



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

NUEVAS TECNOLOGÍAS EN DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Alumno/a: Quirantes Álvarez, Carmen

Tutor/a: María José Grande Burgos

Dpto.: Ciencias de la Salud

Julio 2021

Índice

1. RESUMEN.....	pág. 8
2. INTRODUCCIÓN.....	pág. 10
2.1. DEFINICIONES.....	pág. 10
2.2. ¿QUIÉN SE ENCARGA DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA A NIVEL NACIONAL E INTERNACIONAL?	
pág. 12	
2.3. CONTEXTO	
HISTÓRICO	pág. 13
3. PLANIFICACIÓN DE LA ELABORACIÓN DEL TFM.....	pág. 15
4. OBJETIVO.....	pág. 16
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	pág. 16
6. PRINCIPIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO Y LA APLICACIÓN DE CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS.....	pág. 17
6.1. COMPONENTES DE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS.....	pág.18
6.2. FINES Y APLICACIÓN DE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS.....	pág.19
6.2.1. Aplicación por parte de los organismos de reglamentación.....	Pág. 19
6.2.2. Aplicación por parte de los empresarios del sector alimentario.....	pág. 20
6.3. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS PRINCIPIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO Y LA APLICACIÓN DE CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS	pág. 20
6.4. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LOS CRITERIOS.....	Pág.21
6.4.1. Microorganismos, parásitos y sus toxinas/metabolitos que revisten importancia en un determinado alimento.....	pág. 21
6.4.2. Métodos microbiológicos.....	pág. 22
6.4.3. Límites microbiológicos.....	pág.22
6.5. PLANES DE MUESTREO, MÉTODOS Y MANIPULACIÓN	pág. 23
6.6. PRESENTACIÓN DE INFORMES.....	pág.24
7. TÉCNICAS GENERALES DISPONIBLES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR LOS ALIMENTOS.....	pág. 24
7.1. DETECCIÓN TEMPRANA.....	pág. 25
7.2. BACTERIAS INDICADORAS FECALES.....	pág. 26
7.3. SEGUIMIENTO DE FUENTES MICROBIANAS.....	pág. 26
7.4. MÉTODOS PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE PATÓGENOS.....	pág. 27

7.4.1.	PCR	pág. 27
7.5.	RECuento Y CULTIVO DE COLONIAS.....	pág. 30
7.5.1.	Ventajas y limitaciones de los métodos de cultivo clásicos.....	pág. 33
7.6.	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	pág. 34
7.7.	TABLA RESUMEN DE LAS VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS GENERALES DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS.....	pág. 37
8.	MÉTODOS INMUNOLÓGICOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE BACTERIAS EN AGUA.....	pág. 39
8.1.	MÉTODOS DE INMUNOENSAYO.....	pág. 41
8.1.1.	Métodos de interacción primaria.....	pág. 41
8.1.1.1.	ENZIMOINMUNOENSAYOS.....	pág. 41
8.1.1.1.1.	Determinación de antígenos por ELISA.....	pág. 42
8.1.1.2.	INMUNOFLUORESCENCIA.....	pág. 43
8.1.2.	Métodos de interacción secundaria.....	pág. 43
8.1.2.1.	MÉTODO POR PRECIPITACIÓN.....	pág. 43
8.1.2.2.	MÉTODO POR AGLUTINACIÓN.....	pág. 44
9.	AUTOMATIZACIÓN EN IDENTIFICACIÓN MICROBIANA Y ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD.....	pág. 44
10.	AVANCES EN MÉTODOS DE DETECCIÓN RÁPIDA DE PATOGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS.....	pág. 48
10.1.	MÉTODOS BASADOS EN INMUNOLOGÍA.....	pág. 49
10.2.	MÉTODOS BASADOS EN SEÑALES: BIOSENSORES EN LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS.....	pág. 50
10.2.1.	Biorreceptor.....	pág. 50
10.2.2.	Transductores.....	pág. 53
10.3.	MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR.....	pág. 53
10.3.1.	PCR de punto final.....	pág. 56
10.3.1.1.	PCR SIMPLE.....	pág. 56
10.3.1.2.	PCR MULTIPLEX.....	pág. 57
10.3.2.	PCR de tiempo real.....	pág. 58
10.4.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	pág. 59
11.	TÉCNICAS AVANZADAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR LOS ALIMENTOS.....	pág. 61
11.1.	RETOS ACTUALES.....	pág. 62

11.2.	AVANCES RECIENTES EN MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN ÁCIDOS NUCLEICOS	
		pág. 62
11.2.1.	Tecnología de amplificación	pág. 62
11.2.1.1.	AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA	pág. 64
11.2.1.2.	AMPLIFICACIÓN BASADA EN SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	pág. 65
11.2.1.3.	AMPLIFICACIÓN DE DESPLAZAMIENTO DE HEBRA	pág. 65
11.2.1.4.	AMPLIFICACIÓN DE CÍRCULO RODANTE	pág. 65
11.3.	MÉTODOS AVANZADOS DE BASADOS EN PCR	pág. 66
11.3.1.	PCR digital de gotas	pág. 66
11.3.2.	Extreme PCR	pág. 68
11.3.3.	PCR-fría	pág. 68
11.3.4.	HPE-PCR	pág. 69
11.3.5.	PCR de nanopartículas	pág. 69
11.3.6.	RT-PCR	pág. 70
11.3.7.	PCR de reacción de cadena ligasa	pág. 70
11.3.8.	PCR de detección de ligasa	pág. 71
11.3.9.	PCR de cebador específico único de baja rigurosidad	pág. 71
11.3.10.	PCR de polimorfismo de conformación monocatenario	pág. 72
11.4.	MICROARRAYS-DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR MÚLTIPLES OBJETIVOS	pág. 73
12.	CONCLUSIÓN	pág. 75
13.	BIBLIOGRAFÍA	pág. 76

Índice de tablas, figuras e imágenes

❖ TABLAS

- **TABLA 1 – VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS GENERALES DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS. ELABORACIÓN PROPIA.....PÁG. 38**
- **TABLA 2 – SISTEMAS PARA IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....PÁG. 46**
- **TABLA 3 – DIFERENTES BIOSENSORES DE BASE ÓPTICA PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS.....PÁG. 53**
- **TABLA 4 – DIFERENTES BIOSENSORES DE BASE ELECTROQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS.....PÁG. 54**

❖ FIGURAS

- **FIGURA 1 – PLANIFICACIÓN DE LA ELABORACIÓN DE FIN DE MÁSTER. ELABORACIÓN PROPIA.....PÁG. 15**
- **FIGURA 2– CRITERIOS DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA. ELABORACIÓN PROPIA.....PÁG. 17**
- **FIGURA 3– DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO. ELABORACIÓN PROPIA.....PÁG. 34**

❖ IMÁGENES

- **IMAGEN 1- REPRESENTACIÓN DE UN CICLO DE PCR.....PÁG. 28**
- **IMAGEN 2 -TÉCNICA DE CULTIVO Y PLACA DE S.AUREUS.....PÁG. 30**
- **IMAGEN 3 - MÉTODO DE CITOMETRÍA DE FLUJO: DETECCIÓN DE CÉLULAS INDIVIDUALES MEDIANTE ÓPTICA Y MARCADORES FLUORESCENTES.....PÁG. 35**
- **IMAGEN 4 – REPRESENTACIÓN DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE LA TÉCNICA ELISA.....PÁG. 42**
- **IMAGEN 5 - METODOLOGÍA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI-TOF)PÁG. 47**
- **IMAGEN 6 – ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE PRODUCTOS DE PCR MULTIPLEX.....PÁG.58**
- **IMAGEN 7- REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS CEBADORES USADOS EN LAMP..... PÁG. 64**
- **IMAGEN 8 – PRINCIPIO DE dPCR.....PÁG. 67**
- **IMAGEN 9 – FLUJO DE TRABAJO DE VARIAS PLATAFORMAS DE PCR.....PÁG. 67**
- **IMAGEN 10 – ESQUEMA PROTOCOLO PCR-FRÍA.....PÁG.69**
- **IMAGEN 11 – ESQUEMA DE UN PROCESO TÍPICO DE SELECCIÓN DE CARACTERÍSTICAS EN DATOS DE MICROARRAYS DE ADN.....PÁG. 74**

1. RESUMEN

Los análisis de alimentos son la herramienta perfecta para evitar infecciones e intoxicaciones alimentarias, que tan malas consecuencias pueden acarrear. Se trata de garantizar los mejores controles de calidad a los productos de la industria alimentaria.

Los laboratorios de análisis de alimentos deben tomar muestras, investigando desde superficies, manipuladores, materia prima y producto terminado, que, posteriormente son trasladadas al laboratorio para su análisis.

Conocer más en profundidad las sustancias que conforman los alimentos es algo que se ha intentado saber desde tiempos remotos. Para ello se empezaron a utilizar métodos de análisis rudimentarios que facilitaban la información básica acerca de los componentes. Más tarde, con el desarrollo de técnicas mucho más sofisticadas, hemos sido capaces de detectar y cuantificar sustancias en cantidades muy pequeñas.

Y actualmente, se sigue investigando y desarrollando el uso de nuevas tecnologías que sean más precisas, más rápidas y más eficaces que las actuales, ya que, reducir el tiempo necesario para completar las pruebas de detección de patógenos ha sido el principal objetivo de los microbiólogos de alimentos.

Abstract:

Food analysis is the perfect tool to avoid infections and food poisoning, which can have such bad consequences. It is about guaranteeing the best quality controls for the products of the food industry.

Food analysis laboratories must take samples, investigating from surfaces, manipulators, raw material and finished product, which are later transferred to the laboratory for analysis.

Knowing more about the substances that make up food is something that has been tried to know since ancient times. For this, rudimentary analysis methods were used that provided basic information about the components. Later, with the development of much more sophisticated techniques, we have been able to detect and quantify substances in very small amounts.

And currently, the use of new technologies that are more accurate, faster and more effective than the current ones is still being investigated and developed, since reducing the time necessary to complete the pathogen detection tests has been the main objective of food microbiologists.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 DEFINICIONES

Reglamento (CE) n o 2073/2005 n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (<<DOUE>> núm.338, de 22 de diciembre de 2005; Referencia: DOUE-L-2005-82539.

- **Alimento:** En términos del Codex Alimentarius¹, es toda sustancia elaborada, semielaborada o natural, que se destina al consumo humano, incluyendo las bebidas, el chicle y cualquiera otra sustancia que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos, pero no incluye los cosméticos ni el tabaco ni las sustancias utilizadas solo como medicamentos.

- **Inocuidad de Alimentos:** De acuerdo a lo establecido por el Codex Alimentarius es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine. Los alimentos son la fuente principal de exposición a agentes patógenos, tanto químicos como biológicos (virus, parásitos y bacterias), a los cuales nadie es inmune, ni en los países en desarrollo ni en los desarrollados. Cuando son contaminados en niveles inadmisibles de agentes patógenos y contaminantes químicos o con otras características peligrosas, conllevan riesgos sustanciales para la salud de los consumidores y representan grandes cargas económicas para las diversas comunidades y naciones. La temática de inocuidad es muy amplia, se refiere también a los contaminantes químicos presentes en los alimentos, alimentos producidos por los modernos medios biotecnológicos, evaluación de riesgos microbiológicos, y publicaciones y documentos.

¹ Codex Alimentarius o “Código Alimentario”: conjunto de normas, directrices y códigos de prácticas aprobados por la Comisión del Codex Alimentarius

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

- **Intoxicaciones alimentarias:** Son las ETA² producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de metabolitos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo.
- **Microbiología:** Ciencia que estudia los microorganismos.
- **Microorganismos:** Son organismos vivos, como las bacterias, los virus, los hongos, los mohos, las algas, los protozoos parásitos, los helmintos parásitos microscópicos y sus toxinas y metabolitos.
- **Criterio microbiológico:** criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote.
- **Criterio de seguridad alimentaria:** criterio que define la aceptabilidad de un producto o un lote de productos alimenticios y es aplicable a los productos comercializados.
- **Muestra:** conjunto compuesto de una o varias unidades, o una porción de materia, seleccionada por diversos medios en una población o en una cantidad importante de materia y destinada a proporcionar información sobre una característica dada de la población o la materia estudiada y a servir de base para una decisión relativa a la población o la materia en cuestión, o al proceso que la ha producido.
- **Muestra representativa:** muestra en la que se mantienen las características del lote del que se ha obtenido; se trata, en particular, de una muestra aleatoria simple en la que cada uno de los elementos o incrementos del lote ha tenido las mismas probabilidades de ser incluido en ella.

² ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

- **Cumplimiento de los criterios microbiológicos:** la obtención de resultados satisfactorios o aceptables al efectuar pruebas comparando con los valores fijados para los criterios, mediante la toma de muestras, la realización de análisis y la aplicación de acciones correctoras, de conformidad con la legislación alimentaria y las instrucciones de la autoridad competente.

- **Microbiología alimentaria:** Según SEM³, la microbiología de los alimentos constituye temas de interés de todos los aspectos de tipo científico, metodológico, normativo, académico, incluso comercial o laboral, vinculado con los alimentos, en los que su objetivo esté relacionado con microorganismos patógenos o toxigénicos, alterantes, de utilidad por su potencial tecnológico o sanitario.

- **Seguridad alimentaria:** Según la FAO⁴ la Seguridad Alimentaria se da cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficiente alimento, seguro, y nutritivo, para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias, con el objeto de llevar una vida activa y sana.

2.2. ¿QUIÉN SE ENCARGA DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA A NIVEL NACIONAL E INTERNACIONAL?:

- **A nivel nacional,** AESAN⁵ integra y desempeña, en el marco competencial de la Administración General del Estado, las funciones relacionadas con la seguridad alimentaria y la nutrición saludable.

Sus objetivos fundamentales son:

- Promover la seguridad alimentaria, ofreciendo garantías e información objetiva a los consumidores y agentes económicos del sector agroalimentario español.

³ SEM: Sociedad Española de Microbiología

⁴ FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

⁵ AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

- Planificar, coordinar y desarrollar estrategias y actuaciones que fomenten la información, educación y promoción de la salud en el ámbito de la nutrición, y en particular, en la prevención de la obesidad
- **A nivel internacional**, La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA⁶ ofrece asesoramiento científico para proteger a los consumidores, los animales y el medio ambiente de los riesgos relacionados con los alimentos.

2.3. CONTEXTO HISTÓRICO

La Seguridad Alimentaria es un concepto que ha ido evolucionando a lo largo del tiempo. En los años 70 se identificaba con **manejos de stocks** y existencia de alimentos. En esos momentos, la FAO recomendaba que, para hacer frente a una emergencia, se debía tener 3 meses de consumo de existencias de los productos alimenticios básicos.

En los años 80, el concepto de Seguridad Alimentaria se enfocaba a **la autosuficiencia**, se pensaba que un país tenía seguridad alimentaria cuando podía producir todo lo que consumía. Si el país consumía todo lo que producía se protegía de la fluctuación de precios y escasez.

En los años 90, después de la **liberalización de los mercados**, se asume que el problema no es solamente de disponibilidad de alimentos, es decir, puede haber abundancia de alimentos y, sin embargo, problemas de acceso a los mismos. Así, en esta década se pone el énfasis en los **problemas de acceso** de los hogares porque, aunque un país tenga una alta producción su población puede padecer problemas de seguridad alimentaria y nutrición.

De esta manera se ha llegado a un concepto amplio de seguridad alimentaria que tiene 4 pilares: **la disponibilidad, la estabilidad, el acceso y la utilización**. (Liliana Balbi, 2021) Hoy en día, los consumidores no solo exigen alimentos seguros, económicos, sabrosos y saludables, también esperan bienestar animal y seguridad ambiental. La seguridad alimentaria es un problema de salud mundial, ya que las enfermedades transmitidas por los alimentos presentan un problema de salud pública generalizado y creciente tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo.

⁶ EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Para la prevención y el reconocimiento de problemas relacionados con la salud y la seguridad, la detección de patógenos transmitidos por los alimentos es de suma importancia en todos los niveles de la cadena de producción alimentaria. La aplicación de procedimientos previos a la seguridad alimentaria junto con un estricto seguimiento y contención en varias etapas posteriores al procesamiento, almacenamiento y distribución han reducido notablemente la carga de patógenos transmitidos por los alimentos en los seres humanos.

Generalmente, el recuento y aislamiento de patógenos transmitidos por los alimentos se realiza utilizando métodos dependientes del cultivo. Estos métodos son sensibles, económicos y proporcionan una evaluación tanto cualitativa como cuantitativa de los microorganismos presentes en una muestra, pero requieren mucho tiempo y son laboriosos. Esto hace que se perciban como insuficientes para satisfacer las demandas de las pruebas rápidas de alimentos. Por ello, durante varias décadas, una gran cantidad de investigación se ha dirigido al desarrollo de una metodología rápida, ya que reducir el tiempo necesario para completar las pruebas de detección de patógenos ha sido el principal objetivo de los microbiólogos de alimentos.

(Valderrama et al., 2016).

Debido a todo esto, en los laboratorios los métodos convencionales de hoy en día son reemplazados por métodos avanzados que permiten la detección de patógenos alimentarios en un periodo de tiempo más corto. Podríamos clasificar estos métodos en tres categorías: métodos basados en inmunología, ensayos basados en ácidos nucleicos y biosensores.

Algunos de los métodos avanzados que se explicarán más adelante son los siguientes:

- Biosensores
- Pruebas basadas en ácidos nucleicos (NAT)
- Técnicas basadas en PCR
- Inmunoensayo enzimático
- Microarrays

Son formas más efectivas de controlar y prevenir las infecciones humanas transmitidas por los alimentos.

3. PLANIFICACIÓN DE LA ELABORACIÓN DEL TFM

Este trabajo trata una línea de investigación científica sobre la rama de diagnóstico microbiológico, destacándose en primer lugar el interés que conlleva este tema en la actualidad y en segundo lugar la necesidad de desarrollar nuevos métodos de identificación de patógenos donde actualmente la metodología convencional invierte demasiado tiempo en la obtención de resultados.

Debido a la situación actual durante este curso, el trabajo ha sido realizado de manera bibliográfica , recopilándose la máxima información para contextualizar y elaborar un Trabajo fin de Máster respecto a este tema.

