa de un agente externo o interno, que puede presentar síntomas visibles o no y que puede producir daño a distintas células, órganos o tejidos del individuo. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son aquellas patologías producidas por agentes microbiológicos tras la ingesta de agua o alimentos contaminados con estos (origen alimentario), ninguna persona está libre de no contagiarse por este tipo de enfermedades. Las ETA son un

problema principal a nivel mundial en la salud, sobre todo en países de tercer mundo y también suponen una causa importante de mortalidad. El alimento no siempre está contaminado por microorganismos patógenos, sino que también puede estar contaminado por las toxinas producidas por dichos microorganismos, por lo tanto el término de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) es mucho más amplio de lo que se piensa. Una sustancia tóxica se define como aquella que produce daños perjudiciales al consumidor que la ingiere.

Las enfermedades ETA pueden dar lugar a brotes cuando el mismo alimento contaminado es ingerido por un grupo de personas en una vivienda, restaurante, etc, por lo que da lugar a un brote de la misma enfermedad de origen alimentario. Una vez que el alimento contaminado es ingerido, existe una fase que se denomina periodo de incubación, hasta que aparecen los primeros síntomas (Anderson y Del Rosario, 2005). Estas enfermedades mayoritariamente tienen un impacto leve, produciendo normalmente problemas gastrointestinales como vómitos o diarrea, sin embargo, pueden producir mayor impacto en personas ancianas, embarazadas, recién nacidos y personas inmunodeprimidas, ocasionando una enfermedad de forma más crónica e incluso pudiendo llegar a la muerte. Diferentes patógenos pueden presentar síntomas similares por eso es importante técnicas de detección específicas y/o selectivas ya que distintos patógenos necesitan de tratamientos específicos (Balsalobre-Arenas y Alarcón-Cavero, 2017).

Existen diferentes modos de transmisión de las enfermedades ETA, de las que pueden ser una intoxicación, si se ingieren las toxinas producidas por los propios microorganismos o una infección, si se ingieren células vivas propiamente dichas. La intoxicación se puede producir por la ingesta de la toxina que se encontraba de forma natural en el alimento, animal o vegetal o por la producción de la toxina por el microorganismo patógeno en el alimento. La infección puede ser de forma invasiva o no invasiva. Las infecciones de forma no invasiva, que recibe también el nombre de toxiinfección, los microorganismos producen su infección cerca de la pared intestinal, sin atravesar la pared intestinal ni invadir tejidos. Sin embargo, las infecciones de forma invasiva los microorganismos atraviesan la barrera intestinal e invaden otros tejidos del organismo.

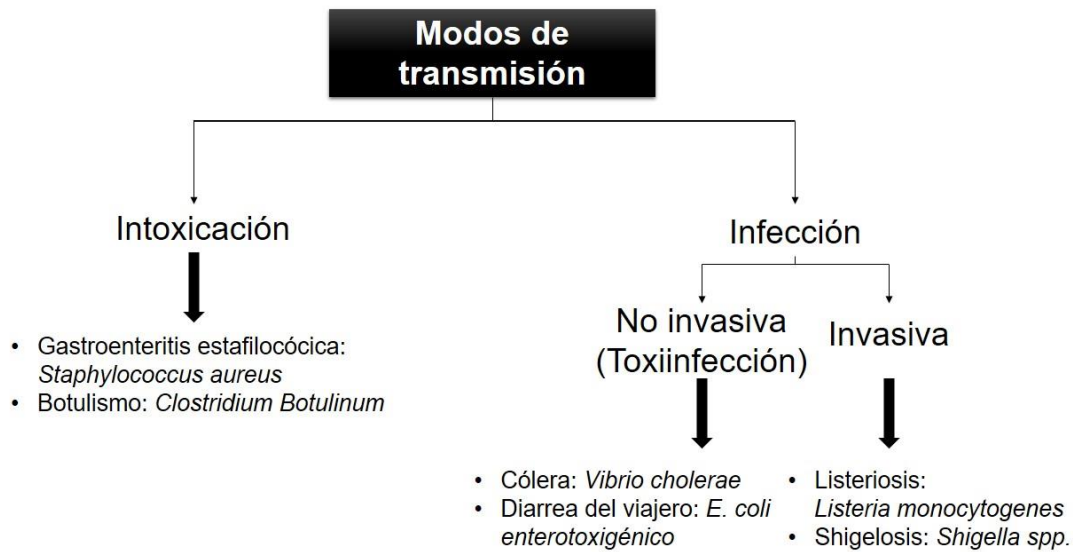


Figura 2. Modo de transmisión de las enfermedades de origen alimentario y ejemplos de algunas de ellas. (Tomado del libro “Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio”).

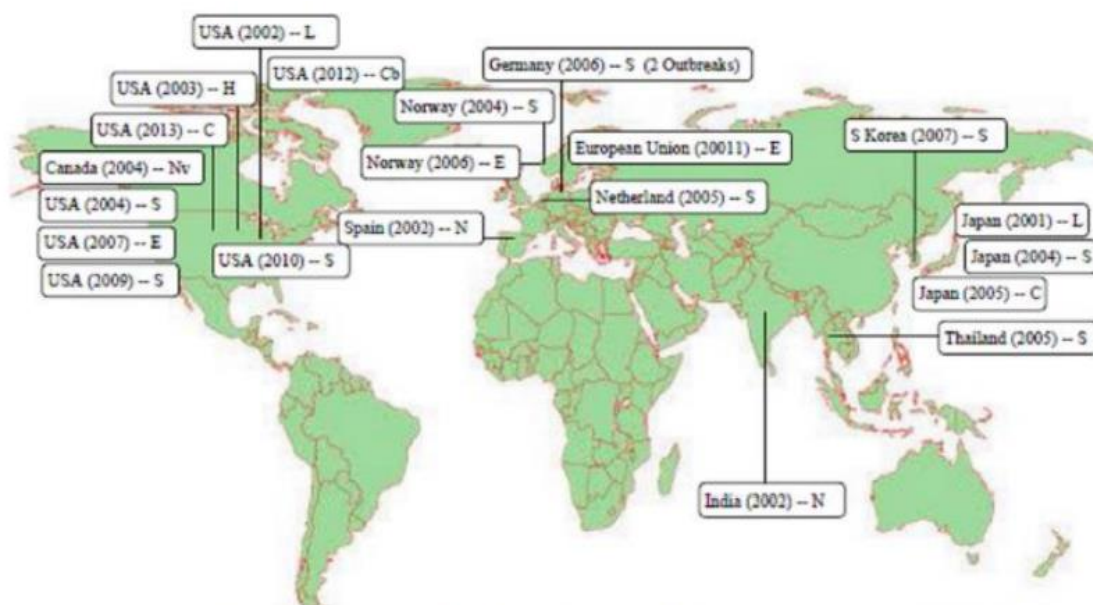
Se conocen más de 250 enfermedades y su transmisión e incidencia ha aumentado estos últimos años debido a la globalización del mercado y el aumento de la migración (Palomino et al., 2014), esto también ha provocado la aparición de nuevos patógenos y el aumento de vectores que transportan los diferentes microorganismos perjudiciales. Según el Centro de Control y la prevención de enfermedades anualmente en EEUU alrededor de 48 millones de personas se enferman, 128000 necesitan hospitalización y alrededor de 3000 personas fallecen a causa de enfermedades transmitidas por los alimentos (Law et al., 2015). Por lo tanto, se ha tenido que aumentar la vigilancia y el control de los alimentos, estableciendo normas de higiene y metodologías para llevar a cabo un control exhaustivo de la calidad de los alimentos, para garantizar la seguridad del consumidor, reducir la aparición de enfermedades transmitidas por alimentos durante su consumo, todo esto para evitar su propagación y por lo tanto, brotes epidemiológicos graves. La industria alimentaria depende cada vez más de análisis microbiológicos para asegurarse de que los alimentos son seguros para el consumo realizando evaluaciones periódicas sobre estos, por lo tanto, para ellos es un reto muy importante estudiar e investigar avances en la detección de los diferentes patógenos en alimentos. Sin embargo, aunque haya aumentado la incidencia de las enfermedades ETA, también ha

aumentado la conciencia del consumidor sobre el cuidado de los alimentos y la seguridad alimentaria, debido al desarrollo de los medios de comunicación como internet u otros medios (Mangal et al., 2015), por lo que es muy importante también concienciar más a la sociedad sobre los diferentes problemas que pueden ofrecer las distintas enfermedades, como realizar un cuidado de los alimentos en la vida cotidiana y aprender en qué momento y en qué condiciones se pueden consumir los distintos alimentos de forma segura, la información a la sociedad se puede otorgar a través de las redes sociales, conferencias, charlas, anuncios de publicidad, etc.

1.2 Principales patógenos transmitidos por alimentos

Los patógenos transmitidos por los alimentos incluyen bacterias, virus, hongos y parásitos (Law et al., 2015). Los diferentes patógenos se agrupan en distintas categorías dependiendo de su gravedad, capacidad de infección, capacidad de crecimiento, potencial metabólico y patogénico, etc; para la microbiología de alimentos es muy importante la caracterización y enumeración de cada uno de los patógenos (Palomino et al., 2014). Además, la incidencia y mortalidad de cada uno de ellos varía según la localización geográfica o el país. De todos los patógenos, las bacterias son las principales causantes de hospitalizaciones y muertes. En el año 2003, en España se produjeron 1221 brotes de enfermedades ETA, 806 brotes fueron causados por bacterias, 26 por virus, 3 por protozoos (parásitos), 22 brotes causados por sustancias tóxicas y 364 causados por agentes desconocidos; las personas afectadas fueron 14112, de las cuales necesitaron hospitalización 1260 y fallecieron 16 (Segura Beneyto, 2010).

