



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MÉTODOS RÁPIDOS APLICADOS EN MICROBIOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

AURA JAZMÍN CASTAÑEDA SERNA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: EDUARDO BONILLA ESPINOSA

VOCAL: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SECRETARIO: ROSALBA ESQUIVEL COTE

1ER. SUPLENTE: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

2° SUPLENTE: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

QFB. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SUSTENTANTE:

AURA JAZMÍN CASTAÑEDA SERNA

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	VII
RESÚMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO 1. HISTORIA DE LOS MÉTODOS RÁPIDOS EN MICROBIOLOGÍA.....	6
CAPÍTULO 2. MÉTODOS RÁPIDOS DEPENDIENTES DEL MEDIO.....	10
2.1 PLACAS DELGADAS CON PELÍCULA PLÁSTICA.	10
2.1.1 Fundamento.	10
2.1.2 Descripción.....	10
2.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.....	11
2.1.4 Ventajas e inconvenientes.	12
CAPÍTULO 3. MEDIOS CROMOGÉNICOS Y FLUOROGÉNICOS.	14
3.1 FUNDAMENTO.....	14
3.2 DESCRIPCIÓN.....	14
3.3 MEDIOS CROMOGÉNICOS Y FLUOROGÉNICOS PARA MICROORGANISMOS INDICADORES.....	15
3.3.1 Placa SlimPlate®	15
3.3.1.1 Fundamento.....	15
3.3.1.2 Descripción.....	15
3.3.1.3 Formatos de las placas SimPlate®	16
3.3.1.4. Ventajas e inconvenientes.....	16
3.3.2. Discos que detectan enzimas específicas para coliformes y <i>E. coli</i>	18
3.3.2.1 Fundamento.....	18
3.3.2.2 Algunas marcas presentes en el mercado.....	18
3.3.2.3 Ventajas e inconvenientes.	19
3.4 MEDIOS CROMOGÉNICOS Y FLUOROGÉNICOS PARA PATÓGENOS ESPECÍFICOS EN ALIMENTOS.	20
3.4.1 Medios especiales para <i>E. coli</i> O157:H7.....	20
3.4.1.1 Fundamento.....	20
3.4.1.2 Descripción.....	20
3.4.1.3 Ventajas e inconvenientes.	22
3.4.2 Medio especial para <i>Listeria monocytogenes</i>	23
3.4.2.1 Fundamento.....	23
3.4.2.2 Descripción.....	23
3.4.2.3 Ventajas e inconvenientes.	24
3.4.3 Medios especiales para <i>Salmonella</i>	24
3.4.3.1 Fundamento.....	24
3.4.3.2 Descripción.....	24
3.4.3.3 Ventajas e inconvenientes.	26
CAPÍTULO 4. SISTEMAS MINIATURIZADOS Y AUTOMATIZADOS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	27
4.1 FUNDAMENTO.....	27
4.2 DESCRIPCIÓN.....	27

4.3	ALGUNAS MARCAS PRESENTES EN EL MERCADO.....	27
4.4	VENTAJAS E INCONVENIENTES.....	29
CAPÍTULO 5. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.....		31
5.1	FUNDAMENTO.....	31
5.2	DESCRIPCIÓN.....	31
5.3	VENTAJAS E INCONVENIENTES.....	32
5.4	SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA.....	33
5.4.1	Fundamento.....	33
5.4.2	Descripción.....	33
5.4.3	Algunas marcas presentes en el mercado.....	34
5.4.4	Ventajas e inconvenientes.....	34
5.5	AGLUTINACIÓN EN LÁTEX (LA) Y AGLUTINACIÓN PASIVA INVERSA EN LÁTEX (RLPA).....	35
5.5.1	Fundamento.....	35
5.5.2	Descripción.....	35
5.5.3	Algunas marcas presentes en el mercado.....	36
5.5.4	Ventajas e inconvenientes.....	36
5.6	INMUNODIFUSIÓN.....	37
5.6.1	Fundamento.....	37
5.6.2	Descripción.....	37
5.6.3	Algunas marcas presentes en el mercado.....	37
5.6.3	Ventajas e inconvenientes.....	38
5.7	ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA).....	39
5.7.1	Fundamento.....	39
5.7.2	Descripción.....	39
5.7.3	Algunas marcas presentes en el mercado.....	40
5.7.4	ELISA en placa.....	40
5.7.4.1	Descripción.....	40
5.7.4.2	Ventajas e inconvenientes.....	42
5.7.5	ELISA en membrana.....	42
5.7.5.1	Descripción.....	42
5.7.5.2	Ventajas e inconvenientes.....	43
5.8	ANÁLISIS DE INMUNOFUORESCENCIA (IF).....	44
5.8.1	Fundamento.....	44
5.8.2	DESCRIPCIÓN.....	44
5.8.4	Ventajas e inconvenientes.....	45
5.9	CITOMETRÍA DE FLUJO.....	46
5.9.1	Fundamento.....	46
5.9.2	Descripción.....	46
5.9.3	Algunas marcas presentes en el mercado.....	47
5.9.4	Ventajas e inconvenientes.....	47
CAPÍTULO 6. MÉTODOS MOLECULARES.....		48
6.1	INTRODUCCIÓN.....	48
6.2	MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN.....	48
6.2.1	Fundamento.....	48
6.2.2	Descripción.....	49
6.2.3	Algunas marcas presentes en el mercado.....	52
6.2.4	Ventajas e inconvenientes.....	52

6.3 REACCIÓN DE LA CADENA POLIMERASA (PCR).....	53
6.3.1 Fundamento.....	53
6.3.2 Descripción.....	53
6.3.3 Otros tipos de PCR.....	55
6.2.3 Equipos presentes en el mercado.....	55
6.3.4 Ventajas e inconvenientes.....	56
6.4 OTRAS TÉCNICAS DE TIPIFICACIÓN MOLECULAR.....	57
6.4.1 Ventajas e inconvenientes.....	59
CAPÍTULO 7. BIOSENSORES.....	60
7.1 BIOSENSORES ELÉCTRICOS.....	60
7.1.1 Fundamento.....	60
7.1.2 Descripción.....	60
7.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.....	61
7.1.4 Ventajas e inconvenientes.....	61
7.2 BIOSENSORES ÓPTICOS.....	62
7.2.1 Biosensor de fibra óptica.....	62
7.2.1.2 Descripción.....	62
7.2.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.....	63
7.2.1.4 Ventajas e inconvenientes.....	64
7.2.2 Sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR).....	64
7.2.2.1 Definición.....	64
7.2.2.3 Algunas marcas presentes en el mercado.....	65
7.2.2.4 Ventajas e inconvenientes.....	66
CAPÍTULO 8. OTROS MÉTODOS RÁPIDOS.....	67
8.1 SISTEMA DE SIEMBRA PARA RECUENTO DE CÉLULAS VIABLES EN ALIMENTOS.....	67
8.1.1 Fundamento.....	67
8.1.2 Descripción.....	67
8.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.....	68
8.1.4 Ventajas e inconvenientes.....	68
8.2 FILTRACIÓN POR MEMBRANA HIDROFÓBICA (HGFMF).....	69
8.2.1 Fundamento.....	69
8.2.2 Descripción.....	69
8.2.3 Algunas marcas presentes en el mercado.....	70
8.2.3 Ventajas e inconvenientes.....	71
8.3 EPIFLUORESCENCIA DIRECTA SOBRE FILTRO.....	72
8.3.1 Fundamento.....	72
8.3.2 Descripción.....	72
8.3.3 Ventajas e inconvenientes.....	72
8.4 MALDI-TOF MS.....	73
8.4.1 Fundamento.....	73
8.4.2 Descripción.....	73
8.4.3 Algunas marcas presentes en el mercado.....	74
8.4.4 Ventajas e inconvenientes.....	75
CAPÍTULO 9. MÉTODOS RÁPIDOS UTILIZADOS EN LA BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS INDICADORES Y PRINCIPALES PATÓGENOS EN ALIMENTOS.....	76
9.1 MICROORGANISMOS INDICADORES.....	76

9.1.1 Mesófilos aerobios	77
9.1.2 Mohos y levaduras.....	78
9.1.3 Coliformes.	82
9.2 PRINCIPALES PATÓGENOS EN ALIMENTOS QUE SE BUSCAN EN NORMA.....	85
9.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	85
9.2.3 <i>Salmonella spp</i>	88
9.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	91
9.3 PATÓGENO <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROHEMORRÁGICO (EHEC).....	93
CONCLUSIONES	96
ANEXOS	98
A. FABRICANTE O PROVEDOR DE CADA METODO RÁPIDO DESCRITO.....	98
B. RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE CADA METODO RÁPIDO.	100
REFERENCIAS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de los métodos rápidos.....	8
Figura 2. Partes de la placa Petrifilm™.....	10
Figura 3. Variedad de placas delgadas con película plástica.....	11
Figura 4. Placa Simplate® y sus reactivos.....	15
Figura 5. Discos con MUG.....	18
Figura 6. <i>E. coli</i> O157:H7 en agar Rainbow.....	20
Figura 7. <i>E. coli</i> O157:H7 en el medio BCM®O157:H7.....	20
Figura 8. <i>E. coli</i> O157:H7 en agar Fluorocult®.....	21
Figura 9. <i>L.monocytogenes</i> en agar BCM®.....	23
Figura 10. <i>Salmonella</i> en agar RAMBACH.....	24
Figura 11. <i>Salmonella</i> en agar XLT 4.....	25
Figura 12. <i>Salmonella</i> en agar MSRV.....	25
Figura 13. Sistemas miniaturizados y automatizados disponibles en el mercado.....	28
Figura 14. Unión antígeno anticuerpo.....	31

Figura 15. Separación inmunomagnética.....	33
Figura 16. Aglutinación en látex.....	36
Figura 17. Sistema 1-2 test para la identificación de <i>Salmonella</i>	38
Figura 18. Sistemas basados en ELISA disponibles en el mercado.	40
Figura 19. Esquema de distintas configuraciones de la prueba de ELISA.....	41
Figura 20. Análisis inmunocromatográfico de flujo lateral.....	43
Figura 21. Inmunofluorescencia por el método directo e indirecto.....	45
Figura 22. Citómetro de flujo.....	46
Figura 23. Principios de la hibridación de ácidos nucleicos.....	49
Figura 24. Marcado con moléculas indicadoras en sondas.....	51
Figura 25. Pasos de la PCR.....	54
Figura 26. Termociclador y termociclador en tiempo real.....	55
Figura 27. Sistemas y equipos de otras técnicas de tipificación molecular.....	59
Figura 28. Biosensores eléctricos.....	61
Figura 29. Funcionamiento del biosensor de fibra óptica.....	63
Figura 30. Biosensor de fibra óptica marca RAPTOR™.....	64
Figura 31. Detección de patógenos y toxinas a partir de SPR.....	65
Figura 32. Sistemas basados en SPR.....	66
Figura 33. Tipos de siembras que opera el sistema de siembra en espiral.....	67
Figura 34. Sistema de siembra en espiral.....	68
Figura 35. Sistema NEO-GRID® e ISO-GRID®.....	70
Figura 36. Diagrama del funcionamiento de un espectrómetro MALDI-TOF.....	74
Figura 37. Sistemas basados en la técnica de MALDI-TOF MS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición y periodo de incubación de algunas placas con película plástica	12
Tabla 2. Características generales de algunos sistemas miniaturizados y automatizados comerciales	28
Tabla 3. Descripción, sistemas y equipos de otras técnicas moleculares	58
Tabla 4. Agares utilizados en el sistema HGMF	71
Tabla 5. Límites máximos permisibles de microorganismos indicadores para diferentes alimentos	76
Tabla 6. Métodos rápidos utilizados para mesófilos aerobios	78
Tabla 7. Géneros importantes de mohos y levaduras en alimentos	80
Tabla 8. Métodos rápidos utilizados para hongos y levaduras	81
Tabla 9. Métodos rápidos utilizados para el recuento de coliformes totales, coliformes fecales y <i>E. coli</i>	84
Tabla 10. Métodos rápidos utilizados para <i>Listeria monocytogenes</i>	87
Tabla 11. Métodos rápidos utilizados para <i>Salmonella</i>	90
Tabla 12. Métodos rápidos utilizados para <i>Staphylococcus aureus</i>	93
Tabla 13. Métodos rápidos utilizados para <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico (EHEC)	95

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

4-MU: 4-metilumbeliferilo

7-AMC: 7-amino-4-metilcumarina

Ab^{*}: Anticuerpo

ADRA^{*}: Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado.

AFLP^{*}: Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados

Ag^{*}: Antígeno

ALP^{*}: Fosfatasa Alcalina

AOAC^{*}: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

APHA^{*}: Asociación Americana para la Salud Pública

ASTEL: Agar soya tripticaseína con 0,6% de extracto de levadura

a_w^{*}: Actividad acuosa

BHI^{*}: infusión cerebro-corazón

BMA^{*}: Agar amortiguado con MUG

CAMP^{*}: Cristie-Atkins-Munch-Peterson

cDNA^{*}: DNA complementario

CH: Colitis hemorrágica

DG18^{*}: Agar dicloran con glicerol al 18%

DNA^{*}: Ácido desoxirribonucleico

dNTP : oligonucleótidos

DRBC^{*}: Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol

EB^{*}: Caldo de enriquecimiento

EHEC*: *Escherichia coli* Enteroemorrágica

EIEC*: *Escherichia coli* Enteroinvasiva

ELISA*: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPEC*: *Escherichia coli* Enteropatógena

ETA: Enfermedades de transmisión alimentaria

ETEC*: *Escherichia coli* Enterotoxigénica

FITC*: Tioisocianato de fluoresceína

HACCP*: Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control

HGMF*: Filtración por membrana hidrofóbica

HRP*: Peroxidasa de rábano

IDT*: Tiempo de detección de Impedancia

IF: Inmunofluorescencia

IMS*: Separación inmunomagnética

ISO*: Organización Internacional de Normalización

Kb: kilo bases

LA*: Aglutinación en látex

LIA*: agar hierro lisina

LMG: lactosa monensina glucuronato

LMP*: cloruro de litio feniletanol -moxolactam

LST: Lauril sulfato triptosa

MALDI-TOF*: Tiempo de vuelo desorción/ionización láser asistida por una matriz

mRNA*: RNA mensajero

MS*: Espectometría de masas

MSRV*: Rappaport Vassiliadis modificado semisólido

MUG: 4-metilumbeliferil- β -glucoronido

NMP: Número más probable

NMX: Norma Mexicana

NOM: Norma Oficial Mexicana

ONPG*: Orto-nitrofenilgalactopiranosido

OXA*: agar base Oxford

PAb*: Anticuerpos policlonales

PCR*: Reacción de la cadena polimerasa

PFGE*: Electroforesis en gel por campo pulsado

PMb*: Anticuerpos monoclonales

PTT: Púrpura trombótica trombocitopénica

Q*: Colorante amortiguador

qPCR*: PCR cuantitativa en tiempo real

R*: Indicador fluorescente

RAPD*: ADN Polimórfico amplificado al azar

rep-PCR*: Amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos Repetitivos.

RFGE*: Restricción de polimorfismos en la longitud de fragmentos

RLPA*: Aglutinación pasiva inversa en látex

RM-VP: Rojo de metilo y Voges-Proskauer

RNA*: Ácido ribonucleico

rRNA*: RNA ribosómico

RT*: Transcriptasa Inversa

SPLC*: Sistema de siembra en espiral

SPR*: Resonancia de plasmón superficial

SS: Agar para Salmonella y Shigella

SUH: Síndrome urémico hemolítico

Tm*: temperatura de fusión

TSAF*: Agar triptona con Fast Green

TSI*: Triple azúcar hierro

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultra violeta

VB: agar verde brillante

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

X-Glu: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosido

XLD: xilosa lisina desoxicolato

YM*: Levaduras y hongos

* = Por sus siglas en inglés

RESÚMEN

El análisis microbiológico de los alimentos, en particular la detección oportuna y rápida de especies patógenas, sigue siendo una tarea desafiante para prácticamente todos los ensayos y tecnologías.

Aunque los métodos convencionales son procedimientos eficaces, algo sensibles y se han utilizado de forma rutinaria, estos consumen mucho tiempo debido a que involucran pasos previos de enriquecimiento y emplean una gran cantidad de material y equipo. Para superar estas dificultades se han desarrollado distintos métodos rápidos, los que resultan ser específicos, sensibles, fiables, relativamente precisos, además requieren menor tiempo y trabajo³³.

La presente investigación se realizó basándose en los criterios de clasificación del Dr. Daniel Y.C.Fung quien es un microbiólogo de renombre internacional en el campo de Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología⁹. Se desarrolló y se complementó esta clasificación mediante artículos, tesis, libros, y sitios de internet de allí que el propósito de la presente investigación es dar a conocer los principales métodos rápidos aplicados en microbiología en alimentos que permiten la detección, cuantificación e identificación de microorganismos indicadores, poniendo énfasis en algunos patógenos de importancia en la industria alimentaria tales como *E.coli* enterohemorrágica del serotipo O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* y *Staphylococcus aureus*.

Dentro de los principales objetivos de este trabajo se encuentran los siguientes:

- Realizar una revisión bibliográfica para dar a conocer los métodos rápidos actuales aplicados en microbiología en alimentos.
- Dar a conocer las ventajas y desventajas de cada método rápido con respecto a los métodos convencionales.
- Mencionar la importancia del uso de éstos en la industria alimentaria.

Para ello, fue necesario ubicar cada técnica o ensayo con base en su principal forma de detección, cuantificación o identificación de los microorganismos de acuerdo a los siguientes criterios: métodos rápidos dependientes del medio, medios cromogénicos y fluorogénicos, sistemas miniaturizados y automatizados, métodos inmunológicos, métodos moleculares y biosensores, se describe su fundamento, las ventajas y desventajas existentes de cada técnica o ensayo.

Se concluyó que los métodos rápidos suelen ser más sensibles que las pruebas microbiológicas convencionales, pero a medida que los ensayos son cada vez más sensibles, pueden presentar retos interesantes para la industria alimentaria y los organismos reguladores debido a que son susceptibles a interferencias debidas a la biota bacteriana normal y complejidad de la matriz alimentaria. En el futuro se deberán realizar esfuerzos para mejorar la aplicación de los sensores más prometedores y aumentar su eficiencia en la detección de patógenos transportados por alimentos. Es posible que falten pocos años para que estos sistemas sean utilizados de manera sistemática para garantizar la seguridad alimentaria o inocuidad de los alimentos^{19,28,36}.

INTRODUCCIÓN

Desde principios del siglo XXI, la contaminación microbiana de los alimentos sigue siendo uno de los principales problemas asociados a su consumo debido a que tiene implicaciones graves desde el punto de vista de la salud pública.

El impacto económico asociado a las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) es considerable, conlleva a pérdidas millonarias para el sector público y privado (p.ej. destrucción de lotes, cierre de empresas, pérdidas de horas de trabajo, hospitalización, medicamentos, investigación epidemiológica, indemnizaciones, etc.). Aunque cualquier individuo es susceptible a padecer una ETA, los principales grupos de riesgo son los niños, ancianos, mujeres embarazadas, personas inmunocomprometidas como (personas con VIH o personas sometidas a tratamientos de quimioterapia).

El análisis microbiológico de los alimentos, especialmente la búsqueda de especies patógenas, sigue siendo una tarea desafiante para prácticamente todos los ensayos y tecnologías.

El problema radica en que las bacterias no se distribuyen de manera uniforme en los alimentos, asimismo el análisis se dificulta debido a la complejidad de la matriz alimentaria, ya que algunos alimentos se componen de una variedad infinita de ingredientes (p.ej. edulcorantes, colorantes, saborizantes, conservadores), además de los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) y micronutrientes (vitaminas y minerales) propios del alimento¹⁹. En algunos métodos rápidos, el exceso de macronutrientes tales como grasas y proteínas dificulta el análisis (p.ej. PCR).

Además, el análisis se puede complicar aún más debido la presencia de microorganismos propios del alimento, los que al estar presentes en cantidades superiores, a menudo interfiere con el aislamiento selectivo e identificación de patógenos específicos, que por lo general se encuentran en un número mucho más bajo. Esta interferencia se hace especialmente crítica cuando se están analizando microorganismos patógenos, ya que a pesar de estar en dosis bajas, resultan nocivos para la salud del ser humano (p.ej. *Listeria monocytogenes*,

Staphylococcus aureus, *Salmonella sp*, toxinas de *E. coli* O157:H7 y de *Clostridium botulinum*).

Aunque la detección y la identificación de microorganismos indicadores y patógenos por métodos convencionales son eficaces, sensibles y se han usado de forma rutinaria en alimentos durante mucho tiempo, estos implican trabajo intenso y consumen mucho tiempo de análisis. Como resultado de ello, estos métodos pueden tardar varios días para llevarse a cabo y son inadecuados para la realización de evaluaciones rápidas de la seguridad microbiológica de los alimentos⁶.

Para superar estas dificultades se han desarrollado distintos métodos rápidos, que se definen como:

“Cualquier método destinado a la detección, recuento, caracterización y la subtipificación de microorganismos (patógenos y del deterioro), los cuales son muy específicos, sensibles, fiables, relativamente precisos y requieren menos tiempo y trabajo en comparación con los métodos convencionales”^{19,33}.

Entre los factores que justifican el uso de métodos rápidos e impulsan su desarrollo se pueden mencionar los siguientes:

- a) **Las presiones regulatorias (normatividad):** Para hacer frente a las presiones regulatorias, la industria alimentaria debe utilizar métodos oficiales de referencia, como los recomendados por la Organización Internacional de Normalización (ISO), Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), Asociación Americana para la Salud Pública o (APHA), entre otras.
- b) **La reducción de desechos biológicos:** Es inevitable la producción de desechos biológicos, sin embargo con el uso de los métodos rápidos se consigue una producción menor debido al diseño compacto de algunas pruebas y medios de cultivo.
- c) **La complejidad analítica:** El análisis microbiológico se vuelve menos complejo al utilizar los métodos rápidos ya que éstos omiten pasos en

comparación con algunos métodos convencionales (p.ej. el empleo de medios cromogénicos y fluorogénicos, para la búsqueda algún patógeno, omite el análisis bioquímico tradicional) o este se puede realizar de manera automatizada (p.ej. sistema VITEK[®]) reduciendo de esta manera material y tiempo en el procesamiento de la muestra.

- d) **Las modernas prácticas de producción, la cantidad de muestras a evaluar y el tiempo disponible para realizar pruebas:** El resultado de las modernas prácticas de producción es la conversión de materia prima a producto terminado en menor tiempo, esto genera un gran número de muestras que se deben analizar para poder liberar los lotes y éstos deben analizarse en el menor tiempo posible para evitar llenar los almacenes de las empresas. Por ello, es necesario la implementación de métodos que faciliten el trabajo y reduzcan el tiempo.
- e) **Los costos totales de una prueba convencional:** Los costos totales de una prueba convencional incluyen los costos de los medios de cultivo y plásticos desechables, así como la mano de obra necesaria para la preparación de los medios de cultivo, tiempo para la lectura y el registro de los resultados.

Los principales requisitos que deben cumplir los métodos rápidos y automatizados en el análisis microbiológico de los alimentos, se resumen en los siguientes puntos:

- Exactitud en la obtención de resultados de acuerdo a los requerimientos establecidos: sensibilidad, límites de detección mínimos, especificidad en el sistema de análisis, versatilidad, aplicación potencial y comparación con métodos de referencia.
- Rapidez: tiempo mínimo requerido para la obtención de resultados, número de muestras procesadas en cada ensayo, por hora y por día.
- Aceptación: por parte de la comunidad científica y de las agencias regulatorias de los sistemas analíticos.
- Sencillez de manejo: preparación de la muestra, funcionamiento del equipo analítico y procesamiento informático de los datos.

- Capacitación y formación del personal adecuado para la técnica a realizar.
- Reactivos: facilidad de preparación, estabilidad, disponibilidad.
- Fiabilidad del método: avalada por la compañía u organismo responsable de la técnica analítica.
- Soporte técnico adecuado: rapidez, disponibilidad, costo y mínimo espacio útil requerido.

Conviene considerar que en la mayoría de los casos, el empleo de métodos rápidos de análisis microbiológico de los alimentos no excluye la etapa previa de enriquecimiento del microorganismo de interés (patógeno), en ocasiones, también es necesario que los resultados positivos obtenidos con métodos rápidos no validados sean confirmados con los métodos de referencia establecidos.

Por lo que en este trabajo monográfico de actualización, se darán a conocer los métodos rápidos que se encuentran disponibles para el análisis microbiológico en la industria alimentaria con base en su principal forma de detección, cuantificación o identificación de los microorganismos de acuerdo a los siguientes criterios: métodos rápidos dependientes del medio, medios cromogénicos y fluorogénicos, sistemas miniaturizados y automatizados, métodos inmunológicos, métodos moleculares y biosensores, se describe su fundamento, las ventajas y desventajas de cada uno³⁵.

OBJETIVOS

Objetivos generales.

Realizar una revisión bibliográfica para dar a conocer los métodos rápidos que se encuentran disponibles en el mercado para el análisis microbiológico en la industria alimentaria.

Objetivos particulares.