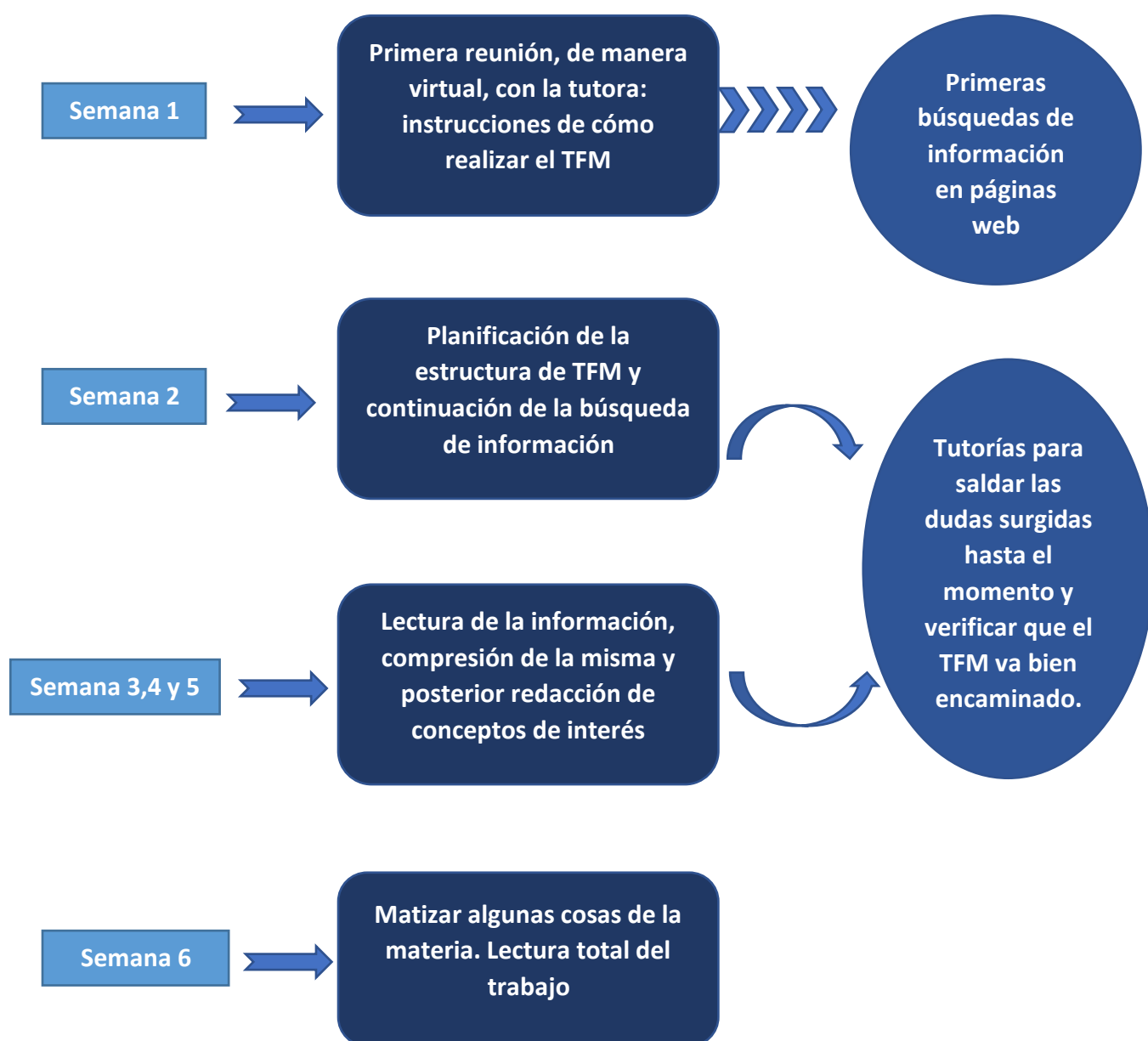


Figura 1 – Planificación de la elaboración fin de master. Elaboración propia

4. OBJETIVOS

Los objetivos generales del presente trabajo son:

- Conocer la importancia sobre la necesidad de la elaboración de nuevas técnicas para el diagnóstico de patógenos
- Conocer y resumir los principios para el establecimiento y aplicación de criterios microbiológicos para alimentos
- Realizar una revisión bibliográfica sobre las nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico
- Clasificarlas según el ámbito de aplicación o técnica utilizada

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se construye a través de un estudio bibliográfico, que al tratarse de metodología de laboratorio tiene importancia tanto a nivel nacional como internacional.

El material dispuesto para realizar dicho trabajo ha sido en su mayoría digital (páginas web), sobre todo las páginas de bases de datos como Pubmed o NCBI, y páginas oficiales como FAO, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Algunas de las palabras claves para buscar información han sido: Diagnóstico de Laboratorio, Microbiología, Automatización, Identificación microbiana, estudios de susceptibilidad.

➤ Criterios para la selección bibliográfica de los documentos:

❖ Criterios de inclusión:

- Artículos que reflejen datos científicos de interés
- Que proporcionen una información fiable, es decir, webs oficiales, que por consiguiente contienen información actualizada
- Que no se distancien mucho en el tiempo para corroborar que la información es actual y válida

❖ **Criterios de exclusión:**

- Artículos que se distancian mucho en el tiempo y no están actualizados.
- Páginas web poco fiables o no apoyadas por la ciencia, debido a que podrían contener conceptos erróneos o sin criterio científico.

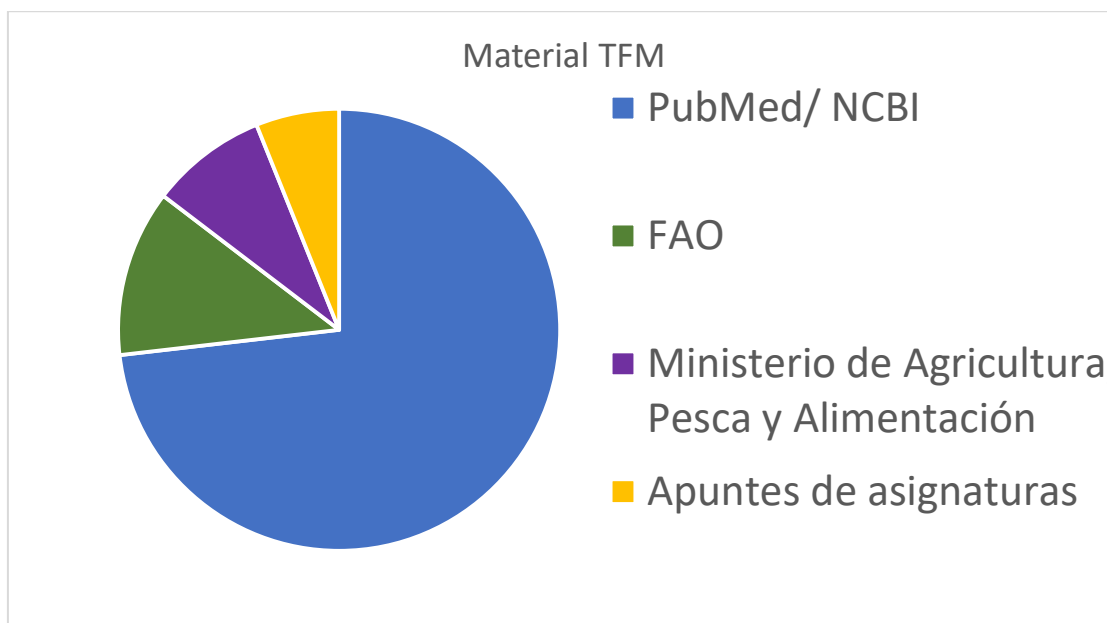


Figura 2- Criterios de búsqueda bibliográfica. Elaboración propia

6. PRINCIPIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO Y LA APLICACIÓN DE CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS

Estos principios se han establecido para ofrecer una directriz sobre el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos a los alimentos en cualquier punto de la cadena alimentaria desde la producción primaria hasta el consumo final.

La inocuidad de los alimentos se asegura principalmente mediante el control en el punto de origen, el control de la planificación y formulación del producto y la aplicación de buenas prácticas de higiene durante la producción, la elaboración (incluido el etiquetado), la manipulación, la distribución, el almacenamiento, la venta, la preparación y el uso, junto con la aplicación del Sistema de HACCP ⁷.

⁷ HACCP o APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

Los criterios microbiológicos deben establecerse de conformidad con estos principios y basarse en análisis y asesoramiento científicos y, cuando se disponga de datos suficientes, en un análisis de riesgos adecuado para el producto alimenticio y su uso. Además, tienen que elaborarse de forma transparente, cumpliendo con los requisitos necesarios para un comercio equitativo, y revisarse periódicamente para comprobar su utilidad frente a nuevos gérmenes patógenos, tecnología en evolución y nuevos conocimientos científicos.

6.1. COMPONENTES DE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS

Un criterio microbiológico consta de:

- Una descripción de los microorganismos que suscitan preocupación y/o de sus toxinas/metabolitos y el motivo de dicha preocupación
- Los métodos analíticos para su detección y/o cuantificación
- Un plan que defina el número de muestras de campo que hay que tomar y la magnitud de la unidad analítica
- Los límites microbiológicos que se consideran apropiados para el alimento en el punto o puntos especificados de la cadena alimentaria
- El número de unidades analíticas que deben ajustarse a esos límites.

Un criterio microbiológico debe indicar también:

- El alimento al que se aplica el criterio.
- El punto o los puntos de la cadena alimentaria en que se aplica el criterio.
- Toda medida que deba adoptarse cuando no se cumple con dicho criterio.
- Al aplicar un criterio microbiológico a la evaluación de los productos, para que puedan aprovecharse de la mejor manera posible el dinero y la mano de obra, es esencial que se apliquen sólo ensayos apropiados a los alimentos y los puntos de la cadena alimentaria que ofrecen los mayores beneficios en relación con la posibilidad de proporcionar al consumidor un alimento inocuo y apto para el consumo. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.2. FINES Y APLICACIÓN DE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS

Los criterios microbiológicos pueden utilizarse para formular requisitos de diseño y para indicar, según proceda, el estado microbiológico requerido de las materias primas, los ingredientes y los productos terminados en cualquier fase de la cadena alimentaria. Los criterios pueden resultar importantes para examinar los alimentos, en caso de que las materias primas y los ingredientes sean de origen desconocido o poco seguro, o bien cuando no se disponga de otros medios para comprobar la eficacia de los sistemas basados en el sistema de HACCP y de las buenas prácticas de higiene. Por lo general, los criterios microbiológicos pueden ser aplicados por los organismos de reglamentación y/o los empresarios del sector alimentario para definir la distinción entre la aceptabilidad y la inaceptabilidad de materias primas, ingredientes, productos, lotes. Los criterios microbiológicos también pueden utilizarse para determinar si los procesos se ajustan a los Principios Generales de Higiene de los Alimentos. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6. 2.1 Aplicación por parte de los organismos de reglamentación

Los criterios microbiológicos pueden utilizarse para definir y comprobar que se cumpla con los requisitos microbiológicos.

Los criterios microbiológicos obligatorios deberán aplicarse a los productos y/o puntos de la cadena alimentaria para los cuales no se disponga de ningún instrumento más eficaz, y a los casos en que se prevea que estos instrumentos pueden aumentar el nivel de protección que se le ofrece al consumidor. Cuando se consideren apropiados, deberán ajustarse a las condiciones específicas del producto y aplicarse sólo al punto de la cadena alimentaria especificado en el reglamento.

En las situaciones en las que no se cumpla con los criterios microbiológicos, según la evaluación del riesgo a que esté expuesto el consumidor, el punto de la cadena alimentaria y el tipo de producto especificado, es posible que las medidas de control reglamentarias que haya que tomar consistan en seleccionar, reelaborar, rechazar o

destruir el producto y/o hacer una nueva investigación para determinar las medidas que han de adoptarse. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.2.2 Aplicación por parte de los empresarios del sector alimentario

Los empresarios del sector alimentario podrán utilizar los criterios microbiológicos no sólo para comprobar que se ajusten a las disposiciones reglamentarias sino también para formular requisitos de diseño y examinar los productos terminados, siendo ésta una de las medidas que permite comprobar y/o validar la eficacia del sistema de HACCP.

Estos criterios deberán ajustarse concretamente al producto y a la fase de la cadena alimentaria a la que se aplicarán. Puede que resulten más rigurosos que los criterios aplicados para fines reglamentarios, por lo que no deberán utilizarse, como tales, para que se adopten medidas de carácter jurídico. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.3. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS PRINCIPIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO Y LA APLICACIÓN DE CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

Deberá establecerse y aplicarse un criterio microbiológico sólo cuando haya una necesidad concreta y cuando su aplicación resulte práctica. Esa necesidad se demostrará, por ejemplo, a través de datos epidemiológicos que indiquen que el alimento examinado puede representar un peligro para la salud humana, y que un criterio resulta significativo para la protección del consumidor, o como resultado de una evaluación de riesgos. El criterio debe poder conseguirse técnicamente aplicando buenas prácticas de fabricación (códigos de prácticas).

Para lograr las finalidades de un criterio microbiológico, es preciso tener en cuenta:

- Las pruebas de los peligros reales o posibles a que está expuesto el consumidor
- El estado microbiológico de la materia o las materias primas;
- El efecto de la elaboración sobre el estado microbiológico del alimento;
- La probabilidad y consecuencias de una contaminación microbiana y/o de su aumento en las operaciones sucesivas de manipulación, almacenamiento y uso;
- La categoría o categorías de consumidores interesados;

- La relación costos/beneficios asociada a la aplicación del criterio; y
- El uso previsto del alimento.

El número y la magnitud de unidades analíticas examinadas por cada lote sometido a ensayo deberán corresponder a lo establecido en el plan de muestreo y no deberán modificarse. Sin embargo, el lote no deberá someterse a repetidos análisis con el fin de lograr su conformidad. ((Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.4. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LOS CRITERIOS

6.4.1. Microorganismos, parásitos y sus toxinas/metabolitos que revisten importancia en un determinado alimento

A los efectos del presente documento se incluyen los siguientes:

- bacterias, virus, levaduras, mohos y algas;
- protozoos y helmintos parásitos;
- sus toxinas/metabolitos.

Los microorganismos incluidos en un criterio deberán considerarse en general importantes –como patógenos, organismos indicadores o bien organismos de deterioro– para el alimento y la tecnología en cuestión. No deberán incluirse en el criterio los organismos cuya importancia en un alimento especificado sea dudosa.

El mero descubrimiento, mediante una prueba de presencia-ausencia, de determinados organismos de los que se sabe que provocan enfermedades transmitidas por los alimentos (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*) no constituye necesariamente una indicación de una amenaza para la salud pública.

En caso de que los gérmenes patógenos puedan detectarse de manera directa y segura, deberá examinarse la posibilidad de realizar ensayos para detectar los gérmenes en lugar de realizar ensayos para detectar los organismos indicadores. Si se aplica un ensayo para un indicador, deberá declararse expresamente si el ensayo se utiliza para señalar prácticas de higiene poco satisfactorias o bien un peligro para la salud. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.4.2 Métodos microbiológicos

En la medida de lo posible, deberán aplicarse solamente métodos cuya fiabilidad (precisión, reproducibilidad, variación entre laboratorios y dentro de ellos) se haya establecido estadísticamente en base a estudios comparativos o realizados en colaboración entre varios laboratorios. Además, deberá darse preferencia a los métodos que se hayan validado para el producto en cuestión, preferentemente con relación a los métodos de referencia elaborados por organismos internacionales. Si bien los métodos deberán ser lo más sensibles y reproducibles posible para que puedan obtenerse los efectos que se persiguen, los métodos que han de utilizarse para llevar a cabo ensayos en las fábricas, a menudo la sensibilidad y reproducibilidad podrán sacrificarse hasta cierta medida en aras de la rapidez y la sencillez. No obstante, deberá haberse demostrado que dichos métodos dan una evaluación suficientemente fiable de la información que se requiere.

Los métodos que se aplican para determinar la idoneidad para el consumo de alimentos altamente perecederos, o de alimentos con una breve duración en almacén, deberán elegirse, en lo posible, de tal forma que los resultados de los exámenes microbiológicos puedan obtenerse antes de que los alimentos se consuman o lleguen a superar su duración en almacén.

Los métodos microbiológicos especificados deberán ser razonables en lo que atañe a la complejidad, disponibilidad de medios, equipo, etc., facilidad de interpretación, tiempo requerido y costos. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.4.3 Límites microbiológicos

Los límites que se establezcan en los criterios deberán basarse en datos microbiológicos apropiados para el alimento y ser aplicables a una gama de productos análogos. Por lo tanto, tendrán que basarse en datos recopilados en distintos establecimientos de producción que trabajan conforme a las buenas prácticas de higiene y aplican el sistema de HACCP.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Al establecer límites microbiológicos, hay que tener presente todo cambio que pueda ocurrir en la microflora durante el almacenamiento y la distribución (por ejemplo, disminución o aumento de la cantidad).

Los límites microbiológicos se establecerán teniendo en cuenta los riesgos relacionados con los microorganismos, así como las condiciones en las que se prevé que el alimento será manipulado y consumido. Los límites microbiológicos deberán tener en cuenta también la probabilidad de que se registre una distribución desigual de microorganismos en el alimento, así como la variabilidad propia del procedimiento analítico.

Si el criterio requiere la ausencia de un determinado microorganismo, deberán indicarse el tamaño y número de la unidad analítica (así como el número de unidades de la muestra analítica). (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.5. PLANES DE MUESTREO, MÉTODOS Y MANIPULACIÓN

Todo plan de muestreo incluye un procedimiento de muestreo y los criterios decisorios que han de aplicarse al lote, basándose en el examen del número prescrito de unidades de la muestra y de las unidades analíticas subsiguientes del tamaño indicado en los métodos determinados. Un plan de muestreo adecuadamente diseñado define la probabilidad de detección de microorganismos en un lote, pero debe tenerse presente que ningún plan de muestreo puede asegurar la ausencia de un determinado organismo. Los planes de muestreo deberán ser administrativa y económicamente factibles.