Los patógenos que se transmiten por alimentos se estudian cada vez más debido a la capacidad de mutación que tienen estos, lo que les permite una mayor capacidad de adaptación al ambiente en una gran diversidad de condiciones (ejemplo: temperaturas altas o bajas, diferentes concentraciones de salinidad o pH ácidos o básicos) (Rajapaksha et al., 2019), una mayor supervivencia, mayor capacidad de infección, resistencia a mecanismos defensivos, una gran resistencia a los antibióticos debido al uso masivo de estos, etc; esto ha provocado una alerta en la existe un aumento de estudios de control y vigilancia de los microorganismos patógenos (Adzitey et al., 2013). Además también existen biotoxinas en determinados alimentos que producen enfermedades en el ser humano.



C= *Campylobacter jejuni*; Cb= *Clostridium botulinum*; E= *E. coli*; H= Hepatitis A; L= *Listeria monocytogenes*; N= virus Norwalk (*Calicivirus*); Nv= norovirus; S= *Salmonella*.

Figura 3. Principales patógenos causantes de los principales brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en cada país (2001-2013). (Mangal et al., 2016).

Dicho anteriormente, las bacterias son los principales patógenos que se encuentran en alimentos y los principales causantes de las enfermedades ETA. Las bacterias son organismos microscópicos que se encuentran en cualquier lado (aire, agua, suelo, y como no, los alimentos). Pueden tener diferentes tamaños y formas (bacilos, cocos, estafilococos, etc.), además pueden presentar estructuras que mejoran su movilidad como cilios o flagelos. Dependiendo de la estructura de la pared celular, existen bacterias gram positivas y bacterias gram negativas, la pared celular de las bacterias gram negativas se compone por peptidoglicano y una membrana externa formada por lipopolisacáridos (LPS) que actúa como capa protectora, las bacterias gram positivas carecen de esta membrana externa y solo están formadas por peptidoglicano. Las bacterias gram negativas al presentar tal membrana le permite presentar mayor capacidad de infección y resistencia a diversos antibióticos, y protege a la bacteria. Por eso, es muy importante saber de qué tipo de bacteria se encuentra infectado el consumidor, para usar unos determinados antibióticos válidos contra esa bacteria. La membrana externa de las bacterias gram negativas le protege contra ciertos antibióticos. Por ejemplo, existen especies de *Salmonella* y de *E. coli* de tipo gram positivo y de tipo gram negativo, por lo que es importante saber

de qué tipo de bacteria se trata mediante técnicas de detección e identificación eficaces.

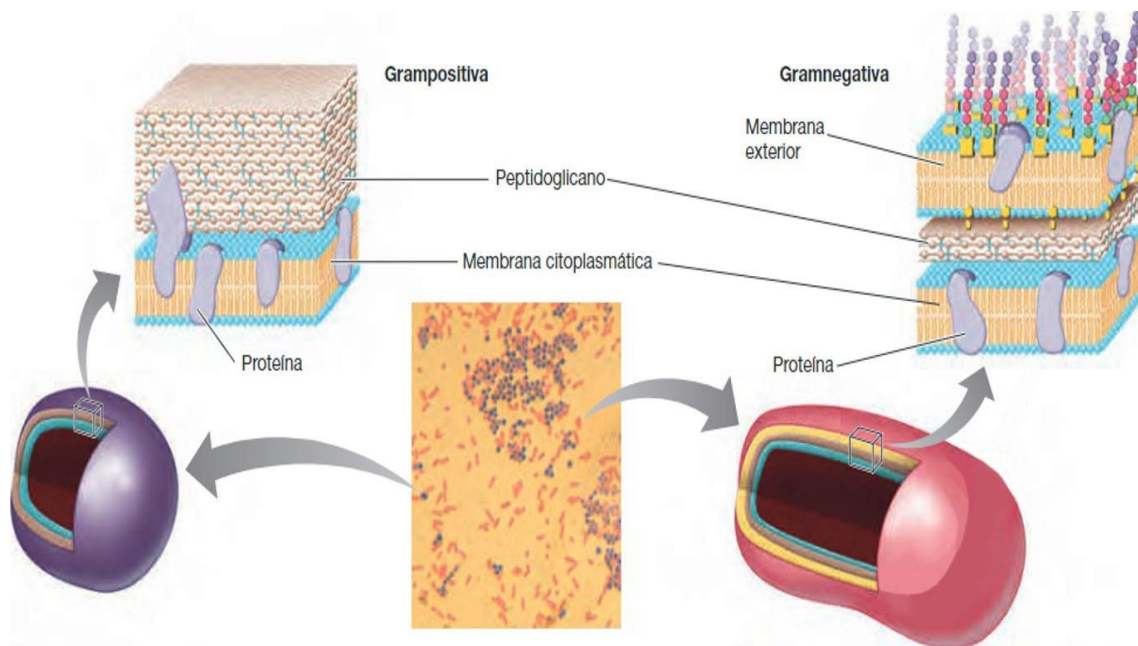


Figura 4. Esquema de la pared celular de las bacterias gram positivas y las gram negativas, además de una foto de cada una de ellas por microscopía óptica. (Tomado del libro: Brock biología de los microorganismos).

Las bacterias pueden sobrevivir en determinadas condiciones, y su comportamiento y metabolismo va depender del tipo bacteriano y de las condiciones del medio. La gran parte de las bacterias no pueden sobrevivir en ausencia de oxígeno, su metabolismo necesita de la presencia de este, lo que les denomina aerobias estrictas. Pero también existen bacterias anaerobias facultativas, las cuales pueden sobrevivir en presencia o ausencia de oxígeno, pueden presentar un metabolismo de tipo aerobio o anaerobio dependiendo de las condiciones y nivel de oxígeno. Por último, también existen bacterias anaerobias que pueden crecer en ausencia de oxígeno, por lo que su metabolismo va ser de tipo anaerobio sin la necesidad de oxígeno. (Caballero Torres, 2008).

Las bacterias pueden producir toxinas bacterianas que también producen enfermedades en el ser humano. Las toxinas se clasifican en dos tipos: exotoxinas (sintetizadas y liberadas al medio por bacterias gram positivas durante su crecimiento) y endotoxinas (forman parte de las bacterias gram negativas y forman

parte de la membrana lipídica externa, por lo que las toxinas son liberadas tras la ruptura de esta estructura) (Anderson y Del Rosario, 2005).

Tabla 1. Propiedades de las toxinas bacterianas, exotoxinas y endotoxinas. (Tomado del libro: Enfermedades de origen alimentario).

	Exotoxinas	Endotoxinas
Origen	Bacterias gram positivas (durante su crecimiento)	Bacterias gram negativas (tras ruptura de membrana externa)
Naturaleza	Proteínas solubles	Moléculas complejas
Acción de la temperatura	Termolábiles	Termoresistentes
Poder tóxico	Muy elevado	Moderado
Poder antigénico	Muy elevado	Débil

Otros patógenos de alimentos son los virus, que son organismos microscópicos que carecen de vida independiente, por lo que necesitan un hospedador. Los virus no son células ya que carecen de la estructura celular típica, pero están formados por un genoma vírico y otras estructuras. Los virus pueden estar formados por ADN o ARN y pueden presentar una envoltura proteica denominada cápsida que protege al genoma, además algunos pueden presentar una envoltura formada por lípidos y proteínas dando lugar a los denominados virus envueltos, si estos carecen de esa envoltura se denominan virus desnudos (Madigan, 2015). Normalmente los virus no se reproducen en los alimentos, sino que se reproducen cuando este ingresa al huésped.

Los parásitos también se pueden transmitir a través de alimentos. Son seres vivos que se nutren de otro ser vivo diferente viviendo con él en su superficie o interior y que normalmente le ocasiona daños y enfermedades, muchos de ellos son parásitos obligados que necesitan una dependencia del huésped para sobrevivir. La transmisión de parásitos por alimentos se puede producir por la ingestión de los propios parásitos o por la ingestión de huevos o quistes de estos al consumir alimentos crudos o poco cocinados. La forma de transmisión va depender del ciclo

de vida de cada uno de los diferentes parásitos. Al igual que los virus, los parásitos tampoco crecen y se multiplican en los alimentos (Caballero Torres, 2008). Los parásitos se anclan en el tracto intestinal impidiendo la adecuada absorción de nutrientes provocando malnutrición en muchos casos debido a ello.

Por último, las micotoxinas producidas por los hongos también se pueden encontrar en los alimentos y producen también enfermedades en el ser humano. Son metabolitos secundarios tóxicos producidos por los hongos durante su crecimiento, existen una gran variedad de micotoxinas con diferencias estructurales, y debido a la gran capacidad que tienen para crecer en los alimentos de forma natural directa o indirectamente, supone un gran desafío para la seguridad alimentaria y la investigación (Degen G.H., 2017). Debido a que son contaminantes de origen natural, difícilmente se va conseguir evitar completamente la existencia de micotoxinas en alimentos, existen unos reglamentos en diferentes países que permiten unos niveles máximos de estas sustancias en los alimentos y que no producen una causa mayor en las personas (Degen G.H., 2017). El crecimiento de hongos y producción de micotoxinas también supone un gran impacto económico debido a las grandes pérdidas de cosecha y ganado provocado por la contaminación de micotoxinas en los diferentes alimentos (Caballero Torres, 2008).