- Clasificar cada técnica o ensayo con base en su principal forma de detección, cuantificación o identificación.
- Describir los fundamentos y su aplicación en la industria alimentaria.
- Describir las ventajas e inconvenientes de estos métodos con respecto a los convencionales o per se.
- Dar a conocer los principales métodos rápidos que permiten la detección, cuantificación e identificación de microorganismos indicadores, poniendo énfasis en algunos patógenos de importancia en la industria alimentaria tales como *E. coli* enterohemorrágica del serotipo O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.* y *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO 1. HISTORIA DE LOS MÉTODOS RÁPIDOS EN MICROBIOLOGÍA.

El análisis de los alimentos para detectar la presencia de bacterias es una práctica común hoy en día para garantizar la calidad y seguridad alimentaria. Sin embargo, antes de la década de 1900, no existían normas de inocuidad de los alimentos, como resultado, rara vez se analizaban los alimentos para descartar una contaminación microbiana, pero a medida que la sociedad se industrializó, el rápido crecimiento de las poblaciones en las ciudades aumentó la demanda de la producción de alimentos, por lo que también aumentaron las preocupaciones de los consumidores por la seguridad alimentaria⁶.

En México, fue hasta 1977 cuando se publicaron dos Normas Mexicanas (NMX) relacionadas con microbiología en alimentos. La primera proporcionaba reglas para el muestreo y el transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico (NMX-F-285-1977. MUESTREO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS) y la segunda especificaba el procedimiento mediante el cual debe hacerse la preparación y la dilución de las muestras para su análisis microbiológico (NMX-Y-286-1977. ALIMENTOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS).

Posteriormente, las Normas Mexicanas antes descritas, se convirtieron en Normas Oficiales Mexicanas (NOM), por lo cual, los requerimientos mínimos que debe cumplir el muestreo, el transporte, la preparación y la dilución de las muestras son de carácter obligatorio (NOM-109-SSA1-1994 y NOM-110-SSA1-1994)^{57,58}.

Del año 1994 a 1995 son publicadas las primeras Normas Oficiales Mexicanas relacionadas con el conteo de microorganismos indicadores y algunos patógenos. La mayoría de estas normas siguen vigentes, sin embargo, cabe destacar que ninguna contempla el empleo de métodos rápidos para el análisis de los alimentos (p.ej. la NOM-092-SSA1-1994. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA, NOM-112-SSA1-1994. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE, NOM-114-SSA1-1994. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN

ALIMENTOS y la NOM-115-SSA1-1994. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS).

En Estados Unidos fue a mediados de 1960 cuando los microbiólogos clínicos comenzaron a involucrarse con los métodos rápidos, los cuales tuvieron un desarrollo acelerado en 1970 y una evolución continua a partir de 1980 hasta el día de hoy, mientras que los microbiólogos de alimentos se mantuvieron rezagados 10 años y fue a partir del año de 1990 que empezó a cobrar gran importancia la microbiología en la industria alimentaria y en la investigación, y a partir de esto se incrementaron considerablemente las actividades en el campo de la microbiología de alimentos^{28,33}.

Por lo anterior, la evolución de los métodos rápidos se puede dividir en 4 etapas:

- Primera etapa- De 1965 a 1975 fue la edad de la miniaturización y la evolución de kits de diagnóstico clínico (las aplicaciones en alimentos se desarrollaron en la década de 1980).
- Segunda etapa- De 1975 a 1985 fue la edad de kits y desarrollos de pruebas inmunológicas.
- Tercera etapa- De 1985 a 1995 fue la edad de sondas genéticas, sistemas de pruebas moleculares y aplicaciones de la reacción de la cadena polimerasa (PCR).
- Cuarta etapa- De 1995 a la actualidad, estamos en la etapa de los biosensores, biochips computarizados y en el desarrollo de la proteómica.

En 1995, el Dr. Daniel Y.C. Fung, quien es un microbiólogo de renombre internacional en el campo de Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología, propuso la tendencia en el desarrollo de los métodos rápidos y automatización en microbiología clínica y en microbiología de alimentos del año 1965 al 2000 (**Figura 1**). En el año 2000 el Dr. J. Stan Bailey quien es un distinguido microbiólogo del Departamento de agricultura de los Estados Unidos, revisó la información de Fung superponiendo sus curvas de las tendencias. Indicó que en un periodo de tiempo, las actividades de los microbiólogos clínicos y los microbiólogos de alimentos mostraban una tendencia paralela, además indicó que en los últimos 20 años se

ha visto un fuerte movimiento hacia el uso de la automatización para detectar patógenos y organismos indicadores (**Figura 1**). Ambas estimaciones son observaciones personales de Fung y Bailey después de seguir tendencias en este campo durante este tiempo^{19,28}.

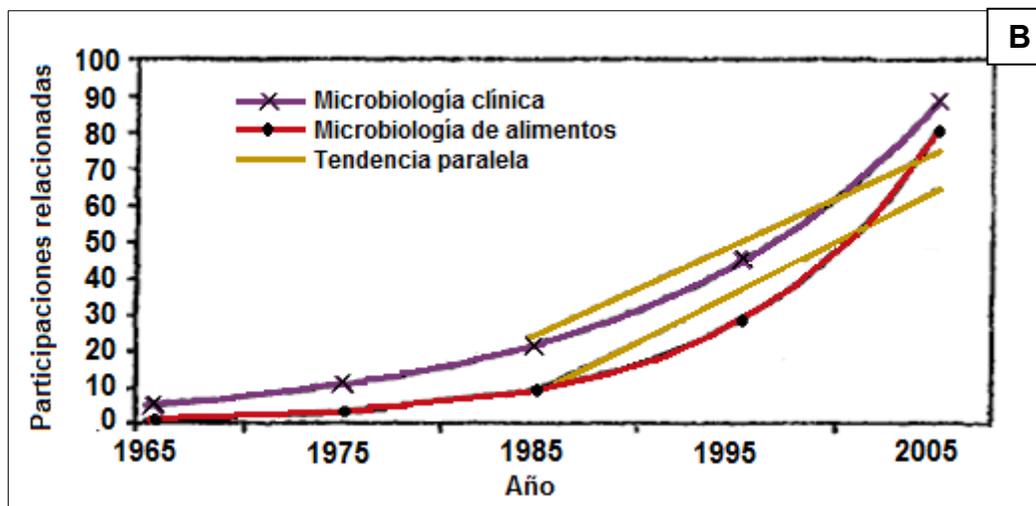
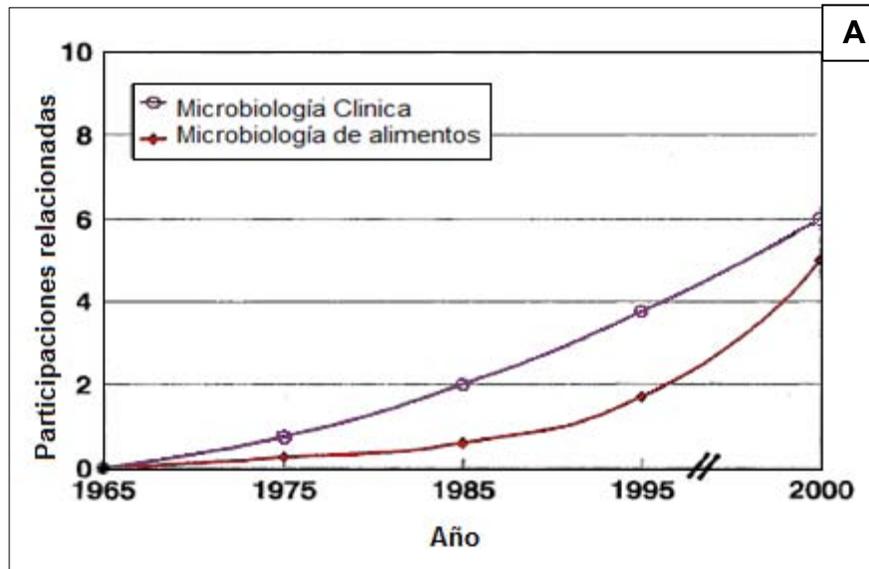


Figura 1. Evolución de los métodos rápidos. Se muestran gráficas que describen la tendencia de la evolución de los métodos rápidos propuesta por Fung (A) y propuesta por Bailey (B). Modificadas del artículo original²⁸.

Desde una perspectiva futurista, el Dr. Fung propuso el siguiente escenario para los próximos años³³:

- 1) No se podrá reemplazar el recuento de microorganismos viables.
- 2) La supervisión de la higiene con métodos rápidos se efectuará en tiempo real.
- 3) Las técnicas genotípicas serán habituales en los laboratorios de alimentos.
- 4) Las pruebas inmunológicas serán automatizadas.
- 5) Los resultados más rápidos se obtendrán con inmunocromatografía.
- 6) En los programas de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) se utilizarán biosensores.
- 7) Los patógenos se detectarán inmediatamente de forma computarizada.
- 8) Se realizará la separación y la concentración eficaz de las bacterias buscadas.
- 9) Se utilizará un sistema de alerta microbiológico en los envases de alimentos.
- 10) Los consumidores tendrán dispositivos de alerta rápido para detectar patógenos en sus hogares.

CAPÍTULO 2. MÉTODOS RÁPIDOS DEPENDIENTES DEL MEDIO.

2.1 Placas delgadas con película plástica.

2.1.1 Fundamento.

Se basa en la obtención de un perfil fenotípico del microorganismo de interés donde se utiliza un medio de cultivo deshidratado listo para usar, que contiene sustratos que al degradarse generan subproductos (p.ej. ácidos o especies iónicas) que se ponen en evidencia mediante un indicador de óxido reducción como el cloruro de trifeniltetrazolio u otro.

2.1.2 Descripción.

Es una placa de tamaño y grosor similar al de una tarjeta de crédito. La que se conforma de dos películas plásticas: la primera es un papel plástico cuadrulado que contiene sobre éste, un gel soluble en agua fría y medio de cultivo deshidratado compuesto de nutrientes, sustratos cromogénicos, antibióticos e indicadores (esta composición es variable y depende del microorganismo que se requiera detectar o identificar). La segunda película es un filme plástico que cubre los componentes de la primera película, en cuya parte inferior también contiene gel soluble en agua fría y un indicador de óxido reducción para la tinción de las colonias desarrolladas (**véase Figura 2**)^{3,28}.

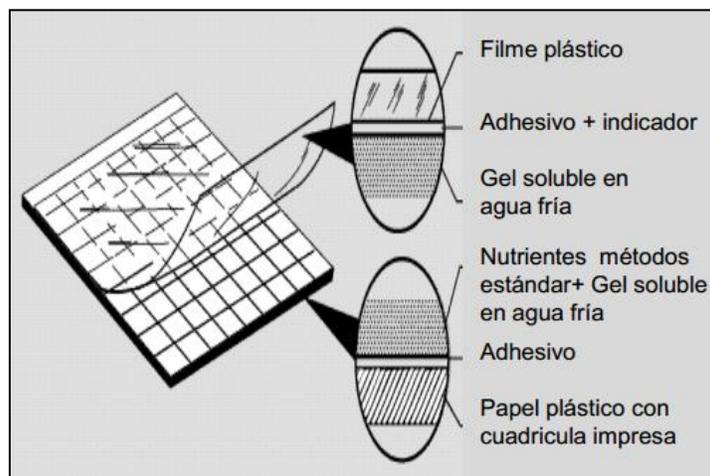


Figura 2. Partes de la placa Petrifilm™. Se muestra el contenido de las dos películas de la marca Petrifilm™.

2.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Existen en el mercado diferentes marcas de placas tales como: 3M™ Petrifilm™ y las placas RIDA® COUNT por mencionar algunas.

Las diferencias principales entre estas dos marcas de placas delgadas con película plástica son^{3,28,41,78,79}.

- El medio de cultivo deshidratado en las placas RIDA® COUNT está cubierto por una tela, la cual permite una mejor absorción de la solución de la muestra aplicada. Las placas 3M™ Petrifilm™ no cuentan con algún sistema para evitar derrames.
- El sellado de las placas es diferente, en las placas RIDA® COUNT se presiona alrededor del medio para sellar y placas 3M™ Petrifilm™ se deja caer la película y se presiona al centro para dispersar la muestra.
- El tiempo de vida útil de las placas RIDA® COUNT es de 48 meses y el de las placas 3M™ Petrifilm™ es de 12 meses desde su fecha de elaboración almacenados en paquetes cerrados a una temperatura menor o igual a 8°C.

En la **Figura 3** se observa la variedad de placas delgadas con película plástica que existen en el mercado de las marcas 3M™ Petrifilm™ y RIDA® COUNT.

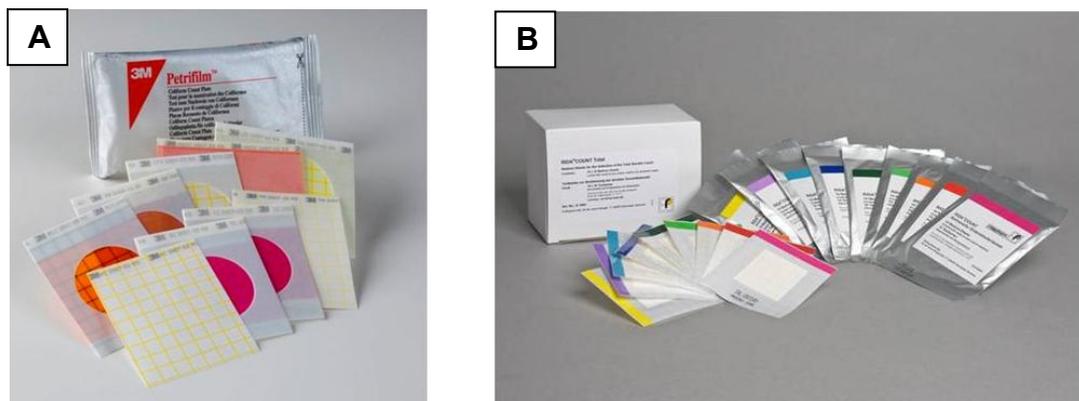


Figura 3. Variedad de placas delgadas con película plástica. Placas 3M™ Petrifilm™ (A) y placas RIDA® COUNT (B).

A continuación, en la **Tabla 1** se muestra la composición y el periodo de incubación las placas 3M™ Petrifilm™ y RIDA® COUNT acorde al microorganismo de interés.

Tabla 1. Composición y periodo de incubación de algunas placas con película plástica.

MARCA Y GRUPO MICROBIANO	COMPOSICIÓN	PERIODO DE INCUBACIÓN
3M™ Petrifilm™ y RIDA® COUNT Recuento de aerobios	Mismos nutrientes del Agar Cuenta Estándar y e indicador de color rojo (cloruro de trifetil tetrazolio TTC)	24 horas
3M™ Petrifilm™ y RIDA® COUNT Hongos y levaduras	Mismos nutrientes del agar Saboraud, antibióticos y 5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) sustrato cromogénico utilizado para identificar fosfatasa alcalina facilitando el recuento de las levaduras	3-5 días
3M™ Petrifilm™ de alta sensibilidad para conteo de coliformes y de conteo rápido de coliformes	Bilis rojo violeta lactosado (BRVL)	24 y 14 horas respectivamente
3M™ Petrifilm™ E.coli y coliformes,	Bilis rojo violeta (BRV) pone en evidencia a E.coli β-glucuronidasa positivas	48 horas
3M™ Petrifilm™ Staph Express	Medio cromogénico de Baird-Parker modificado y un disco con azul-O toluidina que facilita la visualización de las reacciones de DNasa.	24 horas

2.1.4 Ventajas e inconvenientes.

Comparado con el método tradicional de vertido en placa, las placas de película plástica presentan las siguientes ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Las placas 3M™ Petrifilm™ están avaladas por AOAC.
- Comparado con las dimensiones de las cajas petri, las placas 3M™ Petrifilm™ ocupan un menor espacio al incubar las muestras.
- Las placas 3M™ Petrifilm™ se pueden apilar hasta 20 piezas.
- Reducción de desechos biológicos debido a la cantidad de gel utilizado para el análisis y las dimensiones de la placa.

- El indicador ayuda a diferenciar colonias de las partículas del alimento.
- La cuadrícula incorporada evita la necesidad de utilizar cuenta colonias.
- Las placas tienen una vida útil de 1 a 2 años en almacenamiento en frío.

Desventajas:

- Las placas RIDA® COUNT no están avaladas por algún organismo internacional.
- Se debe tener cuidado al descargar la muestra para evitar derrames y al dejar caer la película superior para evitar la formación de burbujas. En las placas 3M™ Petrifilm™ E.coli y coliformes, si el analista no tiene experiencia puede contar las burbujas como coliformes productores de gas.
- Se deben realizar conteos preliminares para verificar el crecimiento, ya que algunos microorganismos pueden licuar el gel, produciendo una difusión que oculte la presencia de otras colonias. Esto es muy común en placas para recuento de aerobios por la presencia de bacterias ácido lácticas en productos fermentados (p.ej. *Lactococcus*, *Lactobacillus*), ya que tienen una alta actividad proteolítica⁴².
- La obtención de resultados en las placas para recuento de aerobios es en el mismo tiempo que el método convencional.
- Se presentan problemas de interpretación en alimentos con colorantes oscuros.
- Algunos alimentos crudos (p. ej. cereales, verduras, frutas, hígado de carne, pescado, carne) y procesados tienen altas cantidades de fosfatasa, causando un cambio de color en el gel o coloreando partículas de alimento provocando una lectura errónea.

CAPÍTULO 3. MEDIOS CROMOGÉNICOS Y FLUOROGÉNICOS.

3.1 Fundamento.

Se basa en el uso de sustratos cromogénicos, fluorogénicos o la mezcla de ambos en un medio de cultivo, donde la enzima presente en el microorganismo de interés al actuar sobre estos sustratos, libera el cromógeno o fluorógeno que se evidencia por la formación de colonias coloreadas o fluorescencia visible en luz ultra violeta (UV).

3.2 Descripción.

Son medios de cultivo diferenciales que pueden contener:

- a) Sustratos cromogénicos.
- b) Sustratos fluorogénicos.
- c) Una mezcla de ambos sustratos.

Los sustratos cromogénicos y fluorogénicos están compuestos por azúcares o aminoácidos unidos a un grupo cromógeno o fluorógeno respectivamente.

Ambos se encuentran unidos por enlaces químicos específicos, cuando el cromógeno es liberado por la acción de las enzimas específicas del microorganismo, provocan un cambio de color mientras que cuando se libera el grupo fluorógeno hace posible la observación de la emisión de fluorescencia al incidir la luz de longitud de onda de 366 nm^{26,56}.

Ejemplos de sustratos cromogénicos: ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) o X-Glu (5-Bromo-4-Cloro-3-indoli- β -D-Glucopiranosido).

Ejemplos de sustratos fluorogénicos: 4-metilumbeliferilo (4-MU), 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG) y 7-amino-4-metilcumarina (7-AMC).

Existen medios especiales en el mercado que contienen los sustratos antes descritos, estos ayudan a identificar el patógeno de interés en los alimentos. En el

capítulo 9 se hablará de algunos de estos medios especiales para ciertos microorganismos.

3.3 Medios cromogénicos y fluorogénicos para microorganismos indicadores.

3.3.1 Placa SlimPlate®.

3.3.1.1 Fundamento.

Se basa en el uso de distintos sustratos que ayudan a detectar múltiples enzimas mediante el uso de reacciones de óxido-reducción asociadas al microorganismo de interés, éstas resultan en cambios cromogénicos o fluorescencia que ayudan a cuantificar y en algunos casos a identificar al microorganismo.

3.3.1.2 Descripción.

Es una placa circular de plástico de tamaño mayor a una caja petri, que cuenta con pocillos (84 pocillos) que contienen una mezcla de nutrientes y sustratos cromogénicos/fluorogénicos. Debido a que la mezcla de inóculo y medio permanecen en estado líquido, cuenta con una esponja para absorber el exceso y evitar derrames (véase **Figura 4**).

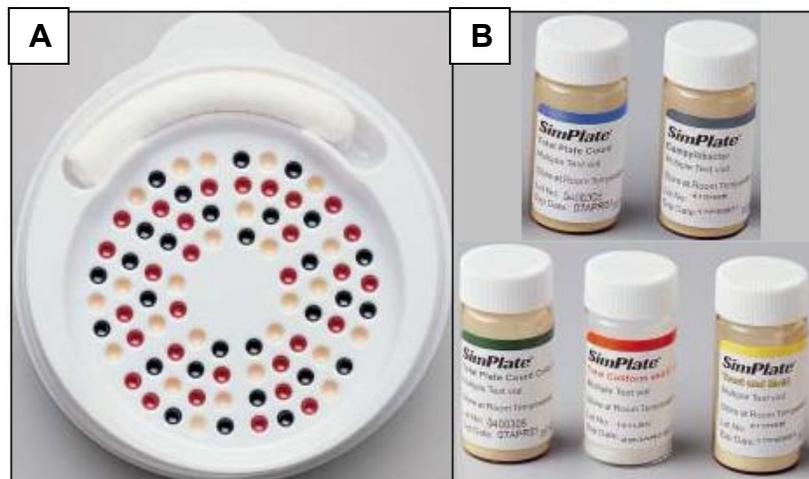


Figura 4. Placa SlimPlate® y sus medios de cultivo. Se ilustra la placa SlimPlate® (A) y la variedad de medios de cultivo que se utilizan dependiendo del microorganismo que se requiera detectar (B).

3.3.1.3 Formatos de las placas SimPlate®.

Existen tres formatos de las placas SimPlate®^{28,48}:

1. SimPlate® cuenta total. Se incuba a 35°C por 24 horas, se cuenta el número de pocillos que tengan cambio de color. El número de pocillos positivos se convierte en valores del NMP gracias al uso de tablas de conversión.
2. SimPlate® hongos y levaduras. Se deben agregar dos suplementos dependiendo del tipo de alimento:
Suplemento V: En jugo de naranja adicionado con vitamina C.
Suplemento M: En carnes y especias.
Se Incuba a 22-25°C durante 56-72 horas, y se cuentan posteriormente los pocillos que cambien de color.
Para las muestras que contengan el suplemento V, se debe contar sólo el número de pocillos que presente fluorescencia con lámpara UV.
3. SimPlate® coliformes y *E. coli*. Para el recuento de coliformes totales se incuba a 35°C durante 24 horas, posteriormente se cuenta el número de pocillos que tengan cambio de color.
Para *E.coli* se cuenta sólo el número de pocillos que presente fluorescencia azul con lámpara de luz UV.

3.3.1.4. Ventajas e inconvenientes.

Comparado con los métodos tradicionales de vertido en placa, y los métodos tradicionales para la detección de hongos, coliformes y *E. coli*, las placas SimPlate® presentan las siguientes ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Las placas SimPlate®, están avaladas por AOAC
- Se eliminan los problemas asociados con la interferencia de partículas de alimentos o licuación de geles (placas de película plástica) causadas por ciertas enzimas bacterianas.

- Los resultados se leen de manera fácil debido a que sólo se cuentan los pocillos que cambiaron de color o que presenten fluorescencia.
- No se requiere equipo adicional (cuenta colonias o equipo automatizado) para realizar el conteo debido al tamaño de los pozos y al desarrollo de color o fluorescencia.
- Sin hacer diluciones a la muestra, pueden contarse hasta un máximo de 738 colonias (haciendo la conversión de los 84 pocillos positivos en tablas de NMP).
- Se obtienen los resultados positivos en 24 horas (un día completo más rápido que el método tradicional).
- Debido a que el método ha sido validado por la AOAC, se pueden obtener resultados utilizando una placa y no duplicados como se hace en el método tradicional³⁰ lo que ahorra material, medio de cultivo y tiempo.
- SimPlate[®] tiene disponible un indicador especial para alimentos con colorantes oscuros.
- Las placas SimPlate[®] pueden almacenarse a temperatura ambiente ahorrando espacio en el refrigerador.
- La vida de anaquel de las placas SimPlate[®] es de 3 años.

Desventajas:

- La dimensión de una placa SimPlate[®] es mayor que una placa de Petri, por lo tanto, ocupan un mayor espacio al incubarse o almacenarse.
- La obtención de resultados en la placa SimPlate[®] para recuento de aerobios es en el mismo tiempo que el método convencional.
- El empleo de suplementos dependiendo del alimento para las placas SimPlate[®] hongos y levaduras representan un gasto adicional. Es mucho más sencillo y económico el método tradicional, ya que se emplea para el conteo directo de mohos y levaduras, el agar papa dextrosa acidificado (PDA) conforme a la NOM-111-SSA1-1994⁶⁰ y el agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) o el agar dicloran con glicerol al 18% (DG18) de acuerdo a las especificaciones del BAM⁸⁵.

- En comparación con el método tradicional, no se puede apreciar las estructuras de los hongos filamentosos.
- Costo alto.

3.3.2. Discos que detectan enzimas específicas para coliformes y *E. coli*.

3.3.2.1 Fundamento.

Se basa en el uso un ensayo cromogénico (que contiene un sustrato que ayuda detectar la actividad de enzimas específicas tales como *D-glucopiranosidasa*) y un ensayo fluorogénico, que contiene el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronido (MUG), el cual se rompe generando 4-metilumbeliferona (MU) por la enzima β -D-glucuronidasa (GUD) presente en *E.coli*.

3.3.2.2 Algunas marcas presentes en el mercado.

En el mercado existe el disco ColiComplete[®], que son discos que al añadirse en tubos con muestra en caldo Lauril sulfato triptosa (LST), los tubos con discos azules se confirman positivos para coliformes totales y los que presentan brillo en UV se confirman positivos para *E.coli*, después del tiempo de incubación (**Figura 5**)^{47, 83,85}.