En particular, la selección de planes de muestreo deberá tener en cuenta:

- Los riesgos para la salud pública asociados con el peligro;
- La susceptibilidad del grupo de consumidores destinatario;
- La heterogeneidad de distribución de los microorganismos cuando se utilizan planes de muestreo con variables; y
- El nivel de calidad aceptable y la probabilidad estadística deseada de que se acepte un lote que no cumple con los requisitos.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Las características estadísticas de rendimiento o la curva de las características operativas deberán indicarse en el plan de muestreo. Las características de rendimiento ofrecen información específica para estimar la probabilidad de aceptación de un lote que no cumple con los requisitos. El método de muestreo deberá definirse en el plan de muestreo. El tiempo que transcurra entre la toma de las muestras de campo y su análisis deberá ser lo más breve razonablemente posible y, durante el transporte al laboratorio, las condiciones (como, por ejemplo, la temperatura) no deberán permitir que aumente o disminuya la cantidad del organismo de que se trata, de forma que los resultados reflejen –dentro de las limitaciones establecidas en el plan de muestreo– las condiciones microbiológicas del lote. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

6.6. PRESENTACIÓN DE INFORMES

El informe sobre los ensayos deberá contener la información necesaria para una identificación completa de la muestra, el plan de muestreo, el método de ensayo, los resultados y, de ser apropiado, una interpretación de la misma. (Reglamento (CE) nº 2073/2005)

7. TÉCNICAS GENERALES DISPONIBLES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR LOS ALIMENTOS

La prueba y la detección rápida de organismos patógenos es un protocolo crucial en la prevención e identificación de crisis relacionados con la salud, la seguridad y el bienestar. La detección de patógenos se ha convertido en uno de los aspectos más desafiantes en las industrias de alimentos y agua, debido a la rápida propagación de enfermedades transmitidas por los alimentos en la comunidad y a costos significativos. Con la perspectiva de una población de inevitable crecimiento las pruebas se convertirán en un requisito para controlar y prevenir posibles brotes de enfermedades potencialmente mortales. La legislación es muy rigurosa en la industria alimentaria, donde la falta de detección de materiales patógenos representa un evento catastrófico principalmente para los tipos de población de edad avanzada, muy jóvenes o inmunodeprimidos. A pesar de la necesidad de pruebas analíticas rápidas, los ensayos estándar convencionales de detección de bacterias requieren hasta 7 días para obtener un resultado. (Rajapaksha et al., 2019)

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Los microorganismos pueden evolucionar rápidamente porque tienen la capacidad de adaptarse y crecer en condiciones adversas tales como altas o bajas temperaturas, pH ácido o básico, diferentes presiones y un amplio rango de salinidades. Ante esto, las medidas de control y la metodología de muestreo que normalmente se utilizan no son lo suficientemente adecuadas para mantener un control de las infecciones. Esto supone un contratiempo ya que la detección temprana de patógenos es importante para el diagnóstico y prevención de enfermedades.

En este apartado se pretende ofrecer una descripción general de la detección de microorganismos patógenos a partir de ensayos convencionales de laboratorio.

7.1. DETECCIÓN TEMPRANA

El seguimiento es el principal punto de control en la prevención de enfermedades causadas por microorganismos patógenos. Los métodos de detección son necesarios y se han realizado a lo largo de los siglos mediante el uso de convenciones todos los métodos microbiológicos. Estos métodos estándar han sido una práctica común durante casi un siglo y continúan ya que se pueden utilizar fácilmente.

Los métodos de detección temprana se basan casi exclusivamente en el uso de agar específico, medios para aislar, cultivar y enumerar células viables en muestras.

El procedimiento de muestreo estándar generalmente incluye el cultivo y aislamiento del patógeno, seguido de su confirmación posterior mediante pruebas bioquímicas y serológicas. A veces tarda de cinco a siete días en obtener una confirmación de resultado para un organismo particular. (Rajapaksha et al., 2019)

Para controlar la calidad de agua se hace una enumeración de bacterias indicadores fecales, entre ellas se encuentran los coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, enterococos y esporas. A estos organismos se les llama <<marcadores>> ya que se utilizan para medir la probabilidad de estar presentes en el agua, lo cual indicaría contaminación fecal. Además, algunos organismos como los virus, protozoos y algunas bacterias tienen una alta supervivencia en cuanto a los indicadores bacterianos focales en ambientes acuáticos. Esto es debido al pastoreo de protozoos y a la pérdida de capacidad de cultivo cuando sufren variaciones de tensiones ambientales.

7.2 BACTERIAS INDICADORAS FECALES

Debido a las limitaciones del monitoreo directo de patógenos, es una práctica estándar monitorear las bacterias indicadoras fecales (FIB). La epidemiología ya ha establecido un conjunto de estándares de salud humana basados en los límites de exposición a FIB en la bebida, actividades recreativas, acuiculturas y aguas residuales. Se cree que la amenaza más grave para la salud humana es la naturaleza humana, no los animales, y por lo tanto la mayor parte del énfasis y los resultados de la investigación se han derivado de la investigación sobre las aguas residuales humanas, donde algunos investigadores han comenzado estrategias para algunas de las especies contaminantes.

Cabe señalar que las bacterias indicadoras no indican fuentes de contaminación y, por lo tanto, la dificultad para identificar los marcadores de fuente puntual se hace evidente. Por lo tanto, el indicador fecal debe ser el que no reproduce externamente al animal huésped, donde tanto *E. coli* como los enterococos pueden sobrevivir, crecer y establecer poblaciones en ambientes naturales como suelos, sedimentos, agua dulce, etc.

Un indicador ideal debe estar correlacionado con la presencia de un patógeno y debería tener un perfil de supervivencia similar al del patógeno que se está tratando indicar. Por ejemplo, *E. coli* y enterococos no son bien correlacionados con *Salmonella spp.* La pobre correlación de indicadores bacterianos con virus es cada vez mayor preocupación debido a los atributos típicos de un virus: baja infección, dosis importante, vinculada a enfermedades agudas y crónicas e implicada en enfermedades asociadas al agua.

(Rajapaksha et al., 2019)

7.3 SEGUIMIENTO DE FUENTES MICROBIANAS (MST)

El establecimiento de las fuentes de contaminación fecal de los cuerpos de agua se ha denominado MST o rastreo de fuentes bacterias (BST). Sin embargo, los microbios que ocurren naturalmente son ubicados en las aguas superficiales con números típicos a una densidad promedio de 10⁶ células por ml. Y virus a una densidad aún mayor. Los métodos asociados con MST incluyen: métodos basados en cultivo e independientes de cultivo. Algunos de estos métodos descritos requieren una biblioteca o una base de datos acogida que se ha predeterminado mediante resultados basados en cultivos. La

identificación de la fuente de contaminación está determinada por una comparación entre las huellas dactilares del organismo de prueba en la base de datos de la biblioteca. Además, los métodos de la biblioteca y la base de datos incluyen típicamente una variedad de pruebas genotípicas y fenotípicas. (Rajapaksha et al., 2019)

7.4 MÉTODOS PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE PATÓGENOS

Los métodos más conocidos para confirmar la presencia de patógenos están basados en el recuento de cultivos y colonias, y en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Son métodos precisos tanto para selectividad como fiabilidad. Hay que destacar que la PCR requiere menos tiempo que los recuentos de cultivos y colonias, pero ambas técnicas proporcionan unos resultados concluyentes e irrefutables.

7.4.1 PCR

La PCR es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos desarrollada en los años 80 que se usa para identificar bacterias. Este método fue desarrollado para el aislamiento, amplificación y cuantificación de una secuencia de ADN corta e incluye el material genético de la bacteria diana.

Existen varios tipos de PCR desarrollados para la cuantificación de bacterias: PCR en tiempo real, PCR multiplex y PCR con transcriptasa inversa. Como se ha mencionado anteriormente, la PCR requiere mucho menos tiempo respecto a las técnicas convencionales de cultivo y placas, lo que le confiere una ventaja. El tiempo estimado suele ser entre 5 y 24 horas para producir un resultado, aunque este tiempo excluye etapas de enriquecimiento. El método de PCR es utilizado para amplificar un fragmento específico de ADN a partir de un complejo conjunto de ADN. Se necesita ADN molde, cebadores, nucleótidos (adenina, guanina, citosina y timina) y la enzima de ADN polimerasa termoestable.

La siguiente imagen ilustra conceptos básicos de la PCR mediante la cual procede a través de fases principales, desnaturalización, hibridación del cebador y extensión del cebador.

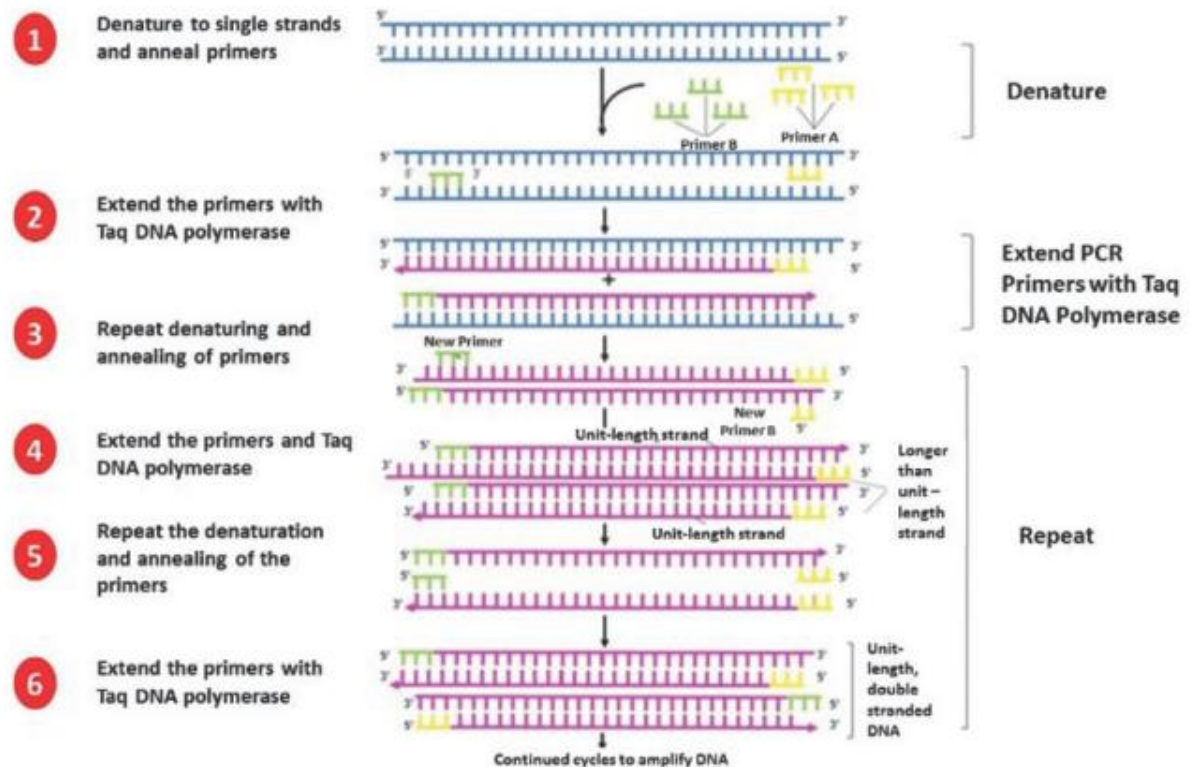


Imagen 1- representación de un ciclo de PCR.

(Rajapaksha et al., 2019)

Se realizan diferentes ciclos sintéticos y se aplica calor más allá del punto de fusión del ADN para desnaturalizar el ADN bicatenario objetivo. A continuación, el ADN se purifica seguido de una fase de extensión utilizando cebadores y una enzima de polimerización termoestable. Posteriormente, cada nuevo ADN bicatenario actúa como diana para un ciclo posterior, y, por lo tanto, se logra una amplificación exponencial. Los cebadores se extienden desde la dirección 5' a 3' mediante una enzima polimérica para superponer las copias de la plantilla original. La detección posterior de la secuencia amplificada se realiza mediante electroforesis en gel. De los métodos enumerados, la PCR múltiplex es el más útil. La PCR multiplex permite la detección simultánea de varios organismos mediante la introducción de diferentes cebadores para amplificar la región de ADN que codifica genes específicos de cada cepa bacteriana objetivo. En PCR en tiempo real se pueden obtener resultados más rápidos sin necesidad de manipular las etapas de reconocimiento. Los resultados de la PCR en tiempo real se obtienen mediante la

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

detección de la emisión de fluorescencia mediante un colorante específico que se adhiere al amplicón. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado y por lo tanto, es posible seguir esta respuesta en tiempo real eliminando los laboriosos procesos de post-amplificación como la electroforesis en gel ya mencionada.

Se obtuvieron muestras fecales de ganado y otros animales para el análisis y cuantificación de *E. coli* O157 con el desarrollo de un método relativamente sensible que utiliza PCR multiplex en tiempo real (qPCR). Este método se dirige esencialmente al gen del antígeno somático O157, junto con los genes de toxina Shiga producidos a partir de varias cepas patógenas de *E. coli*. Este método demostró ser una técnica eficaz, rápida y sensible al tiempo que redujo por completo el costo y el tiempo de detección.

La PCR se ha utilizado ampliamente en la detección de microorganismos patógenos debido a su precisión, rápida detección y sensibilidad. (Rajapaksha et al., 2019)

- **Limitaciones de la PCR:** Uno de los principales inconvenientes de la PCR es que no diferencia entre células viables y no viables. Esto es debido a que el ADN siempre está presente, aunque la célula esté muerta.

Es importante que la muestra esté libre de contaminación, ya que la PCR es muy sensible y si la contaminación de la muestra conduciría a resultados erróneos de ADN. Para diseñar los cebadores se necesitan datos de secuencia previa, esto deriva en que la técnica de PCR solo detecte ausencia o presencia de patógenos o genes conocidos. Existe otro problema, y es que los cebadores usados pueden aparearse con ADN similar y con el ADN diana lo que conllevaría a resultados engañosos. Además, la PCR puede incorporar nucleótidos incorrectos lo que produciría resultados erróneos.

Gracias al aumento de la investigación para calificar el microbioma humano, se han desarrollado nuevos marcadores genéticos. Estos marcadores están asociados con humanos lo que hace que se reduzca la limitación de falsos positivos y se mejora la capacidad de apuntar a organismos relevantes para el huésped. Un ejemplo de esto sería los tradicionales indicadores fecales de bacterias, que no distinguen la contaminación fecal animal de la humana. Subsana esto se evita un riesgo potencial para la salud y se reducen las fuentes de contaminación.

7.5 RECuento Y CULTIVO DE COLONIAS

Considerado el método estándar de oro, el cultivo de patógenos en medios es un método microbiológico convencional confiable y preciso, y aunque es muy utilizado, tiene un inconveniente y es que requiere mucho tiempo y trabajo. Para elaborar esta técnica, se comienza mezclando la muestra con un medio de enriquecimiento selectivo que hace aumentar la población de los organismos objetivo, se ponen en placas en un medio adecuado para aislar cultivos puros y posteriormente se hace un análisis fenotípico de los cultivos. La espera para obtener de los resultados es de unos 2-3 días y se remonta a 7-10 días para la confirmación. Esto supone un evidente perjuicio para las industrias destacando la industria alimentaria. Para hacerlo más llevadero, se combina este método con otros métodos de detección como amplificación de ADN automatizada o un método basado en anticuerpos.

Hasta hace poco, el empeño por detectar e identificar organismos dependían en gran medida de las metodologías *in vitro*. Este es el método más utilizado para la detección de bacterias y se basa en el cultivo y la siembra directa de los organismos.

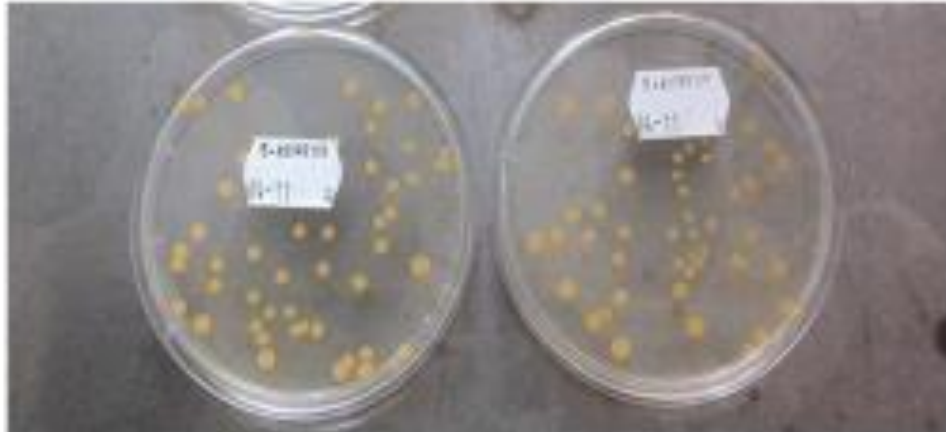


Imagen 2- Técnica de cultivo y placa de S. aureus

(Rajapaksha et al., ,2019)

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

El cultivo de microorganismos supone el mundo de detección de vida con microscopio, y aquí es donde cabe mencionar a Robert Koch conocido por sus postulados. Los postulados de Koch son un conjunto de reglas que determinan si un organismo determinado puede causar una enfermedad. Una de las reglas indica que se debe demostrar que una bacteria es capaz de crecer fuera del cuerpo humano para ver si está preparada la enfermedad. Sin embargo, para las industrias de alimentos y agua que necesitan resultados inmediatos, los ensayos basados en cultivos suponen un inconveniente debido a su tiempo para esclarecer resultados.

Los investigadores son conscientes de que los métodos tradicionales de cultivo de bacterias son eficaces para identificar solamente una fracción de bacterias en una muestra determinada. Razumov en 1932 observó algunas incompatibilidades en el recuento de células viables y el recuento microscópico total de bacterias en ambientes acuáticos. En la observación final Razumov observó un número de células de un orden de magnitud mayor en el recuento microscópico directo que en el recuento en placa, lo que pondría en duda la fiabilidad.

Posteriormente, en 1985 Stanley y Konopka demostraron que las discrepancias de Razumov eran correctas. Las validaron con un gran número de muestras de agua del lago Washigton usando dos métodos de conteo: conteo directo al microscopio con naranja de acridina y conteo de bacterias en una muestra de agua. Así fue como las presunciones de Razumov se demostraron 50 años después.