También existen otras biotoxinas que se transmiten en alimentos, como las ficotoxinas producidas por dinoflagelados y microalgas como el plancton, los moluscos y algunos mariscos ingieren como alimento el fitoplancton que contiene esas determinadas toxinas, posteriormente el ser humano tras ingerir los moluscos contaminados con las toxinas producen una intoxicación que da lugar a distintas enfermedades. Existen ficotoxinas muy mortales que pueden conducir a la muerte del consumidor y que no tiene cura, por lo que es muy importante realizar una gran labor de vigilancia para evitar el consumo de estas toxinas.

Los patógenos más conocidos y más comunes son, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 o *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Vibrio spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Law et al., 2015), *Calicivirus* (virus Norwalk, *Norovirus*), el virus de la hepatitis A y parásitos como *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* y *Anisakis spp.* Por último las micotoxinas más importantes que se encuentran en los alimentos

son las producidas por los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Claviceps* o *Alternaria* (Degen G.H., 2017). En el caso de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* la enfermedad ocurre debido a las toxinas producidas por estos microorganismos (Anderson y Del Rosario, 2005).

Tabla 2. Principales patógenos de alimentos en EEUU. (Tomado del libro Brock biología de los microorganismos).

ORGANISMO	ENFERMEDAD	ALIMENTOS
BACTERIAS		
<i>Bacillus cereus</i>	Infección/Intoxicación	Arroz y alimentos feculentos, alimentos azucarados, carnes, salsas, postres, leche en polvo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Infección	Pollo, lácteos
<i>Clostridium perfringens</i>	Infección/Intoxicación	Carne y verduras mantenidas a una temperatura de conservación inadecuada
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Infección	Carne, especialmente ternera picada, verduras crudas
Otras <i>Escherichia coli</i> enteropatógenas	Infección	Carne, especialmente ternera picada, verduras crudas
<i>Listeria monocytogenes</i>	Infección	Alimentos precocinados refrigerados
<i>Salmonella spp.</i>	Infección	Pollo, carne, productos lácteos, huevo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicación	Carne, postres
<i>Streptococcus spp.</i>	Infección	Lácteos, carne
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Infección	Cerdo, leche
Resto de bacterias	Infección/Intoxicación	
PROTISTAS		
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Infección	Carne cruda y poco hecha

<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Infección	Frutas y hortalizas frescas
<i>Giardia intestinalis</i>	Infección	Carne infectada o contaminada
<i>Toxoplasma gondii</i>	Infección	Carne cruda o poco hecha
VIRUS		
<i>Norovirus</i>	Infección	Marisco, otros muchos alimentos
Hepatitis A	Infección	Marisco y otros alimentos consumidos crudos

1.3 Detección e identificación de los patógenos

La detección e identificación de patógenos en alimentos tiene como fin conocer a través de diferentes técnicas la presencia o ausencia del microorganismo o sus toxinas (detección) y de qué tipo de microorganismo se trata (identificación), tratando de diferenciar los microorganismos patógenos de los no patógenos. Actualmente, existen kits de diagnóstico específicos para ciertos microorganismos, lo que facilita una detección rápida y automatizada del microorganismo de interés.

Estas diferentes técnicas deben realizarse en medio estéril para evitar contaminaciones y asegurar que los microorganismos que se introducen o inoculan son procedentes de los alimentos. Los distintos métodos de detección e identificación pueden estar formados por varias etapas que pueden incluir a su vez diferentes técnicas. A la hora de realizar diferentes métodos existen algunos factores que afectan a la detección e identificación de ciertos patógenos, como la capacidad de crecimiento, la tasa de reproducción, el tiempo de vida, diferentes condiciones ambientales óptimas, etc.

Los diferentes métodos se clasifican en distintos grupos junto con sus fundamentos, ventajas y desventajas, los cuales están sujetos a discusiones continuas. Se pueden realizar a través de métodos clásicos o convencionales también denominados los “estándares de oro” (Umesha y Manukumar, 2018), como puede ser las técnicas de cultivo con medios de enriquecimiento específicos y selectivos (Zhao et al., 2014), seguido de pruebas bioquímicas o el recuento de microorganismos indicadores de contaminación en el alimento (ejemplo: enterobacterias y coliformes), seguido también de una posible confirmación serológica de los resultados (Mangal et al.,

2016). Estas técnicas implican un mayor número de etapas y por lo tanto mayor tiempo para obtener resultados, con la posibilidad en algunos casos de obtener falsos positivos, además de que pueden presentar baja sensibilidad y especificidad, pero por otro lado son eficaces y de bajo coste, los cultivos de enriquecimiento permiten aumentar las concentraciones de los microorganismos a niveles detectables e incluso el resurgimiento de células dañadas o estresadas (Zhao et al., 2014), los cultivos en medios selectivos permite el crecimiento de los microorganismos patógenos de interés. Por último los métodos tradicionales también permiten la evaluación cualitativa (presencia o ausencia) y cuantitativa (cantidad) de los microorganismos Valderrama et al., (2016). En el caso de técnicas cuantitativas se pueden realizar cultivos en que se lleva a cabo la numeración de los microorganismos mediante recuentos en placa o mediante la técnica del número más probable realizando distintas diluciones de la misma muestra (Mangal et al., 2016).

La detección e identificación de patógenos en alimentos también se pueden llevar a cabo a través de métodos moleculares, los cuales han avanzado bastante en los últimos años y presentan una mayor rapidez, sensibilidad (se considera importante para detectar patógenos que se encuentren en cantidades mínimas), especificidad y una reducción de los errores humanos, aunque presenta desventajas como la gran cantidad de dinero que se necesita, la necesidad de conocer secuencias diana, la falta de sensibilidad y especificidad en algunos casos y la limitación de instrumentos de acceso a todos los laboratorios (Valderrama et al., 2016; Priyanka et al., 2016; Law et al., 2015). Los métodos de detección rápida son importantes, particularmente en la industria alimentaria, ya que pueden detectar la presencia de patógenos en alimentos crudos y procesados de inmediato, además de poder detectar patógenos en cantidades muy bajas (Law et al., 2015). A veces, un resultado positivo en los métodos de detección rápida se consideran como “presuntos positivos”, a la espera de una confirmación mediante métodos de cultivo estándar para confirmarlo (Valderrama et al., 2016). Algunos de estos métodos son la espectrofotometría, PCR (que detecta ADN específico de interés), biosensores, citometría de flujo, métodos inmunológicos antígenos-anticuerpo (ELISA), etc (Umesha y Manukumar, 2018). También son interesantes las técnicas de secuenciación del genoma completo de los microorganismos que ayuda a contribuir a una mayor vigilancia sobre la

seguridad alimentaria y también a poder descubrir nuevos patógenos (Kovac J., 2019).

En el caso de las bacterias se pueden utilizar tanto métodos tradicionales como métodos moleculares analizando los propios microorganismos o sus toxinas. Para los virus los métodos de cultivo no se llevan a cabo, ya que el crecimiento en cultivo de estos es muy laborioso o inviable, por lo que se utilizan métodos moleculares o métodos inmunológicos. En el caso de los parásitos también son utilizadas tanto las técnicas tradicionales como las moleculares (Balsalobre-Arenas y Alarcón-Cavero, 2017). Por último, para la detección de biotoxinas en los diferentes alimentos se pueden utilizar distintas técnicas bioquímicas y también técnicas moleculares.

Los retos actuales son conseguir técnicas que sean simples de realizar (procedimientos sencillos), automatizados, con un bajo coste sin la necesidad de materiales especializados, con una gran capacidad de detección rápida en poco tiempo, que tengan sensibilidad (evitar falsos positivos) y por último, especificidad (evitar falsos negativos) del agente microbiológico de interés. Debido al gran desarrollo de la biotecnología y de otros campos, aumenta la posibilidad de grandes progresos en un futuro no muy lejano. Unos métodos efectivos permiten controlar la propagación de enfermedades, establecer normas de higiene y control de alimentos específicos y avanzar en el descubrimiento de nuevos patógenos causantes de enfermedades ETA.

2. OBJETIVOS

- Estudiar las principales técnicas de detección e identificación de patógenos en alimentos.
- Revisar y comparar las diferentes pruebas de diagnóstico para diferenciar las ventajas y limitaciones de cada una.
- Conocer los principales patógenos transmisibles por alimentos e investigar sobre ellos.
- Ampliar el conocimiento sobre la microbiología de los alimentos y las enfermedades ETA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo una búsqueda de información para realizar este trabajo, en la búsqueda se incluyen distintas páginas web de carácter científico, artículos y revistas científicas, libros proporcionados por la biblioteca de la universidad de Jaén e incluso bibliografías propias de asignaturas del grado. Tras realizar una búsqueda exhaustiva, en primer lugar, seleccionamos los artículos más influyentes sobre este tema, con una antigüedad de no más de 10 años para los artículos científicos y para los libros de texto.

Se realiza una búsqueda sobre la microbiología de alimentos, los diferentes patógenos que se transmiten por estos dando lugar a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y las diferentes técnicas y pruebas de detección e identificación de los diferentes microorganismos, con sus respectivas ventajas y limitaciones de cada una de estas técnicas, y por último los retos actuales de futuro acerca de este tema.