De igual forma, en el mercado se encuentra disponible el reactivo de MUG, que puede incorporarse a casi cualquier medio de cultivo que se utilice para la detección de *E.coli* (p.ej. caldo EC, Agar Bilis Rojo Violeta, Agar Mac Conkey).

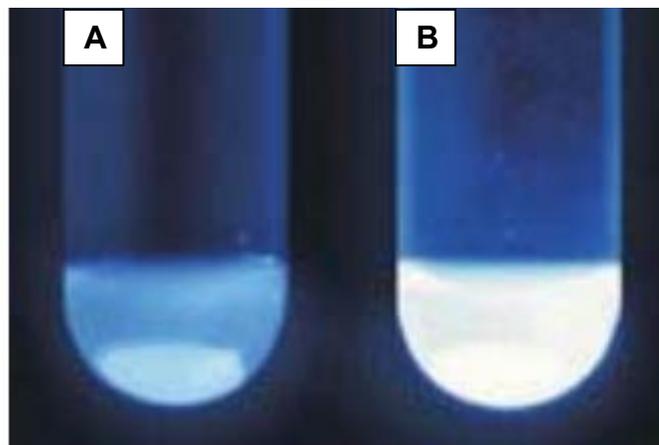


Figura 5. Discos con MUG. Se ilustra reacción negativa (A) y positiva (B) para *E.coli* bajo luz UV.

3.3.2.3 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- El disco ColiComplete[®], Está avalado por la FDA.
- Se detectan coliformes totales en 24 horas y *E.coli* en 48 horas, por lo tanto, se obtienen resultados en menor tiempo que el método convencional.
- A comparación de la metodología descrita en la NOM-112-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES, no hay transferencias de inóculo a otros medios de cultivo, ya que en un solo tubo se confirma la presencia o ausencia de coliformes totales y *E. coli*. Con lo que se ahorra material y uso del medio de cultivo.
- Los resultados son fáciles de interpretar porque son de manera visual. No es necesario el uso de equipos adicionales.
- Se puede incorporar el reactivo de MUG a casi cualquier medio que se utilice para la detección de *E.coli*.

Desventajas:

- Comparado con la norma, los resultados son cualitativos y no cuantitativos.
- No se puede identificar *E.coli* O157:H7, ya que es GUD negativa.
- La carne de bivalvos contiene naturalmente GUD y puede dar falsos positivos.
- El óxido de cerio que a veces es adicionado al vidrio, interfiere con la prueba del MUG.
- No es adecuado el uso de MUG en Agar Eosina Azul de Metileno, ya que este contiene compuestos fluorescentes que pueden enmascarar la presencia de MU.
- Es corta la caducidad del reactivo de MUG. El reactivo tiene una caducidad de 5 meses, sin embargo, un medio de cultivo adicionado con MUG (que comercialmente están disponibles), la caducidad se reduce a 4 meses.

3.4 Medios cromogénicos y fluorogénicos para patógenos específicos en alimentos.

3.4.1 Medios especiales para *E. coli* O157:H7.

3.4.1.1 Fundamento.

Estos medios contienen combinaciones de sustratos cromogénicos que son específicos para dos enzimas asociadas a *E. coli* tales como la β -galactosidasa y la β -glucuronidasa; por lo que las especies bacterianas que presentan estos fenotipos o combinaciones de ellos, producirán colonias de diferentes colores.

3.4.1.2 Descripción.

Existen medios cromogénicos y fluorogénicos los cuales se utilizan para la detección e identificación de *Escherichia coli* del serotipo O157:H7. A continuación se mencionan tres medios y sus características morfológicas.

1. Agar Rainbow: Las colonias de *E. coli* O157:H7 son negras o grises debido al telurito añadido al medio. Las demás cepas de *E. coli* sobreproducen β -galactosidasa en relación con la β -glucuronidasa y se observan de color púrpura, violeta o azul (véase **Figura 6**). La mayoría de las cepas no patógenas de *E. coli* son glucuronidasa positiva y tienen color rosado. Casi todas las otras especies bacterianas son inhibidas en este medio o crecen como colonias de color blanco a color crema⁵¹.

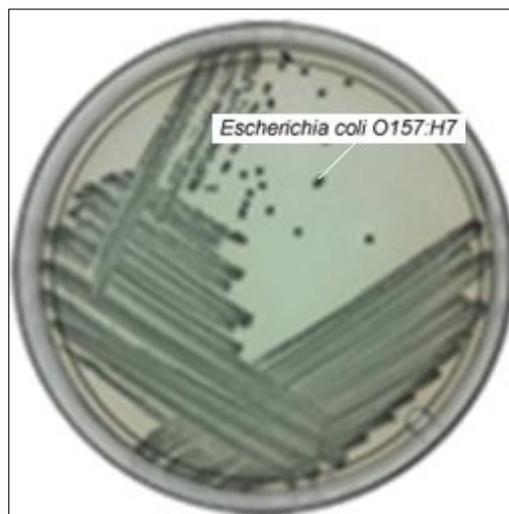


Figura 6. *E. coli* O157:H7 en agar Rainbow.

2. Medio BCM[®]O157:H7: Las colonias de *E. coli* O157:H7 son de color negro azulado y las demás colonias de *E. coli* se observan de color de verde a amarillo (véase **Figura 7**)⁵⁵.

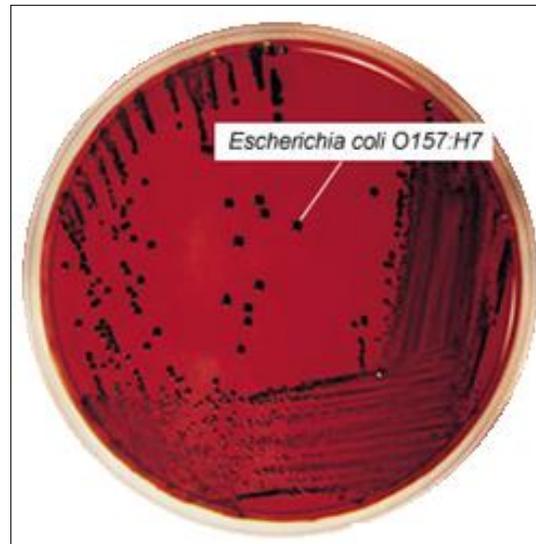


Figura 7. *E. coli* O157:H7 en el medio BCM[®]O157:H7.

3. Agar Fluorocult[®] *E. coli* O157:H7: Las colonias de *E. coli* O157:H7 son colonias sin color y las demás colonias de *E. coli* se observan de color amarillo (véase **Figura 8 C**)⁷¹. El medio contiene como indicador azul de bromotimol para indicar que el Sorbitol presente en el medio ha sido degradado, las colonias de color amarillo indica la presencia de microorganismos sorbitol positivo, los microorganismos sorbitol negativo como es *E. coli* O157:H7 se pone de manifiesto como colonias sin color. Además, el medio contiene como substrato fluorescente 4-methylumbelliferil- β -D-glucuronido (MUG) y como la cepa *E. coli* O157:H7 no es capaz de formar β -D-glucuronidasa a partir de MUG, las colonias sospechosas no deben de presentar fluorescencia.



Figura 8. *E. coli* O157:H7 en agar Fluorocult®.

3.4.1.3 Ventajas e inconvenientes.

Ventaja:

- Los medios anteriormente descritos, están avalados por la FDA.
- Los medios BCM® y Fluorocult® no presentan resultados falsos positivos debido a sus compuestos selectivos y diferenciales.
- Empleando algunos de estos medios de cultivo, los resultados se obtienen en menor tiempo (24 horas) comparado con los medios empleados en el método tradicional (3-4 días).
- No se elaboran diversos medios de cultivo para identificación bioquímica, ahorrándose tubos, cajas petri, medio de cultivo, agua destilada, espacio de almacenamiento, etc.
- Reducción de desechos biológicos en comparación a las pruebas bioquímicas tradicionales.
- Facilidad de interpretación, debido a que las colonias tienen una morfología colonial particular.
- Bajo costo.

Desventaja:

- En agar Rainbow las colonias de microorganismos de *Klebsiella pneumoniae*, raras cepas de *Hafnia alvei* y *Citrobacter sp.* pueden parecerse a las colonias de *E. coli* O157:H7 (falsos positivos).
- Se debe complementar el resultados con métodos inmunológicos (Véase **Capítulo 5**).

3.4.2 Medio especial para *Listeria monocytogenes*.

3.4.2.1 Fundamento.

Es un medio que utiliza sustratos cromogénicos para la detección directa del factor de virulencia fosfatidil inositol fosfolipasa C o PI-PLC que es exclusivo de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.

3.4.2.2 Descripción.

Agar BCM[®]: Es un medio que utiliza 5-bromo-4-cloro-3-indoxilo mio-inositol-1-fosfato como sustrato cromogénico. Después de 24 a 48 h de incubación a 35 ° C, las colonias color turquesa ponen en evidencia la presencia de la fosfolipasa C (véase **Figura 9**)^{37,54}.

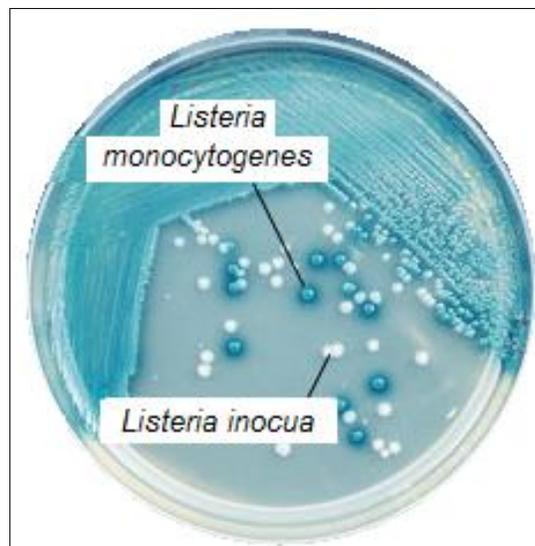


Figura 9. *L.monocytogenes* en agar BCM[®].

3.4.2.3 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- El medio está avalado por FDA.
- El medio de cultivo es específico para *Listeria* patógena.
- No se elaboran diversos medios de cultivo para identificación bioquímica, ahorrándose tubos, cajas petri, medio de cultivo, agua destilada, espacio de almacenamiento, etc.
- Facilidad de interpretación, debido a que las colonias tienen una morfología colonial particular.
- Reducción de desechos biológicos en comparación a las pruebas bioquímicas tradicionales.

3.4.3 Medios especiales para *Salmonella*.

3.4.3.1 Fundamento.

Son medios de cultivo que utilizan sustratos cromogénicos con el fin de detectar características fenotípicas específicas que presenta *Salmonella*.

3.4.3.2 Descripción.

Existen medios cromogénicos y fluorogénicos los cuales se utilizan para la detección e identificación de *Salmonella sp.* . A continuación se mencionan tres medios y sus características morfocoloniales.

1. Agar RAMBACH: Permite diferenciar *Salmonella* claramente de otras bacterias en 24 a 48 horas. Esto es posible por la adición de propilenglicol al medio de cultivo ya que *Salmonella sp.* forma ácido a partir del propilenglicol y en combinación con el indicador de pH producen colonias rojas características. Para diferenciar los coliformes de la *Salmonella sp.* el medio de cultivo contiene un cromógeno, que indica la presencia de la β -galactosidasa característica de los coliformes. Los microorganismos coliformes crecen en forma de colonias verde azuladas/violeta azuladas. Otras enterobacteriáceas y bacterias Gram-negativos como p. ej. *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, crecen en forma de colonias incoloras/amarillentas (véase **Figura 10**)⁷².

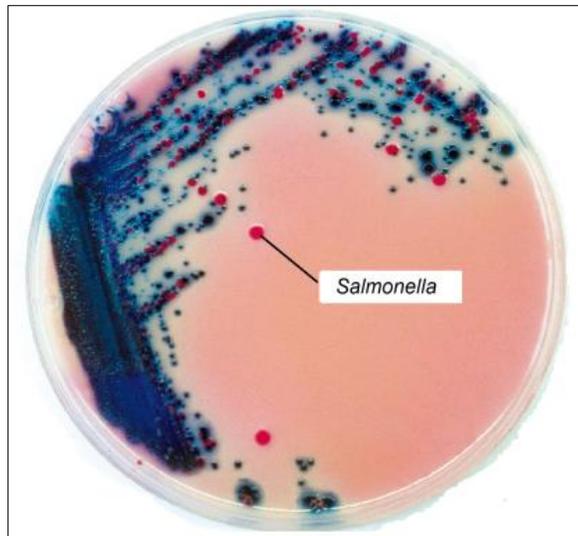


Figura 10. *Salmonella* en agar RAMBACH.

2. Agar XLT 4: La diferenciación de *Salmonella* de otros microorganismos que también crecen en este medio se basa en la fermentación de xilosa, lactosa y sacarosa, la descarboxilación de lisina y la producción de sulfuro de hidrógeno. La producción de sulfuro de hidrógeno se detecta por la adición de iones férricos. Las colonias características de *Salmonella sp.* son de color amarillas a rojas con centro negro. El tiempo de incubación varía de 18 a 48 horas (véase **Figura 11**)⁴⁵.

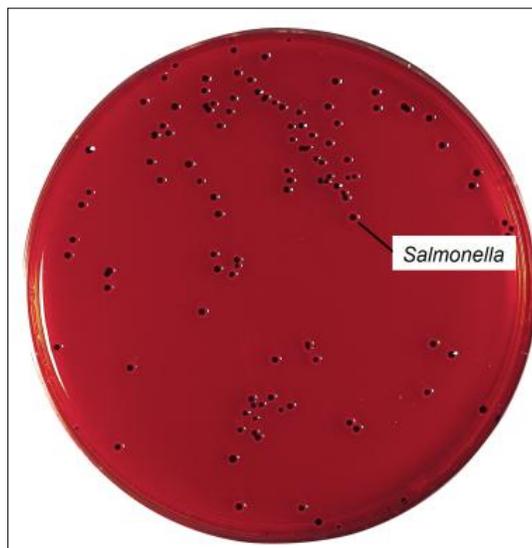


Figura 11. *Salmonella* en agar XLT 4.

3. Agar Rappaport Vassiliadis Modificado semi-sólido (MSRV): la eficiencia del medio se basa en la capacidad que tiene *Salmonella* a migrar a través del medio selectivo, por lo tanto, sólo detecta especies de *Salmonella* móviles, produciendo de este modo halos opacos posterior a las 24 horas de incubación. (véase **Figura 12**)⁸⁴.



Figura 12. *Salmonella* en agar MSRV.

3.4.3.3 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- En ninguno de los tres medios antes descritos, se obtienen falsos positivos, además se obtienen resultados de 24 a 48 horas.
- A diferencia de la norma oficial mexicana se puede utilizar un solo medio de cultivo, ahorrando cajas petri, medio de cultivo, agua destilada, espacio de almacenamiento por lo que se reduce la generación de desechos biológicos.
- Facilidad de interpretación, debido a que las colonias tienen una morfología colonial particular. Además es de bajo costo.
- A comparación del medio XLD, la fuente compleja de nitrógeno que tiene el medio XLT4 mejora la recuperación de *Salmonella*.

Desventaja: El agar MSRV no es adecuado para las *Salmonellas* inmóviles (p.ej. *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*).

CAPÍTULO 4. SISTEMAS MINIATURIZADOS Y AUTOMATIZADOS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.

4.1 Fundamento.

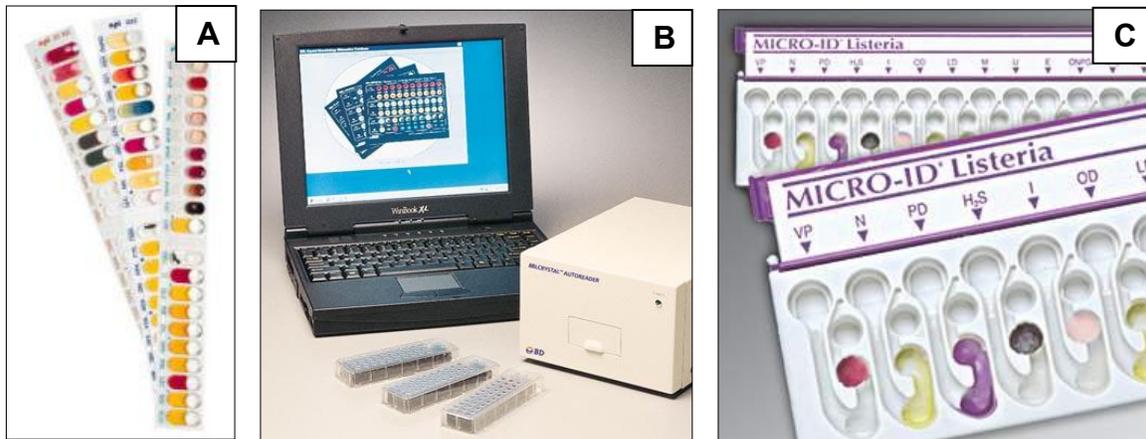
Se basan en reacciones enzimáticas que generan productos (p.ej. ácidos o especies iónicas) a partir de sustratos específicos acordes al microorganismo de interés, poniéndose en evidencia mediante indicadores de óxido reducción, generando así, un perfil bioquímico o fenotípico exclusivo de cada microorganismo.

4.2 Descripción.

Son dispositivos desechables de plástico con múltiples cámaras (15 a 30), las que contienen los sustratos deshidratados. La mayoría de los sistemas requieren de 18 a 24 h de incubación, sin embargo, existen otros en donde los resultados se pueden interpretar de 5 a 10 h, posteriormente los resultados del perfil bioquímico se comparan con una base de datos (Software específico del fabricante). En general, muestran 90 a 99 % de precisión y son comparables a los métodos de identificación convencionales.

4.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Actualmente se hallan sistemas miniaturizados y automatizados tales como: API[®], sistema Crystal ID[®], Micro ID[®], Micro Scan[®], y sistema Vitek[®] por mencionar algunos (véase **Figura 13**)^{6,19,28}.



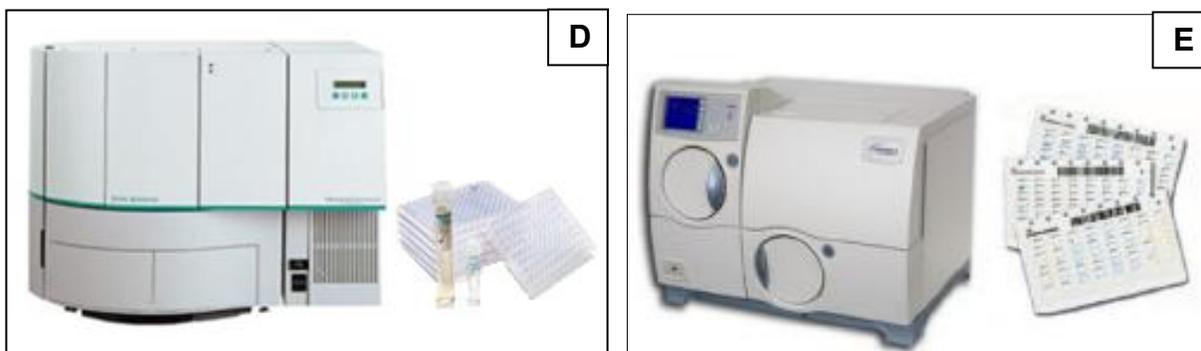


Figura 13. Sistemas miniaturizados y automatizados disponibles en el mercado. Se ilustra: API® (A), sistema Crystal ID® (B), Micro ID® (C), Micro Scan (D)® y Vitek (E)®.

A continuación en la **Tabla 2** se describen las características principales que tienen algunos sistemas de identificación comerciales.

Tabla 2. Características generales de algunos sistemas miniaturizados y automatizados comerciales. Fuente: Almaraz.

Sistema	Formato	Inoculación	Tiempo para la obtención de resultados	Método de detección	Análisis de resultados e interpretación
API®	Pocillos o microtubos en tiras de plástico	Manual	2-72 horas, de acuerdo al tipo de microorganismo	Colorimétrico, fluorescencia y turbidez (manuales)	Libro de códigos asistidos por computadora o respuesta telefónica computarizada
Crystal ID®	Microplaca modificada	Manual	3-20 horas, de acuerdo al tipo de microorganismo	Colorimétrico y fluorescencia	Libro de códigos asistidos por computadora
Micro ID®	Cámaras con sustrato en tiras plásticas	Manual	4 horas	Colorimétrico (manual)	Libro de códigos asistidos por computadora
Micro Scan®	Placa de microtitulación	Manual	2-42 horas, de acuerdo al tipo de microorganismo	Colorimétrico, fluorescencia (manual o automatizado)	Automatizado, asistidos por computadora y libro de códigos
Vitek®	Tarjetas con orificios diminutos	Automatizada	2-18 horas	Colorimétrico (automatizado)	Automatizado, asistidos por computadora

4.4 Ventajas e inconvenientes.

Comparado con los métodos tradicionales de identificación bioquímica, los sistemas miniaturizados y automatizados presentan las siguientes ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- La mayoría de los sistemas antes mencionados, están avalados por AOAC, excepto el sistema Crystal ID[®] que está avalado por la FDA.
- Se puede identificar una amplia variedad de especies debido a que las bases de datos se actualizan constantemente.
- No se elaboran diversos medios de cultivo para identificación bioquímica, ahorrándose tubos, cajas petri, medio de cultivo, agua destilada, espacio de almacenamiento, etc.
- Reducción de desechos biológicos en comparación a las pruebas bioquímicas tradicionales.
- En los sistemas automatizados, debido a que la inoculación y la lectura se hace de manera automatizada, se reduce la carga de trabajo del analista.
- Reducción considerable del tiempo de incubación (p.ej. en el sistema VITEK[®] se pueden obtener resultados en 4 horas).
- En los sistemas automatizados se pueden procesar un número elevado de muestras dependiendo del tamaño del equipo (p. ej. existen dos formatos de VITEK[®] 2 uno para 30 muestras y otro para 60).

Desventajas:

- El inconveniente principal en los sistemas automatizados es el gran tamaño del equipo y su costo, además estos equipos requieren control adecuado de la temperatura ambiente y en algunas ocasiones la humedad.
- Antes de aplicar la técnica de detección se deben establecer ciertas propiedades fisiológicas, como tinción de Gram, demanda de oxígeno y temperatura óptima para la proliferación.

- En algunos sistemas miniaturizados los cambios de color en el sustrato no son tan evidentes para diferenciar una reacción positiva de una reacción negativa (p.ej. Crystal ID)
- En algunos sistemas miniaturizados pueden presentarse derrames (p.ej. API).
- Existen microorganismos que tardan en hidrolizar algunos sustratos. Al hacerse una lectura en menor tiempo puede haber falsos negativos.
- Cuando las pruebas incluyen sensibilidad a antibióticos se pueden generar falsos negativos, debido a que los antibióticos vienen en pequeñas concentraciones y algunos de éstos no cuentan con la concentración suficiente para impedir el crecimiento de ciertos microorganismos.

CAPÍTULO 5. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.

5.1 Fundamento.

Los métodos inmunológicos se basan en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) que pueden ser visibles por los fenómenos de precipitación, aglutinación, difusión y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, radioisótopos o con enzimas)¹⁹.

5.2 Descripción.

La especificidad que tiene los Ac de unirse a un Ag se produce por enlaces débiles o no covalentes, siendo por tanto reversible. Depende de dos factores:

1. Afinidad: fuerza de unión entre el epítipo y el idiotipo del anticuerpo (**Figura 14**). Pueden existir anticuerpos de igual especificidad, pero diferente afinidad.
2. Avidéz: es la fuerza de unión global del anticuerpo por el antígeno.

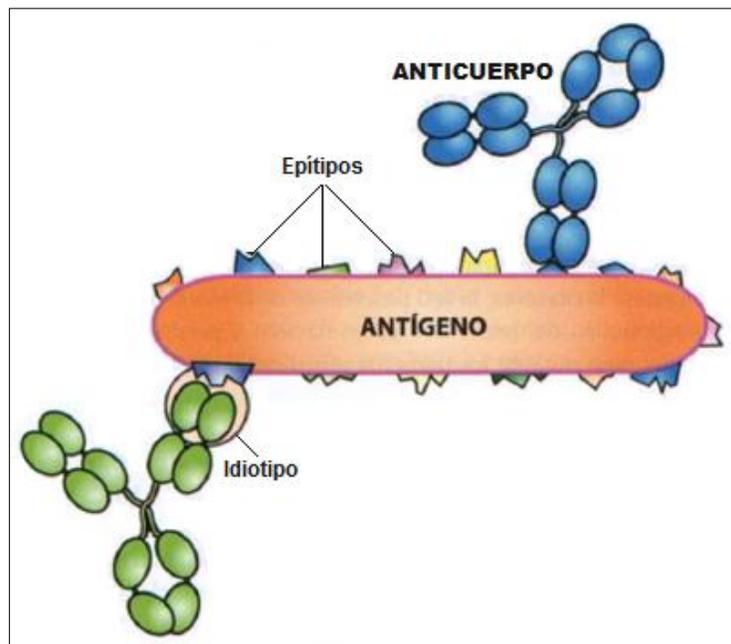


Figura 14. Unión antígeno anticuerpo. Tomado de: Calleja⁴.