Aunque se podrían utilizar varios métodos para el recuento de colonias bacterianas, este es el más utilizado. No es un método complejo, pero se deben seguir con minuciosidad técnicas asépticas que evitarán la contaminación. Para comenzar, se preparará una dilución en serie de un cultivo de bacterias diana. Una alícuota de 1 μL (10^{-5} , 10^{-6}) se llevará con un método de placa de extensión estándar o placas de agar deseadas. Las placas cultivadas con bacterias serán incubadas a 37°C que es la temperatura considerada como óptima para el crecimiento bacteriano. Al pasar 24-48 horas, las colonias bacterianas se colocan en el medio agar y se podrán contar en un plazo de 5 a 7 días. Después, las unidades formadoras de colonias (UFC) se calcularán con la siguiente ecuación:

$$CFUs = \frac{\text{Numero de colonias} \times \text{factor de cdilucion}}{\text{Volumen de la placa de cultivo}}$$

Aparte de las técnicas clásicas de recuento de unidades formadoras de colonias, los científicos han desarrollado métodos avanzados rápidos y sencillos para calcular las colonias bacterianas. En 2008 se desarrolló un método de cuantificación de unidades formadoras de colonias rápido y flexible que se puede operar en un laboratorio de microbiología estándar. Se informó de un método de placa con gotas de cultivos bacterianos. Las imágenes de las gotas bacterianas se capturaron con una cámara digital y se cuantificaron utilizando el software 'ImageJ', un complemento y un programa gratuito. El método de software desarrollado se ha identificado como fácil, rápido y rentable en comparación con el método de recuento de colonias convencional para recuentos viables de microorganismos.

En un proyecto que involucró la confirmación de cepas probióticas beneficiosas de *Bifidobacterium lactis* administradas para la salud en el tracto gastrointestinal de los niños, se utilizaron técnicas estándar de conteo de colonias para enumerar cuantitativamente las poblaciones bacterianas de las muestras fecales recolectadas. Aquí, el tamaño de la muestra del procedimiento experimental fue limitado, así como la falta de datos de referencia. Comparable al cultivo bacteriano normal, la PCR proporcionó recuentos significativamente más altos y consistentes. En otro estudio experimental que comparó el método de cultivo convencional con técnicas como la PCR y los biosensores, los resultados mostraron que el cultivo y el recuento de colonias no tuvieron en cuenta los patógenos entéricos particulares que de otro modo se detectarían en otros métodos moleculares comparables. (Rajapaksha et al., 2019)

Los coliformes fecales tienen la virtud de sobrevivir en entornos extremadamente duros, incluyendo la depredación por otros organismos de pastoreo. En un estudio fecal se analizaron esporas de *Streptococci* y *Clostridium perfringens* en sedimentos de agua dulce y marina cerca de las salidas de aguas residuales. Tras un estudio de 8 días, se demostró que las células seguían presentes durante los periodos de extinción,

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

reconociendo así la capacidad de estas células para sobrevivir. El protocolo empleado para este estudio fue simple: recolección de sedimentos, estudios de depredación y ensayos de supervivencia de microcosmos in situ seguidos de enumeración.

La enumeración de este estudio se realizó colocando un filtro de membrana sobre una capa de 15 ml de agar *Enterococcus*. Los resultados ilustraron que las colonias rojas y oscuras eran presuntivas de estreptococos fecales.

Los patógenos microbianos son una de las principales causas de enfermedades transmitidas por el agua a nivel mundial y *E. coli* ha sido aceptada como un indicador universal de la salud del agua.

Existe una variedad de métodos de tinción, entre ellas la tinción BacLight que tiene ventajas sobre los métodos de recuento de células estándar, debido a que es rápido y fácil de usar a la vez que confiable. Puede producir recuento total y células viables en un solo paso. Las preparaciones de los componentes del ensayo son sencillas y además cuenta con la característica de que es fácil de leer (las bacterias viables color verde y las células muertas color rojo). El método está basado en el principio de epifluorescencia para obtener el resultado.

7.5.1 Ventajas y limitaciones de los métodos de cultivo clásicos

Los métodos basados en cultivos son el pilar de la mayoría de las pruebas convencionales para la detección de bacterias. Son los instrumentos básicos utilizados para la detección a nivel mundial, debido a que se les confiere confiabilidad en eficiencia y sensibilidad. Son considerados el estándar de oro para la confirmación de los resultados obtenidos en escenarios de emergencia, pero más allá de estas ventajas, estas técnicas requieren cantidades considerables de equipo de laboratorio, consumibles y tiempo para detectar patógenos.

Es necesario capacitar al personal de laboratorio para preparar e interpretar los resultados, lo que dificulta la utilización generalizada y no especializada. Por tanto, es evidente que, aunque las técnicas de cultivo siguen siendo un método de elección, es necesario desarrollar sistemas más rápidos, fiables y fáciles de usar.

Teniendo en cuenta los estudios mencionados, en el siguiente esquema se ofrece un protocolo resumido para el método de recuento de colonias. La selección de la muestra debe realizarse de forma aséptica.

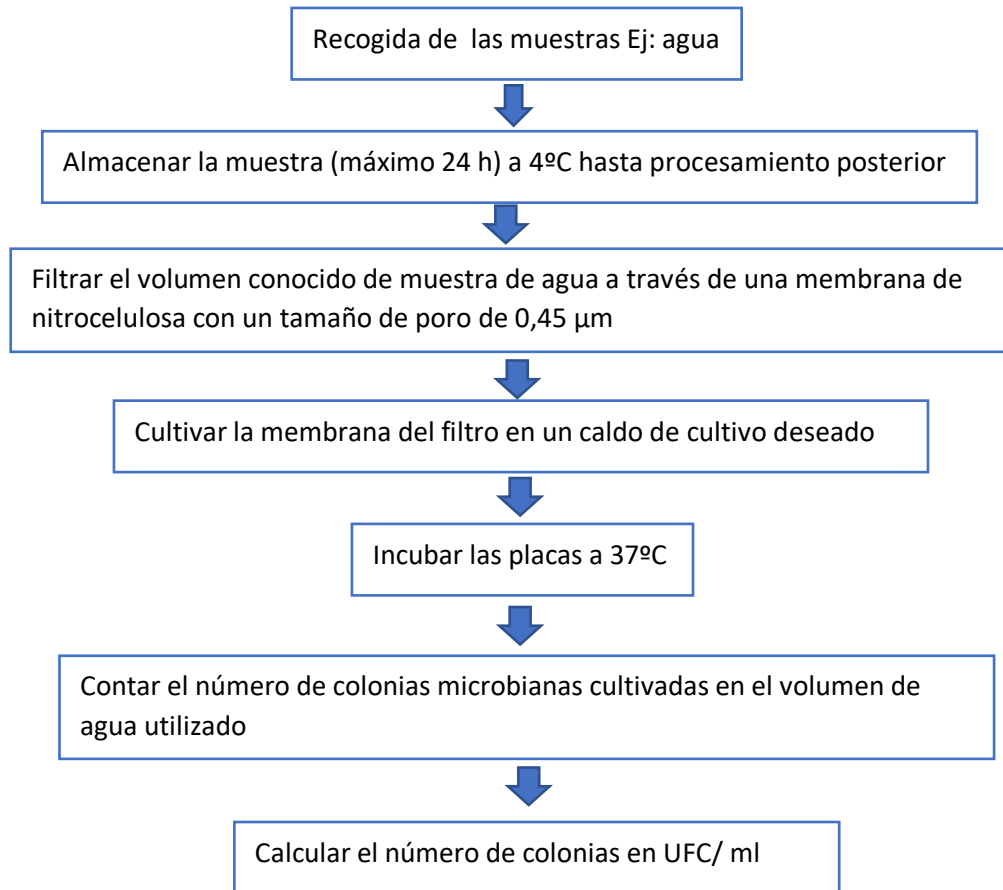


Figura 3 – Diagrama de flujo de trabajo. Elaboración propia

7.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es un método basado en la detección óptica para lisar células individuales en matrices complejas. El método puede ser considerado como una forma de microscopia de fluorescencia automatizada en el que se puede inyectar una muestra en un líquido que pasa a través del área de detección de flujo del instrumento.

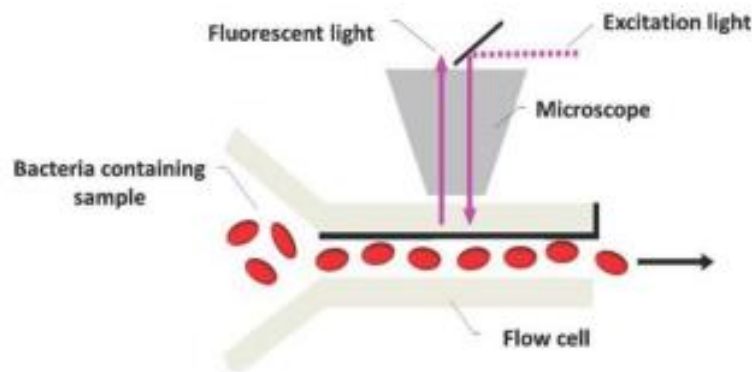


Imagen 3- Método de citometría de flujo: detección de células individuales mediante óptica y marcadores fluorescentes

(Rajapaksha et al., 2019)

El principio básico para la detección de microorganismos incluye lo siguiente:

1. Los microorganismos se suspenden en una matriz líquida
2. Se pasan a través de un rayo de luz enfocada por láser
3. Cuando esto ocurre, la luz se dispersa y es absorbida por los microorganismos objetivo.
4. La extensión y la naturaleza de este proceso de dispersión, que es una propiedad intrínseca de los microorganismos con la fuente de luz, se puede analizar recogiendo la luz dispersa con un sistema de lentes y fotocélulas y se puede utilizar para determinar el número, tamaño y forma de los microorganismos.

La medición de alta sensibilidad se puede lograr en tiempos muy cortos. Debido a la alta sensibilidad de este método, la citometría de flujo es adecuada para detectar un bajo número de organismos específicos en fluidos, raspaduras, enjuagues, alícuotas de líquidos enteros. La citometría de flujo no solo puede examinar bacterias sino también virus. En particular, los virus en el agua de mar se han contado con éxito después de la tinción con un colorante específico de ácido nucleico SYBR Green-I.

Aunque los métodos usados preferiblemente para detectar el número de bacterias son el ensayo de inmunofluorescencia directa (DFA) y las técnicas de inmunoensayo enzimático, se demostró que la citometría de flujo se puede modificar y mejorar para ofrecer 15 veces más sensibilidad que estos métodos.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Desde 2011, las técnicas de citometría de flujo se han utilizado preferentemente junto con otros métodos como la qPCR y los biosensores fluorescentes para lograr resultados más específicos. La razón por la que la citometría de flujo no se usa como técnica independiente es por los numerosos pasos de dilución que se deben realizar antes del análisis, esto es necesario para reducir la concentración de desechos, lo que facilita que los anticuerpos se unan a su objetivo y cada célula individual se analice como pasaron por el punto de detección. Desafortunadamente, esto disminuye la sensibilidad potencial de citómetro de flujo. (Rajapaksha et al., 2019)

• **Limitaciones de la citometría de flujo:** algunas de las limitaciones inherentes a la citometría de flujo incluyen las siguientes:

- 1- Se produce una falta de tejido y arquitectura celular debido a la necesidad de las células de estar en suspensión.
- 2- Las subpoblaciones de células que tienen expresiones de marcador semejantes son difíciles de diferenciar y el método que necesita más fluoróforos está sujeto a un desbordamiento de la señal
- 3- El citómetro de flujo es capaz de generar un gran volumen de datos, esto hace que el exceso de análisis sea muy pesado.

7.7 TABLA RESUMEN DE LAS VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS GENERALES DE DETECCIÓN DE PATÓGENOS

Método de detección de patógeno	Ventajas	Limitaciones
Métodos convencionales de recuento y cultivo de colonias	Bacterias indicadoras aptas para identificar los niveles de contaminación en muestras	Las bacterias indicadoras no identifican la fuente de contaminación
	Protocolos sencillos	Bacterias no bien correlacionadas con patógeno indicador
	Técnicas precisas	Identifica solo una fracción de bacterias en una muestra determinada
		Agar específico
		Requiere tiempo
		problemas de contaminación ambiental
		Difícil y laborioso realizar la enumeración manual de bacterias
		Imprescindible personal capacitado
		Algunos patógenos emergentes no son detectables

Método de detección de patógeno	Ventajas	Limitaciones
Seguimiento de fuentes microbianas (MST)	Se incluyen tanto métodos basados en el cultivo como independientes del cultivo	Requerimientos de huellas dactilares y bases de datos de acogida
	Protocolos sencillos	Tecnología e instrumentación costosa

Método de detección de patógeno	Ventajas	Limitaciones
Reacción en cadena de la polimerasa	Resultados concluyentes, sólidos e inequívocos	Requiere experiencia
	La PCR en tiempo real (qPCR) resultados rápidos, no requiere una curva de calibración, cuantificación fácil.	La precisión de qPCR disminuye con la disminución de las concentraciones de ADN
	Las PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) distingue entre células viables y no viables y detecta bacterias en fase de crecimiento	La PCR tiene una falta de diferenciación entre células viables y no viables
	En PCR multiplex se detectan varios organismos mediante la introducción de diferentes cebadores	La contaminación de la muestra puede producir resultados engañosos
	La PCR digital de gotas detecta cada gota de fluorescencia y detecta incluso un pequeño cambio de fluorescencia y la precisión muy alta.	La PCR incorpora nucleótidos incorrectos incluso en concentraciones bajas, lo que generaría resultados engañosos.

Método de detección de patógeno	Ventajas	Limitaciones
Citometría de flujo	Determina el número tamaño y forma de los microorganismos	Numerosos pasos de dilución antes del análisis
	Mediciones de alta sensibilidad en poco tiempo	Las células en la suspensión producen una falta de tejido
	Detecta organismos específicos en fluidos, raspaduras, enjuagues o alícuotas de líquidos enteros	Dificultad para diferenciar las subpoblaciones celulares con expresiones de marcador similares
	Detecta virus del agua de mar con etiquetas fluorescentes	Análisis laborioso

Tabla 1 – Ventajas y limitaciones de métodos de detección de patógenos. Elaboración propia.

8. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS UTILIZADOS EN LA IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE BACTERIAS EN AGUA

Se puede hacer una distinción entre las enfermedades relacionadas con el agua, bien sea enfermedades causadas por sustancias químicas o por agentes biológicos. Las ocasionadas por bacterias patógenas aumentan cada día la lista de enfermedades emergentes y reemergentes. Se suelen utilizar métodos convencionales para la determinación de microorganismos patógenos en agua, y principalmente para los indicadores bacterianos de contaminación fecal.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Se recomienda el uso de métodos rápidos y confiables en situaciones como la aparición de brotes de enfermedades, ya que en estas situaciones es necesario detectar el microorganismo patógeno en agua como posible agente causal. Dentro de estos métodos se encuentran los inmunoensayos, que incluyen métodos por precipitación y métodos por aglutinación, técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta y citometría de flujo. Estas técnicas son muy útiles en la detección de microorganismos en agua. Algunas técnicas más avanzadas respecto a las expuestas serían la inmunomagnética y la inmunocaptura.

Los métodos convencionales dejan paso a los métodos automatizados en microbiología de aguas. Estos requieren menos tiempo para esclarecer los resultados y son fáciles de usar, precisos y rentables económicamente. Se trata de métodos que estudian el aislamiento, caracterización y enumeración de microorganismos.

Como punto a favor de las pruebas microbiológicas rápidas decir que ofrecen detección, identificación y enumeración de microorganismos en un tiempo más corto y son más sencillas en comparación con las técnicas tradicionales. También se necesita menos material de laboratorio y menos personal, lo que hace posible optimizar los recursos disponibles y concluir en una mayor productividad.

Estas pruebas rápidas están basadas en métodos bioquímicos y enzimáticos, con reducción de colorantes, inmunoensayo, filtración por membrana y reconocimiento de ácido nucleico.

• Ventajas de los métodos rápidos:

Una de las principales ventajas que tiene este método es la posibilidad de liberar lotes rápidamente, un bajo costo, así como menor trabajo manual. Otra de las ventajas son la facilidad de poner en marcha los ensayos, se pueden hacer análisis de grandes cantidades de muestras, los residuos biológicos se pueden eliminar fácilmente. También decir que son precisos y con buen límite de detección. Además, tiene una gran sensibilidad y especificidad lo que facilita la determinación de factores de virulencia. Y, por último, pero no menos importante, la velocidad de los análisis y obtención de resultados.

• Desventajas de los métodos rápidos:

Algunas de las desventajas que observamos en este tipo de métodos es la que el analito que se busca debe enriquecerse antes de poner en marcha la detección. A veces, se detectan microorganismos muertos, y algunas concentraciones de antígenos en las muestras no se llegan a detectar. Se trata por lo general de métodos cualitativos, por lo que no es posible correlacionar el resultado con la intensidad de la contaminación.

8.1 MÉTODOS DE INMUNOENSAYO

Los inmunoensayos tienen como base la interacción antígeno (Ag) – Anticuerpo (Ac). Esta unión es reversible ya que las interacciones son no covalentes. Si la interacción primaria Ag-Ac no es visible se llevarán a cabo métodos para poder visualizarla. La estrategia consiste en marcar el Ag o el Ac a través de una unión covalente de determinadas moléculas ya que de esta forma se hará visible esa primera interacción. Es una técnica muy sensible y capaz de detectar bajas concentraciones de antígenos y/o anticuerpos.

Dentro de los inmunoensayos en la detección de microorganismos en aguas se encuentran:

- Métodos de interacción primaria: enzimoimmunoensayos, técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta
- Métodos de interacción secundaria: precipitación y aglutinación.

8.1.1 Métodos de interacción primaria**8.1.1.1 ENZIMOINMUNOENSAYOS**

Han sido usados por varias décadas en la detección y caracterización de microorganismos y sus componentes en microbiología. El método más popular es el ELISA. Su principal ventaja consiste en el corto periodo de tiempo que se necesita para identificar el agente patógeno.

La técnica de ELISA utiliza anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa) para visualizar la reacción Ag-Ac, la cual es utilizada tanto para la determinación de antígenos como de anticuerpos.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Permite tanto la detección de bacterias patogénicas como de toxinas en muestras ambientales, con alta sensibilidad y especificidad, por lo que ofrece resultados en tiempos más cortos que en los métodos tradicionales. (Hundora Fernández et al., 2013)

8.1.1.1.1 Determinación de antígenos por ELISA

La detección del antígeno puede ser directa o indirecta. En la primera opción, un anticuerpo primario se conjuga con una enzima, mientras que en la segunda opción se conjugan un conjunto de anticuerpos primarios y secundarios no marcados.