Los motores de búsqueda para la selección de los artículos y algunos libros fueron: [Google académico](#) y [Web of Science \(WOS\)](#). Google académico o Google scholar es un motor de búsqueda que pertenece a Google y en él se pueden encontrar una gran cantidad de artículos, libros, revistas y documentos de carácter científico correspondientes a una multitud de fuentes. Web of Science (WOS) es una base de datos a la que se puede acceder gracias a FECYT (Fundación Española de Ciencia y Tecnología) y la Universidad de Jaén, en esta base de datos también se encuentran artículos y revistas científicas con un gran impacto algunas de ellas.

La búsqueda comienza con la palabra clave “pathogens in food” en la cual encontramos aproximadamente 1.640.000 resultados en Google académico y 45.860 resultados en WOS filtrando la búsqueda a artículos publicados desde el 2012 hasta la actualidad. Se refina la búsqueda con “detection and identification of pathogens in food” encontrando 18.400 resultados en Google académico y 2.023 resultados en WOS.

La búsqueda total fue de unos 75 artículos científicos y 4 libros de texto revisados, de todos estos, muchos artículos son publicados del año 2014, 2013 y 2012, pero también existen artículos publicados en todos los años en los que se realiza la búsqueda. De los 4 libros, uno corresponde al año 2013, otro al 2015 y por último

dos al año 2016. La gran mayoría de los artículos son de revisión, en los cuales se describen diferentes técnicas para la detección e identificación de patógenos en alimentos, muchos de ellos, de los últimos 10 años, se centran sobre todo en métodos rápidos de detección de futuro y en métodos moleculares. Estudian sobre todo bacterias, en las que destacan *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. De todos los artículos, luego han sido seleccionados para realizar este trabajo 17 artículos científicos.

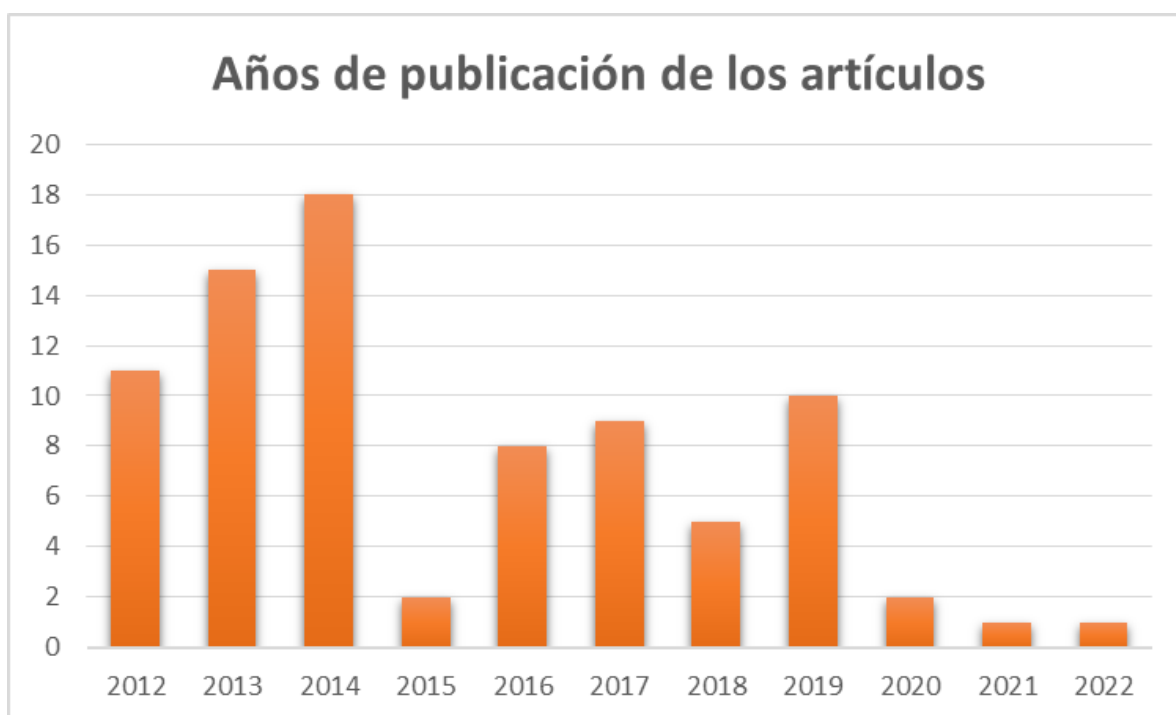


Figura 5. Gráfico que refleja los años de publicación de los diferentes artículos de la búsqueda. (Elaboración propia).

4. RESULTADOS

4.1 Métodos tradicionales

Los métodos tradicionales son conocidos como los “estándares de oro” (Umesha y Manukumar, 2018), y se trata principalmente de pruebas fenotípicas a los diferentes patógenos. Se basa principalmente en métodos de cultivo específicos y selectivos, recuento de microorganismos indicadores y pruebas de caracterización bioquímica e inmunológicas.

4.1.1. Métodos basados en el cultivo de microorganismos

Se trata del método por excelencia en microbiología, en el que se cultivan y se aíslan los microorganismos mezclando la muestra de alimentos a analizar en placas con medios sólidos o líquidos de enriquecimiento para poder aumentar la concentración de los microorganismos y poder recuperar microorganismos dañados o heridos, para posteriormente realizar posiblemente el cultivo en medios selectivos (Zhang, 2013), para luego, por último poder enumerarlos (Umesha y Manukumar, 2018). Los medios de cultivo selectivo son útiles para que se aíse el microorganismo de interés en gran cantidad y evitar la contaminación de la muestra por el crecimiento de otros microorganismos (Mangal et al., 2016).

Para realizar el conteo clásico de los microorganismos, se debe realizar una dilución en serie, a partir de una suspensión madre de los microorganismos a estudiar. Se deben hacer diluciones como mucho de hasta 10^{-5} o 10^{-6} en placas de medio de cultivo con agar, posteriormente se incuban en una estufa a 37°C (temperatura óptima normalmente) durante 1 o 2 días, después se realizará el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) siguiendo la ecuación (Rajapaksha et al., 2019):

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias} \times FD(\text{factor de dilución})}{Volumen \text{ en } ml}$$

Se realiza el recuento correspondiente a aquella dilución en la que el número de colonias en placa esté comprendido entre 50 y 300 colonias y posteriormente se aplica la ecuación anterior.

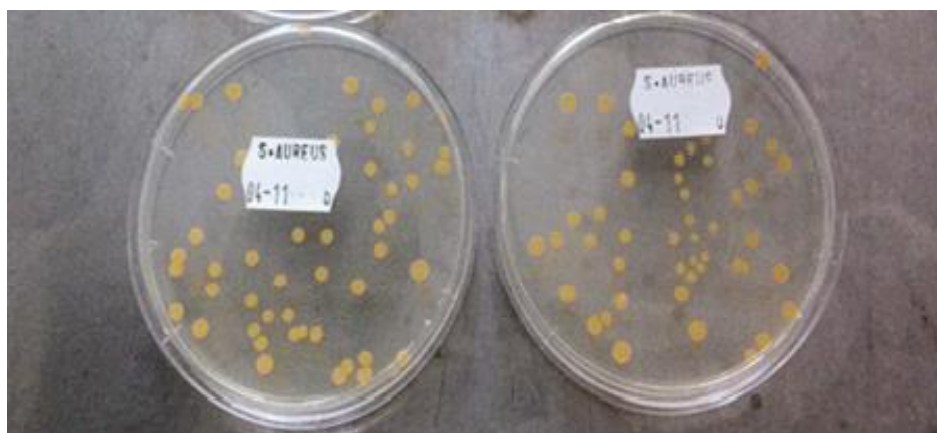


Figura 6. Fotografía del cultivo en placa de *Staphylococcus aureus*. (Rajapaksha et al., 2019).

También se puede realizar un recuento microscópico de los organismos, en el cual se parte del cultivo de estos, pasando los microorganismos a un portaobjetos realizando una tinción específica del patógeno de interés y posteriormente realizar el recuento en la visualización del microscopio óptico. Es fácil y sencillo, pero se necesitan técnicas específicas de tinción, el conteo puede ser impreciso debido dando lugar a recuentos erróneos, además de para poder identificar el patógeno se necesita el aprendizaje morfológico y fenotípico del patógeno en cuestión (Madigan, 2015). Por último también se puede realizar el recuento de bacterias indicadoras de ciertos patógenos como coliformes o enterobacterias, indicadoras fecales de contaminación, sobre todo en el agua, la desventaja que presentan las bacterias indicadoras es que no permite saber la fuente de contaminación (Rajapaksha et al., 2019).

Tras la detección e identificación de los patógenos mediante el cultivo de estos se suele confirmar mediante técnicas bioquímicas y serológicas, y también a veces, mediante técnicas moleculares. (Mangal et al., 2016).

El cultivo de microorganismos es un método de detección convencional que permite dar una información cuantitativa y cualitativa sobre el patógeno a estudiar y puede ser fiable y preciso, pero también supone una forma lenta de detección y es muy laborioso (Umesha y Manukumar, 2018).

En los artículos analizados, 1) “Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*”. (Giraldo et al., 2021). 2) “Evaluación del comportamiento de los patógenos alimentarios *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* mediante técnicas moleculares y cultivo en matrices alimentarias”. (Herrera Pérez, 2013). 3) “Estudio microbiológico (cualitativo y cuantitativo) de superficies inertes que están en contacto con la preparación de alimentos en cafeterías de una universidad pública”. (López et al., 2016). 4) “Caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* patógeno, resistente a los antimicrobianos, formador de biopelículas, aislado de productos lácteos y cárnicos de la India”. (Bhardwaj et al., 2021).