En los métodos inmunológicos se utilizan los anticuerpos policlonales (PAb) y los anticuerpos monoclonales (MAb).

Los PAb tienen diversas moléculas de anticuerpo de distintos orígenes y actúan contra diferentes epítipos del mismo antígeno, por lo que pueden participar en

reacciones cruzadas con antígenos de diferentes microorganismos. Por el contrario, los MAb son homogéneos y muy específicos^{6,19,4}.

5.3 Ventajas e inconvenientes.

En general los métodos inmunológicos presentan las siguientes ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Son métodos sencillos y dan resultados fáciles de interpretar.
- No se elaboran diversos medios de cultivo para identificación bioquímica, ahorrándose tubos, cajas petri, medio de cultivo, agua destilada, espacio de almacenamiento, etc.
- Reducción de desechos biológicos en comparación a las pruebas bioquímicas tradicionales.
- Cuando se planean de manera minuciosa los PAb o MAb en emparejado producen la mejor señal con datos reproducibles^{6,19,28}.
- Cuando el método detecta toxinas o sus subproductos metabólicos, indican que las células bacterianas están vivas

Desventajas:

- En alimentos por lo general, los microorganismos son expuestos a lesiones subletales o condiciones de estrés como el pH ácido, estrés osmótico (sal), conservadores antimicrobianos, temperaturas de almacenamiento y choque térmico, lo cual puede alterar su morfología, y su fisiología, de modo que se produce una expresión aberrante de antígenos y se debilita la señal durante la detección por medio de anticuerpos.
- Cuando el método detecta células intactas no hay distinción entre células viables y las células muertas, aunque sólo las primeras son las que importan en la seguridad alimentaria. No obstante, se puede resolver tal problema por medio de cultivos activos paralelos al inmunoanálisis.

5.4 Separación inmunomagnética.

5.4.1 Fundamento.

La separación inmunomagnética (IMS) se basa en la detección del antígeno mediante el uso de anticuerpos adsorbidos y unidos covalentemente a una superficie de partículas esféricas magnéticas. Ésto con la finalidad de concentrar y aislar diversos microorganismos de muestras ambientales y de alimentos.

5.4.2 Descripción.

Son partículas magnéticas de óxido férrico cubiertas con anticuerpos para atrapar y concentrar el patógeno blanco en una mezcla de microorganismos. Posteriormente se extraen estas esferas de las suspensiones por medio de un separador magnético en un tubo de ensayo, se lava varias veces el complejo magnético con solución amortiguadora para eliminar contaminantes no deseados y luego se recuperan las células para aplicar otras pruebas (p.ej. medios de cultivo diferenciales, inmunoanálisis, PCR o análisis con biosensores).

Se ha demostrado que el método IMS es eficaz para la captura de *E.coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria* de diversas matrices de alimentos (p.ej. carne, productos lácteos y pollo)^{6,19,23,28,38}.

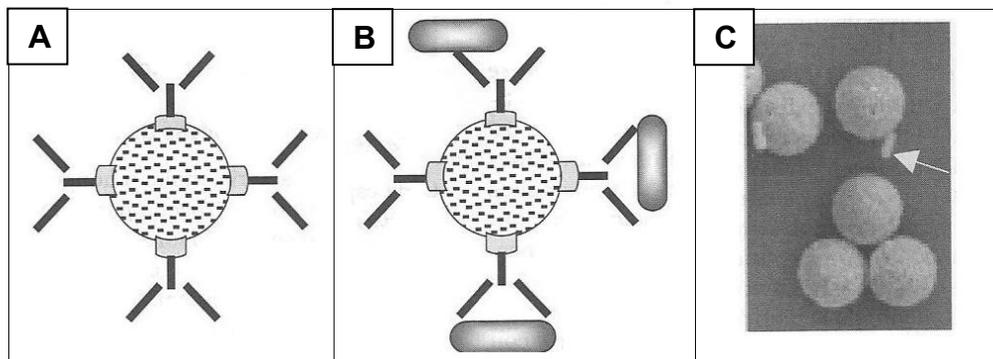


Figura 15. Separación inmunomagnética. Se ilustra las partículas paramagnéticas durante la captura de bacterias con anticuerpos. Fuente: Ray¹⁹.

En la **Figura 15** se observa el diseño de una partícula cubierta de anticuerpos (A), células bacterianas capturadas (B) y una fotografía tomada a través de un

microscopio electrónico de barrido en la que se observan señaladas por la flecha células de *Listeria* capturadas por el anticuerpo unido a las microesferas (C).

Existen dos métodos de separación inmunomagnética; estos son el método directo y el método indirecto.

En el método directo se mezclan el microorganismo blanco con partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos para el microorganismo.

Cuando las partículas hacen contacto con las células bacterianas se adhieren mediante el anticuerpo primario.

En el método indirecto se agrega el anticuerpo primario a la suspensión para que se fije al microorganismo blanco; luego se agregan partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario y se deja que se una a éste.

5.4.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Dynabeads[®], es una de las principales marcas presentes en el mercado, además se han citado en diversos artículos y libros^{6,19, 23,25, 28, 38, 39}.

5.4.4 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Las partículas Dynabeads[®] están avaladas por la FDA.
- Al concentrar el patógeno de interés mediante el uso de anticuerpos se evita que el microorganismo se estrese comparado con los medios de cultivo selectivos.
- La eliminación de etapas de enriquecimiento selectivo acorta el tiempo de análisis de la muestra.
- Debido a que este método concentra el microorganismo de interés, se reducen compuestos presentes en los alimentos que inhiben la PCR facilitando su uso (p.ej. ácidos húmicos, grasas).

Desventajas:

- Captura no específica de bacterias no blanco si no se hace la minuciosa selección del anticuerpo.
- Inconsistencias en la tasa de captura que pueden variar de 10-70% según el anticuerpo o patógeno blanco buscado.
- De acuerdo con lo citado por Sandoval en su artículo³⁹, menciona que a mayor tiempo de reacción inmunológica o tiempo de incubación se obtienen más bacterias y aumenta la posibilidad de uniones inespecíficas. Aunque las diferencias no son significativas es un método con resultados cuantitativos variables.

5.5 Aglutinación en látex (LA) y aglutinación pasiva inversa en látex (RLPA)

5.5.1 Fundamento.

Se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, en donde al entrar en contacto las partículas de látex sensibilizadas por anticuerpos específicos con los antígenos correspondientes, provocan un aglutinado visualizado como grumos¹⁹.

5.5.2 Descripción.

Son perlas de látex coloreadas recubiertas de anticuerpos o partículas de oro coloidal en una suspensión de células bacterianas. Si el antígeno específico está presente, se pone en evidencia la aglutinación o se forma un precipitado.

Para el análisis de toxinas bacterianas, el ensayo se conoce como aglutinación inversa pasiva en látex (RPLA), mediante el cual se utilizan pocillos de placas de microtitulación donde se inmovilizan anticuerpos contra una toxina específica en partículas de látex, que luego se mezclan con la muestra preparada que probablemente contiene la toxina (antígeno), la principal diferencia es que los antígenos (células bacterianas) en LA son insolubles, mientras que en RPLA los antígenos (toxinas) son solubles de manera que, si la muestra contiene la toxina específica se formará un patrón difuso en el fondo; cuando no la contiene aparece un anillo o un botón.

En la **Figura 16** se ilustra la aglutinación resultado de una interacción de antígeno anticuerpo-látex^{6, 19}.

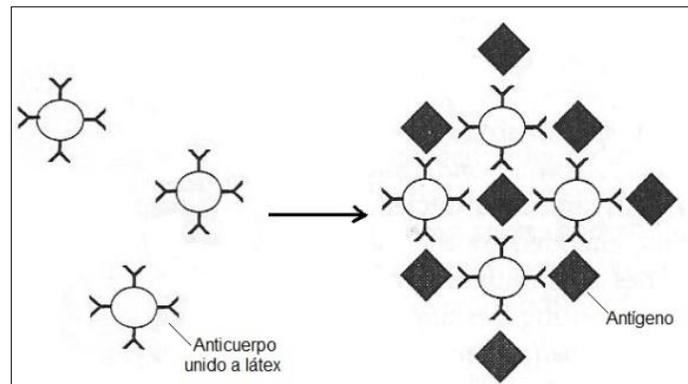


Figura 16. Aglutinación en látex. Fuente: Doyle⁶.

5.5.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Actualmente en el mercado se hallan sistemas basados en LA y RPLA tales como: RIMTM, ProlexTM, Wellcolex[®] por mencionar algunos ^{77,83}.

5.5.4 Ventajas e inconvenientes.

A continuación se presentan las siguientes ventajas e inconvenientes del método.

Ventajas:

- RIMTM, ProlexTM y Wellcolex[®], están avalados por la FDA.
- En LA el método es muy sencillo, ya que solamente en una lámina se agrega una gota de muestra y una gota de partículas de látex unidas al anticuerpo y se espera de 2 a 8 minutos para obtener aglutinado visible.
- En RPLA las toxinas y metabolitos indican que las células bacterianas están vivas.
- Se obtienen resultados de manera rápida debido a que se pone en evidencia la aglutinación en menos de 10 minutos.
- Su costo es bajo.

Desventajas:

- Aunque las reacciones de aglutinación son extremadamente simples y se producen casi instantáneamente, no son muy sensibles y requieren alrededor de 10^7 bacterias por reacción.

- En algunos casos, las partículas de alimentos suspendidas pueden afectar en la interpretación de las reacciones de aglutinación.

5.6 Inmunodifusión

5.6.1 Fundamento.

Se basa en una reacción antígeno-anticuerpo, donde migra por difusión el antígeno de interés en un medio adecuado y al interactuar con el anticuerpo, producen una banda de precipitado visible.

5.6.2 Descripción.

En general, el gel más utilizado en el método de inmunodifusión, es la agarosa, debido a que tiene menos efecto electroendosmótico y, por tanto, la difusión de las proteínas se ve menos afectada.

Aunque la mayoría de las veces es posible visualizar el precipitado en el gel a simple vista, en ocasiones es necesario teñir el gel para obtener mejor resolución y claridad del precipitado. Los colorantes más utilizados son el azul brillante de Coomassie y el negro amido; sin embargo, otros colorantes utilizados para teñir proteínas pueden ser útiles para este fin. Una vez realizada la tinción, se debe utilizar una solución decolorante para extraer el exceso de colorante.

En las pruebas de inmunodifusión, si uno de los reactivos, sea el antígeno o el anticuerpo, permanece fijo y el otro se mueve y se une a él, se tiene una inmunodifusión simple. Por el contrario, si los dos pueden moverse libremente en el medio, se trata de una inmunodifusión doble⁹.

5.6.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

En el mercado existe 1-2 test[®] que es una prueba exclusiva para *Salmonella* móvil. Es un dispositivo en forma de L con dos cámaras, una de motilidad y otra de inoculación (**Figura 17**). La cámara de motilidad o vertical contiene agar semisólido, y la parte superior de esta cámara se inocula con un anticuerpo específico para el antígeno flagelar de *Salmonella*. La cámara de inoculación u horizontal contiene un medio de enriquecimiento selectivo y se inocula con una alícuota de caldo preenriquecido.

Si está presente *Salmonella* móvil, crece en la cámara de enriquecimiento selectivo y migra a la cámara de la motilidad. Cuando se pone en contacto el anticuerpo con el antígeno flagelar, se forma una línea visible de precipitación^{6,19}.

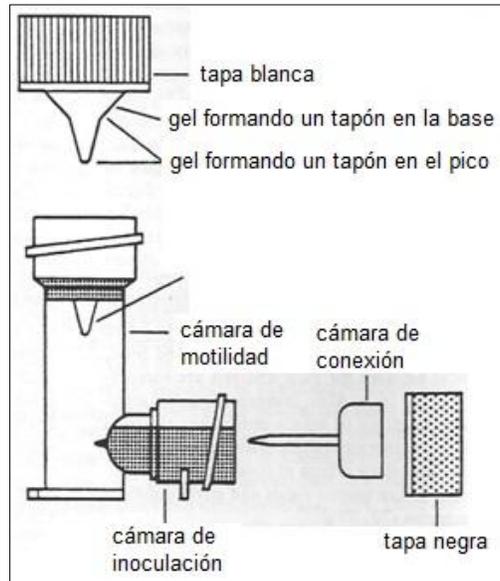


Figura 17. Sistema 1-2 test® para la identificación de *Salmonella*. Fuente: Doyle⁶

5.6.3 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Es un ensayo avalado por AOAC.
- Presenta alta sensibilidad y especificidad para la detección de *Salmonella* en alimentos.
- Los resultados se obtienen en 38 h desde que se comienza a procesar la muestra.
- La facilidad de manipulación del dispositivo; es una prueba adecuada para todo tipo de laboratorio.

Desventaja:

- Sólo aplicable para la identificación de *Salmonella* móviles en alimentos.

5.7 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

5.7.1 Fundamento.

Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática.

5.7.2 Descripción.

Este es uno de los estudios más utilizados para detectar patógenos tales como *E.coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*.

Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (placa o membrana), la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro, el cual es proporcional a la cantidad del antígeno contenido de la muestra^{19, 22}.

Las enzimas más utilizadas son peroxidasa de rábano (HRP) y fosfatasa alcalina (ALP).

Los sustratos específicos que se agregan son: o-fenildiamina y tertametil bencidina (para HRP) y p-nitrofenilfosfato (para ALP).

5.7.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Actualmente en el mercado existen sistemas basados en la prueba de ELISA tales como: Assurance[®] EIA, TECRA[™], TRANSIA[®] PLATE, Rapid Chek[®], VIP[®]GOLD por mencionar algunos ^{6,19,28, 50, 81}.

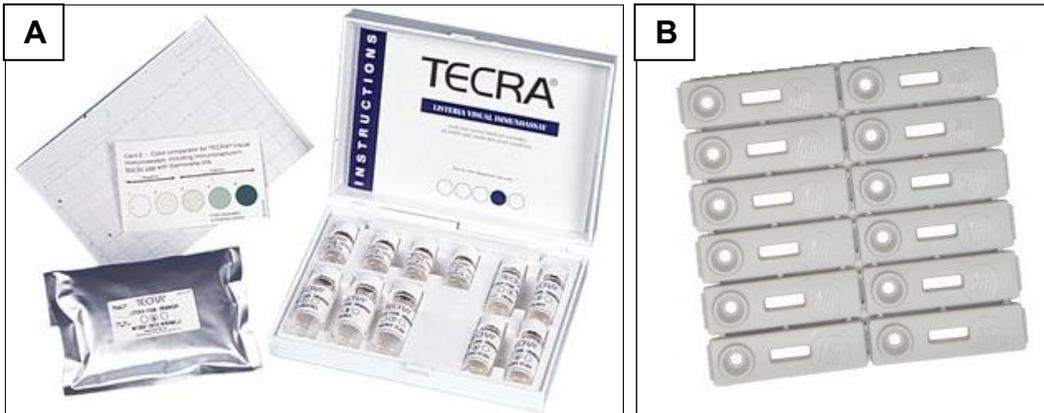


Figura 18. Sistemas basados en ELISA disponibles en el mercado. Se ilustran los sistemas: TECRA[™] (A) y VIP[®]GOLD (B).

En la **Figura 18** se ilustra un sistema basado en ELISA en placa (A) y un sistema basado en ELISA en membrana (B). Estos soportes (placa y membrana), se describen a continuación.

5.7.4 ELISA en placa.

5.7.4.1 Descripción.

La prueba se realiza en una placa de poliestireno de 96 pocillos (placa de microtitulación). En general se utilizan tres estudios de ELISA: indirecto, emparejado, análisis de hibridación por competencia (véase **Figura 19**).

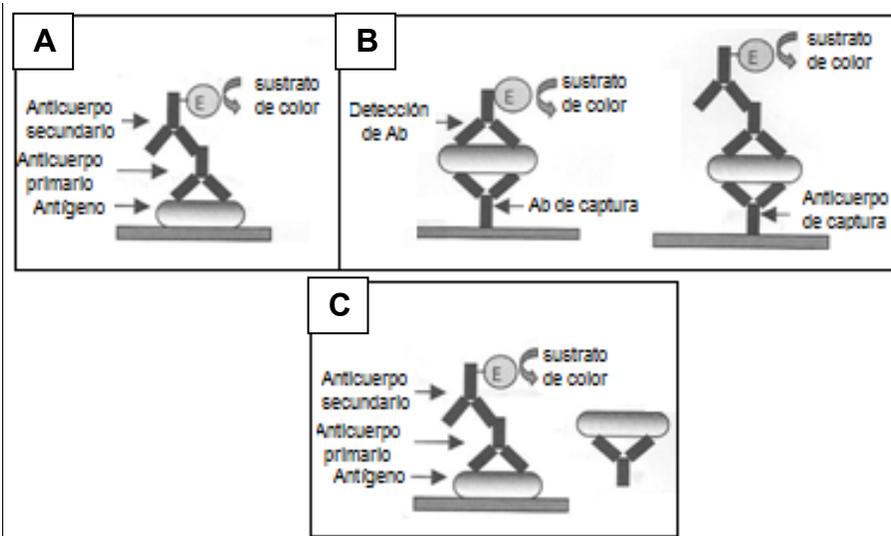


Figura 19. Esquema de distintas configuraciones de la prueba de ELISA. Se ilustran el método indirecto (A), emparedado (B) y análisis de hibridación por competencia (C). Fuente: Ray¹⁹.

En los análisis indirectos primero, el antígeno es inmovilizado en la placa de poliestireno y luego reacciona con el anticuerpo primario; después de lavar la placa, se agrega un anticuerpo secundario con una enzima acoplada y se permite su fijación al anticuerpo primario. Luego se agrega la solución de sustrato para generar color (**Figura 19 A**).

En las pruebas de ELISA de emparedado, primero se fija el anticuerpo a la placa y se permite que, a su vez, se fije el antígeno; entonces, se agrega un segundo anticuerpo específico contra el antígeno, marcado con una enzima, con el que éste queda en medio de los dos anticuerpos. Es necesario que el antígeno tenga al menos dos sitios de fijación para la unión de ambos anticuerpos (**Figura 19 B**).

En la prueba de ELISA por competencia, primero se inmovilizan las células o antígenos bacterianos en los pocillos de placas de microtitulación. Aparte, en tubos de ensayo se mezcla el antígeno primario en diversas diluciones de bacterias (o antígenos) y se agregan a los pocillos que contiene antígeno inmovilizado. Después de lavar, se agrega un anticuerpo conjugado a una enzima, y el sistema de sustrato para generar color. Si la muestra con máxima dilución de

células se observa reacción mínima o igual a la de una muestra control, se considera que el resultado es positivo (**Figura 19 C**).

5.7.4.2 Ventajas e inconvenientes.

A continuación se presentan las siguientes ventajas e inconvenientes del método de ELISA en placa.

Ventajas:

- Assurance[®] EIA, TECRA[™], son ensayos avalados por AOAC y TRANSIA[®] PLATE está avalado por la FDA.
- Una vez que se dispone de los anticuerpos adecuados, la técnica es sencilla y barata.
- Es rápido, ya que pueden ser detectado el patógeno de interés en 10 minutos después del aislamiento y enriquecimiento previo (véase **Capítulo 9**).
- No es necesario utilizar instalaciones o equipos complejos de laboratorio.
- La interpretación de los resultados es muy sencilla, objetiva y visual.

Desventajas:

- Rapid Chek[®], es un ensayo que no está reconocido a nivel internacional.
- La sensibilidad del método es baja, debido a que detectan a partir de 10^4 a 10^5 bacterias/mL para las células bacterianas enteras y unos pocos ng/mL o menos, para toxinas o proteínas; se necesita, por lo tanto, un enriquecimiento previo.
- El análisis es tedioso ya que se requiere hacer lavados, además se invierte mucho tiempo.

5.7.5 ELISA en membrana.

5.7.5.1 Descripción.

Análisis inmunocromatográfico de flujo lateral o inmunoprecipitación (también conocido como prueba con “tira reactiva”); es un método en donde se utiliza una

disposición “en emparedado” y se realiza en una membrana, en vez de hacerlo en pocillos de microtitulación, como en la prueba de ELISA.

Primero se captura el microorganismo y es inmovilizado en un área predeterminada de la membrana. Se agrega a la tira de nitrocelulosa un anticuerpo de detección, preparado de antemano con un reactivo de color (oro coloidal o partículas de látex). Se agrega una muestra de antígeno específico (microbiano) a los pocillos de muestreo y se permite que se fije al anticuerpo conjugado con las partículas de oro coloidal o látex (**Figura 20**). El complejo formado fluye por capilaridad hacia el otro extremo de la tira a través de la membrana porosa, que contiene dos zonas de captura, una específica para anticuerpos no fijados y acoplados a reactivos de color (línea de control).

La aparición de líneas de control en la membrana indica que la muestra es negativa (no contiene el antígeno), pero la aparición de dos de éstas líneas indica un resultado positivo¹⁹.

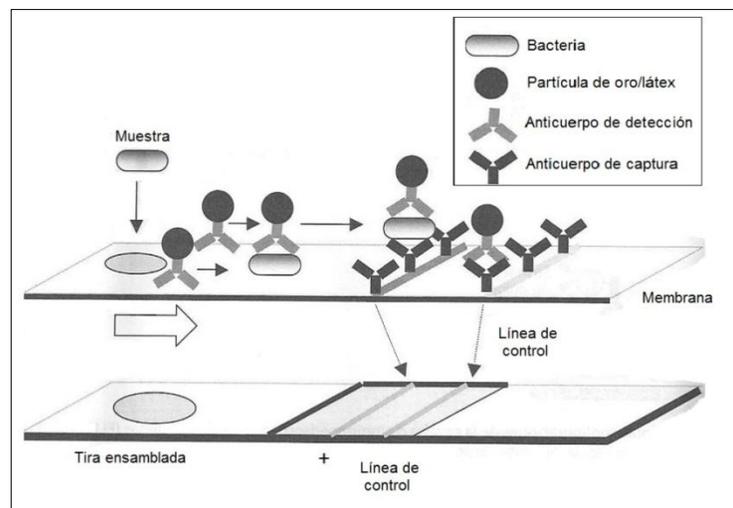


Figura 20. Análisis inmunocromatográfico de flujo lateral. Fuente: Ray¹⁹.

5.7.5.2 Ventajas e inconvenientes.

A continuación se presentan las siguientes ventajas e inconvenientes de ELISA en membrana.

Ventajas:

- VIP[®] GOLD, es un ensayo avalado por AOAC.
- Es extremadamente simple, debido a que no requiere lavado o manipulaciones comparado con el ELISA en placa.
- Lectura manual, no es necesario un equipo sofisticado para leer los resultados.
- Es rápido, ya que puede ser detectado el patógeno de interés, en el dispositivo en 10 minutos después del aislamiento y enriquecimiento previo (véase **Capítulo 9**).

Desventajas:

- Pocos son los patógenos que se detectan usando este método (p.ej. E. coli O157:H7 y *Salmonella*).
- Debido a que cada dispositivo tiene anticuerpos exclusivos para la identificación de un antígeno, sólo se puede detectar un microorganismo.
- La sensibilidad del método es baja, debido a que se detecta a partir de 10^4 a 10^5 bacterias/mL para las células bacterianas enteras.
- Se debe de realizar un enriquecimiento previo debido a la sensibilidad del método, aumentando así el tiempo de identificación (24horas).

5.8 Análisis de inmunofluorescencia (IF).

5.8.1 Fundamento.

Se basa en la detección de antígenos o anticuerpos primarios, mediante el uso de anticuerpos marcados con un fluoróforo que al ser excitado por luz UV, emite una fluorescencia.

5.8.2 Descripción.

Ésta técnica une colorantes fluorescentes tales como rodamina B, isocianato de fluoresceína e isotiocianato de fluoresceína (FITC) de manera covalente con anticuerpos, para permitir su fácil observación. Esta fluorescencia que emite el

complejo antígeno-anticuerpo con marcador fluorescente, es captada por un microscopio de fluorescencia, una cámara digital o un espectrofluorómetro.

La Inmunofluorescencia puede ser directa o indirecta. En la IF directa el antígeno se fija a los anticuerpos marcados con fluorescencia (**Figura 21 A**). En la IF indirecta, los anticuerpos secundarios son marcados con fluorescencia; éste detecta la presencia del complejo de anticuerpo primario y antígeno (**Figura 21 B**)

7,14,19,21

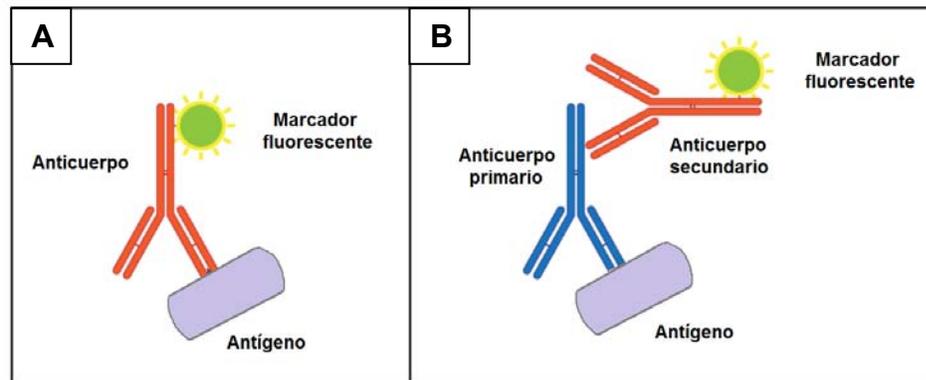


Figura 21. Inmunofluorescencia por el método directo e indirecto.