El modelo más conocido es el Sándwich ELISA en el que el Ac específico para el Ag de interés está absorbido en un soporte sólido al que se le añade la muestra biológica. Si en la muestra está presente el Ag, quedará capturado en la placa y se añadirá otro Ac específico conjugado con la enzima. Para terminar, se añade el sustrato incoloro que, por acción de la enzima, producirá un color observable a simple vista y el cual se puede cuantificar con el espectrofotómetro.

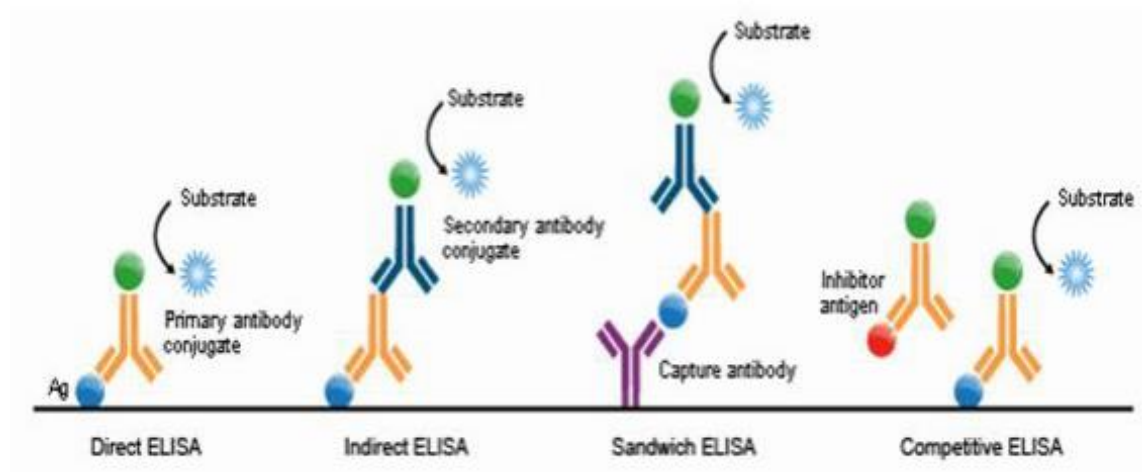


Imagen 4- Representación de los diferentes métodos de la técnica ELISA

(S Umesha y Manukumar, 2016)

8.1.1.2 INMUNOFLUORESCENCIA

La unión del Ac junto con el fluorocromo hace que éste último emita una luz a una determinada longitud de onda cuando es excitado por un haz de luz de menor longitud de onda. Cada tipo de fluorocromo emite luz en una gama de color (verde, rojo, etc) en un determinado espectro de longitud de onda.

El hecho de que existan distintos fluorocromos capaces de emitir a diferentes longitudes de onda, hace posible la detección de antígenos diferentes en un mismo microorganismo. La visualización de la reacción puede hacerse con un microscopio de fluorescencia (para colonias de microorganismos fijadas en portaobjetos) o por citometría de flujo (para microorganismos en suspensión).

8.1.2 Métodos de interacción secundaria

8.1.2.1 MÉTODO POR PRECIPITACIÓN

Cuando se mezcla una cantidad suficiente de antígeno soluble con anticuerpo específico se produce una interacción Ag-Ac que forma un precipitado. Cuando se agregan concentraciones crecientes de antígeno soluble a una cantidad fija de suero que contiene anticuerpos específicos, a medida que la cantidad de antígeno agregado aumenta, la cantidad de precipitado se incrementa hasta alcanzar un máximo.

En un extremo de la curva de precipitación, cuando se agregan pequeñas cantidades de antígeno, los complejos inmunes se forman en exceso de Ac. En el otro extremo, al agregar grandes cantidades de Ag, los complejos inmunes se forman en exceso de Ag, son pequeños y probablemente están constituidos por una molécula de Ac y dos de Ag. Entre estas dos situaciones extremas se encuentra la zona de equivalencia, en donde la relación Ag-Ac permite la formación de grandes redes de complejos inmunes que precipitan (Hundora Fernández et al., 2013)

La unión Ag-Ac se traduce por la formación de un precipitado insoluble con la condición de que los reactivos se encuentren a concentración equivalente.

8.1.2.2 MÉTODO POR AGLUTINACIÓN

Las reacciones de aglutinación involucran una interacción entre el Ag y el Ac que conducirá a la aparición de un aglutinado que se verá como grumos o gránulos. Se trata de hacer reaccionar cantidades equivalentes del Ag y Ac.

La gran diferencia entre las reacciones de precipitación y las de aglutinación está en las características del Ag: mientras que en las reacciones de precipitación se emplean antígenos solubles, en las reacciones de aglutinación el Ag es particulado.

Las reacciones de aglutinación tienen la ventaja de ser muy sencillas de realizar, no requieren ningún equipamiento para su lectura, son rápidas y fáciles de implementar. Además, tienen una mayor sensibilidad que las reacciones de precipitación, pero menor sensibilidad que ELISA e inmunofluorescencia indirecta; son menos específicas, tienen la desventaja de depender de los factores físico-químicos como la concentración de electrolitos, pH, temperatura y tiempo de reacción.

(Hundora Fernández et al., 2013)

9. AUTOMATIZACIÓN EN IDENTIFICACIÓN MICROBIANA Y ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD

La microbiología ha sido tradicionalmente una disciplina manual. A diferencia de otras áreas de laboratorio, la automatización de ésta no ha sido fácil, principalmente debido a la gran variabilidad en el tipo de muestras, diversidad y número de microorganismos a identificar, etc. En cuanto a esto que acabamos de describir, para poder lograr la automatización en microbiología ha sido necesario optimizar la productividad y los flujos de trabajo, pasando por diferentes test de identificación y susceptibilidad. Se ha conseguido en gran medida el automatizado mediante la informatización de resultados.

Respecto a la identificación bacteriana y los estudios de susceptibilidad se han desarrollado un gran número de técnicas rápidas, semiautomatizadas o automatizadas. Estos equipos aportan estandarización y velocidad, pero no han logrado resolver toda la problemática que el estudio microbiológico plantea, por lo que aún es necesario complementar su uso con pruebas manuales.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Hoy en día existen en el mercado equipos inoculadores que pueden lograr una siembra con colonias bien aisladas, y se reduce la necesidad de hacer traspasos y subcultivos, con el consiguiente ahorro en tiempo y reactivos.

Lo ideal sería la <<automatización total>> del laboratorio, lo que comprende equipos en línea para siembra, incubación, análisis remoto de colonias desarrolladas mediante digitalización de imágenes y posterior identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF⁸) con realización de antibiograma automatizado a las colonias así identificadas. Todos estos equipos en línea estarían interconectados mediante un software que además comunica con equipos automatizados, tinción de Gram y la realización de técnicas serológicas.

La automatización total es un concepto aún lejano en la realidad, pero lo que sí es posible en la actualidad, es contar metodologías de identificación más rápida que la convencional.

Los procedimientos convencionales de identificación de microorganismos consisten en observación de características físicas y de tinción (morfología de colonias, tinción Gram) y de reacciones bioquímicas. Inicialmente, estas pruebas bioquímicas se realizaban en medios en tubos, los que con el tiempo se miniaturizaron en formatos que permitieron aumentar el número de pruebas y eventualmente automatizar la lectura de estos resultados. Dependiendo de las reacciones de cada microorganismo frente a diferentes sustratos, se obtiene un perfil bioquímico que, al ser comparados con perfiles conocidos, permite la identificación. (Beatrice Hervé., 2015).

El tiempo de la identificación convencional era de 24-48 horas para permitir la expresión de la reacción, ya que debería lograrse un número crítico de bacterias, que dependen de su velocidad de replicación. Con la automatización se logró reducir este tiempo a 8-10 horas, debido a que se detecta reacción con sustratos preformados, o se logra visualizar la reacción bioquímica con un menor número de aplicaciones, dada la miniaturización de la reacción. Esta reducción en los tiempos hace necesario contar con

⁸ Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

personal capacitado durante las 24 horas en el laboratorio, para optimizar y hacer más eficiente los procesos, sacando así provecho a las ventajas que ofrece esta tecnología más rápida. En la siguiente tabla se presentan los diferentes tipos de equipos y kits disponibles para identificación bioquímica.

Metodología de identificación bioquímica	Kits/equipos disponibles	Automatizado	Tiempo de espera
Observación visual de turbidez o cambio de pH, por utilización de diversos sustratos	Paneles Api, Crystal, baterías convencionales	No	15-24 hrs
Detección de cambios de pH por utilización de Hidratos de carbono, actividad enzimática, patrones de resistencia	Tarjetas Vitek, Phoenix, Microscan tradicionales, Sensititre	Sí	8-12 hrs
Detección fluorométrica o colorimétrica de liberación de productos cromogénicos por reacción de enzimas preformadas	MicroScan Rapid panels, BD Phoenix, Vitek, Trek diagnostic Systems	Sí	2-4 hrs

Tabla 2- Sistemas para identificación mediante pruebas bioquímicas
Beatrice Hervé., 2015.

Con una verificación de la tecnología MALDI-TOF, con el objetivo de conocer la concordancia en identificación de género y de especie, entre metodología convencional y espectrometría de masas, comparando los resultados obtenidos por Vitek 2 Compact y Vitek MS en 205 cepas, obteniendo una concordancia global de 95% para género y especie y 98% para género solamente.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Cabe destacar que la identificación de enteropatógenos no es satisfactoria por esta metodología, ya que no permite diferenciar cepas de *E. coli* de *Shigella*, ni tipificar las cepas de *Salmonella spp.* (Beatrice Hervé., 2015.)



Imagen 5- Metodología de espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Beatrice Hervé., 2015.

La espectrometría de masas para el análisis de microorganismos ofrece resultados prometedores frente a los métodos convencionales debido a su metodología confiable, económica y rápida.

La espectrometría de masas puede ser utilizada en la identificación a partir de muestra directa con unos protocolos publicados; pero, llevar a cabo estos protocolos resulta laborioso e interrumpe el flujo normal de trabajo de un laboratorio. Por ello, se mantiene el método convencional de identificación (incubación por 18 horas en placas y luego identificación de colonias).

En cuanto a estudios de susceptibilidad a antimicrobianos, existen diferentes metodologías, que se pueden clasificar en: convencionales o fenotípicos, y automatizados ya sea fenotípicos o genotípicos.

Actualmente persiste un desfase entre la velocidad de identificación que se logra por espectrometría de masas, y la menor velocidad en obtener un resultado de susceptibilidad a antimicrobianos, ya que, a pesar de su automatización, esta última sigue basada en la velocidad de replicación del microorganismo.

Es necesario considerar también que, pese a los grandes avances logrados en relación a automatización de estudios de susceptibilidad, aún no es posible prescindir del todo de los métodos manuales, ya que hay algunos microorganismos, o combinaciones de microorganismo/antimicrobiano que presentan falsas susceptibilidades o resistencias.

10. AVANCES EN MÉTODOS DE DETECCIÓN RÁPIDA DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son un problema de salud pública y es por ello que la seguridad alimentaria se va convirtiendo cada vez más en un pilar esencial. El monitoreo y la detección rápida de patógenos transmitidos por los alimentos son las formas más efectivas de controlar y prevenir las ETA. Recientemente se han desarrollado varios tipos de métodos rápidos de detección, identificación y monitoreo para patógenos transmitidos por los alimentos, incluidos métodos inmunológicos, métodos basados en biosensores, y métodos moleculares.

Los patógenos transmitidos por los alimentos son microorganismos (bacterias, virus y hongos). En particular, son bacterias como *Escherichia coli* O157 117, *Salmonella* entérica, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campilobacter jejuni*, *Bacillus cereus* y otras cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC no 0157) y *Vibrio spp.*

Los métodos tradicionales para la detección de patógenos bacterianos de los alimentos dependen del cultivo de los organismos en placas de agar, lo que requiere mucho tiempo; de 2 a 3 días para los resultados iniciales y hasta una semana para confirmar los microorganismos patógenos específicos. Esto junto con la alta prevalencia de enfermedades transmitidas por los alimentos da lugar a importantes problemas derivados de la inocuidad de los alimentos. Por lo tanto, garantizar la seguridad

alimentaria y proteger la salud pública es esencial para prevenir la propagación de enfermedades infecciosas y de ahí surge la necesidad de elaborar métodos más rápidos de detección de patógenos transmitidos por los alimentos.

Se están desarrollando nuevas técnicas moleculares para patógenos sobre diversos aspectos de la detección, como la sensibilidad, la rapidez y la selectividad, la discriminación de la célula viable y también la idoneidad para el análisis in situ. Los métodos inmunológicos permiten el análisis rápido y sensible de una variedad de patógenos y toxinas, especialmente con potencial para análisis in situ. Los métodos de biosensores emergentes pueden detectar patógenos transmitidos por alimentos en un tiempo mucho más corto con una sensibilidad y selectividad comparables a los métodos convencionales y pueden usarse potencialmente en el futuro como dispositivos independientes para el monitoreo in situ. (Zhao et al.,2014).

10.1. MÉTODOS BASADOS EN INMUNOLOGÍA

La inmunología se ha desarrollado como una tecnología polivalente con numerosas aplicaciones en el campo de la agricultura, la medicina y en muchas otras áreas de las ciencias biológicas. Se ha demostrado que las técnicas inmunológicas son altamente específicas, sensibles, simples, rápidas, rentables y pueden automatizarse para aplicaciones a gran escala. El inmunodiagnóstico se utiliza para la detección rápida de patógenos que no pueden identificarse fácilmente con otros métodos convencionales. El desarrollo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) se considera un hito importante en el avance del diagnóstico serológico de enfermedades causadas por patógenos microbianos, especialmente por virus. El principio básico de la detección basada en anticuerpos es la unión de los anticuerpos a los antígenos diana, seguida de la detección del complejo antígeno-anticuerpo. ELISA se utiliza ampliamente para desarrollar métodos para detectar bacterias patógenas y toxinas bacterianas en los alimentos. Se requiere menos tiempo experimental en comparación con los métodos tradicionales basados en cultivos, pero la detección basada en anticuerpos aún carece de la capacidad de detectar microorganismos en tiempo real.

Solo, si las cantidades del patógeno son lo suficientemente altas, se pueden utilizar inmunoensayos para proporcionar información en tiempo real. Pero los problemas que

pueden surgir son la baja sensibilidad de los ensayos, la baja afinidad del anticuerpo por el patógeno o analito que se está midiendo y la interferencia de los contaminantes. (Zhao et al.2014)

Los métodos basados en inmunología, junto con otros métodos para la detección de patógenos, como la separación magnética inmune en perlas magnéticas, se combinan con la espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF/MS) para la detección de enterotoxina B estafilocócica, y la combinación de separación magnética inmune con citometría de flujo para la detección de *Listeria monocytogenes*.

10.2. MÉTODOS BASADOS EN SEÑALES: BIOSENSORES EN LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS

10.2.1. Biorreceptor

Un biosensor es un dispositivo analítico que convierte la respuesta/señal biológica en una señal eléctrica. Esto tiene dos componentes principales importantes: uno es el biorreceptor para reconocer y un transductor, para convertir el evento de reconocimiento en una señal eléctrica sensible medible. Un biorreceptor puede ser tejido, orgánulo, microorganismo, enzima, célula, anticuerpo, ácido nucleico, etc. La transducción puede ser óptica, termométrica, magnética y piezoeléctrica o combinaciones de una o más de las técnicas anteriores. (S Umesha y Manukumar,,2016)

Los anticuerpos son biorreceptores comunes; puede ser monoclonal, policlonal o recombinantes, basados en propiedades respectivas y difieren en la forma en que se sintetizan. En cualquier caso, generalmente se inmovilizan en un sustrato cerca de la superficie del detector o un portador.

El uso de enzimas como elementos de reconocimiento está bien desarrollado y es un área ampliamente estudiada. Las enzimas se eligen en función de su capacidad de unión específica y la actividad catalítica y con un sustrato adecuado que debe proporcionar suficiente transferencia de elección al trabajo.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

En el campo de la detección de patógenos, el uso de enzimas marcadas ganó más popularidad en la detección de inmunoensayos que otros métodos marcados como radioisótopos y marcadores fluorescentes. Las enzimas ofrecen la ventaja de sensibilidad, la posibilidad de visualización directa y son estables durante años.

En los biorreceptores basados en células, el reconocimiento se basa en células/microorganismos completos o en un componente celular específico que es capaz de unirse específicamente a ciertas especies. La capacidad de las células para reconocer y responder a estímulos los ha convertido en componentes atractivos para su incorporación en biosensores. En biosensores basados en células (CBB) una célula completa sirve como elemento de reconocimiento molecular y requiere dos fases. Primero, las propias células son los transductores primarios, convirtiendo el analito detectado en una respuesta celular. Se requiere un segundo transductor para convertir la señal celular en una señal electrónica que pueda ser procesada y analizada.

En 2006 se desarrolló un biosensor artificial basado en células que utilizaba un nanocompuesto de sílice dopado con liposomas, que imita los ensayos de células enteras existentes para *Listeriolysin O (LLO)*, una hemolisina formadora de poros secretada por el patógeno *L. monocytogenes* transmitido por los alimentos. Los liposomas inmovilizados actúan como un compartimento celular que contamina los tintes fluorescentes. La liberación de tinte debido a la formación de poros por LLO indica la presencia de la toxina.

Los biosensores basados en células sintéticas tienen una vida propia muy larga y la conservación es más fácil, ya que se basan en sistemas no vivos.

Las proteínas actúan como una cabina utilizada para el transporte de sustancias químicas de un lugar a otro, como proteína portadora o una proteína de entrada involucrada en la superficie celular. Estas proteínas proporcionan un medio de reconocimiento molecular a través de uno u otro tipo de mecanismo específicamente, sitio activo o sitios potencialmente eficientes.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Estos tipos de proteínas se adhieren a diferentes tipos de transductores para la detección de patógenos bacterianos. La matriz de sensores a base de lectina se expone a células viables de gramnegativos y grampositivos, así como a levaduras. Con este tipo de biosensor, fue posible distinguir entre cinco especies microbianas, incluidas *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *E. coli* y *Enterobacter aerogenes*.