En todos de ellos se utilizan muestras a partir de alimentos, para detectar distintos patógenos, la detección la llevan a cabo de forma cuantitativa (realizando el recuento de las unidades formadoras de colonias) o de forma cualitativa (solo

detectando e identificando la presencia o ausencia del patógeno), después realizan una confirmación mediante técnicas de caracterización bioquímica, técnicas inmunológicas o técnicas moleculares.

Tabla 3. Comparación de las muestras utilizadas, patógenos a detectar, tipos de estudio y maneras de confirmación de identificación, de los distintos artículos en los que se realiza el cultivo de los patógenos. (Elaboración propia)

Muestras	Patógeno	Tipo de estudio	Confirmación
1) Alimentos lácteos y derivados	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cualitativo	Técnicas de caracterización bioquímica e inmunológica
2) Lechuga, bacalao y mejillones	<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cuantitativo y cualitativo	Técnicas moleculares
3) A partir de superficies y utensilios de cocina de una cafetería de universidad.	Distintos patógenos a estudiar, bacterias indicadoras (coliformes totales y bacterias mesófilas aerobias) y <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella</i> , etc.	Cuantitativo (recuento de bacterias indicadoras) y cualitativo (presencia o ausencia de los demás patógenos).	Técnicas de caracterización bioquímica
4) Productos lácteos y pollo crudo	<i>Escherichia coli</i>	Cualitativo	Técnicas de caracterización bioquímica y moleculares

4.1.2. Técnicas de caracterización bioquímica

Las pruebas bioquímicas se basan en la actividad de distintas enzimas, proteínas o actividades metabólicas que ponen de manifiesto la identificación de un microorganismo en concreto. Existen kits de caracterización bioquímica que permiten averiguar de qué microorganismo se trata (Giraldo et al., 2021). Los métodos bioquímicos se suelen usar para la confirmación de los cultivos selectivos y para diferenciar unos microorganismos de otros.

Una de las técnicas bioquímicas más utilizadas es la prueba de CAMP pero también existen otras pruebas que miden diferentes características bioquímicas como la actividad catalasa, actividad oxidasa, fermentación de azúcares, etc (Giraldo et al., 2021).

En el artículo mencionado en el apartado anterior: “Estudio microbiológico (cualitativo y cuantitativo) de superficies inertes que están en contacto con la preparación de alimentos en cafeterías de una universidad pública”. (López et al., 2016). Para realizar el análisis cualitativo de los microorganismos, es decir, comprobar la presencia o ausencia de un determinado patógeno, se confirma mediante técnicas de caracterización bioquímica, por ejemplo en el agar manitol salado, se realiza la prueba de la catalasa, la prueba de DNAsa, coagulasa y resistencia a Novobiocina, si en todas sale positivo, se trata de *Staphylococcus aureus*. Para cada placa se realiza una serie de pruebas que determinan la caracterización de un determinado patógeno, por eso es necesario saber las características fenotípicas y bioquímicas de cada patógeno.

En el estudio “Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*”. (Giraldo et al., 2021), se realiza la prueba CAMP, que estudia la proteína CAMP que produce hemólisis junto con β -lisina en *Listeria monocytogenes* o estreptococos, lo que lo diferencia de otras especies u otros microorganismos.

En otros estudios, realizan caracterización bioquímica mediante kits comerciales preparados para un tipo de patógeno en específico (Bhardwaj et al., 2021).

4.1.3. Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas consisten en la unión de antígeno-anticuerpo. La existencia de un determinado anticuerpo específico de un cierto patógeno o su toxina que permite la detección e identificación de este. La técnica inmunoenzimática más común para la detección de patógenos en alimentos es la denominada técnica ELISA, que se basa en la unión de un anticuerpo primario a un antígeno específico, tras la unión antígeno-anticuerpo, este complejo es reconocido por un anticuerpo secundario asociado a una enzima, que emite fluorescencia tras la unión de este antígeno secundario, permitiendo la detección de un patógeno de forma rápida, sencilla y específica, pero para ello se requiere la necesidad de un anticuerpo específico, que puede no ser válido para distintas especies, (Valderrama et al., 2016). La creación de un anticuerpo eficaz va a marcar la especificidad y sensibilidad de la técnica. Para desarrollar esta técnica, primero se tienen que aislar los antígenos y después se lleva a cabo la formación de los anticuerpos específicos, normalmente mediante inoculación en animales produciendo la inmunización de estos, por último se forman anticuerpos asociados a enzimas específicos que reconocen la unión antígeno-anticuerpo, (Di Febo et al., 2019).

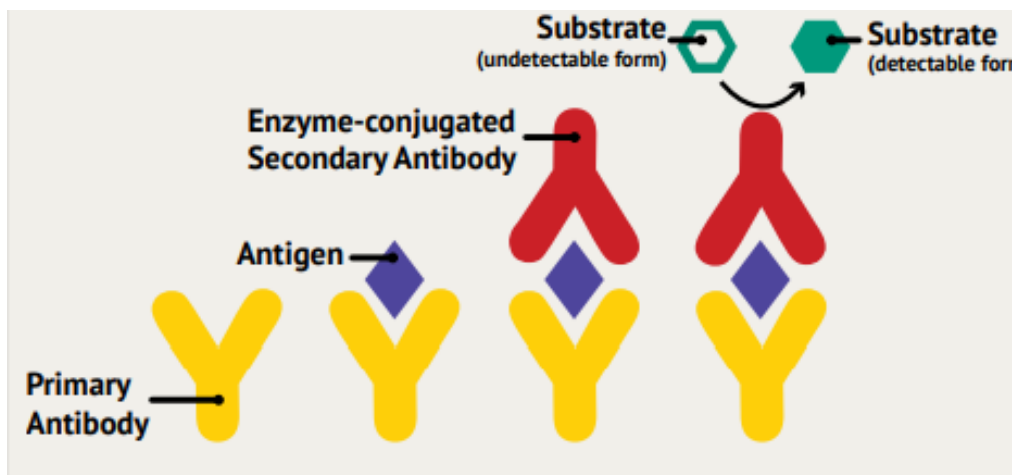


Figura 7. Composición de todas las partes que forman parte de la técnica ELISA. (Zhang, 2013).

Tabla 4. Comparación de los distintos artículos leídos sobre pruebas inmunológicas para detectar patógenos en alimentos. (Elaboración propia).

Artículo	Patógeno a detectar	Muestras	Resultados
“Development of a capture ELISA for rapid detection of <i>Salmonella</i> entérica in food samples”. (Di Febo et al., 2019).	<i>Salmonella</i> .	Productos lácteos, carnes, pastas y harinas, huevos y alimentos para animales.	Alta especificidad y sensibilidad, pero con algunos falsos positivos por reactividad cruzada.
“Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of <i>Bacillus cereus</i> in food”. (Zhu et al., 2016).	<i>Bacillus cereus</i>	Carne picada.	Gran especificidad y sensibilidad y lograron eliminar de forma más eficaz la reactividad cruzada debido a un método molecular (subtractive screen) mejorando la especificidad de los anticuerpos.
“Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157: H7 detection”. (Pang et al., 2018)	<i>E. coli</i>	Repollo chino	Alta especificidad y sensibilidad, sin diferencias significativas por reactividad cruzada.
“Desarrollo y optimización de un método basado en ELISA para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> O157 en hortalizas frescas”. (Cavaiuolo et al., 2013)	<i>Listeria</i> y <i>E. coli</i> .	Pepino	Alta especificidad y sensibilidad de nuevo.

En la tabla de arriba (tabla 4), en los diferentes artículos leídos utilizan distintos patógenos y alimentos como muestras a analizar, pero tienen algo en común, que en todos de ellos los resultados obtienen una alta especificidad y sensibilidad.

Las ventajas y desventajas de todas las técnicas convencionales descritas anteriormente se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Resumen de las ventajas y desventajas que presentan las técnicas tradicionales basadas en el fenotipo del patógeno. (Elaboración propia).

Técnicas	Ventajas	Desventajas
Cultivo	-Recuento de forma cuantitativa y cualitativa. -Caracterización de los patógenos. -Técnicas eficaces. -Bajo coste. -Permite aumentar la concentración de los patógenos y la regeneración de células dañadas.	-Detección muy lenta. -Mayor número de etapas -Realización laboriosa. -Puede presentar baja especificidad y sensibilidad. -Necesidad de conocimientos morfológicos. -Necesidad de confirmación por otras técnicas. -Medios de cultivo específicos.
Caracterización bioquímica	-Detección rápida. -Identificación específica de género y especie. -Permite la confirmación de detección e identificación de la técnica de cultivo. -Bajo coste.	-Existencia de muchas especies con distintas características bioquímicas. -Necesidad de aprendizaje de conocimientos de caracterización bioquímica.
Inmunológicas	-Detección rápida. -Alta especificidad y sensibilidad. -Realización sencilla.	-Necesidad de un anticuerpo específico. -Posibles falsos positivos por reactividad cruzada. -Precio elevado.

4.2. Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares se basan en los ácidos nucleicos de los microorganismos, que a diferencia de las técnicas convencionales las cuales se basan en la morfología, fisiología y fenotipo de estos, las técnicas moleculares se basan en el genotipo, es decir, la composición total de los ácidos nucleicos, no solamente los que se expresan. Debido al avance de la biotecnología y de la ingeniería genética estos últimos años, las técnicas moleculares han avanzado considerablemente. Consiste en la extracción y aislamiento de ADN de los patógenos para posteriormente analizar diversos genes que permitan su detección e identificación, (Huertas et al., 2019). Algunas de las técnicas más importantes son la secuenciación, hibridación, microarrays, PCR, electroforesis en gel de campo impulsado, etc.