5.8.4 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Se obtienen resultados de manera rápida; dependiendo del caso, se pueden obtener resultados el mismo día en el que se toma la muestra.
- No es necesaria la esterilidad en este método.
- El método directo requiere de menor tiempo de incubación, menos lavados y sus reacciones son más específicas comparadas con el método indirecto.
- El método indirecto es más sensible y produce una fluorescencia más brillante que el método directo.
- El microscopio de fluorescencia es un instrumento fácil de adquirir y dependiendo de la marca, se puede obtener a un bajo costo.

Desventajas:

- Alto costo de los anticuerpos marcados con colorantes fluorescentes.

- El método indirecto, requiere de mayor tiempo de incubación, mayor cantidad de lavados.
- El método directo es menos sensible, comparado con que el método indirecto.

5.9 Citometría de flujo.

5.9.1 Fundamento

Es una técnica de análisis celular multiparamétrico, cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas secuencialmente, gracias a una corriente líquida laminar, por delante de un haz de láser focalizado y de una longitud de onda determinada. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Éstos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas proporcionando la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula (tamaño, complejidad y características antigénicas de cada célula particular o inmunofenotipo).

5.9.2 Descripción.

La citometría de flujo es una técnica que permite detectar células midiendo características (p.ej. morfología, contenido de ácidos nucleicos, antigenicidad de superficie).

Las células se hacen pasar una a una por un citómetro y sobre ellas se hace incidir un haz de láser. La información producida, puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por haz de láser.

Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora. De este modo, se realiza una estimación del número, tamaño y forma de los microorganismos.

Mediante citometría de flujo, es posible la detección directa de células bacterianas por medio de anticuerpos marcados con fluorescencia^{19,21,24,35}.

5.9.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Actualmente en el mercado existen citómetros de flujo tales como: BD FACSCanto™, BD Accuri™, CyFlow® (Figura 22), por mencionar algunos^{44,46,75}.



Figura 22. Citómetro de flujo. Se ilustra el sistema CyFlow® Counter.

5.9.4 Ventajas e inconvenientes.

A continuación se presentan las siguientes ventajas e inconvenientes del método.

Ventajas:

- Pueden realizarse mediciones de millones de células por minuto.
- Se evita la necesidad de recurrir a etapas de enriquecimiento y cultivo de las muestras
- Puede emplearse con fines tanto cualitativos como cuantitativos.
- Debido a su gran sensibilidad, resulta ser un método muy útil en la detección de concentraciones bajas de microorganismos específicos en fluidos.

Desventajas:

- Costo elevado del citómetro de flujo.
- Algunos equipos ocupan un espacio considerable, sin embargo, actualmente se producen equipos más compactos.
- Debido a la similitud morfológica entre ciertas células y partículas del alimento, se puede dificultar la interpretación de los resultados.

CAPÍTULO 6. MÉTODOS MOLECULARES

6.1 Introducción.

Los métodos rápidos antes citados (véase **Capítulo 3** a **Capítulo 5**), están basados en la detección de determinadas características fenotípicas de los microorganismos.

La mayor parte del diagnóstico microbiológico recae en la detección de las expresiones fenotípicas de las células y están sometidas a variaciones, ya que las condiciones de crecimiento se pueden ver influenciadas por la temperatura, pH, presencia de nutrientes, potencial de óxido-reducción, estrés químico, ambiental, a_w , etc. En este sentido, incluso los métodos inmunológicos, dependen de la expresión fenotípica de las células para producir antígenos de interés, que puedan ser detectados por anticuerpos específicos.

Por el contrario, los métodos moleculares se dirigen a la detección de características celulares mucho más estables contenidas en los ácidos nucleicos (genotipo).

Aunque existen una amplia variedad de métodos moleculares, únicamente se han desarrollado comercialmente para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos, el método de hibridación y la PCR. Recientemente, se han desarrollado otros métodos de tipificación molecular tales como: Análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), electroforesis en gel por pulsos de campo (PFGE), restricción de polimorfismos en la longitud de fragmentos (RFLP) y polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), por mencionar algunos¹⁹.

6.2 Métodos de hibridación.

6.2.1 Fundamento.

Se basan en la capacidad que poseen dos cadenas de ácido nucleico con secuencias de bases complementarias (homólogas), de unirse específicamente entre sí y formar una molécula de cadena doble (dúplex o híbrido). Para ello, se requiere que la cadena de ácido nucleico que contiene de 20 a 4,000 bases (la sonda) provenga de un microorganismo de identidad conocida y que la otra cadena proceda de un microorganismo desconocido que se desea detectar o

identificar. La hibridación positiva indica el microorganismo desconocido como idéntico, a aquel del que proviene de la sonda.

6.2.2 Descripción.

En la formación del dúplex, la base de adenina se une siempre a la timina, mientras que las bases de guanina y citosina forman un par de unión. Como la hibridación requiere homología en la secuencia de los ácidos nucleicos, una reacción de hibridación positiva entre dos cadenas, cada una de ellas procedente de una fuente distinta, indica el parentesco genético entre dos microorganismos que donaron cada una de las cadenas de la secuencia para la reacción de hibridación (**Figura 23**)⁸.

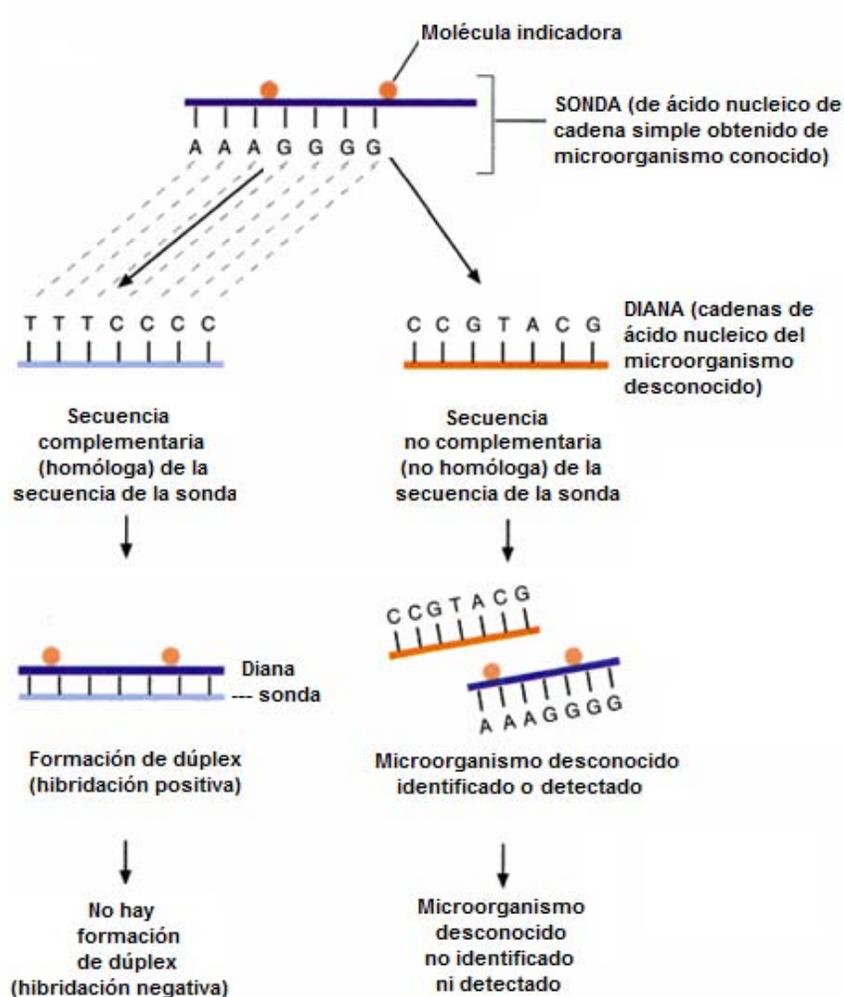


Figura 23.Principios de la hibridación de ácidos nucleicos. Fuente: Forbes⁸.

La selección y el diseño de una sonda (longitud y secuencia de bases) depende de la secuencia del ácido nucleico por determinar (microorganismo problema). Estas sondas pueden tener una secuencia, que compartan las bacterias de cierto Gram o es posible diseñar sondas aún más específicas para identificar un género o una especie de una bacteria en particular, un factor de virulencia o un gen de resistencia a los antibióticos que pueda estar presentes en ciertas cepas de una especie dada.

Todas las pruebas de hibridación, deben contar con un medio para detectar la hibridación. Ésto se logra mediante el empleo de una molécula “indicadora” que forma químicamente un complejo de sonda monocatenaria de DNA. Las sondas pueden marcarse con varias de estas moléculas, pero con mayor frecuencia se usan marcadores radioactivos (p.ej. ^{32}P , ^{125}I o ^{36}S , biotina avidina, quimioluminiscentes).

Con marcadores radioactivos, la hibridación se detecta por la emisión de la radiactividad del complejo sonda diana (**Figura 24 A**)

En la biotinilación, se incorpora biotina a la sonda de DNA mediante un proceso químico. Se detecta con avidina, una proteína de unión a la biotina, conjugada con una enzima como la peroxidasa de rábano. Cuando se agrega el sustrato cromogénico, la peroxidasa forma un producto coloreado que puede detectarse en forma visual o espectrofotometría (**Figura 24 B**).

Las sondas marcadas con moléculas indicadoras quimioluminiscentes, pueden unirse de manera directa por medios químicos a la sonda de ácido nucleico sin usar un anticuerpo conjugado. Estas moléculas (p.ej. la acridina), emiten luz, de forma que la hibridación entre una sonda quimioluminiscente y el ácido nucleico diana, puede detectarse con un luminómetro (**Figura 24 C**).

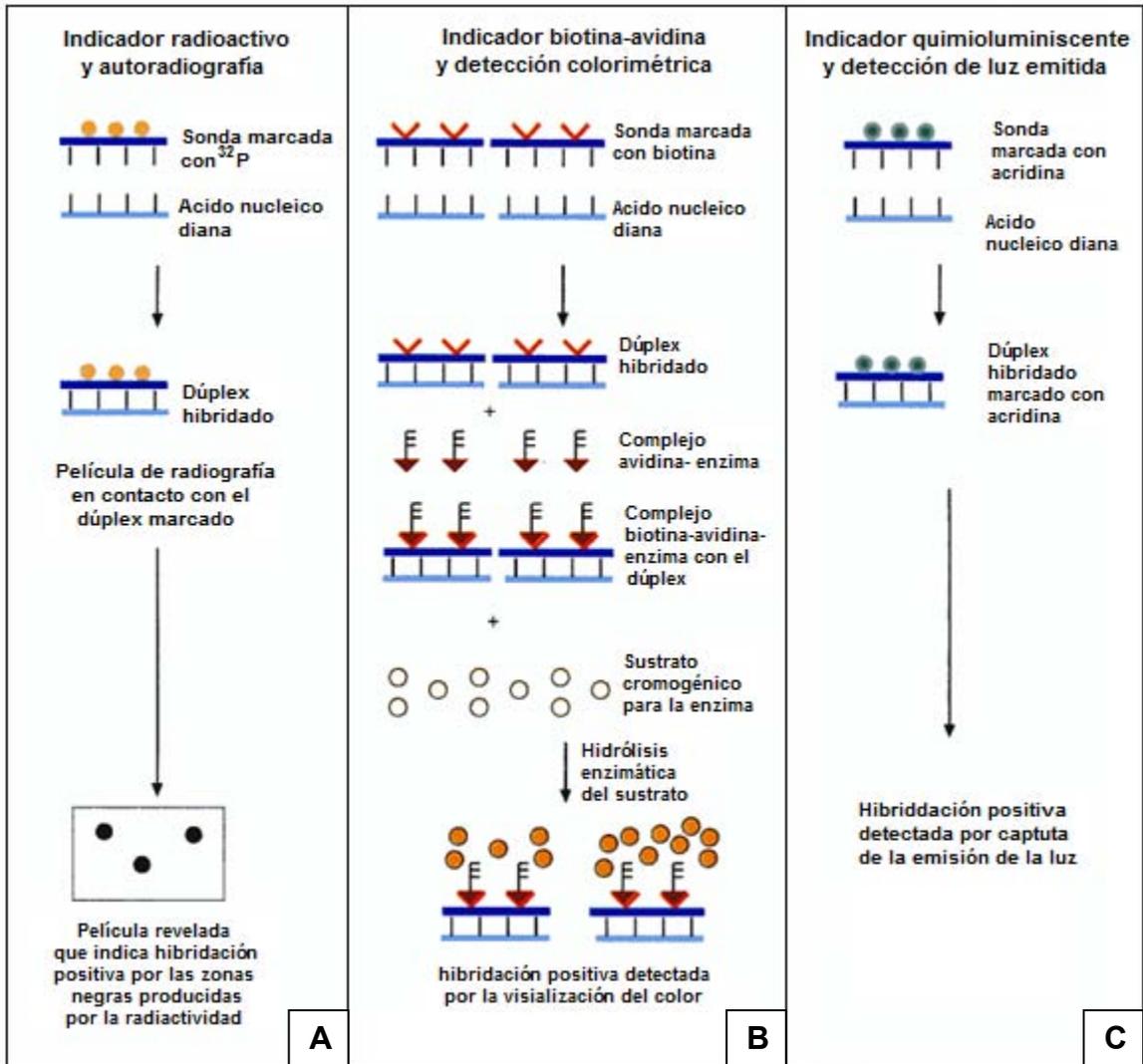


Figura 24. Marcado con moléculas indicadoras en sondas. Fuente: Forbes.

6.2.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Existen en el mercado ensayos comerciales basadas en el método de hibridación tales como GENE-TRAK[®] y AccuProbe[®] (donde la sonda es marcada con fluoresceína y éster de acridinio quimioluminiscente respectivamente), por mencionar algunos.

6.2.4 Ventajas e inconvenientes.

A continuación se presentan las siguientes ventajas e inconvenientes del método.

Ventajas:

- GENE-TRAK[®] está avalado por AOAC.
- Es un método sensible y conveniente para detectar patógenos en alimentos como *E. coli* O157:H7, *Listeria*, y *Salmonella*.
- El resultado no está sujeto a la expresión fenotípica.
- Estos métodos son específicos y relativamente más rápidos que los tradicionales.
- Tiene alta especificidad.
- No se elaboran diversos medios de cultivo para identificación bioquímica, ahorrándose tubos, cajas petri, medio de cultivo, agua destilada, espacio de almacenamiento, etc.

Desventajas:

- AccuProbe[®] no está avalado por un organismo internacional.
- Si no hay suficiente ácido nucleico del microorganismo de interés en la reacción, se obtienen resultados falsos negativos, por lo tanto, es necesario un enriquecimiento previo.
- Aunque los marcadores radioactivos son sensibles, hay limitación del tipo de marcador por las dificultades inherentes al trabajo con radioactividad.

6.3 Reacción de la cadena polimerasa (PCR).

6.3.1 Fundamento.

Es un método de amplificación del ácido nucleico del microorganismo de interés, que combina los principios de: desnaturalización, hibridación, elongación y replicación, que se aplican en numerosos ciclos. Una sola copia de ácido nucleico del microorganismo de interés, se multiplica por 2^{31} o más copias en un periodo relativamente breve. Proporcionando una gran cantidad de fragmentos que pueden detectarse por varios métodos.

6.3.2 Descripción

La PCR es una técnica que permite obtener en gran cantidad un fragmento específico de DNA. La técnica requiere de los siguientes componentes: el DNA molde que hay que amplificar, una pareja de cebadores (primers) complementarios a los extremos de la región de DNA y una DNA polimerasa termoestable, como la DNA Taq polimerasa, aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, con una mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato.

El proceso requiere la repetición de una serie de ciclos (20 a 40), de unos 2-5 min de duración y consta de las siguientes etapas: **desnaturalización, hibridación, elongación y amplificación.**

La mezcla de reacción se calienta a 95°C durante 30 a 120 segundos, para disociar o desnaturalizar las cadenas del DNA (**desnaturalización**), posteriormente se enfría por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores y del DNA molde a 40-65°C, para que se lleve a cabo la hibridación y los cebadores se alineen en los extremos de la cadena del DNA (**hibridación**), y finalmente, se calienta de nuevo a la temperatura óptima de la DNA polimerasa, a 72°C para copiar las cadenas (**elongación**).

Los termocicladores permiten la automatización de este proceso de calentamiento/enfriamiento, que se repite de 20 a 40 ciclos (**amplificación**) hasta obtener la cantidad de DNA deseada (**Figura 25**). Estos fragmentos de DNA

amplificados suelen tener un tamaño comprendido entre 0,1 y 3 kb y pueden ser utilizados para su estudio posterior^{5,6,19}.

Como al copiar un fragmento dicatenario (o dúplex) de DNA, aparecen dos fragmentos idénticos, en cada ciclo se duplica la cantidad de DNA y por ello se produce un proceso exponencial, donde tras n ciclos se producirán 2^n copias⁵.

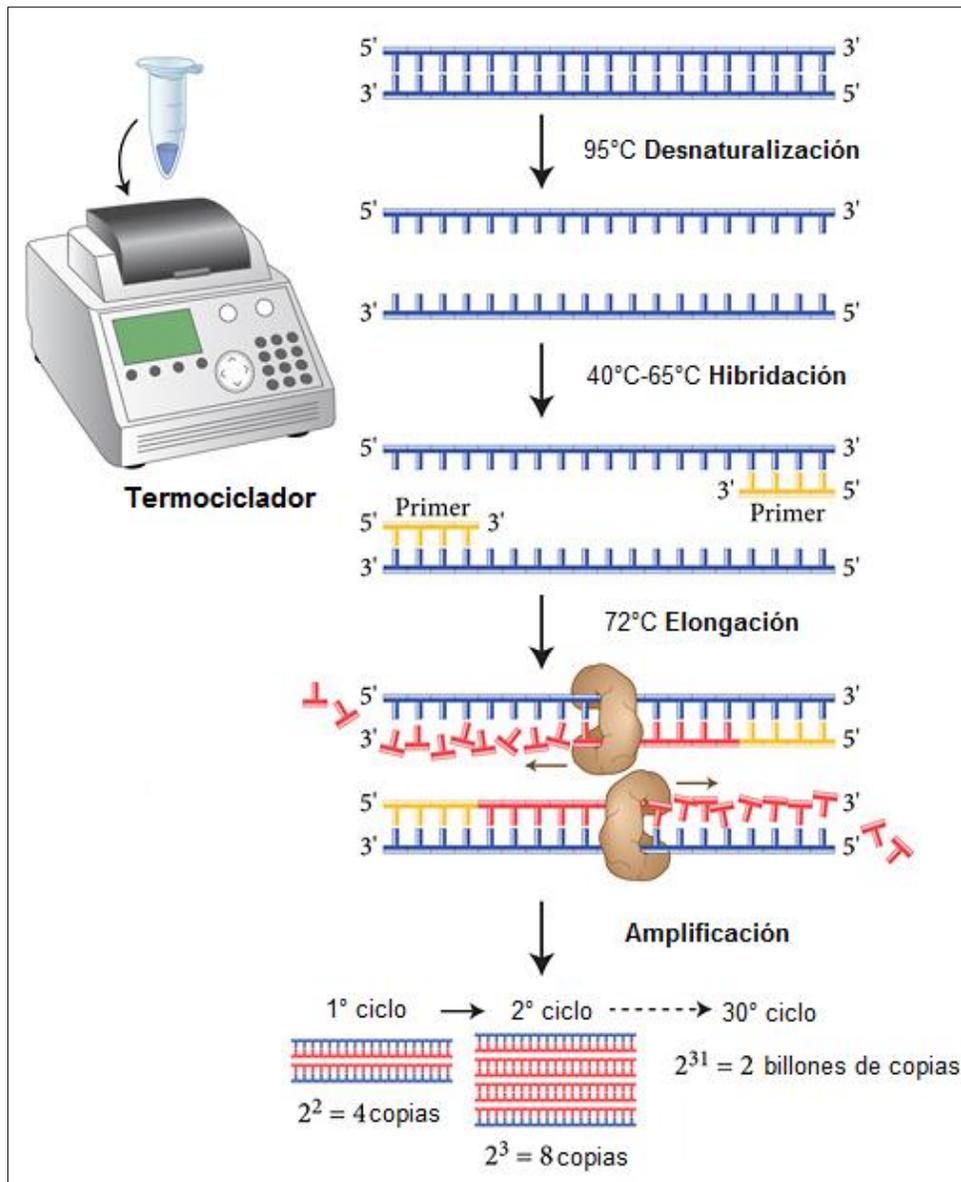


Figura 25. Pasos de la PCR. Fuente: Sebastián.

6.3.3 Otros tipos de PCR.

La capacidad de amplificación de la PCR estimuló el desarrollo de varias modificaciones que aumentan la eficiencia de esta metodología.

Algunos ejemplos específicos son la **RT-PCR** y la **PCR cuantitativa en tiempo real** (por mencionar algunas), las cuales se describen a continuación^{8, 19}.

La **RT-PCR** (PCR transcriptasa inversa), es un método en el cual, la amplificación se realiza con el RNA mensajero (mRNA), que sólo se transcribe en las células viables. Se puede realizar en una o en dos etapas: en la reacción de una sola etapa, el DNA polimerasa termoestable también tiene actividad RT. En la reacción de dos etapas se usa una enzima RT, separada de los componentes de la reacción de PCR.

La **PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR)**, es un sistema que combina la capacidad de detectar e identificar el número real de microorganismo de interés presentes en la muestra que utiliza una sonda (de 100 pb) marcada con indicador fluorescente (R) y un colorante amortiguador (Q). Esta sonda se hibrida con el DNA del microorganismo de interés. Mientras se realiza la primera hibridación, la Taq polimerasa del DNA (por su acción de endonucleasa), extrae la sonda y libera el colorante indicador; un detector láser integrado cuantifica los productos amplificados por la PCR.

6.2.3 Equipos presentes en el mercado.

En el mercado hay numerosas empresas que se dedican a fabricar termocicladores para la reacción de PCR (**Figura 26 A**) y termocicladores en tiempo real para la q-PCR (**Figura 26 B**).

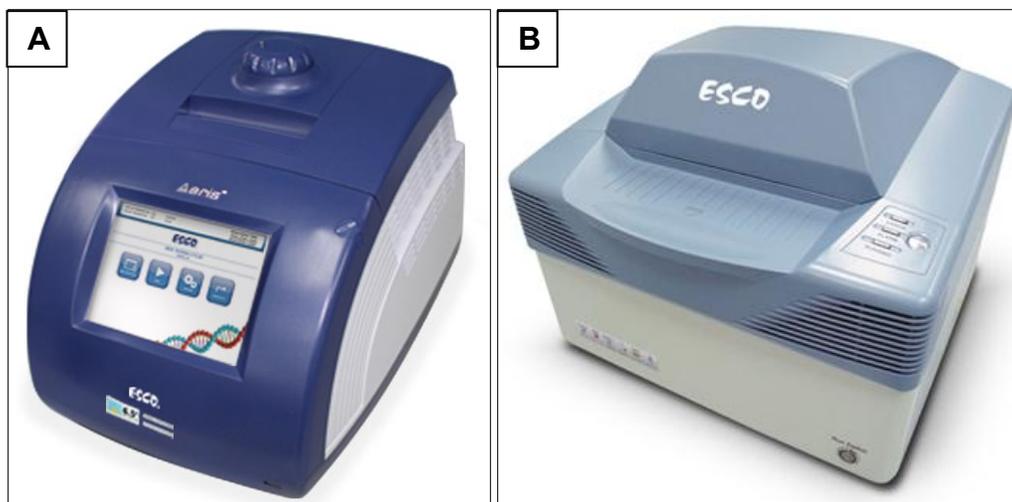


Figura 26. Termociclador y termociclador en tiempo real. Se ilustran termocicladores de la empresa PRO-LAB⁷⁶.

6.3.4 Ventajas e inconvenientes.

A continuación se presentan las siguientes ventajas e inconvenientes del método.

Ventajas:

- Ensayos basados en la PCR, tales como BAX[®] y ANSR[™], están avalados por AOAC.
- A partir de una muestra pequeña de ADN (entre 0.05 y 1 μ g) se puede obtener una cantidad considerable de fragmentos amplificados, para su posterior estudio⁵.
- Usando el método RT-PCR, se puede diferenciar las células vivas ya que la amplificación se realiza con el RNA mensajero (mRNA).

Desventajas:

- En los métodos basados en PCR, no permiten distinguir entre células vivas y muertas. La presencia de inhibidores en los alimentos, puede afectar la eficiencia de unión del cebador, provocando una deficiencia en la amplificación.

- En alimentos de origen vegetal, las sustancias húmicas presentes en el suelo y la presencia de hierro, afectan la unión del primer o inhiben la amplificación en la PCR.
- Los alimentos con alto contenido de proteína y grasa, tales como pollo, carne, quesos frescos, tienden a interferir más con la amplificación. Esto puede ser debido a la presencia de proteinasas, las cuales degradan enzimas.
- Debido a la complejidad de los alimentos, un método de preparación desarrollado para un tipo de alimento en particular, puede no ser utilizable para otros alimentos. Por ejemplo, la extracción usando condiciones alcalinas y detergentes, puede reducir los efectos inhibidores de PCR, de alimentos que contienen alto contenido de proteínas y grasas, pero otros alimentos pueden requerir diluciones, lavados, filtraciones, o etapas de centrifugación, para eliminar los efectos inhibitorios.
- A medida que se aumentan en número de pares de cebadores, se puede causar interferencia en el proceso de amplificación en la PCR múltiple.