Un receptor que está diseñado para imitar como un biorreceptor (anticuerpo, enzima, célula o ácidos nucleicos) a menudo se denomina receptor similar o biomimético. Los métodos como las células modificadas genéticamente y la técnica de impresión molecular han surgido como herramientas atractivas y altamente aceptadas para el desarrollo de espejos artificiales o agentes de reconocimiento. La técnica denominada impresión molecular, produce sitios de reconocimiento artificial formando un polímero alrededor de una molécula que se puede utilizar como plantilla. El polímero conjugado biocrómico (BCP) es un tipo de biosensor biométrico para la detección de patógenos. Los componentes de la membrana celular que tienen actividad biológica se incorporan en polímeros conjugados con propiedades ópticas deseables, e informan de la presencia de patógenos con un cambio de color que se utiliza para la detección colorimétrica de toxinas bacterianas.

Las proteínas de punta presentes en los fagos se utilizan para reconocer los receptores bacterianos. En este caso el reconocimiento es muy específico y se puede utilizar para la tipificación de bacterias. De aquí surgió el camino para el desarrollo de tecnologías específicas de detección de patógenos. El uso de fagos como elemento de reconocimiento para la detección de diversos patógenos como *E. coli*, *S. aureus* y esporas de *Bacillus cereus*. (S Umesha y Manukumar,,2016)

10.2.2. Transductores

El transductor juega un papel importante en el proceso de detección del biosensor. Los biosensores se clasifican según los métodos de transducción que emplean. En la última década, se han desarrollado una amplia variedad de métodos de transducción para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Aunque constantemente se están desarrollando nuevos tipos de transductores para su uso en biosensores. Los métodos de transducción como el óptico, electroquímico y basado en masa son los métodos más comunes. (S Umesha y Manukumar, 2016). La detección orientada a la óptica tiene un interés considerable para la detección de patógenos debido a su selectividad. Ofrece una gran cantidad de subclases como adsorción, refracción, reflexión, dispersión infrarroja, fluorescencia, quimioluminiscencia y fosforescencia. Sin embargo, estas subclases requieren un espectrómetro adecuado para registrar las propiedades electroquímicas del analito.

Modo de acción	Patógeno objetivo	Límite de detección	Tiempo de ensayo
Óptico interferómetro	<i>S. typhimurium</i>	10 ⁵ UFC/mL	12 h
Espejo resonante de detección	<i>Escherichia coli</i>		
Turbidimetría	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>		
Método de óptica automatizada	<i>Salmonella spp.</i> <i>L. monocytogenes</i>	10-50 células por cada 25 g de muestra	24 h
Método óptico usando rayo láser	<i>E. coli</i>	45 células	
Superficie mejorada adsorción infrarroja espectroscopia	<i>Salmonella</i>		
Fluorescencia – microscopía	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. typhimurium</i> , ,	10 ² UFC/mL	
Quimioluminiscencia	<i>E. coli</i> O157:H7	10 ² a 10 ³ UFC/ mL	30 min
Bioluminiscencia	<i>E. coli</i>	10 ³ cél / mL	2 h

Tabla 3- Diferentes biosensores de base óptica para la detección de patógenos

(S Umesha y Manukumar, 2016)

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Las técnicas de detección óptica más comunes son la resonancia en plasma de superficie (SPR) y la espectrometría de fluorescencia debido a su sensibilidad. SPR es capaz de detectar el índice de refracción de registro que tiene incluso cambios muy pequeños, que ocurren cuando las células se unen a receptores inmovilizados en la superficie del transductor y mide el cambio de ángulo de la luz reflejada en función del cambio de densidad del medio contra el tiempo. Los biosensores SPR sirven para la detección de patógenos transmitidos por alimentos, por ejemplo, para *L. monocytogenes* y *Salmonella*.

Los métodos de detección basados en electroquímicos son otro posible medio de transducción, que se ha utilizado para la identificación y cuantificación de patógenos transmitidos por los alimentos. Este biosensor se puede clasificar en impedimétrico, amperométrico, conductimétrico y potenciométrico; y según su potencial, la corriente, la conductancia y la impedancia, respectivamente.

Modo de acción	Patógeno objetivo	Rango dinámico /Límite de detección	Tiempo de ensayo
Amperométrico	<i>E. coli</i> O157:H7	7.8×10^1 cél/ mL	10 min
	<i>S. typhimurium</i>	1.09×10^3 cél/ mL	2,5 h
	<i>E. coli</i>	50 cél/ mL	30 min
Potenciométrico	<i>E. coli</i> O157: H7	$7,1 \times 10^2$ cel/ mL	45 min
Conductométrico	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>Salmonella spp</i>	$7,9 \times 10^1$ cél/ mL	10 min
Impedimétrico	<i>S. typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>B. cereus</i>	$5,4 \times 10^5$ cél/ mL	2.2 h

Tabla 4- Diferentes biosensores de base electroquímica para la detección de patógenos

(S Umesha y Manukumar, 2016)

El desarrollo de una 'nariz electrónica' para la detección de patógenos ha llamado la atención en los últimos años. Se utilizó un sistema nasal electrónico para identificar *S. typhimurium* en muestras de carne inoculadas. Se utilizó una nariz electrónica que contenía 32 sensores de polímero conductor para obtener los patrones de olor del casco de las muestras de carne. Se analizaron los compuestos orgánicos volátiles que emanan de las tiras de vacuno envasadas al vacío. Sus resultados demostraron que el sistema de nariz electrónica fue capaz de identificar la contaminación de *S. typhimurium* en muestras de carne un nivel de concentración bajo. También está de modo el uso de una serie de sensores compuestos de polímero conductor que contienen negro de humo y polianilina para detectar e identificar patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos como *Salmonella spp*, *B. cereus* y *V. parahaemolyticus* mediante la producción de un patrón de respuesta individual para cada bacteria. Esto demostró la aplicación potencial para la identificación in situ de patógenos transmitidos por los alimentos, donde estos sensores podrían interconectarse con dispositivos portátiles para cuantificar las emisiones que emanan de las muestras de alimentos contaminados. Aparte de esto, las ventajas que tienen los biosensores, que son selectivos, precisos. Por otro lado, tienen desventajas como el costo elevado, la actividad puede perder en un momento particular, el tiempo de respuesta es bajo en material tisular, el tiempo de recuperación que se necesita es alto debido a la capacidad de unión y las duras condiciones para revertir la reacción.

(S Umesha y Manukumar, 2016)

10.3. MÉTODOS DE DETECCIÓN MOLECULAR

El uso de métodos moleculares es un enfoque clave para la identificación rápida y precisa de patógenos transmitidos por los alimentos. Una de las principales razones de la amplia aceptación de las técnicas moleculares en la detección de patógenos es una capacidad para generar resultados en un corto tiempo en comparación con los métodos basados en cultivos. Entre los métodos moleculares disponibles para la detección de patógenos se encuentra la PCR de punto final, PCR multiplex y PCR de tiempo real.

La detección rápida y precisa de patógenos transmitidos por los alimentos fue posible con la llegada de la PCR.

La PCR implica la amplificación de un segmento específico de ADN de cualquier patógeno en condiciones restringidas de reactivos y combinaciones de tiempo y temperatura. La PCR se divide en dos categorías: PCR de punto final y PCR en tiempo real, en función del tiempo transcurrido hasta la interpretación de los resultados y la detección de la cantidad de ADN amplificado. La PCR de punto final se divide a su vez en PCR simple y multiplex.

10.3.1. PCR punto final

Dentro de esta categoría encontramos la PCR simple y la PCR multiplex.

10.3.1.1. PCR SIMPLE

Es el enfoque molecular más sencillo para detectar patógenos. Es una técnica establecida para detectar microorganismos patógenos. En este método, el ADN de doble hebra se desnaturaliza en hebras simples, y los cebadores específicos o los oligonucleótidos de una sola hebra se hibridan con estas hebras de ADN, seguido de la extensión de los cebadores complementarios al ADN de una sola hebra, con una ADN polimerasa termoestable. Estos pasos se repiten, lo que da como resultado la duplicación del número inicial de secuencias diana con cada ciclo. Esta cantidad de productos de amplificación se puede visualizar como una banda de gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio. (Zhao et al, 2014)

Tiene ventajas como rapidez, especificidad, sensibilidad y menor cantidad de muestras que los métodos basados en cultivo.

La PCR también se utiliza para la detección de toxinas mediante la amplificación de genes específicos que codifican toxinas bacterianas. Se han desarrollado métodos de PCR para la detección de toxinas para varias especies bacterianas, incluidas *V. cholerae*, *B. cereus*, *E. coli* y *S. aureus*. Además de la PCR, se han diseñado y utilizado una serie de sondas de hibridación específicas de genes para la detección de genes de toxinas en patógenos transmitidos por los alimentos.

La PCR simple puede identificar los microorganismos conocidos a nivel de género o especie en muy poco tiempo.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

La detección de patógenos transmitidos por los alimentos en las granjas es particularmente importante porque proporciona suficiente tiempo establecer medidas para prevenir una mayor propagación y fortalecer la bioseguridad. Sin embargo, tiene una utilidad limitada en investigaciones de brotes que involucren nuevos patógenos ya que no hay información de secuencia disponible en GenBank / NCBI. En tales casos, la PCR debe combinarse con la secuencia de genes de extinción o digestión por restricción del producto amplificado para la identificación y diferenciación de los nuevos patógenos implicados.

La PCR simple se ha extendido utilizado en estudios de prevalencia para la detección de una variedad de patógenos en la producción (antes de la cosecha), etapas de sacrificio y procesamiento.

10.3.1.2. PCR MULTIPLEX

La incapacidad de la PCR simple para amplificar múltiples objetivos/genes llevó al desarrollo de la PCR multiplex. La PCR multiplex se puede utilizar para la detección simultánea de múltiples patógenos en una única reacción de PCR. Sin embargo, diseñar cebadores para una reacción multiplex es un desafío.

La principal ventaja es la menor utilización de reactivos y enzimas (ADN polimerasa Taq). Otra ventaja es que, al igual que los patógenos, se analizan individualmente, además, se requiere poco tiempo para preparar la muestra y obtener los resultados. La única limitación es que los fragmentos amplificados de la misma longitud no pueden detectarse y es posible que una cantidad menor de producto amplificado no sea visible en el gel de agarosa. Esto podría superarse diseñando los cebadores mas largos que los utilizados en la PCR convencional con una temperatura de fusión más alta. (Kumar y Thakur, 2018.)

La PCR multiplex se ha comercializado mucho, se encuentran disponibles varios kits. En principio, fue desarrollado para la detección de cinco principales patógenos transmitidos por alimentos: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella entérica* y *Shigella*; y con el tiempo se ha aplicado con éxito en la diferenciación de especies, serotipos, subtipos, genes de toxinas y genes de bacterias de resistencia a los antimicrobianos. También se desarrolló una PCR multiplex para la detección del género *Listeria*.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

La aplicación de esta PCR podría ser muy útil en la investigación de enfermedades ya que ayudará a reducir significativamente el costo del diagnóstico y reducirá el tiempo de recuperación necesario para la serotipificación de los aislamientos.

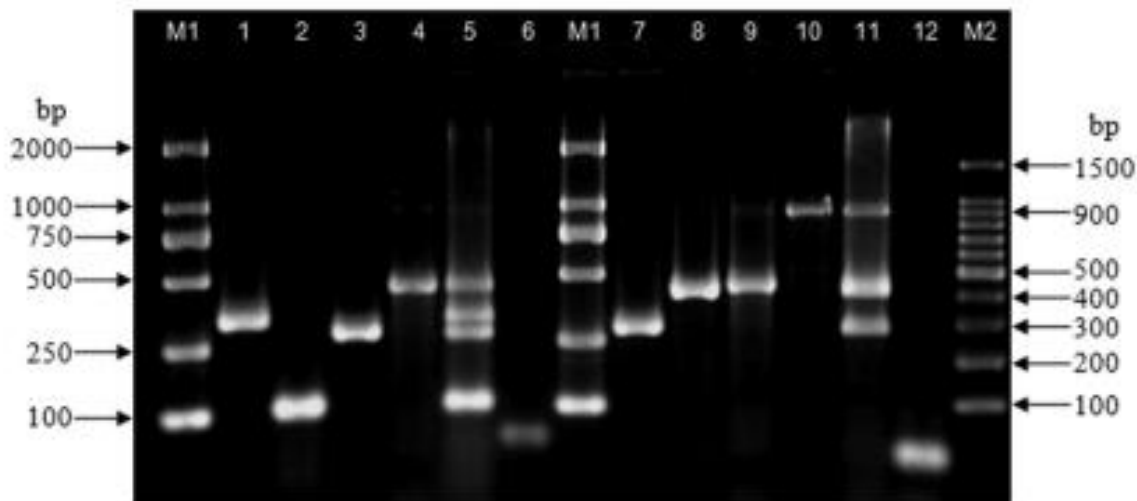


Imagen 6 – Análisis de electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR multiplex
(Wang et al; 2017)

10.3.2. PCR tiempo real

La PCR en tiempo real es un método reconocido para la detección y cuantificación de patógenos transmitidos por los alimentos. La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), se utiliza para cuantificar el ADN y el ADNc, determinando los números de genes o transcripciones presentes en diferentes muestras. Ofrece ventajas como la rapidez para obtener el resultado, la reducción del riesgo de contaminación y la facilidad en la manipulación de la tecnología. La máquina de PCR en tiempo real es un termociclador que es capaz de estimular el tinte fluorescente con un láser para cuantificar el producto de amplificación cada minuto de ciclo y mostrar fases exponenciales. Los métodos de detección e identificación han demostrado ser intrínsecamente más específicos y sensibles que los métodos tradicionales.

10.4. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los métodos tradicionales de detección de patógenos transmitidos por los alimentos, aunque cuentan con facultades de ser lo suficientemente sensibles, requieren un tiempo elevado para uso práctico, hasta semanas para poder realizarse. Es por esto que se buscan nuevas técnicas que superen este tipo de limitaciones, y aunque ya se han investigado, explorado y desarrollado nuevos métodos más rápidos, estos aún requieren algunas mejoras como sensibilidad, selectividad o precisión.

El desarrollo en métodos inmunológicos, moleculares y de biosensores ayudaron a mejorar el tiempo necesario para producir los resultados. La especificidad y la sensibilidad de los métodos inmunológicos depende de la fuerza de unión del anticuerpo específico a su antígeno, y funcionan bien para las matrices alimentarias sin interferir factores como otras células no diana, ADN o proteínas. Los métodos basados en biosensores son fáciles de realizar sin capacitación y producen resultados en la detección en tiempo real de patógenos y toxinas transmitidas por los alimentos con una alta sensibilidad y selectividad comparable a los métodos basados en cultivos. Sin embargo, aún deben mejorarse en la detección de matrices alimentarias.

Todos los ensayos disponibles para el diagnóstico de alimentos requieren cierto grado de preparación de la muestra, que es un factor muy importante para los métodos de detección rápida. Se requieren más estudios sobre las técnicas de separación de microorganismos de la matriz alimentaria, así como sobre la concentración de la muestra antes de la detección mediante ensayos inmunológicos, biosensores, etc. La preconcentración es la opción preferida, ya que puede mejorar la sensibilidad varias veces al aumentar el número de organismos objetivo por unidad de volumen a un costo relativamente bajo. Se utilizan varios modos disponibles de preconcentración, incluida la filtración, el fraccionamiento por tamaño, la centrifugación y la separación inmunomagnética, o combinaciones de estos métodos.

Deberían aprovecharse más las posibilidades de combinar varios métodos rápidos, incluidos los métodos inmunológicos, basados en ácidos nucleicos, en biosensores, etc. Con la aplicación correcta de varias de estas tecnologías simultáneamente, se podrían desarrollar tecnologías más precisas y de mayor alcance.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

Los biosensores deben demostrar que son capaces de alcanzar al menos los mismos niveles de detección que los métodos tradicionales (entre 10 y 100 UFC/mL) para fortalecer su atractivo en las aplicaciones de microbiología alimentaria, sin mencionar la rentabilidad y la eficacia del tiempo.

A pesar de los numerosos esfuerzos de investigación realizados durante las últimas décadas y últimos años para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos, las tecnologías actuales aun presentan margen de mejora. Dado que los patógenos transmitidos por los alimentos están presentes en su mayoría en cantidades muy bajas (<100 UFC/g) y en la presencia de millones de otras bacterias, no se detectan fácilmente. Por lo tanto, sería ideal un método que sea confiable, preciso, rápido, simple, sensible, selectivo y rentable. Tales métodos de detección de patógenos ofrecerían una gran ventaja comercial en la industria alimentaria y campos relacionados. Además, la tendencia a cruzar varios métodos generará nuevos dispositivos o metodologías para fortalecer las ventajas de los métodos de detección rápida. (Kumar y Thakur, 2018.)

En resumen, existe una gran cantidad de aplicaciones prometedoras en el campo de los métodos de detección rápidos y automatizados de patógenos transmitidos por los alimentos. Dada la amplia aplicabilidad y el gran potencial de tales métodos, todavía hay una gran posibilidad de nuevos desarrollos en un futuro próximo.

11. TÉCNICAS AVANZADAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR LOS ALIMENTOS

Los métodos convencionales de hoy en día son reemplazados por métodos avanzados como pruebas basadas en ácidos nucleicos (NAT) y diferentes técnicas basadas en PCR utilizadas en biología molecular para identificar patógenos específicos. Se detectan *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*

La identificación de patógenos transmitidos por los alimentos en un corto período de tiempo sigue siendo un desafío para el campo científico en general y la tecnología alimentaria en particular.

La seguridad microbiológica de los alimentos se ha convertido en una preocupación importante para los consumidores, la industria y las agencias reguladoras. La contaminación puede ocurrir a través de la contaminación del aire, el agua, el suelo y también en varios puntos durante el cultivo de los alimentos, la etapa de cosecha, el procesamiento y durante la preparación.

La rápida detección e identificación de microorganismos es un tema importante en el campo científico. Las pruebas microbiológicas se realizan con dos objetivos principales: establecer la ausencia de patógenos o sus toxinas para garantizar la seguridad de los alimentos, y enumerar la carga microbiana total o indicadora para monitorear la efectividad del procesamiento higiénico y verificar la calidad del producto y la estabilidad de la vida útil.

Hay una mejora en los métodos tradicionales, y los laboratorios han comenzado a adoptar pruebas basadas en ácidos nucleicos (NAT) para identificar patógenos rápidamente. Las ventajas de NAT incluyen resultados rápidos en un corto período de

tiempo, aunque sea baja en número (teóricamente una sola célula) y detectando un organismo específico de interés. Los métodos moleculares se han desarrollado ampliamente y se han descubierto otras maneras de realizar PCR que veremos en este apartado.