4.2.1. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La técnica de PCR consiste en la amplificación de una secuencia de ADN específica (genes diana) con la ayuda de una ADN polimerasa (Taq polimerasa) y cebadores específicos a la secuencia que se quiere amplificar, por lo que es necesario conocer la secuencia de ADN diana para diseñar los cebadores. Tras la amplificación, la cual se realiza normalmente en un termociclador, en la PCR convencional se realiza una electroforesis al producto de PCR y se analizan los resultados bajo luz ultravioleta. Existen muchas variaciones de la PCR como RT-PCR, PCR inversa, PCR en tiempo real, PCR múltiple, etc.

Esta técnica es muy utilizada para la detección e identificación de patógenos en alimentos durante los últimos años, presenta una alta especificidad y sensibilidad, además de ser una prueba rápida y eficaz. Sin embargo, es necesario conocer secuencias diana de los patógenos en específico.

De los artículos revisados, utilizan distintos tipos de PCR para detectar distintos patógenos en específico, además de utilizar diferentes muestras. Por ejemplo, en “Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR”. (Vinayaka et al., 2019). Realizan PCR en tiempo real que permite la cuantificación como la detección a la vez, ya que se utiliza un marcador fluorescente que permite cuantificar el producto

de PCR. Todo esto para detectar *Salmonella* en ensalada de verduras mixtas, huevo de gallina y carne de cerdo picada sin la necesidad de un cultivo anterior a la PCR.

En otros artículos, llevan a cabo la PCR múltiple en tiempo real, que consiste en amplificar más de una secuencia diana, se utiliza para cada secuencia unos cebadores y una sonda específicos (ya que es en tiempo real). Esta técnica permite realizar una PCR múltiple para identificar diferentes patógenos en una misma reacción, por ejemplo en “Development of a multiplex real-time PCR for simultaneous detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in food samples”. (Wei et al., 2019). Llevan a cabo el desarrollo una PCR múltiple en tiempo real para identificar *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, y *Staphylococcus aureus* utilizando tomates cherry, leche y carne picada de cerdo en lata como muestras de alimentos. La técnica de PCR múltiple en tiempo real se describe en varios artículos, por lo que es una técnica que estos últimos años se está desarrollando bastante.

En otros artículos llevan a cabo simplemente el desarrollo de una PCR simple para detectar un patógeno en específico.

El desarrollo de los diferentes tipos de PCR tiene en común que todos presentan unos resultados con una alta especificidad y sensibilidad.

Tabla 6. Comparación de los diferentes tipos de PCR que más se usan para la detección e identificación de patógenos en alimentos. (Elaboración propia).

PCR simple	PCR múltiple	PCR en tiempo real
-Detección de un patógeno. -Necesidad de realizar electroforesis	-Detección múltiple de varios patógenos en una sola reacción. -Necesidad de realizar electroforesis.	-Puede ser simple o múltiple. -Permite la cuantificación y detección a la vez. -Elimina la necesidad de realizar electroforesis.



Figura 8. Gráfico que refleja los diferentes tipos de PCR desarrollados en los últimos años, se aprecia que con diferencia el más estudiado y desarrollado es la PCR múltiple. (Elaboración propia).

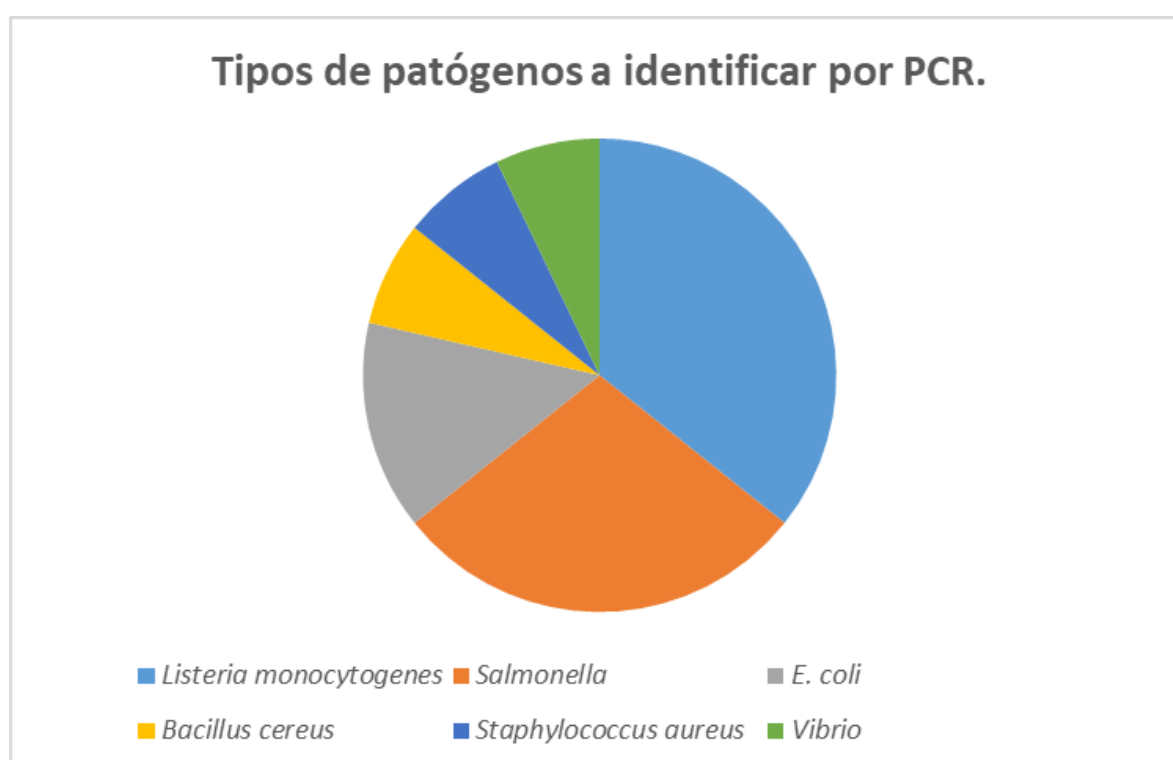


Figura 9. Gráfico que refleja los patógenos interesados para detectar e identificar por PCR en los diferentes artículos. Se aprecia que los patógenos más interesados son *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. (Elaboración propia).

4.2.2. Técnicas de hibridación.

La hibridación es una técnica que permite detectar fragmentos de ADN o ARN que son complementarios a fragmentos de secuencia conocida (sondas). Las sondas se encuentran marcadas y mediante la hibridación se consigue detectar el fragmento de ácido nucleico que se desee, de modo que se debe obtener una sonda específica y complementaria al fragmento de interés, que suelen ser secuencias de ARN ribosómico o genes diana. Existen diferentes tipos de hibridación como hibridación *in situ*, dot-blot, microarrays, etc.

Por ejemplo, en “Selective enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* in milk within 7 h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation. Journal of bioscience and bioengineering”. (Yamaguchi et al., 2012). Realizaron la detección de enterobacterias y *Pseudomonas spp.* en leche mediante hibridación *in situ* utilizando sondas marcadas por fluorescencia, una sonda para la detección de enterobacterias y otra para la detección de *Pseudomonas spp.* La solución de hibridación la pasaron a un papel de filtro con una solución de contratinción para poder realizar un recuento de las bacterias mediante un microscopio de epifluorescencia. Esta técnica tiene una gran precisión y fiabilidad, además de ser más rápida que los métodos convencionales.

Otro tipo de hibridación que ha avanzado estos últimos años y que se utiliza para la detección e identificación de patógenos en alimentos es la hibridación en microordenaciones (microarrays), la cual consiste en una hibridación a gran escala formada por una gran cantidad de sondas inmovilizadas en un soporte sólido, de modo que se puede llevar a cabo un desarrollo de una técnica de hibridación de microordenaciones para la detección universal de distintos patógenos de alimento como llevan a cabo en “Development of a gold nanoparticle-based universal oligonucleotide microarray for multiplex and low-cost detection of foodborne pathogens” (Wang et al., 2017). Se utilizan una gran cantidad de sondas marcadas con nanopartículas de oro en vez de fluoróforos para la detección de 8 patógenos transmitidos por alimentos, *Shigella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, permitiendo la detección múltiple con una gran especificidad y sensibilidad.

Tabla 7. Comparación entre hibridación *in situ* e hibridación mediante microordenaciones. (Elaboración propia).

Hibridación <i>in situ</i>	Microarrays
-Hibridación <i>in situ</i> a partir de células o tejidos. -Uso de sondas a pequeña escala. -Detección de uno o varios patógenos. -Observación de los microorganismos <i>in situ</i>. -Permite la detección y cuantificación de los microorganismos -Visualización al microscopio epifluorescente.	-Hibridación en soporte sólido. -Uso de sondas a gran escala. -Detección múltiple de distintos patógenos o especies. -Permite solo la detección. -No distingue entre células vivas o muertas. -Visualización mediante un escáner.

4.2.3. Otras técnicas moleculares.

La amplificación y posterior secuenciación de secuencias diana, ARN ribosómico o del genoma completo (WGS), permite la identificación de los patógenos de interés, gracias a la amplia base de datos que existe actualmente. Tal secuencia es comparada con las secuencias depositadas en la base de datos gracias a los programas bioinformáticos existentes. En un estudio, (Moura et al., 2017) llevan a cabo la secuenciación del genoma completo a partir de distintas muestras procedentes directamente de humanos, de distintos alimentos y de entornos relacionados con los alimentos utilizando distintas tecnologías de secuenciación para identificar distintas cepas de *Listeria monocytogenes* y muestras de alimentos contaminados, lo que esto también permite la investigación sobre los distintos brotes producidos por los patógenos.