6.4 Otras técnicas de tipificación molecular.

A continuación en la **TABLA 3**, se observa la descripción de otras técnicas de tipificación molecular, de importancia en brotes relacionados con alimentos. Se enuncian algunas marcas y equipos presentes en el mercado ^{10,17,27}.

Tabla 3. Descripción, sistemas y equipos de otras técnicas moleculares.

TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	SISTEMA/EQUIPO
RAPD	Es similar a la PCR, sin embargo, se utiliza un primer de tamaño corto (10 nucleótidos) para amplificación, y por tanto, menos específico. A la región amplificada se le denomina locus-RAPD.	Termociclador
PFGE	Se necesitan enzimas especiales que se emplean para cortar el DNA en pocos pedazos largos (15-20 fragmentos). Posteriormente, los fragmentos de DNA son puestos en geles de agarosa y se aplica un campo eléctrico no homogéneo, alternando periódicamente la orientación, generando así, un ángulo de reorientación del DNA de aproximadamente 120°. A diferencia de la electroforesis en gel que se lleva a cabo en un campo eléctrico homogéneo generado por dos filas de electrodos paralelamente opuestos al gel, el campo que se aplica en PFGE no es homogéneo, es generado por una fila de cátodos y al lado opuesto una fila de ánodos.	CHEF-DR ⁵³ CHEF-Mapper ⁵³ Rotaphor ⁸⁶
RFLP	Mediante enzimas de restricción, se lleva a cabo cortes en puntos precisos, generándose una colección de fragmentos de DNA de una longitud definida. Posteriormente se separa por electroforesis, donde los fragmentos de menor tamaño migran más y los de mayor tamaño migran menos.	Termociclador
AFLP	Se amplifica el DNA por PCR, después se corta con dos enzimas de restricción, se ligan adaptadores a los extremos de los fragmentos de restricción, se amplifica un subgrupo de fragmentos de restricción por PCR empleando dos primers, los cuales son complementarios al adaptador y al sitio de restricción, por último se lleva a cabo una electroforesis en gel de acrilamida, de los fragmentos amplificados usando preferiblemente marcadores fluorescentes o radioactivos.	Termociclador y Criterion™ Cell ⁵³ , mini-PROTEAN ⁵³

En la **Figura 27**, se ilustran sistemas tales como, el Criterion™ Cell para la electroforesis vertical en gel de poliacrilamida para AFLP (A) y CHEF-DR®, donde se lleva a cabo la electroforesis de campo pulsado de la técnica de PFGE (B)^{53,66}.

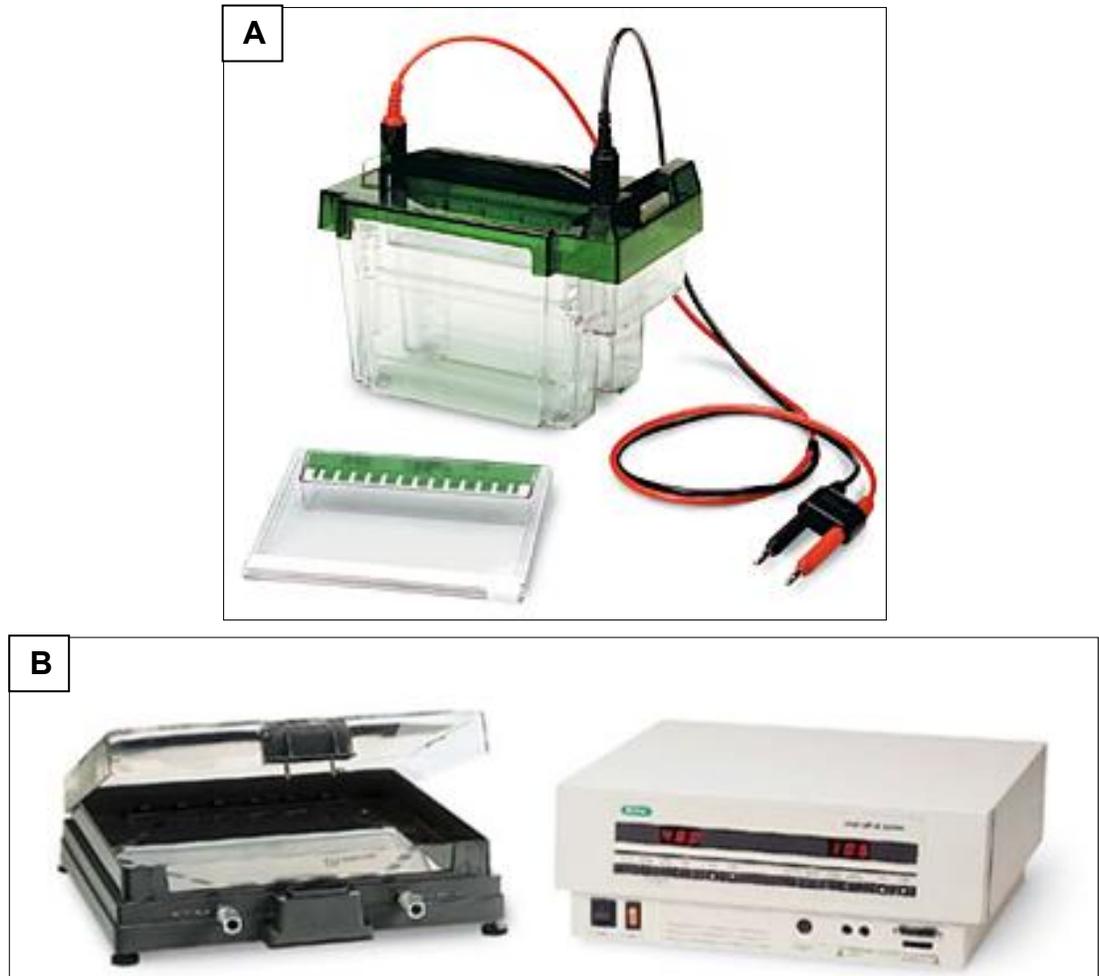


Figura 27. Sistemas y equipos de otras técnicas de tipificación molecular.

6.4.1 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- No es necesario trabajar en un ambiente estéril después de la extracción del DNA para realizar la identificación.
- Costo de los reactivos y equipo.

Desventaja:

- El personal debe estar capacitado para el manejo de los equipos.
- Se debe mandar la cepa a secuenciar, esto implica un gasto extra por parte del laboratorio.
- Actualmente se están desarrollando equipos para su aplicación en la industria alimentaria.

CAPÍTULO 7. BIOSENSORES.

Los biosensores son dispositivos que se basan en la detección de complejos biológicos o químicos formados por antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato o receptor-ligando, que son colocados muy cerca de un traductor que genera una señal eléctrica, óptica (con fibra óptica y resonancia de plasmón superficial) o de cambio de masas (piezoeléctricas y de acústica superficial). Los biosensores de cambio de masa no tienen relevancia alimentaria^{6,19,28,31,40}.

7.1 Biosensores eléctricos.

7.1.1 Fundamento.

Se basa en la detección de los cambios de conductancia en un medio, a causa del metabolismo microbiano de sustancias inertes a compuestos iónicos con carga eléctrica y subproductos ácidos (p.ej., aminoácidos, ácido láctico y ácido acético). Tal metabolismo ocasiona cambios en la impedancia eléctrica (resistencia al flujo de corriente alterna) y la conductancia del medio, estos parámetros ayudan a monitorear el crecimiento microbiano.

7.1.2 Descripción.

Es el monitoreo por impedancia del crecimiento microbiano. El tiempo de detección de impedancia (IDT) es el periodo inicial que requieren los microorganismos contenidos en un alimento para alcanzar una población mayor a 10^6 . El IDT es inversamente proporcional a la carga microbiana inicial; es decir, que un IDT mayor corresponde a menor carga microbiana. A partir del IDT y la pendiente de la curva se puede calcular la carga inicial, así como el tiempo de generación de una población microbiana¹⁹.

En general los sistemas cuentan con un par de electrodos que contiene medio de crecimiento o solución reactante. La medición puede realizarse de dos formas: directa o indirectamente.

En la técnica directa, el par de electrodos son sumergidos en el medio inoculado con la bacteria que se desea medir. Los productos metabólicos creados durante el crecimiento de los microorganismos modifican la composición del medio,

cambiando el contenido iónico, lo cual a la vez origina un cambio de la conductividad del medio de cultivo. Tales modificaciones son proporcionales a la concentración de microorganismos vivos.

En la técnica indirecta, los electrodos, en lugar de ser sumergidos en el medio de crecimiento inoculado, se introducen en una solución separada (usualmente una solución de hidróxido de potasio). Los gases producidos por el metabolismo bacteriano (principalmente el CO₂) son absorbidos por la solución de hidróxido de potasio, lo cual provoca un decremento en la conductancia de la solución alcalina.

7.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

En el mercado hay numerosos sistemas, como Bacterometer[®], Malthus AT analyzer, BacTrac[™](Figura 28 A) y μ- Trac[™] (Figura 28 B) por mencionar algunos. Los cuales se han empleado para detección y conteo de *E.coli*, *Listeria*, *Salmonella* y *Staphylococcus* en muestras de alimentos^{19,40, 82}.

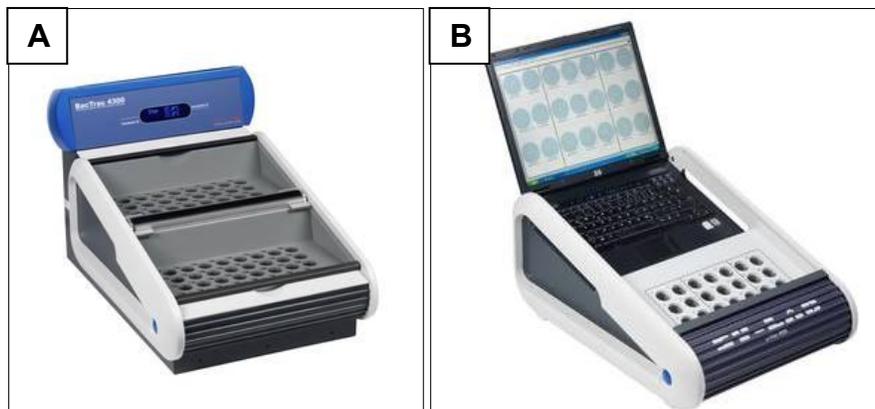


Figura 28. Biosensores eléctricos. Se ilustra el sistema BacTrac[™]4300 y μ- Trac[™]4200⁸².

7.1.4 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Bacterometer[®], es un instrumento avalado por la FDA.
- Permite detectar sólo células viables, que es lo que preocupa en la seguridad alimentaria.
- El equipo realiza la lectura de manera automática.

Desventajas:

- La mayoría de los instrumentos no están avalados por un organismo internacional.
- Carece de sensibilidad debido a que detecta 10^5 a 10^7 células por mL.
- Debe de considerarse que el equipo requiere un espacio considerable.
- El tiempo de obtención de resultados es largo, pues se requieren de 24 a 48h.

7.2 Biosensores ópticos.

Los sensores ópticos son los más populares ya que se caracterizan por su gran sensibilidad, disponibilidad de instrumentos y datos relativamente fácil de interpretar. Por esta razón a continuación se hablarán de dos tipos de sensores ópticos.

7.2.1 Biosensor de fibra óptica.

7.2.1.2 Descripción.

Es un sensor donde se utiliza un conductor de onda hecho de poliestireno o vidrio, en forma de fibra o laminilla. La técnica se basa en la propiedad de reflexión interna total cuando la luz viaja por un conductor y genera una onda en la superficie del conductor. Las moléculas fluorescentes que hay en el campo evanescente son excitadas y emiten luz que regresa a la fibra en modos de orden superior, que pueden detectarse por medio de un fluorómetro.

El sensor de fibra óptica actúa con la configuración de emparedado de los inmunoanálisis, en la que primero, un anticuerpo captura un patógeno específico y es inmovilizado sobre la superficie del conductor; luego se inyecta la muestra en el multiplicador que contiene la fibra y se deja que se una al blanco. Después de un paso de lavado, se agregan los anticuerpos de detección marcados con fluorescencia para que se fijen al antígeno, formando una especie de emparedado. A continuación se conecta la fibra a una fuente de láser o un detector (**Figura 29**). El haz de láser (635nm) viaja por el conductor y genera una onda evanescente (una onda estacionaria en un campo cercano con una intensidad que muestra un

decaimiento exponencial con distancia desde el límite en el cual la onda se produjo) que excita las moléculas de fluoróforo, localizadas en el complejo antígeno- anticuerpo. Al excitarse, los fluoróforos emiten luz, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de antígeno presente y es captada por el detector. Las moléculas fluoróforas que se utilizan con mayor frecuencia en aplicaciones de fibra óptica son Cyanine 5 y Alexa-fluor 647, cuyas ondas de excitación y emisión no se superponen, de modo que es fácil detectarlas con un fluorímetro^{12,19}.

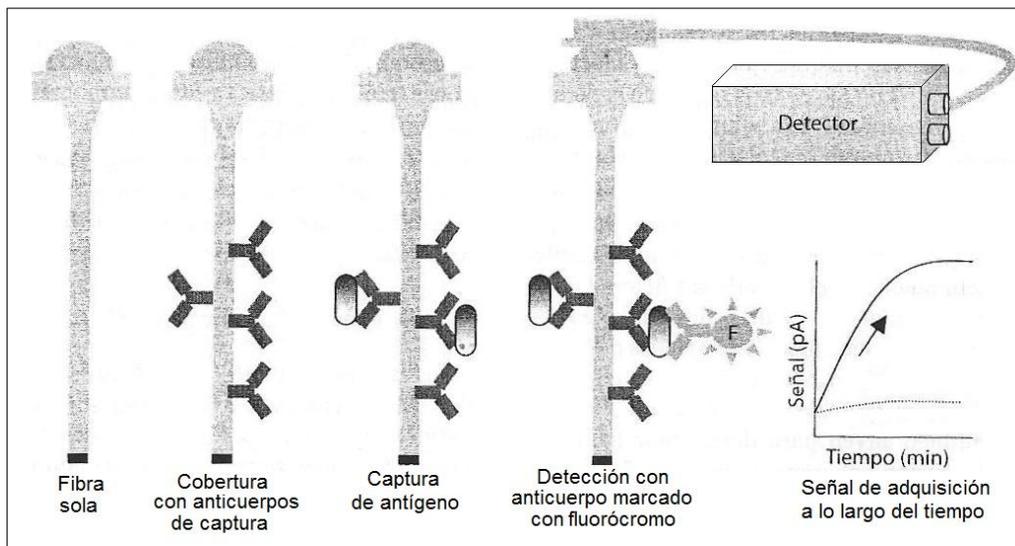


Figura 29. Funcionamiento del biosensor de fibra óptica. Tomado de: Ray¹⁹

7.2.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

En el mercado existe un dispositivo de fibra óptica llamado RAPTORTM (**Figura 30**), el cual incluye un puerto para inyección de muestras, conductos de micro flujos, diodo láser e interfase de computadora para análisis de datos. El dispositivo acepta hasta cuatro fibras, de modo que permite la detección simultánea de cuatro patógenos. En diversas muestras de alimentos permite la detección de *L. monocytogenes* en embutidos, *Salmonella* Thyphimurium en pollo y huevo, *fumonisin* y *aflatoxinas* en maíz^{31,80}.



Figura 30.Biosensor de fibra óptica marca RAPTOR™.

7.2.1.4 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- El análisis de patógenos en alimentos se lleva a cabo casi en tiempo real.
- Necesita poca cantidad de muestra.
- Tiene gran selectividad y especificidad.
- El sensor es portátil y de fácil manejo.
- Las fibras se pueden reutilizar.

Desventajas:

- RAPTOR™, no está avalado por un organismo internacional.
- Baja sensibilidad, el límite inferior de detección de células bacterianas es de 10^3 a 10^4 células/mL.
- La preparación de las fibras donde se agregan los anticuerpos es un proceso laborioso y requiere de un día de incubación.

7.2.2 Sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR).

7.2.2.1 Definición.

La resonancia de plasmones (oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de un metal) superficiales, es un fenómeno óptico que ocurre cuando una luz polarizada se dirige desde un prisma (con alto índice de refracción) hacia una superficie de oro o de plata (con menor índice de refracción) que contiene

anticuerpos o receptores. Esta superficie está situada entre el prisma y la muestra. La luz que incide en la interfase entre el metal y el prisma provoca la excitación de un plasmón superficial para un determinado ángulo de incidencia de dicha luz, llamado ángulo de resonancia.

El ángulo de resonancia depende del índice de refracción del medio colindante de la lámina metálica, por lo que las variaciones del ángulo de resonancia dan información acerca de la concentración real del analito o célula bacteriana.

La presencia de antígenos que interactúan con los anticuerpos provoca un desplazamiento en la resonancia a longitudes de onda mayores y el grado de desplazamiento es proporcional a la concentración de las moléculas fijadas (**Figura 31**). Se ha utilizado sensores de SPR para la detección de toxinas y patógenos como *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* presentes en alimentos^{6,12,31}.

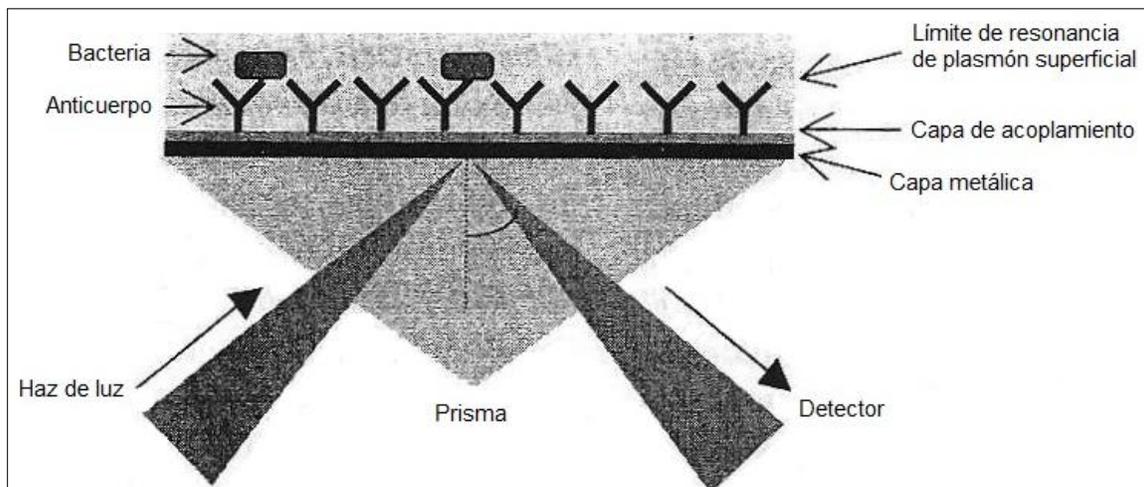


Figura 31. Detección de patógenos y toxinas a partir de SPR. Tomado de: Ray¹⁹.

7.2.2.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

En el mercado hay numerosos sistemas de SPR tales como, OpenPlex (**Figura 32 A**), SR7000DC (**Figura 32 B**), SpreetaTM, electrómetro y espectrómetro de SPR SR700DC por mencionar algunos^{6,65}.

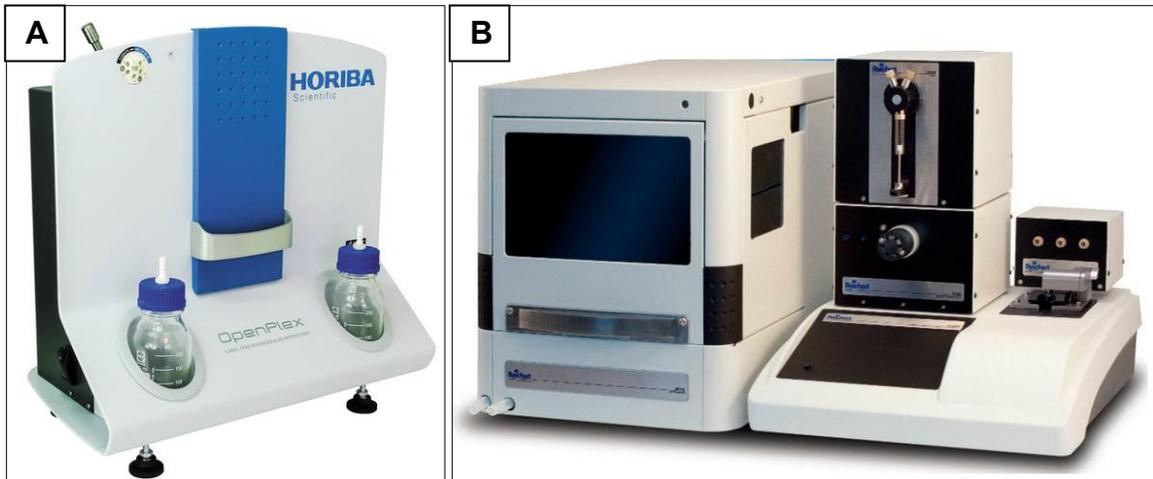


Figura 32. Sistemas basados en SPR.

7.2.2.4 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Permite la detección en tiempo casi real (menos de 30 minutos) de fenómenos de enlace entre dos moléculas.
- Comparados con los sensores de fibra óptica, el sistema de detección no utiliza marcadores (fluoróforos) y, por tanto, ahorra reactivos adicionales, pasos de análisis y tiempo.
- Tiene gran selectividad y especificidad.
- El sensor es portátil y de fácil manejo.
- Es un sistema muy sensible y permite detectar concentraciones del orden de nanogramos.

Desventaja:

- La mayoría de los instrumentos antes mencionados, no están avalados por un organismo internacional.
- Los equipos son de costo elevado.

CAPÍTULO 8. OTROS MÉTODOS RÁPIDOS.

8.1 Sistema de siembra para recuento de células viables en alimentos.

8.1.1 Fundamento

El sistema de siembra en espiral (SPLC), se basa en dispensar una muestra de líquido en un patrón en forma de espiral, el volumen de la muestra dispensada disminuye a medida que el dispensador se mueve desde el centro hasta el borde de una placa Petri giratoria que contiene medio de cultivo (que puede ser o no selectivo).

8.1.2 Descripción.

Es un sistema que permite de forma rápida obtener el recuento de células viables mediante el uso de una aguja de siembra que distribuye en forma de espiral, una muestra líquida en la superficie de una placa con agar. Después de sembrar utilizando el modo constante, espiral, o circular (**Figura 33**), la placa de Petri se incuba durante 48 ± 3 horas a 35 ± 1 °C, posteriormente se determina la carga microbiana seleccionando un área de la placa de Petri, en donde las unidades formadoras de colonias (UFC) son fácilmente contables y se multiplica este número por la dilución (si es que se realizó)^{29,85}.

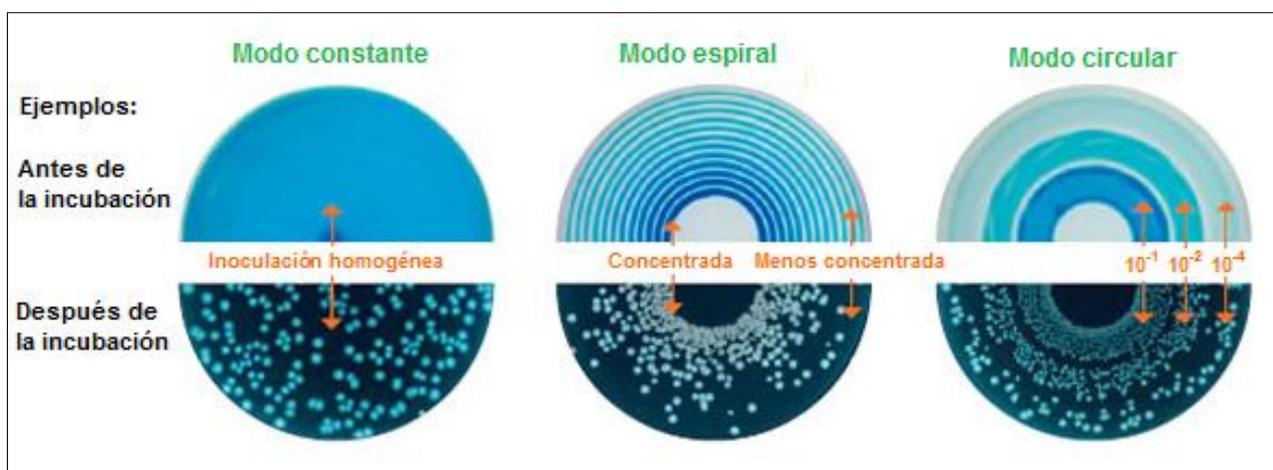


Figura 33. Tipos de siembras que opera el sistema de siembra en espiral.