11.1. RETOS ACTUALES

La detección de patógenos transmitidos por los alimentos asociados con muchos factores impedidos en los alimentos llama la atención para la investigación científica. Hay muchas variedades de alimentos como sólidos, líquidos, cárnicos y alimentos listos para consumir. La complejidad de los alimentos presenta varios obstáculos en el muestreo, la preparación y el análisis. Incluso muchos inhibidores en matrices de alimentos muestran su obstaculización en métodos de detección como el ensayo basado en ADN, la técnica de PCR y el ensayo específico antígeno-anticuerpo (ELISA). Una de las tareas más desafiantes es la preparación de la muestra, se implementa antes de someterla a detección.

Además, se utilizan muchas metodologías para la detección de ADN patógeno y toxinas en los alimentos, pero estos ensayos han fallado debido a la baja tasa de recuperación, lo que a su vez se debe a la reducción de la precisión del ensayo. Serían útiles muchas técnicas de amplificación que combinen un diseño simple, rentabilidad y robustez para el desarrollo de las pruebas. Esto es uno de los grandes desafíos en la investigación que aún no se ha logrado.

11.2. AVANCES RECIENTES EN MÉTODOS DE DETECCIÓN BASADOS EN ÁCIDOS NUCLEICOS

Un investigador que busque continuamente herramientas sensibles para la detección de microorganismos patógenos, que actualmente es el área que está en auge para la detección de patógenos, son las técnicas orientadas al ácido nucleico, que se comentan a continuación. Para obtener el mejor rendimiento y reproducibilidad de los resultados mediante varios métodos de identificación, es obligatorio seguir los protocolos estándar con sumo cuidado incluso para la preparación de muestras, el aislamiento del ADN y la conservación del ADN molde, ya que estos van a decidir el destino y la calidad de los

experimentos. En este apartado se explicarán los métodos rápidos de NAT en biología molecular para la detección de patógenos alimentarios.

11.2.1. Tecnología de amplificación

11.2.1.1. AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA

La amplificación del ADN es esencial para la detección del patógeno alimentario objetivo. El método de amplificación isotérmica (LAMP) no requiere un proceso cíclico con un perfil de temperatura específico, pero amplifica el ADN con mayor especificidad, de manera eficiente y rápida. Actualmente hay varios programas de software disponibles en línea para LAMP.

LAMP tiene pasos de preparación de muestras más simples en comparación con la PCR convencional y la PCR en tiempo real. Con una simple alteración, el producto de reacción se puede visualizar sin equipo especializado costoso, y la reacción tarda entre 30 y 60 minutos. No hay necesidad de una purificación extensa del ADN. Durante la reacción de LAMP se produce una gran cantidad de ion pirofosfato como subproducto de amplificación. Se usa Mn junto con calceína como indicador de fluorescencia de la amplificación del ADN. La calceína presenta una fuerte fluorescencia bajo la luz ultravioleta formando complejos de quelación con iones metálicos divalentes como Ca^{2+} y Mn^{2+} . Cuando los iones de Mn^{2+} forman complejos con la calceína, la fluorescencia se apaga. Antes de la reacción de amplificación, la calceína es combinada con los iones Mn^{2+} y apaga la fluorescencia UV, y el color de la solución de reacción es naranja. El pirofosfato recién generado se une preferiblemente con Mn^{2+} y calceína combinada con iones de Mg^{2+} , lo que da como resultado una mayor fluorescencia. En combinación con la transcripción inversa, LAMP amplifica las secuencias de ácido ribonucleico con más precisión y detecta el ADN diana en pocas copias de la mezcla reacción.

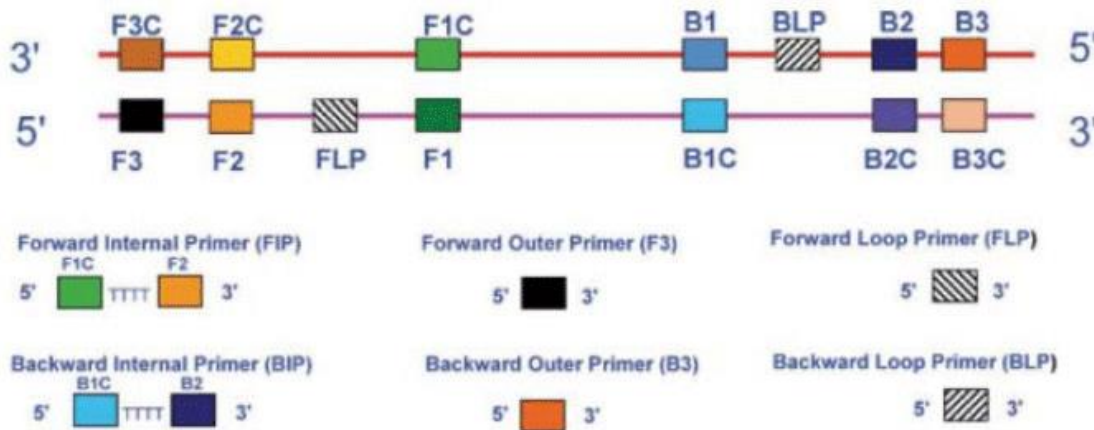


Imagen 7- Representación esquemática de los cebadores usados en LAMP

(Reviews in medical virology parida, M., 2008)

11.2.1.2. AMPLIFICACIÓN BASADA EN SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) es una tecnología desarrollada para amplificar ácidos nucleicos sin el uso de un termociclador como en la PCR. Es una amplificación isotérmica basada en la transcripción y es un método sensible ajustado para la detección de moléculas de ARN. En la reacción, dos cebadores de oligonucleótidos son complementarios a la región de ARN diana. La reacción se realiza a 41°C durante 1-2 h. a esta temperatura, el ADN genómico permanece bicatenario y, por lo tanto, no puede reemplazar el sustrato de amplificación. Uno de los cebadores tiene la secuencia promotora T7 que amplifica la cadena de ADNc usando la enzima transcriptasa inversa. El híbrido de ADN/ARN formado es digerido por RNAasa I para producir un ADNss. El segundo cebador que tiene un par de bases complementarias del cDNA lo une y polimeriza para formar dsDNA por transcriptasa inversa. El dsDNA produce multiples copias de ssRNA simple con la ayuda de la polimerasa de RNA T7. El producto monocatenario resultante podría utilizarse para la hibridación sin una etapa de desnaturalización previa. La sensibilidad de detección del ensayo NASBA se determinó a 1 UFC/ml.

En la reacción de NSBA se generan 10-100 copias de moléculas de ARN diana en cada ciclo y después de 4-5 ciclos se crean aproximadamente 1 millón de copias de la secuencia diana. El número de ciclos en la reacción NASBA es significativamente menor en comparación con los métodos de PCR convencionales.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

La técnica NASBA es la herramienta de diagnóstico prometedora para la detección de microorganismos viables porque se basa en la detección y amplificación de un ARN molecular. el ARN y el ADNc de doble hebra se acumulan exponencialmente y se detectan mediante electroforesis en gel de agarosa. Recientemente, se emplean sondas marcadas con fluorescencia y un escáner de fluorescencia para seguir la amplificación NASBA en tiempo real de un genoma de ARN viral. Dado que NASBA tiene la misma velocidad y precisión que la PCR, y ha agregado la ventaja de la detección de patógenos vivos, se convertirá en un método de laboratorio prometedor en microbiología de alimentos. El uso de NASBA podría contribuir al desarrollo de un kit de detección de patógenos asequible, portátil y fácil de usar, adecuado incluso para laboratorios no tan bien equipados.

11.2.1.3. AMPLIFICACIÓN DE DESPLAZAMIENTO DE HEBRA

La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) es también un método de amplificación isotérmica, que utiliza cuatro cebadores diferentes que contienen un sitio de restricción para la exonucleasa, ADN como plantilla y un fragmento deficiente en exonucleasa de *Escherichia coli* ADN polimerasa I para elongación de cebadores. En una sola reacción de puede producir 10^9 copias del ADN diana. SDA es la base para algunas pruebas de detección comerciales y se ha evaluado recientemente para la identificación de *M. tuberculosis* directamente a partir de muestras clínicas.

11.2.1.4. AMPLIFICACIÓN DE CÍRCULO RODANTE

En la amplificación de círculo rodante (ECA), la ADN polimerasa extiende un cebador directo único a lo largo de una plantilla circular durante muchas rondas, desplazando las secuencias hacia arriba y produciendo un ADN monocatenario largo de múltiples repeticiones. La tecnología RCA permite la amplificación de las secuencias de ADN de la sonda más 10-12 copias/h tanto en solución como en fase sólida a una sola temperatura. Tiene la capacidad de detectar fácilmente hasta unas pocas sondas circularizadas específicas de objetivos en una muestra de prueba. En la reacción de RCA, están involucradas numerosas rondas de síntesis enzimática isotérmica. La ADN polimerasa extiende un cebador con hibridación circular continuamente alrededor de la sonda de ADN circular de varias docenas de nucleótidos para replicar su secuencia una y otra vez.

Una de las principales ventajas de RCA es que, a diferencia de la PCR, esta tecnología es resistente a la contaminación y requiere poca o ninguna optimización del ensayo. La capacidad de RCA para producir productos de amplificación unidos a la superficie ofrece ventajas significativas para los ensayos de hibridación in situ o de microarrays. Las reacciones de RCA exhiben una excelente especificidad de secuencia que es favorable para el genotipado o la detección de mutaciones.

11.3. MÉTODOS AVANZADOS BASADOS EN PCR

11.3.1. PCR digital de gotas

Es una técnica eficaz para analizar muestras con más especificidad y sensibilidad. Se utilizaron una variedad de plantillas de ADN de *Cryptosporidium* para evaluar la especificidad y la linealidad comparando la qPCR convencional y la ddPCR emergente. Este último actúa como una nano PCR autónoma, donde los ácidos nucleicos dirigidos se clasifican aleatoriamente y se contienen en cada gota que contiene de cero a una (o más) copias de ese ácido nucleico en particular. Cada gota emite fluorescencia y, por lo tanto, se mide individualmente; esto también proporciona una intensidad detectada más fácilmente ya que los pequeños cambios se observan más fácilmente individualmente por el instrumento, en comparación con una cantidad requerida por la qPCR. La principal ventaja de este método sobre la qPCR convencional incluye la no necesidad de establecer una curva de calibración; la cuantificación absoluta se obtiene sin dificultad. La precisión del método digital de gotitas también es significativamente mayor que la qPCR, pero disminuye a medida que disminuye la concentración de ADN. Debido a su volumen de nano litros, la relación entre las moléculas de ADN diana y los reactivos de PCR es sustancialmente mayor. En general, el costo también fue significativamente más bajo que el de la qPCR convencional.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

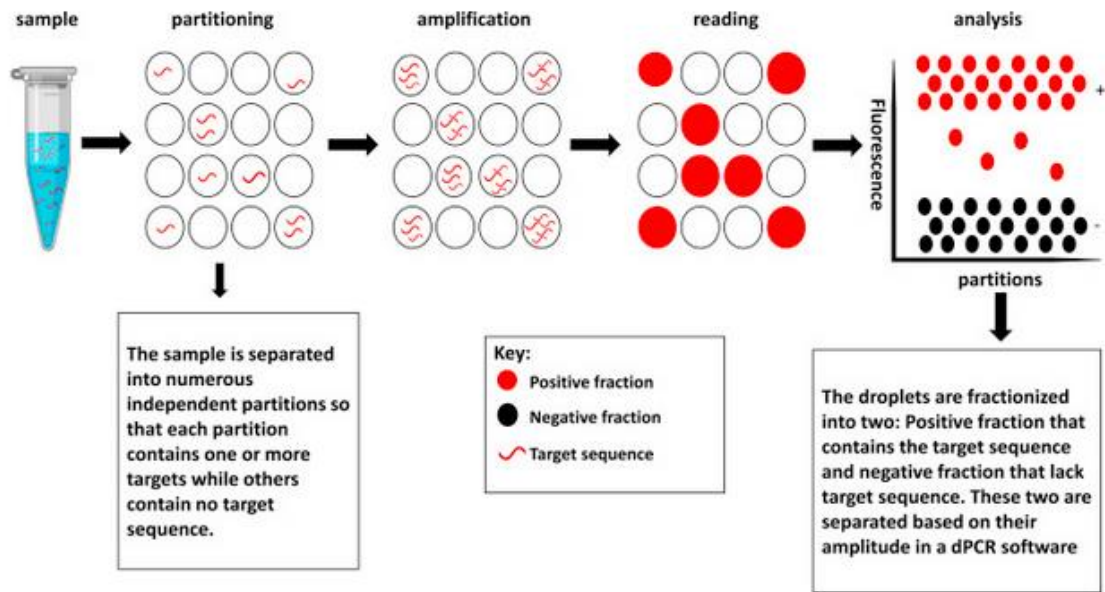


Imagen 8 – Principio de ddPCR que muestra cómo una sola muestra que contiene la secuencia diana se divide y amplifica para generar miles de copias que pueden detectarse y leerse utilizando un sistema favorable.

(Nyaruba et al, 2019)

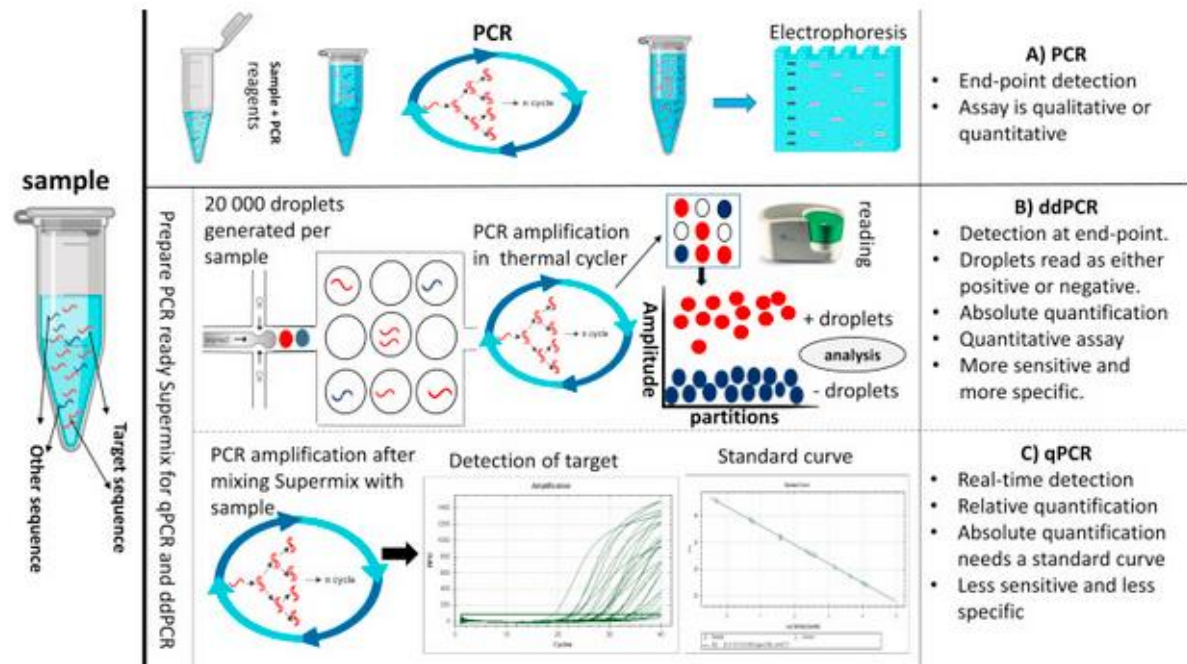


Imagen 9 – El flujo de trabajo de varias plataformas de PCR.

- A) *Detección de muestras basada en electroforesis en gel*
- B) *Flujo de trabajo ddPCR y detalles de los pasos de procesamiento de la muestra*
- C) *Flujo de trabajo de cuantificación de PCR*

(Nyaruba et al, 2019)

11.3.2. PCR extrema

La PCR extrema requiere una duración más corta para la detección de microorganismos que la PCR convencional, debido a la rápida conducción del calor. Cuando se aumenta la concentración de cebadores y enzima polimerasa, la velocidad de los ciclos de reacción también aumenta de 10 a 20 veces y los resultados pueden esperarse en un periodo de tiempo corto. La extreme-PCR es eficiente y capaz de llevar a cabo ciclos específicos de amplificación de ADN en 15-60 segundos. Por tanto, la PCR extrema es adecuada para la detección rápida de patógenos infecciosos con resultados inmediatos.

11.3.3. PCR-fría

La detección de genes poco abundantes aumenta las dificultades para diagnosticar enfermedades patógenas. La PCR fría se desarrolla para resolver este problema y el método se utiliza para amplificar selectivamente genes poco abundantes a partir de una mezcla de ADN mutante y de tipo salvaje utilizando la temperatura de desnaturalización crítica. Por ejemplo, un desajuste de bases en una cadena de ADN afecta a la temperatura de desnaturalización. Por lo tanto, la temperatura de desnaturalización se reduce, por lo que el gen podría desnaturalizarse y amplificarse mientras que el ADN de tipo salvaje no puede amplificarse. El gen mutante se enriquece a la temperatura más baja. Este método ha logrado 100 veces el éxito en la detección de mutaciones y podría utilizarse para detectar patógenos virales.