La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) es otra técnica que permite la caracterización molecular de los patógenos en el que se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa utilizando dos campos eléctricos, se usan enzimas de restricción que cortan el ADN facilitando la interpretación y comparación de los resultados. En el artículo (Favier et al., 2013) llevan a cabo la electroforesis en gel

de campo impulsado partiendo de muestras de carne de pollo, huevos y salchichas de cerdo para poder llevar a cabo la caracterización de las distintas cepas de *Salmonella* permitiendo un mayor conocimiento sobre la epidemiología sobre el patógeno obteniendo resultados de distintas cepas para *Salmonella*.

Las ventajas y desventajas que presentan todas las técnicas moleculares descritas anteriormente se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 8. Resumen de las ventajas y desventajas que presentan las técnicas moleculares. (Elaboración propia).

Técnicas	Ventajas	Desventajas
PCR	-Alta especificidad y sensibilidad. -Gran rapidez y sencillez. -Identificación de forma cualitativa y cuantitativa. -Posibilidad de detección múltiple en una misma reacción (PCR múltiple). -Identificación rápida de microorganismos de crecimiento lento o no cultivables (Ejemplo: virus).	-Necesidad de conocer secuencias diana específicas. -Diseño de cebadores específicos -Alto coste. -Posibilidad de posible contaminación. -Alguna vez requiere enriquecimiento y purificación del ADN. -Es necesario realizar electroforesis (excepto PCR en tiempo real).
Hibridación	-Alta especificidad y sensibilidad. -Rapidez y sencillez -Posibilidad de observar los microorganismos <i>in situ</i>. -Detección múltiple de distintos patógenos (Microarrays). -Identificación rápida de microorganismos de crecimiento lento o no cultivables	-Necesidad de desarrollar sondas específicas y marcarlas. -Alto coste. -Visualización mediante aparatos específicos.

Secuenciación	-Muy alta especificidad, sensibilidad y rapidez. -Conocimiento de la secuencia de cada microorganismo. -Caracterización molecular. -Identificación de cada tipo de patógeno. -Otorga información epidemiológica.	-Necesidad de información en la base de datos y existencia de programas bioinformáticos. -Tecnología especializada. -Alto coste.
Electroforesis en gel de campo impulsado	-Identificación y caracterización molecular de distintos microorganismos. -Otorga información epidemiológica.	-Alto coste. -Técnica laboriosa.

4.3. Otras técnicas

Existen diversas técnicas de detección e identificación que no se atribuyen ni a métodos convencionales ni métodos moleculares, como puede ser la fagoterapia o MALDI-TOF.

La fagoterapia consiste en el uso de bacteriófagos que son virus que infectan y matan bacterias permitiendo la detección de patógenos y otorgando un control sobre la seguridad de los alimentos. En diversos estudios llevan a cabo el uso de bacteriófagos específicos para detectar un patógeno en concreto, por ejemplo, en un estudio (Denyes et al., 2017) llevan a cabo el uso de un bacteriófago específico para detectar *Salmonella* a partir de muestras de pollo. El bacteriófago usado (fago S16) fue modificado genéticamente, en el que se le añadió una sonda específica permitiendo detectar rápidamente *Salmonella*.

MALDI-TOF o espectrometría de masas es una técnica en el que los microorganismos se exponen a un rayo láser permitiendo la separación de las proteínas según su masa permitiendo su caracterización, detección e identificación. En un artículo, (Manukumar y Umesha, 2017), llevan a cabo la técnica MALDI-TOF para detectar *Staphylococcus aureus* a partir de diferentes muestras de alimentos,

tras realizar esta técnica los resultados son estudiados mediante un programa bioinformático, con el que se consigue identificar el patógeno gracias a la existencia de las bases de datos.

Como todas las técnicas, estas también presentan sus respectivas ventajas y desventajas reflejadas en la siguiente tabla:

Tabla 9. Ventajas y desventajas que presentan las técnicas de fagoterapia y MALDI-TOF.
(Elaboración propia)

Técnicas	Ventajas	Desventajas
Fagoterapia	-Alta especificidad y sensibilidad. -Biocontrol sobre los alimentos. -Barato y sencillo.	-Posible resistencia de las bacterias. -Posible falsos positivos por reactividad cruzada. -Solo es útil a bacterias.
MALDTI-TOF	-Alto rendimiento para la detección de patógenos. -Rapidez y precisión para otorgar resultados.	-Alto coste. -Necesidad de material especializado y de programas bioinformáticos. -Conocimiento de proteínas específicas para cada patógeno o existencia en la base de datos.

5. DISCUSIÓN

Actualmente, las enfermedades ETA son un problema mundial serio, no solamente sanitario, también económico y social debido al aumento de infecciones por patógenos que se transmiten por alimentos y la gran pérdida que supone de estos. Por eso, es muy importante desarrollar unas técnicas de detección e identificación y unos controles de calidad de los alimentos con gran fiabilidad, rapidez y sencillez para conseguir una detección rápida, impidiendo el aumento de los brotes y de enfermedades.

En este estudio, se demuestra que todos los métodos microbiológicos son importantes, las técnicas convencionales nos permiten caracterizar macroscópica y microscópicamente los patógenos, además de otorgar también información bioquímica y metabólica. Los métodos moleculares nos otorgan una información sobre el genoma y una caracterización molecular de los distintos microorganismos, además de que permite la detección de microorganismos no cultivables o de crecimiento lento. Es importante no abandonar el uso de ningún tipo de técnicas ya que pueden ser muy útiles en cualquier momento de estudio, en muchas ocasiones la combinación de las técnicas convencionales con las moleculares han tenido una gran efectividad para la detección y cuantificación de los patógenos (Herrera Pérez, 2013).

Los métodos de cultivo es el convencional más utilizado, existen multitud de medios selectivos para detectar cualquier patógeno en específico, actualmente esta técnica sigue siendo muy utilizada, sin embargo, existen microorganismos difíciles de cultivar o no cultivables, como los virus, lo cual limita esta técnica. Otra técnica convencional a destacar son los métodos inmunológicos que presentan una gran especificidad y selectividad, gracias a la creación de anticuerpos específicos, pero requieren de gran cantidad de tiempo y presentan un alto coste.

La PCR, en concreto la PCR múltiple en tiempo real es uno de los métodos moleculares más utilizados para detectar patógenos en alimentos, esta técnica permite la detección múltiple de diversos patógenos, y a la vez, su cuantificación, además es una técnica más rápida con una mayor efectividad y selectividad, pero con un alto coste. De las demás técnicas moleculares cabe destacar la secuenciación, la cual se encuentra en auge, secuenciaciones masivas de los

microorganismos nos permite detecciones e identificaciones más tempranas, además de mucha información epidemiológica sobre los distintos brotes.

Otras técnicas como la fagoterapia pueden suponer en un futuro no muy lejano la detección de bacterias con una gran especificidad y sensibilidad, pero aún queda mucho por investigar.

Como reto futuro se deben mejorar muchos aspectos en investigación de técnicas, como el desarrollo de métodos fáciles de llevar a cabo, con bajo coste, con una gran rapidez y especificidad y con capacidad de alcance a todos los laboratorios. También se debe conseguir una preparación de muestras con una mayor velocidad e intentar encontrar los alimentos contaminados con una mayor rapidez y seguridad, además de estar en alerta y preparados para las posibles apariciones de nuevos patógenos que pueden poner en peligro la salud pública, la sociedad también debe de estar concienciada sobre el gran problema que suponen las enfermedades ETA. Por otro lado, también se debe mejorar la investigación de los patógenos, su patogénesis, forma de transmisión, virulencia, etc. (Bhardwaj et al., 2021).

6. CONCLUSIONES

- Las enfermedades transmitidas por alimentos suponen un gran problema mundial y es necesario desarrollar metodologías de detección e identificación temprana y eficaz para impedir o reducir las infecciones por los distintos patógenos.
- Las técnicas convencionales se centran más en el fenotipo del patógeno, y permiten la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica de este, además de permitir estudiarlos de forma cuantitativa como cualitativa con resultados con gran fiabilidad y también de presentar una facilidad de desarrollo e interpretación y un bajo coste, sin embargo estos métodos necesitan de un gran tiempo de estudio, con una gran cantidad de pasos y con la necesidad de confirmación por otras técnicas en algunos casos, añadiendo que existen microorganismos difíciles de cultivar o no cultivables.

- Las técnicas moleculares se centran más en el genotipo del patógeno, permitiendo conocer su caracterización molecular, estos métodos son mucho más rápidos que los convencionales, presentan una mayor sensibilidad y especificidad, permite la detección cuantitativa como cualitativa y también permite la detección e identificación de microorganismos no cultivables o difíciles de cultivar. No obstante, presentan desventajas como un alto coste, la necesidad de equipos especiales e información de las bases de datos y con la obligación en muchos casos de enriquecimiento de los patógenos. Las técnicas moleculares junto con avances en biotecnología y biomedicina son el futuro para una rápida y detección temprana de los microorganismos patógenos.
- Se debe invertir y estudiar más en investigación sobre esta área para mejorar la seguridad de los alimentos, evitar grandes pérdidas de estos y también para mejorar la salud pública.
- La sociedad debe de estar informada sobre este ámbito y no tomarlo como un problema a la ligera y tener conocimientos sobre seguridad de los alimentos en casa.