8.1.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

En la actualidad se comercializan equipos tales como Autoplater[®] (Spiral Biotech, Inc.), Whitley Automatic Spiral Plater 2 (Microbiology International), Easy Spiral[®] (interscience), Eddy Jet 2 (IUL), por mencionar algunos. El fundamento de los equipos antes mencionados es el mismo, sin embargo, difieren entre sí por su diseño portátil, algún grado de automatización, sistema de trazabilidad adicional, algunos poseen un sistema de desinfección adicional y otros prescinden de este sistema porque ocupan puntas estériles desechables (**Figura 34**)^{19, 43,69,73}.

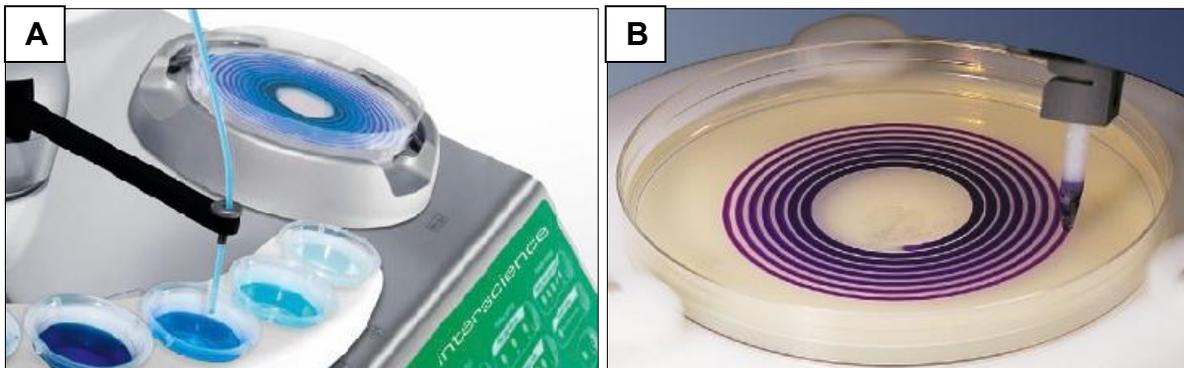


Figura 34. Sistema de siembra en espiral. El equipo Easy Spiral[®] fabricado por interscience posee un sistema de desinfección (A) y el equipo Eddy Jet 2 fabricado por IUL, ocupa puntas desechables (B).

8.1.4 Ventajas e inconvenientes.

Comparado con el método tradicional de vertido en placa, el sistema de siembra en espiral presenta las siguientes ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Sencillez en su realización, debido a que se inocula de manera automatizada.
- Ahorro de tiempo y de material de laboratorio (tubos, pipetas y solución salina isotónica para las diluciones).
- Por ser un sistema automatizado se reducen también riesgos de contaminación cruzada y posibles errores en el manejo por parte del analista.
- El método tiene alta eficiencia en leche y productos lácteos^{7,52}.
- Es opcional el uso de cuenta colonias o equipos sofisticados, debido a que puede realizarse de manera manual.

Desventajas:

- El sistema de siembra, no está avalado por un organismo internacional.
- La posible obstrucción de la manguera de siembra con partículas pertenecientes a la matriz alimentaria.
- La concentración de microorganismos que puede dispensar el sistema para un sencillo recuento, tiene un rango de 500 a 500,000 microorganismos/mL, por lo tanto, si hay sospecha de altas concentraciones microbianas se deben hacer diluciones adicionales.

8.2 Filtración por membrana hidrofóbica (HGMF).

8.2.1 Fundamento.

Se basa en la filtración de una muestra empleando vacío y un filtro de membrana que lleva impreso una rejilla de características hidrofóbicas, que actúa como barrera, impidiendo la extensión de las colonias.

8.2.2 Descripción.

La muestra del alimento, debe ser previamente homogeneizada y tratada con enzimas, con el fin de evitar la obstrucción de las partículas del alimento en la membrana. Posteriormente, se hace pasar por una unidad de prefiltrado conectado a un sistema de vacío, con el fin de eliminar partículas del alimento (la unidad de prefiltrado tiene 5 μm de tamaño de poro), posteriormente, la muestra pasa al filtro de membrana, que lleva impreso la rejilla de características hidrofóbicas, la cual actúa como barrera impidiendo la extensión de las colonias, delimitando 1 600 cuadrados.(el tamaño de poro es de 0.45 μm) y tras aplicar nuevamente vacío, la rejilla se coloca sobre una placa de agar, el que dependerá del microorganismo que se quiera buscar (**Tabla 4**). Finalizada la incubación, el analista puede considerar el cuadrado que presenta crecimiento como una única colonia y así proceder a contar el número total de positivos en los 1,600 compartimentos.

Puesto que existe una posibilidad de que más de una bacteria quede atrapada en un cuadrado en el sistema, se tiene una tabla de conversión Número Más Probable (NMP)⁷⁴.

8.2.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

En la actualidad la empresa NEOGEN[®] comercializa el sistema ISO-GRID[®] y el sistema NEO-GRID[®]. El fundamento de los sistemas es el mismo, sin embargo, difieren entre sí por su embudo de filtración.

El embudo del sistema NEO-GRID[®] es desechable y se debe de agregar la muestra previamente digerida con enzimas y filtrada, mientras que, el embudo del sistema ISO-GRID[®] es reutilizable, porque se puede esterilizar en autoclave y se debe agregar la muestra previamente digerida con enzimas ya que el sistema cuenta con una unidad de prefiltrado interno (**Figura 35**).

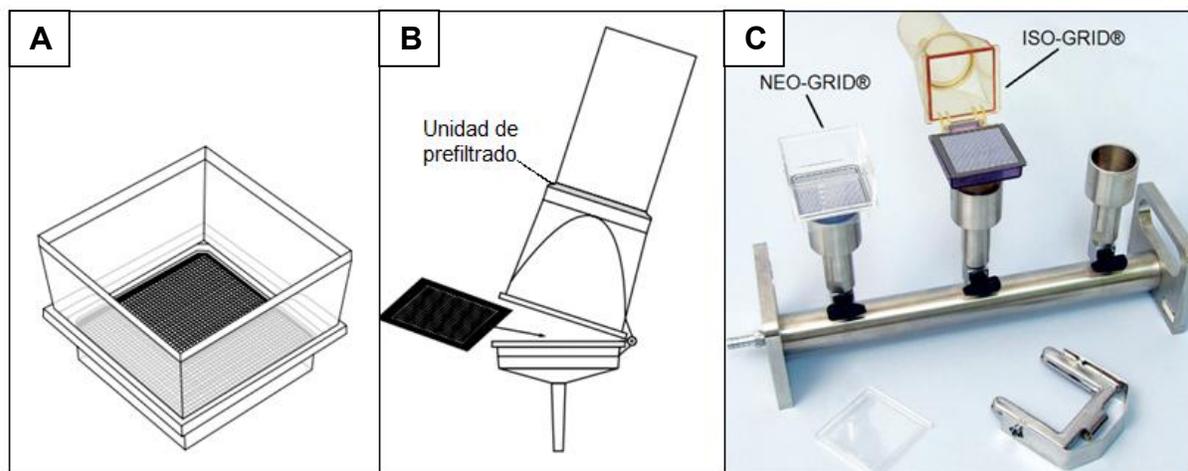


Figura 35. Sistema NEO-GRID[®] e ISO-GRID[®]. Embudo de filtración NEO-GRID[®] (A), embudo de filtración ISO-GRID[®] (B), sistema completo de vacío y embudos de filtración (C).

En la **Tabla 4**, se menciona el medio de cultivo utilizado, dependiendo del microorganismo de interés, además se hace una comparación del tiempo de incubación, utilizando el sistema HGMF comparado con el método tradicional de acuerdo al BAM.

Tabla 4. Agares utilizados en el sistema HGMF que vende el fabricante⁷⁴.

Microorganismo	Medio	Tiempo de incubación con el sistema HGMF	Tiempo de incubación con método tradicional
Mesófilos aerobios	Agar triptona de soya con Fast Green(TSAF)	24 horas	48 horas
Hongos y levaduras	Agar para levaduras y hongos (YM)	48 horas	168 horas
Coliformes totales	Agar lactosa monensina glucuronato (LMG)	26 horas	96 horas
<i>Escherichia coli</i> -glucuronidasa (+)	Después de incubar en LMG, transferir agar buffer MUG (BMA)	30 horas	144 horas
<i>Listeria monocytogenes</i>	Agar LM-137	18-24 horas	48horas
<i>Salmonella spp.</i>	EF-18	18-24 horas	88-128 horas

8.2.3 Ventajas e inconvenientes.

Comparado con el método tradicional de vertido en placa, el sistema HGMF presenta las siguientes ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- El sistema está avalado por la FDA.
- Ahorro de material de laboratorio (tubos, pipetas, cajas petri, solución salina isotónica para las diluciones, etc.) y reducción de desechos biológicos.
- Recuento preciso y objetivo de unidades formadoras de colonias ya que cada cuadrado representa aproximadamente una colonia.
- Los 1,600 cuadrados, ofrecen un amplio rango de recuento y elimina la necesidad de realizar varias diluciones.
- El embudo de filtración ISO-GRID[®] es reutilizable.
- Disminución en el tiempo de análisis para algunos microorganismos comparado con el método tradicional de acuerdo al BAM (véase **Tabla 2**).

Desventajas:

- El embudo de filtración NEO-GRID[®] es desechable, provocando mayor gasto, además, se debe de prefiltrar la muestra.

8.3 Epifluorescencia directa sobre filtro.

8.3.1 Fundamento.

Se basa en la detección de células bacterianas, mediante un microscopio de fluorescencia o cualquier equipo que mida la epifluorescencia, estas células están previamente filtradas y tratadas con un agente fluorescente. Las células bacterianas viables emiten una fluorescencia naranja a roja y las células muertas emiten una fluorescencia verde.

8.3.2 Descripción.

Es una técnica microscópica en la cual se filtra la muestra, a través de una membrana de policarbonato donde quedan retenidos los microorganismos (la muestra previamente se trata con detergentes y enzimas proteolíticas con el fin de evitar la saturación del filtro con partículas del alimento). Posteriormente, la membrana se tiñe con naranja de acridina, que es un fluorocromo nucleofílico que origina distintos patrones de fluorescencia en el ADN y el ARN, dependiendo de la fase de crecimiento celular.

Los filtros teñidos, se observan en un microscopio de fluorescencia y los recuentos de microorganismos se obtienen mediante el conteo de las partículas fluorescentes³⁵.

8.3.3 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Las preparaciones, una vez teñidas, se mantienen estables durante aproximadamente un mes permitiendo su análisis posterior.
- Actualmente, existen sistemas automatizados de filtrado, tinción y recuento automáticos, que facilitan su interpretación y disminuyen el tiempo de análisis, obteniéndose resultados en 7 minutos.
- El microscopio de fluorescencia, es un instrumento fácil de adquirir y dependiendo de la marca, se puede obtener a un bajo costo.

Desventajas:

- A pesar de su rapidez, es un método poco sensible, ya que su límite de detección oscila entre 2×10^4 y 1×10^6 células/mL.
- Es costoso el equipo que realiza el análisis de manera automatizada.
- La naranja de acridina que funciona como fluorocromo, es un compuesto carcinogénico. Debe de colectarse en un recipiente o botella, y entregarlo al operador de residuos autorizado.

8.4 MALDI-TOF MS.

8.4.1 Fundamento.

La espectrometría en masa (MS), tiempo de vuelo por una matriz asistida por desorción/ionización láser (MALDI-TOF), es una técnica de ionización suave, que permite el análisis de patrones de proteínas de una bacteria mediante espectrometría de masas.

8.4.2 Descripción.

La tecnología MALDI (matriz asistida por una desorción/ionización láser), es una técnica en la que la muestra se mezcla con un solvente que contiene moléculas orgánicas (matriz), que absorben fuertemente la radiación láser. Esta radiación, la cual absorbe la matriz, causa primero la evaporación del solvente y después fotoexcita la muestra, la cual se ioniza.

Los espectrómetros de masas de tiempo de vuelo (TOF), funcionan midiendo en secuencia cuándo y cuántos iones de distintas relaciones de masa a carga llegan a un detector, después de inyectar una sola ráfaga de iones. Éstos se aceleran rápidamente, entrando a un tubo hacia el detector. Los iones que tienen la misma carga, recibirán cada uno la misma energía cinética, recorrerá el tubo a distintas velocidades y así llegarán al detector en distintos momentos. El detector de iones mide y cuantifica la cantidad de iones que salen del tubo y llegan al detector (**Figura 36**).

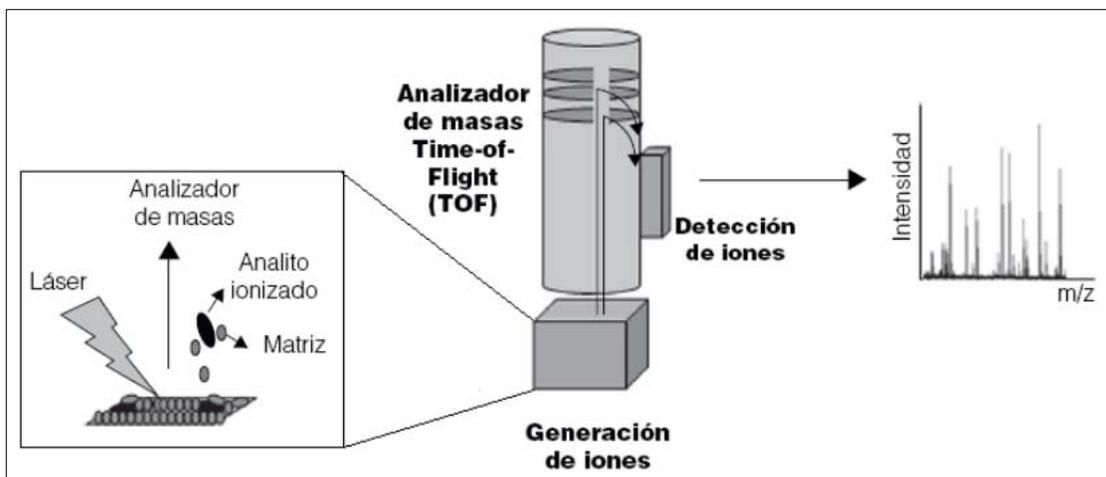


Figura 36. Diagrama del funcionamiento de un espectrómetro MALDI-TOF. Fuente: Moreno.

8.4.3 Algunas marcas presentes en el mercado.

Existen en el mercado sistemas basados en la técnica de MALDI-TOF MS, tales como microflex[®] (**Figura 37. A**) y VITEK[®] MS (**Figura 37. B**) por mencionar algunos⁵².

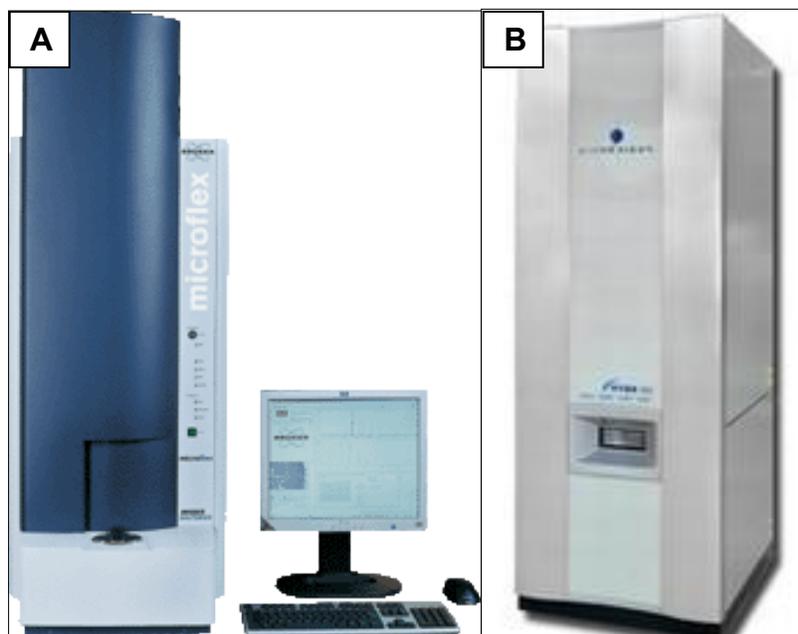


Figura 37. Sistemas basados en la técnica de MALDI-TOF MS.

8.4.4 Ventajas e inconvenientes.

Ventajas:

- Reducción de los desechos biológicos comparado a los métodos tradicionales.
- No se elaboran diversos medios de cultivo para identificación bioquímica, ahorrándose tubos, cajas petri, medio de cultivo, agua destilada, espacio de almacenamiento, etc.
- Reducción de la carga de trabajo del analista ya que la mayor parte del análisis se realiza de manera automatizada.
- Permite una clasificación más amplia de las cepas debido a la gran cantidad de espectros cargados en el software.
- El equipo ahorra la necesidad de seleccionar frecuencias de láser que coincidan para distintos analitos, ya que la matriz es la que absorbe la radiación láser.
- Se pueden detectar polimorfismo en la secuencia del gen.

Desventajas:

- Ningún instrumento está avalado por algún organismo internacional.
- En el caso de los estreptococos del grupo Viridians y *S. pneumoniae*, existen problemas para discernir entre especies, debido a la similitud genómica.
- Costo elevado del equipo.
- Se debe de aislar la cepa antes de su caracterización.

CAPÍTULO 9. MÉTODOS RÁPIDOS UTILIZADOS EN LA BUSQUEDA DE MICROORGANISMOS INDICADORES Y PRINCIPALES PATÓGENOS EN ALIMENTOS.

9.1 Microorganismos indicadores.

Son microorganismos (o grupos) que advierten oportunamente un manejo inadecuado o contaminación que incrementa el riesgo de hallar patógenos en alimentos. Los microorganismos indicadores aportan información importante sobre el deterioro de los alimentos y permiten un enfoque de prevención de riesgos, además, su detección en el laboratorio es sencilla, rápida y económica¹¹.

Los principales microorganismos indicadores en alimentos son:

1. Mesófilos aerobios
2. Hongos y levaduras
3. Coliformes (totales y fecales)

Aunque actualmente no esté vigente, en la NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PRÁCTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS se mostraban diferentes límites de microorganismos indicadores dependiendo del alimento (Véase **Tabla 5**).

Tabla 5. Límites máximos permisibles de microorganismos indicadores para diferentes alimentos.

Alimentos	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	Coliformes fecales (UFC/g)
Salsas y purés cocidos	5 000	NM	NM	50	NM
Mayonesas, salsas tipo mayonesa, aderezo	3 000	20	50	NM	NM
Ensaladas rusas, mixtas cocidas	100 000	NM	NM	<100	NM
Ensaladas verdes, crudas o de frutas	150 000	NM	NM	NM	100
Carnes de mamíferos, aves, pescados, mariscos, crustáceos, moluscos bivalvos (Cocidos)	150 000	NM	NM	<10	NM
Postres no lácteos	5 000	NM	NM	10	NM

Alimentos	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	Coliformes fecales (UFC/g)
Postres lácteos como son: pastel de crema, dulce de leche, gelatina de leche, flan	100 000	NM	NM	<100	NM
Helados	200 000	NM	NM	100	NM
Yogurth	NM	10	10	10	NM
Aguas preparadas	150 000	NM	NM	100	Negativo

*NM: No se menciona en la Norma.

9.1.1 Mesófilos aerobios.

El recuento de células viables totales en alimentos, aporta información importante sobre la posible presencia de microorganismos patógenos, la baja vida de anaquel de los alimentos, las condiciones higiénicas con las que fue manipulado un alimento. Sin embargo, este método no se debe usar en ciertos productos donde interviene el proceso de fermentación, tales como ciertos quesos y embutidos, yogurt o de “maduración” natural, ya que por la naturaleza del alimento, las cifras de bacterias son muy elevadas^{15,16,28}.

Los mesófilos aerobios constituyen un grupo de microorganismos capaces de crecer en un rango de temperatura de 30-37°C.

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, se hace uso de la metodología descrita en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA⁵⁹, donde la técnica utilizada es la cuenta en placa. El procedimiento es el siguiente:

Se coloca en cajas Petri una cierta cantidad de la muestra líquida y repetir el procedimiento haciendo diluciones decimales. Se agrega agar tripton-extracto de levadura (agar para cuenta estándar) en las cajas de Petri, y se mezcla hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio. Se deja solidificar y se procede a Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 h. En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

A continuación, se presentan algunos métodos rápidos utilizados para el recuento de mesófilos aerobios, así como, las marcas presentes en el mercado, el tiempo de análisis de acuerdo al método empleado y según la norma (**Tabla 6**).

Tabla 6. Métodos rápidos utilizados para mesófilos aerobios.

Método rápido	Marcas	Compuesto activo	Tiempo de análisis	Tiempo de análisis indicado en la NOM 092
Placas delgadas con película plástica	RIDA [®] COUNT y Petrifilm [™]	Nutrientes del Agar Cuenta Estándar e indicador TTC	24 horas	48 horas
Medios cromogénicos y fluorogénicos.	Placa SlimPlate	Indicador red/ox resazurina	24 horas	
Filtración por membrana hidrofóbica (HGMF)	NEOGEN [®] ISO-GRID [®]	Agar TSA	24 horas	
SPLC	Easy Spiral [®] Eddy Jet 2	NE	48 horas	

NE= No especificado

Se observa en la **Tabla 6**, el tiempo de análisis de mesófilos aerobios en la mayoría los métodos rápidos descritos en el presente trabajo, es menor por un día comparado con la metodología en la norma.

9.1.2 Mohos y levaduras.

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la biota de un alimento, o como agentes contaminantes en los equipos sanitizados inadecuadamente. Además los mohos y las levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas (p.ej. la irradiación), permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Las levaduras son aerobias facultativas y los mohos son aerobios obligados, el rango de pH y de temperatura para su crecimiento es bastante amplio, debido a

que va de 2-9 y de 10-35°C. Los requerimientos de humedad de los hongos son relativamente bajos, la mayoría de las especies pueden crecer a una actividad acuosa (a_w) de 0.85 o menor, aunque las levaduras generalmente requieren una mayor actividad de agua⁸⁵.

Cuando se requiere determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano, se hace uso de la metodología descrita NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS⁶⁰. El procedimiento es el siguiente:

Se coloca en cajas Petri cierta cantidad de muestra líquida directa y se repite el procedimiento haciendo diluciones decimales. Se vierte agar papa dextrosa acidificado y se mezcla cuidadosamente. Se invierten las cajas previamente solidificadas y colocan en la incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, se cuentan las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación.

Géneros importantes de mohos y levaduras en alimentos.

Algunos de los géneros más comunes de mohos y levaduras que descomponen a los alimentos se mencionan en la **Tabla 7**, estos provocan el deterioro fisicoquímico de los alimentos, debido al uso de carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además, algunas especies pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes que afectan seriamente la salud del ser humano³.

Tabla 7. Géneros importantes de mohos y levaduras en alimentos.

Género	Alimentos que descomponen	¿Produce micotoxinas?
<i>Aspergillus</i>	Moho que está implicado en la descomposición de alimentos, como: cereales, granos, mermeladas, jamón curado, nueces, frutas y vegetales (P. ej. <i>Aspergillus glaucus</i>).	Algunas especies producen aflatoxinas (p.ej. <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i>)
<i>Alternaria</i>	Moho que pudre tomates y da un sabor rancio a los productos lácteos (P. ej. <i>Alternaria solani</i>).	Algunas especies o cepas producen micotoxinas (p.ej. <i>Alternaria alternata</i>).
<i>Fusarium</i>	Moho que se relaciona con la putrefacción de las frutas cítricas, las papas y los granos (P. ej. <i>Fusarium solani</i>).	Produce Fumonisina (p.ej. <i>Fusarium verticillioides</i>) y tricotecenos (p.ej. <i>F. graminearum</i>).
<i>Geotrichum</i>	Moho que con frecuencia crecen en productos lácteos (P. ej. <i>Geotrichum candidum</i>).	No
<i>Mucor</i>	Moho que produce descomposición de los vegetales (P. ej. <i>Mucor rouxii</i>).	No
<i>Penicillium</i>	Moho que puede producir descomposición de granos, panes y carne (P. ej. <i>penicillium digitatum</i>).	Algunas especies producen citrinina y ocratoxinas (p.ej. <i>Penicillium citrinum</i>)
<i>Rhizopus</i>	Moho que produce descomposición de muchas frutas y vegetales (P. ej. <i>Rhizopus stolonifer</i>).	No
<i>Pichia</i>	Levadura que forma película en la cerveza, el vino y la salmuera para producir descomposición (P. ej. <i>Pichia membranaefaciens</i>).	No
<i>Rhodotorula.</i>	Levadura que puede producir decoloración de alimentos como la carne, el pescado y la col fermentada (P. ej. <i>Rhodotorula glutinis</i>).	No
<i>Torulopsis</i>	Levadura que produce descomposición de la leche porque pueden fermentar la lactosa, también puede producir putrefacción en concentrados de frutas y alimentos ácidos (P. ej. <i>Torulopsis versatilis</i>).	No
<i>Candida</i>	Levadura que descompone los alimentos con alto contenido de sal, azúcar y acidez, además forma una película en la superficie en líquidos. Algunas vuelven rancia a la mantequilla y a los productos lácteos (P. ej. <i>Candida lipolyticum</i>).	No

A continuación se presentan los métodos rápidos utilizados para el recuento de mohos y levaduras, algunas marcas presentes en el mercado, tiempo de análisis de acuerdo al método y según la norma (**Tabla 8**).