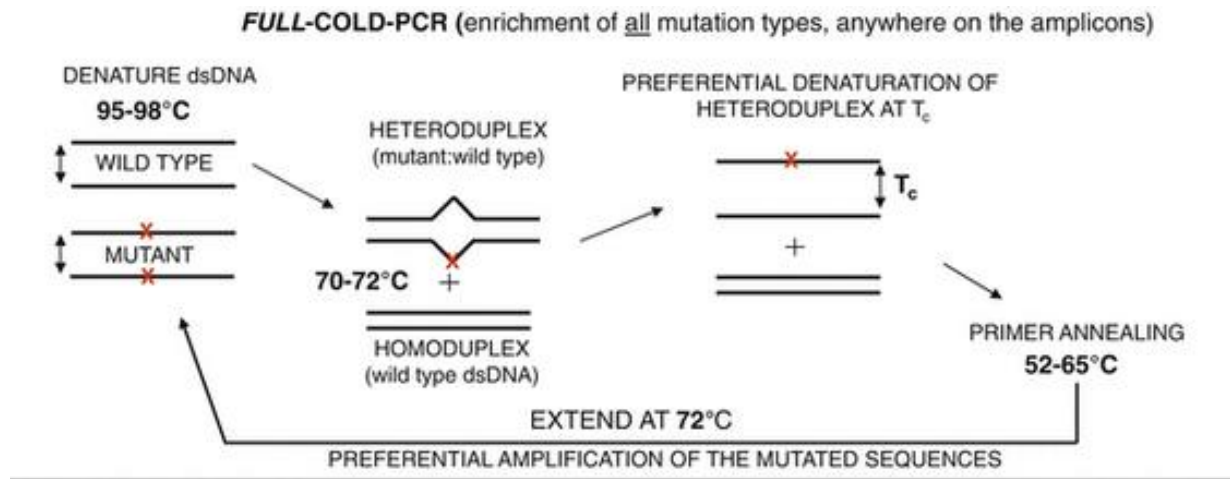


Imagen 10 – Esquema protocolo de PCR-fría

(Castellanos et al,2014)

11.3.4. HPE-PCR

La extensión de pulso de calor-PCR (HPE-PCR) es otra técnica desarrollada con una técnica de amplificación para cadenas de ADN largas con grandes repeticiones de bases de CTG. Esta técnica es una solución para superar los problemas de amplificación en grandes extensiones. Esta HPE-PCR es eficaz en la amplificación de ADN con secuencias ricas en GC.

11.3.5. PCR de nanopartículas

La PCR de nanopartículas es otro desarrollo con amplificación rápida de ADN que amplifica la plantilla (G+C) simplemente con precisión, especificidad y sensibilidad. Las nanopartículas de oro podrían mejorar la eficiencia de la amplificación del ADN en un tiempo de reacción corto con velocidades de enfriamiento cada vez mayores. Las excelentes propiedades de transferencia de calor en las nanopartículas de oro ayudan a la eficiencia de la amplificación del ADN. Las nanopartículas de oro tienen propiedades ópticas, térmicas y catalíticas similares a las proteínas de unión monocatenarias que solo se unen con cadenas simples y no se unen con ADN bicatenario. Por tanto, el método podría utilizarse para desarrollar y detectar patógenos virales.

11.3.6. RT-PCR

Una de las limitaciones más evidentes de las técnicas de PCR proviene de la falta de diferenciación entre células viables y no viables. Esto es porque el ADN siempre está presente tanto si la célula está viva como muerta. La PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) se desarrolló para contrarrestar esta falta de discriminación y es capaz de diferenciar células viables. La transcriptasa inversa es una enzima capaz de sintetizar ADN monocatenario a partir de ARN en la dirección 5'-3'.

11.3.7. PCR de reacción en cadena ligasa

LCR es una nueva técnica utilizada para detectar secuencias de ácidos nucleicos de microorganismos mediante amplificación de ADN. Es similar a la PCR, pero solo las moléculas sonda se amplifican mediante la polimerización de nucleótidos. Dos sondas para cada hebra de ADN se ligan juntas para formar una sola sonda. LCR utiliza ADN polimerasa termoestable y una enzima ADN ligasa para impulsar la reacción. Esta técnica tiene una desventaja en la detección de patógenos alimentarios, ya que puede detectar ADN de organismos muertos. LCR emplea la especificidad de las enzimas ligasa para lograr la discriminación alélica. Es una de las técnicas de amplificación desarrolladas recientemente para la detección de mutaciones puntuales en patógenos microbianos. La característica única de LCR es el segundo juego de cebadores, espejo del primer par, que está diseñado con el nucleótido en el extremo 3' del cebador que denota la diferencia de secuencia. En presencia de ADN diana, las sondas adyacentes se ligan mediante ADN ligasa termoestable. Si hay un desajuste en la unión del cebador, será discriminado por la ligasa termoestable y la falta de producto de PCR. La ausencia del producto ligado indica al menos un cambio de un solo par de bases en la secuencia diana. Posteriormente, los productos ligados pueden servir como plantillas y amplificarse exponencialmente mediante ciclos térmicos. Un inconveniente es que la diana se amplifica, pero el riesgo de contaminación y la variación en el número de copas del plásmido que contiene la diana LCR es una fuente de error. LCR tiene un poder de discriminación muy bueno en un sitio de nucleótido diana, como el cambio de base de un solo nucleótido.

11.3.8. PCR de detección de ligasa

La detección de moléculas de ADN específicas mediante ligación enzimática fue desarrollada para superar limitaciones de las sondas oligoméricas para distinguir mutaciones de base única asociadas con enfermedades genéticas. Las sondas oligoméricas de ssDNA típicamente son específicas en longitudes de 20-25 nucleótidos, su sensibilidad está comprometida debido a su temperatura de disociación relativamente baja. Las ventajas de la detección basada en ligación son tanto la hibridación de la sonda como la selectividad catalítica de la ADN ligasa para mejorar la especificidad y la sensibilidad de la detección. Dado que las ligasas favorecen el complemento perfecto de una estructura de ADN de doble hebra para catalizar con éxito el sellado de una muesca en la cadena principal del fosfodiéster, se pueden usar para unir dos sondas de hibridación adyacentes covalentemente juntas en presencia de una molécula diana correcta. Las sondas son específicas de la diana y sólo detectan si las sondas se ligan. La sonda “discriminadora” está diseñada de manera que el extremo 3 coincide con la diana en una posición única que contiene un nucleótido que distingue la diana de otras cadenas de ADN.

11.3.9. PCR de cebador específico único de baja rigurosidad

La PCR de cebador específico único de baja rigurosidad (LSSP-PCR) es una técnica basada en PCR extremadamente simple que permite la detección de mutaciones únicas o múltiples en fragmentos de ADN de tamaño genético. En los dos pasos, el primer paso es la PCR específica (SPCR) para obtener la plantilla de ADN que se utilizará y el segundo es LSSP-PCR que utiliza condiciones de baja rigurosidad y solo un cebador, normalmente utilizado en el SPCR.

Brevemente, los fragmentos de ADN molde se someten a PCR utilizando altas concentraciones de un solo cebador oligonucleótidos específico, con grandes cantidades de ADN polimerasa Taq y baja temperatura de hibridación. En estas condiciones, el cebador se hibrida específicamente con su región complementaria y no específicamente con múltiples sitios dentro de los fragmentos de ADN de una manera dependiente de la secuencia, produciendo un conjunto heterogéneo de productos de reacción que pueden resolverse mediante electroforesis para dar lugar a una firma de

ADN multibanda que refleja la secuencia de la plantilla de ADN. Este tipo de PCR se ha utilizado ampliamente en la detección de mutaciones en enfermedades genéticas humanas.

11.3.10. PCR de polimorfismo de conformación monocatenario

El análisis de polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP) se considera generalmente como el método más adecuado para la detección de mutaciones en tramos cortos de ADNn. El proceso SSCP implica la amplificación por PCR del fragmento diana, la desnaturalización del producto de PCR con calor y formamida (u otros desnaturalizantes como hidróxido de sodio, urea e hidróxido de metilmercurio) y electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. Los fragmentos descritos de ADN monocatenarios (ADNss) caen en conformaciones únicas determinadas por su secuencia primaria cuyas estructuras se estabilizan mediante interacciones intramoleculares.

Una alteración de una sola base puede resultar en un cambio conformacional, que puede ser detectado por la movilidad alterada de la molécula de ssDNA en SSCP.

Varios parámetros afectan a la sensibilidad del análisis SSCP:

- Tipo de mutación
- Tamaño del fragmento de ADN
- Fragmento de contenido de G y C
- Contenido de poliacrilamida u otra composición de matriz de gel
- Tamaño y potencial del gel
- Temperatura del gel durante la electroforesis
- Concentración de ADN
- Tiempo de ejecución de la electroforesis
- Composición del tampón, incluida la fuerza iónica y el pH

11.4. MICROARRAY- DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR MÚLTIPLES OBJETIVOS

Microarray se refiere a una pequeña matriz bidimensional de fragmentos de ADN de alta densidad que se imprimen o sintetizan en un portaobjetos de vidrio o silicio (chip) en un orden específico. La hibridación de los fragmentos de ADN con sondas marcadas con fluorescencia podría detectarse mediante software avanzado e instrumentación. Los microarrays de diagnóstico microbiano (MDM) utilizan tres tipos de sondas:

1. Oligonucleótidos cortos
2. Oligonucleótidos largos
3. Amplicones de PCR

Los oligonucleótidos cortos tienen 1-2 desajustes y esto reduce la capacidad de unión y, por lo tanto, es necesario utilizar la amplificación por PCR. Las sondas largas de oligonucleótidos y los productos de PCR, por otro lado, se caracterizan por un potencial de discriminación más bajo (80-85% de homología de secuencia), pero una mayor capacidad de unión también se puede combinar con enfoques de amplificación más genéricos. Además, la longitud de la sonda, la posición del desajuste también juega un papel importante en la especificidad de hibridación. Un portaobjetos de vidrio plano con diferentes modificaciones de superficie que permiten la unión covalente de moléculas de sonda es el formato de microarrays convencional ampliamente aceptado en los laboratorios de investigación. Se han desarrollado formatos alternativos en tubos o placas de 96 pocillos que representan productos comercializados en el mercado de rutina.

El gen de ARNr 16S sirve como reloj evolutivo y marcador taxonómico en la sistemática bacteriana. Las razones para elegir el gen ARNr 16S como marcador de diagnóstico se basan en el formato ubicuo, la presencia de regiones muy variables conservadas y la disponibilidad de una base de datos extensa y de acceso público.

Los marcadores alternativos incluyen genes universalmente conservadores, genes funcionales específicos de grupo, virulencia u otros genes específicos de la diana. La utilización de genes marcadores alternativos más específicos permite la tipificación adicional de los microorganismos detectados. Un laboratorio clínico también podría considerar el uso de un microarray validado para la detección de genes de resistencia a

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

los antimicrobianos. Recientemente, se desarrolló y validó un microarray de diagnóstico para la detección de cepas clínicas de *E. coli* resistentes a fluoroquinolonas.

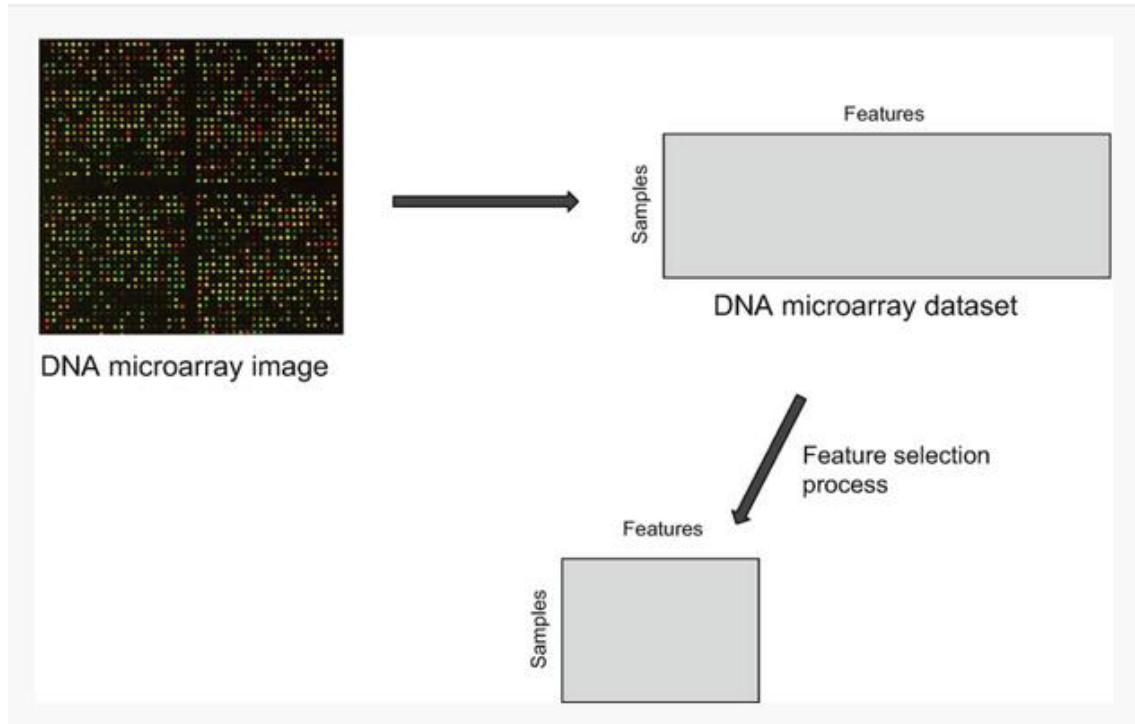


Imagen 10 – Esquema de un proceso típico de selección de características en datos de microarrays de ADN

(Bolón – Canedo V et al, 2019)

12. CONCLUSIONES

1. La detección de patógenos es uno de los aspectos más desafiantes en las industrias de alimentos y agua, debido a la rápida propagación de enfermedades transmitidas por los mismos y a los costos significativos que genera, por ello los métodos microbiológicos que determinen la idoneidad de alimentos altamente perecederos, deberán elegirse de forma que los resultados puedan obtenerse antes de que dichos alimentos se consuman.
2. Los métodos inmunológicos de detección rápida como inmunoensayos, métodos por precipitación y métodos por aglutinación, técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta y citometría de flujo, son métodos rápidos y fiables en situaciones como la aparición de brotes de enfermedades.
3. Actualmente se cuentan con metodologías de identificación rápida, pero la automatización total es un concepto aún lejano en la realidad, y aún no es posible prescindir del todo de los métodos manuales, ya que hay algunos microorganismos, o combinaciones de microorganismo/antimicrobiano presentan falsas susceptibilidades o resistencias.
4. Las técnicas moleculares en la detección de patógenos tienen la capacidad de generar resultados en un corto tiempo en comparación con los métodos basados en cultivos.
5. El valor que la industria alimentaria da a la confianza del consumidor es enorme y sirve de incentivo para localizar aquellas zonas que ofrecen un margen de mejora. Enfocándonos en esas zonas tenemos la oportunidad de elevar aún más los niveles de seguridad alimentaria y para ello, el papel de la tecnología es fundamental. Con la aplicación correcta de varias de estas tecnologías simultáneamente, se podrían desarrollar tecnologías más precisas y de mayor alcance que satisfagan todas las necesidades de la industria alimentaria.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Beatrice Hervé E., Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*. (2015). ISSN 0716-8640, <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.11.004>.
- Bolón Canedo V., Alonso Betanzos A., López de Ullibarri I., Cao R. Challenges and Future Trends for Microarray Analysis. *Methods Mol Biol*. (2019). 1986:283-293. doi: 10.1007/978-1-4939-9442-7_14. PMID: 31115895.
- Castellanos Rizaldos E., Milbury C.A., Guha M., Makrigiorgos G.M. COLD-PCR enriches low-level variant DNA sequences and increases the sensitivity of genetic testing. *Methods Mol Biol*. (2014). 1102:623-39. doi: 10.1007/978-1-62703-727-3_33. PMID: 24259002.
- Di Giovanni G.D., Hashemi F.H., Shaw N.J., Abrams F.A., LeChevallier M.W., Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. *Appl Environ Microbiol*. (1999). 65(8):3427-32. doi: 10.1128/AEM.65.8.3427-3432.1999. PMID: 10427030; PMCID: PMC91515.
- Glosario de términos de educación en inocuidad de alimentos de la Organización Mundial de la Salud
- Fundora Hernandez, H. et al. Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Rev Cubana Hig Epidemiol* .(2013). 51,1,84-96. ISSN 1561-3003.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

- Jochem F.J. Short-term physiologic effects of mechanical flow sorting and the Becton-Dickinson cell concentrator in cultures of the marine phytoflagellata *Emiliana huxleyi* and *Micromonas pusilla*. *Cytometry A*. (2005). 65,1,77-83. doi: 10.1002/cyto.a.20137. PMID: 15791646.
- Kumar D., Thakur S. Molecular Tools To Study Preharvest Food Safety Challenges. *Microbiol Spectr*. (2018). 6(1). doi: 10.1128/microbiolspec.PFS-0019-2017. PMID: 29451114.
- Mangal M., Bansal S., Sharma S.K., Gupta R.K. Molecular Detection of Foodborne Pathogens: A Rapid and Accurate Answer to Food Safety. *Crit Rev Food Sci Nutr*. (2016). 3, 56(9), 1568-84. doi: 10.1080/10408398.2013.782483. PMID: 25830555.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<https://www.mapa.gob.es/es/>
- Nyaruaba R., Mwaliko C., Kering K.K., Wei H. Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world. *Tuberculosis (Edinb)*. (2019). 117:85-92. doi: 10.1016/j.tube.2019.07.001. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31378274.
- Qian H., Pang E., Du Q., Chang J., Dong J., Toh S.L., Ng F.K., Tan A.L., Kwang J. Production of a monoclonal antibody specific for the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* and characterization of the epitope. *Appl Environ Microbiol*. (2008) 74(3):833-9. doi: 10.1128/AEM.01559-07. Epub 2007 Dec 7. PMID: 18065632; PMCID: PMC2227716.
- Rajapaksha P., Elbourne A., Gangadoo S., Brown R., Cozzolino D., Chapman J. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst*. (2019). 14,144(2),396-411. doi: 10.1039/c8an01488d. PMID: 30468217.

Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico

- Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (<<DOUE>> núm.338, de 22 de diciembre de 2005; Referencia: DOUE-L-2005-82539
- Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE) (DO L 338 de 22.12.2005, p. 1)
- Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- Umesha S., Manukumar H.M. Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (2018). 2, 58(1), 84-104. doi: 10.1080/10408398.2015.1126701. Epub 2017 Jul 11. PMID: 26745757.
- Valderrama W.B., Dudley E.G., Doores S., Cutter C.N. Commercially Available Rapid Methods for Detection of Selected Food-borne Pathogens. *Crit Rev Food Sci Nutr.* (2016). 3,56(9),1519-31. doi: 10.1080/10408398.2013.775567. PMID: 25749054.
- Wang X., Ying S., Wei X., Yuan J. Development of a gold nanoparticle-based universal oligonucleotide microarray for multiplex and low-cost detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* (2017). 17, 253, 66-74. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.005. Epub 2017 May 9. PMID: 28505584.
- Zhao X., Lin C.W., Wang J., Oh D.H. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol.* (2014). 28,24(3),297-312. doi: 10.4014/jmb.1310.10013. PMID: 24375418.