7. BIBLIOGRAFÍA

ADZITEY, F., HUDA, N., Y ALI, G. R. (2013): "Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks". *Biotech*, 3(2), pp. 97–107. DOI:10.1007/s13205-012-0074-4

AHMED E. YOUSEFF., CAROLYN CARLSTROM. (2006): *Microbiología de los alimentos: Manual de laboratorio (1ª edición)*. Acribia.

ANDERSON, P., Y DEL ROSARIO, M. (2005): *Enfermedades de origen alimentario*. Ediciones Díaz de Santos.

BALSALOBRE-ARENAS, L., Y ALARCÓN-CAVERO, T. (2017): "Rapid diagnosis of gastrointestinal tract infections due to parasites, viruses, and bacteria. Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(6), pp. 367–376. DOI:10.1016/j.eimc.2017.01.002

BHARDWAJ, DK, TANEJA, NK, SHIVAPRASAD, DP, CHAKOTIYA, A., PATEL, P., TANEJA, P., Y SANAL, MG. (2021): "Caracterización fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* patógena, resistente a los antimicrobianos, formadora de biopelículas, aislada de productos lácteos y cárnicos de la India". *Revista internacional de microbiología alimentaria*, 336, 108899. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108899

CABALLERO TORRES, Á. E. (2008): *Temas de Higiene de los Alimentos*. Editorial Ciencias médicas.

CARROLL K.C., & HOBDEN J.A., & MILLER S, & MORSE S.A., & MIETZNER T.A., & DETRICK B, & MITCHELL T.G., & MCKERROW J.H., & SAKANARI J.A. (2016): *Microbiología médica*, 27e. McGraw Hill.

CAVAIUOLO, M., PARAMITHIOTIS, S., DROSINOS, EH Y FERRANTE, A. (2013): “Desarrollo y optimización de un método basado en ELISA para la detección de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157 en hortalizas frescas”. *Métodos analíticos* , 5 (18), pp. 4622-4627. DOI:10.1039/C3AY40893K

DEGEN G. H. (2017): “Mykotoxine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und gesundheitliches Risiko [Mycotoxins in food : Occurrence, importance and health risk]”. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 60(7), pp. 745–756. DOI:10.1007/s00103-017-2560-7

DENYES, J. M., DUNNE, M., STEINER, S., MITTELVIEFHAUS, M., WEISS, A., SCHMIDT, H., Y LOESSNER, M. J. (2017). “Modified bacteriophage S16 long tail fiber proteins for rapid and specific immobilization and detection of *Salmonella* cells”. *Applied and environmental microbiology*, 83(12). DOI: 10.1128/AEM.00277-17

DI FEBBO, T., SCHIRONE, M., VISCIANO, P., PORTANTI, O., ARMILLOTTA, G., PERSIANI, T., Y LUCIANI, M. (2019): “Development of a capture ELISA for rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples”. *Food Analytical Methods*, 12(2), pp. 322-330. [DOI:10.1007/s12161-018-1363-2](https://doi.org/10.1007/s12161-018-1363-2)

FAVIER, G. I., ESTRADA, C. S. L., OTERO, V. L., & ESCUDERO, M. E. (2013). “Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina”. *Food Control*, 29(1), 49-54. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.05.056

GIRALDO ARISTIZÁBAL, A., AGUILERA BECERRA, A. M., URBANO CÁCERES, E. X., PEDRAZA BERNAL, A. M., Y JAIMES BERNAL, C. P. (2021): “Comparación teórica entre técnicas fenotípicas y genotípicas utilizadas en la identificación de *Listeria monocytogenes*”. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 16(2), pp. 7-19. DOI:10.18359/rfcb.5012

HERRERA PÉREZ, I. J. (2013): “Evaluación del comportamiento de los patógenos alimentarios *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* mediante técnicas moleculares y cultivo en matrices alimentarias”.

HUERTAS-CARO, CARLOS, URBANO-CÁCERES, ELIANA, Y TORRES-CAYCEDO, MARÍA. (2019): “Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos”. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), pp. 513-528.

KOVAC J. (2019): “Precision Food Safety: a Paradigm Shift in Detection and Control of Foodborne Pathogens”. *MSystems*, 4(3). DOI:10.1128/mSystems.00164-19.

LAW, J. W., AB MUTALIB, N. S., CHAN, K. G., Y LEE, L. H. (2015): “Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations”. *Frontiers in microbiology*, 5, 770. DOI:10.3389/fmicb.2014.00770

LÓPEZ, A. B. E., SÁNCHEZ, M. D. L. C. M., & LINO, A. C. (2016): “Estudio microbiológico (cualitativo y cuantitativo) de superficies inertes que están en contacto con la preparación de alimentos en cafeterías de una universidad pública”. *Revista Electrónica Sobre Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación*, 3(6).

MADIGAN, MICHAEL T. (2015): *Brock biología de los microorganismos. 14a ed.* Print.

MANGAL, M., BANSAL, S., SHARMA, S. K., Y GUPTA, R. K. (2016): “Molecular Detection of Foodborne Pathogens: A Rapid and Accurate Answer to Food Safety”. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), pp. 1568–1584. DOI:10.1080/10408398.2013.782483

MANUKUMAR, H.M., UMESHA, S. (2017). “MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. *Sci Rep* 7, 11414. DOI: 10.1038/s41598-017-11597-z

MOURA, A., TOURDJMAN, M., LECLERCQ, A., HAMELIN, E., LAURENT, E., FREDRIKSEN, N., VAN CAUTEREN, D., BRACQ-DIEYE, H., THOUVENOT, P., VALES, G., TESSAUD-RITA, N., MAURY, M. M., ALEXANDRU, A., CRISCUOLO, A., QUEVILLON, E., DONGUY, M. P., ENOUF, V., DE VALK, H., BRISSE, S., Y LECUIT, M. (2017). "Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France". *Emerging infectious diseases*, 23(9), pp.1462–1470. DOI: 10.3201/eid2309.170336

PALOMINO-CAMARGO, CAROLINA, Y GONZÁLEZ-MUÑOZ, YUNIESKY. (2014): "Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones". *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), pp. 535-546.

PANG, B., ZHAO, C., LI, L., SONG, X., XU, K., WANG, J., ... Y LI, J. (2018): "Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157: H7 detection". *Analytical biochemistry*, 542, pp. 58-62. DOI:10.1016/j.ab.2017.11.010

PRIYANKA, B., PATIL, R. K., Y DWARAKANATH, S. (2016): "A review on detection methods used for foodborne pathogens". *The Indian journal of medical research*, 144(3), pp. 327–338. DOI:10.4103/0971-5916.198677

R. DÍAZ, C. GAMAZO, I. LÓPEZ-GOÑI. (1999): *Manual práctico de microbiología (2ª edición)*. Masson.

RAJAPAKSHA, P., , ELBOURNE, A., , GANGADOO, S., , BROWN, R., , COZZOLINO, D., , Y CHAPMAN, J. (2019): "A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms". *The Analyst*, 144(2), pp. 396–411. DOI:10.1039/c8an01488d

SEGURA BENEYTO, MANUEL. (2010): *Manipulador de comidas preparadas*. Print.

UMESHA, S., Y MANUKUMAR, H. M. (2018): "Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future

challenges". *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(1), pp. 84–104. DOI:10.1080/10408398.2015.1126701

VALDERRAMA, W. B., DUDLEY, E. G., DOORES, S., Y CUTTER, C. N. (2016): "Commercially Available Rapid Methods for Detection of Selected Food-borne Pathogens". *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), pp. 1519–1531. DOI:10.1080/10408398.2013.775567

VINAYAKA, A. C., NGO, T. A., KANT, K., ENGELSMANN, P., DAVE, V. P., SHAHBAZI, M. A., Y BANG, D. D. (2019). "Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR". *Biosensors and Bioelectronics*, 129, pp.224-230. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.078

WANG, X., YING, S., WEI, X., Y YUAN, J. (2017). "Development of a gold nanoparticle-based universal oligonucleotide microarray for multiplex and low-cost detection of foodborne pathogens". *International journal of food microbiology*, 253, pp.66–74. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.005

WEI, S., DALIRI, E. B. M., CHELLIAH, R., PARK, B. J., LIM, J. S., BAEK, M. A., ... Y OH, D. H. (2019). "Development of a multiplex real-time PCR for simultaneous detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in food samples". *Journal of Food Safety*, 39(1). DOI:10.1111/jfs.12558

YAMAGUCHI, NOBUYASU & KITAGUCHI, AKIKO Y NASU, MASAO. (2012). "Selective enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* in milk within 7 h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation". *Journal of bioscience and bioengineering*. 113. pp.746-50. DOI:10.1016/j.jbiosc.2012.01.009.

ZHANG, G. (2013): "Foodborne pathogenic bacteria detection: an evaluation of current and developing methods". *The Meducator*, 1(24).

ZHAO, X., LIN, C. W., WANG, J., Y OH, D. H. (2014): "Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens". *Journal of microbiology and biotechnology*, 24(3), pp. 297–312. DOI:10.4014/jmb.1310.10013

ZHU, L., HE, J., CAO, X., HUANG, K., LUO, Y., Y XU, W. (2016): "Development of a double-antibody sandwich ELISA for rapid detection of *Bacillus Cereus* in food". *Scientific Reports*, 6(1), pp. 1-10. DOI:10.1038/srep16092