Tabla 8. Métodos rápidos utilizados para hongos y levaduras.

Método rápido	Categoría	Marcas	Compuesto activo	Tiempo de análisis	Tiempo de análisis indicado en la NOM 111
Dependientes del medio	Placas delgadas con película plástica	RIDA [®] COUNT y Petrifilm [™]	Nutrientes de Saboraud, antibióticos y 5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP)	3-5 días	4-5 días
Medios cromogénicos y fluorogénicos.		Placa SlimPlate	NE	2.5-3 días	
Otros	Filtración por membrana hidrofóbica (HGMF)	NEOGEN [®] ISO-GRID [®]	Agar YM	2 días	

*NE: No especificado

Se observa en la **Tabla 7** que tiempo de análisis de hongos y levaduras en la mayoría los métodos rápidos descritos en el presente trabajo, es menor al menos por un día comparado con la metodología en la norma.

9.1.3 Coliformes.

Los coliformes pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y se caracterizan por su capacidad de fermentar la lactosa. Los coliformes se pueden encontrar en el intestino del hombre y de los animales, en el suelo, plantas, cáscara de huevo, etc¹¹.

Cuando se requiere determinar el NMP de coliformes se hace uso de la metodología descrita en la NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE⁶¹. El procedimiento es el siguiente:

El análisis se divide en dos etapas: la etapa presuntiva y la etapa confirmatoria.

Para la prueba presuntiva, se emplean series de 3 tubos de caldo lactosado o caldo lauril sulfato triptosa por dilución, los que se inoculan con la muestra, se homogenizan y se incuban a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas, transcurrido el tiempo se observan si hay formación de gas en los tubos, en caso de no existir, se continua la incubación por 24 ± 2 horas más. Esta etapa se emplea para la recuperación y enriquecimiento de los microorganismos presentes en la muestra.

Prueba confirmativa, de cada tubo que muestre desarrollo y formación de gas, inocular un número igual de tubos con medio de confirmación (Caldo bilis verde brillante). Incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas, observar nuevamente la producción de gas, incubar por 48 ± 2 horas en caso negativo. Para indicar el resultado, considerar la serie de tubos de la prueba confirmativa que dé formación de gas después del periodo de incubación requerido y buscar el valor en la tabla de número más probable.

Los coliformes se clasifican en: coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*.

Coliformes totales.

Comprende 4 géneros de la familia Enterobacteriaceae, estos son: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia*. Los que se caracterizan por fermentar la lactosa presente en el medio. Estos organismos se usan como índice de higiene.

Coliformes fecales.

Los coliformes fecales son un subgrupo de los totales y comprenden un grupo de microorganismos seleccionados por la temperatura de incubación (44.5 a 45°C) de los inóculos procedentes de los tubos de la prueba confirmatoria. Tales cultivos de enriquecimiento contienen por lo general un alto porcentaje de *E. coli* tipos I y II y son indicativos de una probable contaminación de origen fecal del alimento.

Escherichia coli.

Los integrantes del género *Escherichia* son fermentadores de lactosa con mayor o menor rapidez y lo hacen con producción de ácido y gas. Se trata de bacilos cortos, generalmente móviles mediante flagelos peritricos, no esporulados, Gram negativos y anaerobios facultativos.

Cifras sustanciales de *E. coli* en un alimento, sugieren una falta general de limpieza en el manejo del mismo y un almacenamiento inadecuado^{18,19,34}.

Para la identificación de *E.coli* se toma una asada de cada tubo positivo de la prueba confirmativa y se siembra en agar eosina azul de metileno (EMB) para su aislamiento y se incuban las placas a 35°C ± 2°C de 18-24 h, se seleccionan las colonias típicas de *E.coli*, se siembra en agar cuenta estándar (Incubar a 35°C +/-2°C por 18-24 h) y posteriormente se realiza la identificación bioquímica mediante pruebas IMViC.

Se conocen varios tipos enterovirulentos de *E. coli* implicados en brotes de enfermedad de origen alimentario. Se agrupan en cuatro importantes categorías en base a su virulencia, diferente interacción con la mucosa intestinal, variedad en síndromes clínicos y diferencias en la epidemiología. Estos tipos son:

1. *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC).
2. *Escherichia coli* enteroinvasivo (EIEC).
3. *Escherichia coli* enterotoxigénico (ETEC).
4. *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC).

A continuación, se presentan los métodos rápidos utilizados para el recuento de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*, algunas marcas presentes en el mercado, tiempo de análisis de acuerdo al método y según la norma (**Tabla 9**).

Tabla 9. Métodos rápidos utilizados para el recuento de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*.

Método rápido	Categoría	Marcas	Compuesto activo	Tiempo de análisis	Tiempo de análisis indicado en la NOM 112
Dependientes del medio	Placas delgadas con película plástica	RIDA [®] COUNT y 3M [™] Petrifilm [™]	BRV	1-2 días	3-4 días coliformes totales y fecales 5-7 días <i>E.coli</i>
Métodos cromogénicos y fluorogénicos	X	Placa SlimPlate [®]	clorofenol rojo β-D-galactopiranosido (CPRG) y MUG	1 día	
	X	ColiComplete [®]	MUG	1-2 días	
Métodos moleculares	Métodos de hibridación	GENE-TRAK [®]	X	5 días	
Biosensores	Biosensores eléctricos	Bacterometer [®] , BactTrac [™] y μ-Trac microorganism	X	5 días	
Otros	Filtración por membrana hidrofóbica (HGMF)	NEOGEN [®] ISO-GRID [®]	Agar LMG y agar buffer MUG	1.5 días	
	MALDI-TOF	microflex [®] , VITEK [®]	X	Aslamiento +10-15 min	

*X: No especificado

Se observa en la **Tabla 8** que tiempo de análisis coliformes totales, fecales y *E.coli*, varía en la mayoría los métodos rápidos descritos en el presente trabajo, sin embargo se observa que el tiempo de análisis no sobrepasa de los dos días.

9.2 Principales patógenos en alimentos que se buscan en norma.

9.2.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un bacilo corto, Gram-positivo, no esporulado, móvil, aerobio, capaz de crecer en condiciones de microaerofilia, catalasa positivo y oxidasa negativo. En agar sangre da origen a colonias puntiformes, circulares, lisas y translúcidas de color azul grisáceo con una zona discreta de β -hemólisis. Es una bacteria que se encuentra de forma ubicua en la naturaleza y es el agente etiológico de la listeriosis. La mayoría de la listeriosis humana es transmitida por los alimentos, afecta de cuatro a ocho personas por millón al año, esto reportado en países desarrollados. La enfermedad puede ser grave, la tasa de mortalidad varía de 20 a 30% y aumenta a 50% en recién nacidos.

Las manifestaciones de la listeriosis incluyen septicemia, meningitis, encefalitis e infecciones intrauterinas o cervicales en las mujeres embarazadas, que pueden resultar en aborto espontáneo o muerte fetal.

L. monocytogenes se encuentra en alimentos tales como: leche cruda, quesos blandos y madurados, helado, verduras crudas, aves y carnes crudas, pescados crudos y ahumados^{54,67,85}.

La metodología descrita en la **NORMA Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes***⁶², se basa en el aislamiento y la diferenciación de especies de *Listeria spp.*, principalmente por la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica de los miembros de este género.

El procedimiento que describe la norma es el siguiente:

1.- Enriquecimiento: Después de la toma de muestra se inocula en un medio de enriquecimiento (EB), y se incuba por 48 h a 30°C. En el caso de muestras en donde se sospecha que tienen células de *Listeria spp* dañadas, se recomienda la incubación en un caldo de enriquecimiento que contenga piruvato de sodio a 30°C por 6 h, posteriormente se continúa la incubación por 48 h a 30°C.

2.- Aislamiento: Resembrar en los medios cloruro de litio feniletanol -moxolactam (LMP) y medio base Oxford OXA. Incubar las placas del medio LMP a 30°C por 24 a 48 h y las de medio OXA a 35°C por el mismo periodo. Seleccionar cinco o más colonias típicas del medio de OXA o LMP y pasar a placas de agar soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (ASTEL) e Incubar a 35°C por 24 h y se utiliza como inóculo para realizar las pruebas de identificación.

3.- Identificación: Aunque la mayoría de las pruebas de identificación son para *Listeria spp*, la norma menciona algunas pruebas que ayudan en la identificación de *Listeria monocytogenes*.

Se hace una prueba de hemólisis donde se incuba por 48 h a 35°C. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura. Confirmar las reacciones dudosas con la prueba de CAMP.

En la prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP), se emplean las cepas de colección *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi*. En una placa de agar sangre de carnero se siembra una estría de la cepa de *S. aureus* y, paralelamente una de *R. equi*, separadas lo suficiente para que entre éstas se puedan estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse. Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C se observa el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica más intensa. La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus*, y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes no son hemolíticas en esta prueba.

El tiempo de análisis utilizando la metodología que describe la norma es de 6 a 7 días.

A continuación se presentan los métodos rápidos utilizados para la detección e identificación de *Listeria monocytogenes*, algunas marcas presentes en el mercado, tiempo de análisis de acuerdo al método y según la norma (**Tabla 10**).

Tabla 10. Métodos rápidos utilizados para *Listeria monocytogenes*.

Método rápido	Categoría	Marcas	Tiempo de análisis	Tiempo de análisis indicado en la NOM 143
Medios cromogénicos y fluorogénicos.	Medios especiales	agar BCM [®] .	E+24 a 48 h	6-7 días
Sistemas miniaturizados Y sistemas automatizados	Identificación bioquímica	API [®] , sistema Crystal ID [®] , Micro ID [®] , Micro Scan [®] , y sistema Vitek [®]	E+A+(Tabla2)	
Métodos inmunológicos	Separación inmunomagnética	Dynabeads [®] , Lister Test [®]	E+24 h	
	Aglutinación en látex (LA) y aglutinación pasiva inversa en látex (RLPA)	RIM [™] , Prolex [™] , Listeria Latex	E+10 min	
	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	Assurance [®] EIA, TECRA [™] , Transia [®] card, Rapid Check, VIP [®] GOLD, Clearview [™] , Listeria-Tek	E+10 min	
	Análisis de inmunofluorescencia	VIDAS [®]	E+<24 h	
Métodos moleculares	Métodos de hibridación	GENE-TRAK [®] , AccuProbe [®]	E+A+35 min	
	Reacción de la PCR	BAX [®] , Probelia [™]	E+A+3 h+ secuenciar	
Biosensores	Eléctricos	Bacterometer [®] , Malthus AT, Bac Trac [™] , µ-Trac [™]	E+A+24-48 h	
	Fibra óptica	RAPTOR [™]	E+A+Tiempo real	
	Sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR)	BIACORES, Spreeta [™] , espectroscopio SPR, Rejchert SR7000, IAsys	E+A+Tiempo real	
Otros	Filtración por membrana hidrofóbica (HGMF)	NEOGEN [®] , ISO-GRID [®]	18-24 h	
	MALDI-TOF	microflex [®] , VITEK [®]	E+A+10-15 min	

Acotaciones: E: Enriquecimiento (48 h), A: Aislamiento (24-48 h), ver procedimiento.

9.2.3 *Salmonella* spp.

Es un microorganismo patógeno perteneciente al grupo de Enterobacterias. Bacilo Gram-negativo, aerobio, no esporulado que casi nunca fermenta lactosa o sacarosa, en cambio fermenta glucosa y manosa (no producen gas).

La salmonelosis es una infección de importancia en salud pública debido al impacto socioeconómico que ocasiona tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados. Es una enfermedad transmitida por alimentos tales como aves crudas, los huevos, la carne vacuna y, algunas veces, en las frutas y vegetales sin lavar. Esta enfermedad causa la mayor parte de los brotes que afectan a centenares de personas y, aunque puede ser causada por cualquiera de los casi 2 500 serotipos que existen hasta hoy, los que se aíslan con mayor frecuencia son *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium.

Desde la década de los ochenta, la incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en el mundo industrializado y ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países. Este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo en la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en la práctica del manejo de los alimentos, así como el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos. Estos cambios han tenido como consecuencia nuevos problemas en la higiene de los alimentos al originar una fácil propagación de *Salmonella*^{30,85}.

Aunque la **NORMA Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos**⁶³, cuenta con diferentes protocolos dependiendo del alimento para el aislamiento de *Salmonella* en alimentos, se describe un esquema general que consta de 5 pasos básicos:

1.- Preenriquecimiento: Después de la toma de muestra se adiciona medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro). Se transfiere asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril

de boca ancha con tapón de rosca y se deja reposar por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se ajusta el pH, se mezcla y se incuba 24 h a 35°C.

2.-Enriquecimiento selectivo: Se transfiere una cierta cantidad de muestra del medio de preenriquecimiento en un tubo que contenga caldo tetracionato y otro con caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetracionato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport. Se Incuba de 18 a 24 h a 35°C o para alimentos fuertemente contaminados a 42°C.

3.- Selección en medios sólidos: Del caldo selenito cistina y tetracionato, estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y una tercera caja con cualquiera de los medios selectivos adicionales (agar entérico Hektoen, agar Sulfito de Bismuto o Agar para *Salmonella* y *Shigella* (SS). Incubar las placas 24 h a 35°C, si no se observan colonias típicas, incubar otras 24 h a 35°C.

4.- Identificación bioquímica: Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo, que se encuentren bien aisladas e inocular en dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA) e incubar por 24 h a 35°C. Se continúa la identificación bioquímica partir de los cultivos recuperados de TSI y se realiza la prueba de ureasa que dependiendo del medio puede ser convencional (24 h a 35°C) o rápida (2 h a 37°C en baño de agua).

Cuando las pruebas bioquímicas iniciales, dan resultados atípicos o no concluyentes, se realizan las pruebas complementarias en medio SIM, agar citrato de Simmons, caldo manitol y caldo Rojo de metilo y Voges-Proskauer (RM-VP).

5.- Serotipificación: A partir de los cultivos recuperados de TSI se hacen ensayos de antígenos somáticos o flagelares (que dependiendo del ensayo puede tardar hasta 72 h).

El tiempo de análisis utilizando la metodología que describe la norma es de 7 a 13 días.

A continuación se presentan los métodos rápidos utilizados para la detección e identificación de *Salmonella*, algunas marcas presentes en el mercado, tiempo de análisis de acuerdo al método y según la norma (**Tabla 11**).

Tabla 11. Métodos rápidos utilizados para *Salmonella*

Método rápido	Categoría	Marcas	Tiempo de análisis	Tiempo de análisis indicado en la NOM 114
Medios cromogénicos y fluorogénicos.	Medios especiales	agar RAMBACH, el agar XLT 4, el agar MSRV	P+ES+24-48 h	7-13 días
Sistemas miniaturizados Y sistemas automatizados	Identificación bioquímica	API [®] , sistema Crystal ID [®] , Micro ID [®] , Micro Scan [®] , y sistema Vitek [®]	P+ES+SMS+ (Tabla 2)	
Métodos inmunológicos	Separación inmunomagnética	Dynabeads [®] , Screen	P+30 min	
	Aglutinación en látex (LA) y aglutinación pasiva inversa en látex (RLPA)	RIM [™] , Prolex [™] , Rapid Test, Serobact [™] , Bactigen, Spectate [®] ,	P+ES+10 min	
	Inmunodifusión	1-2 Test	P+ES+38 h	
	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	Assurance [®] EIA, TECRA [™] , Transia [®] card, Rapid Check, VIP [®] GOLD, Salmonella-Tek,	P+ES+10 min	
	Análisis de inmunofluorescencia	VIDAS [®]	P+ES+ <24 h	
Métodos moleculares	Métodos de hibridación	GENE-TRAK [®] AccuProbe [®]	P+ES+SMS+ 35min	
	Reacción de la PCR	BAX [®] , Probelia [™]	P+ES+SMS+3 h+ secuenciar	
Biosensores	Eléctricos	Bacterometer [®] , Malthus AT, Bac Trac [™] , µ-Trac [™]	P+ES+24-48 h	
	Fibra óptica	RAPTOR [™]	P+ES+Tiempo real	
	Sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR)	BIACORES, Spreeta [™] , espectroscopio SPR, Rejchert SR7000, IASys	P+ES+Tiempo real	

Método rápido	Categoría	Marcas	Tiempo de análisis	Tiempo de análisis indicado en la NOM 114
Otros	Filtración por membrana hidrofóbica (HGMF)	NEOGEN [®] , ISO-GRID [®]	18-24 h	7-13 días
	MALDI-TOF	microflex [®] , VITEK [®]	P+ES+SMS+ 10-15 min	

Acotaciones: P: Preenriquecimiento (24 h), ES: Enriquecimiento selectivo (18-24 h), SMS: Selección de medios sólidos (24-48 h)

9.2.4. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva en forma de cocos agrupados en pares o racimos irregulares que es capaz de dar positiva la prueba de coagulasa y termonucleasa.

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una enterotoxina termoresistente que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias.

Entre las razones para determinar *Staphylococcus aureus* en alimentos están:

- Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.
- Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico.
- Demostrar la contaminación postproceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.
- Los alimentos sujetos a contaminación postproceso con tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas. Este tipo de alimentos se vuelven más peligrosos, si además son sujetos a un inadecuado manejo o son mantenidos a temperaturas de conservación inapropiadas.

Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica^{1,85}.

La metodología descrita en la **NORMA Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos**⁶⁴, determina la cuenta de *Staphylococcus aureus* presente en alimentos nacionales o de importación.

El procedimiento que describe la norma es el siguiente:

1.- Aislamiento: Se deposita una cierta cantidad de la muestra diluida sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker distribuyendo el inóculo con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, se invierten las placas y se incuban de 45 a 48h a 35°C.

2.- Enriquecimiento: Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus* y sembrar en tubos con caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) e incubar a 35°C durante 24 h.

3.- Identificación: Se realizan la prueba de coagulasa donde se agrega una cierta cantidad del cultivo anterior en plasma de conejo y se comprueba la coagulabilidad de 6 a 24 horas en intervalos de una hora y la prueba termonucleasa donde se calienta el cultivo en caldo (BHI) en baño de agua hirviendo, se agrega una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio e incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h.

El tiempo de análisis utilizando la metodología que describe la norma es de 3.5 a 4 días.

A continuación se presentan los métodos rápidos utilizados para la detección e identificación de *Staphylococcus aureus*, algunas marcas presentes en el mercado, tiempo de análisis de acuerdo al método y según la norma (**Tabla 12**).

Tabla 12. Métodos rápidos utilizados para *Staphylococcus aureus*.

Método rápido	Categoría	Marcas	Tiempo de análisis	Tiempo de análisis indicado en la NOM 115
Dependientes del medio	Placas delgadas con película plástica	RIDA [®] COUNT, 3M [™] Petrifilm [™]	24 h	3.5-4días
Sistemas miniaturizados Y sistemas automatizados	Identificación bioquímica	API [®] , sistema Crystal ID [®] , Micro ID [®] , Micro Scan [®] , y sistema Vitek [®]	A+E+(Tabla2)	
Métodos inmunológicos	Aglutinación en látex (LA) y aglutinación pasiva inversa en látex (RLPA)	RIM [™] , Prolex [™] , AureusTest [™] , StaphTEX [™] , Staph Latex	A+E+10 min	
	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	Assurance [®] EIA, TECRA [™] , Transia [®] card, Rapid Check, VIP [®] GOLD, Clearview [™] , Listeria-Tek	A+E+10 min	
Métodos moleculares	Métodos de hibridación	GENE-TRAK [®] , AccuProbe [®]	A+E+35 min	
	Reacción de la PCR	BAX [®] , Probelia [™]	A+E+3 h+ secuenciar	
	Eléctricos	Bacterometer [®] , Malthus AT, Bac Trac [™] , µ-Trac [™]	A+E+24-48 h	
Otros	MALDI-TOF	microflex [®] , VITEK [®]	A+E+10-15 min	

Acotaciones: A: Aislamiento (45-48 h), E: Enriquecimiento (24 h), ver procedimiento.

9.3 Patógeno *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC).

Escherichia coli enterohemorrágico (EHEC), conocido también como *E. coli* O157:H7, produce tres síndromes característicos:

1. Colitis hemorrágica (CH).
2. Síndrome urémico hemolítico (SUH).
3. Púrpura trombótica trombocitopénica (PTT).

Está considerado como el patógeno más importante dentro de los tipos de *E.coli* enterovirulentos de origen alimentario debido a que su dosis infectiva es baja (desde 1 hasta 100 UFC).

E.coli O157:H7 es de origen bovino y se difunde a través de la leche, huevos y alimentos de cómo carne picada de bóvido, cordero y cerdo. Aunque el reservorio principal de *E.coli* O157:H7 es el ganado bovino, se ha encontrado en otros animales como en pollo, cerdo y cordero. En estudios realizados sobre carnes de matadero, el microorganismo se ha encontrado en carne picada de bovino en una tasa superior al 3-5%; carnes de cerdo y aves de corral en un 1-2% y en 2% de carne de cordero, de todas las muestras analizadas. También se ha aislado en heces de bóvidos jóvenes y de otras especies de animales. De todo ello se deduce que algunos alimentos crudos de origen animal pueden estar contaminados con *E.coli* O157:H7 por contacto fecal durante las operaciones de sacrificio y preparación en el matadero o del ordeño en el establo^{6,18}.

A continuación se presentan los métodos rápidos utilizados para la detección e identificación de *E.coli* O157:H7, algunas marcas presentes en el mercado y el tiempo de análisis de acuerdo al método (**Tabla 13**).

Tabla 13. Métodos rápidos utilizados para *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC).

Método rápido	Categoría	Marcas	Tiempo de análisis
Medios cromogénicos y fluorogénicos.	Medios especializados	Agar Rainbow, BCM [®] O157:H7, Agar Fluorocult [®] E. coli O157:H7	24 h
Métodos inmunológicos	Separación inmunomagnética	Dynabeads [®]	ES+6-18 h
	Aglutinación en látex (LA) y aglutinación pasiva inversa en látex (RLPA)	RIM [™] , Prolex [™] , Ecolex [™] O157, Wellcolex [®]	10 min
	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).	Assurance [®] EIA, TECRA [™] , Transia [®] card, Rapid Check, VIP [®] GOLD, Clearview [™] , EHEC-Tek, Premier [®] , Eia FOSS	10 min
	Análisis de inmunofluorescencia	VIDAS [®]	<24 h
Métodos moleculares	Reacción de la PCR	BAX [®] , Probelia [™]	3 h+ secuenciar
Biosensores	Fibra óptica	RAPTOR	Tiempo real
	Sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR)	BIACORES, Spreeta [™] , espectroscopio SPR, Rejchert SR7000, IAsys	Tiempo real

Acotaciones: ES: Enriquecimiento selectivo (6-18 h),

CONCLUSIONES

Tradicionalmente, los métodos para detectar patógenos transmitidos por los alimentos se han basado principalmente en los medios de cultivo para seleccionar y propagar células viables presentes en los alimentos. Aunque son eficaces, estos ensayos son de trabajo intensivo y requiere mucho tiempo, comprendiendo a menudo varios días para completarse.

Los avances en biotecnología han introducido nuevas técnicas de análisis de alimentos que son más rápidos y más sensibles que los métodos tradicionales. Estos ensayos, colectivamente conocidos como métodos rápidos, comprenden un grupo grande y diverso de pruebas.

La mayoría de estas pruebas tienen un mismo objetivo, acelerar el análisis, por lo que son muy adecuadas para su uso en el análisis preliminar de un gran número de muestras de alimentos para la presencia de un patógeno específico.

Sin embargo, dado que estos ensayos siguen siendo susceptibles a la interferencia de la biota bacteriana normal y por la complejidad de matrices de alimentos, es esencial que sean evaluados cuidadosamente, preferentemente mediante estudios en colaboración comparativos u oficiales, antes de su uso en el análisis de rutina.

Los métodos rápidos suelen ser más sensible que las pruebas microbiológicas convencionales, pero a medida que los ensayos son cada vez más sensibles, pueden presentar retos interesantes para la industria alimentaria y los organismos reguladores.

El recuento de mesófilos aerobios, hongos y levaduras es al menos un día más rápido utilizando métodos rápidos comparado con la metodología indicada en la Norma Oficial Mexicana. Para los coliformes totales, fecales y E.coli, el análisis puede obtenerse en menos de dos días si se utilizan los métodos rápidos.

En general, dependiendo de la norma del patógeno a identificar, se debe preenriquecer, enriquecer y aislar la muestra del alimento antes de utilizar algún

método rápido, estos pasos no se pueden omitir pero se pueden sustituir por la separación inmunomagnética, aunque debe de haber un preenriquecimiento en la muestra del alimento.

La elección del método rápido adecuado dependerá de los siguientes puntos:

- Si el método rápido está reconocido a nivel internacional.
- El microorganismo que se requiera identificar.
- La complejidad de la matriz alimentaria.
- Alcance de identificación (si requerimos algún serotipo).
- Espacio del laboratorio y en la incubadora.
- Cantidad de muestras a analizar.
- Cantidad del personal con el que se cuenta en el laboratorio y si están capacitados o se pueden capacitar.
- Presupuesto.

En el futuro se deberán realizar esfuerzos para mejorar la aplicabilidad de los sensores más promisorios y aumentar su eficiencia en la detección de patógenos transportados por alimentos. Es posible que falten pocos años para que estos sistemas sean utilizados de manera sistemática para la seguridad alimentaria o en aplicaciones de bioseguridad de alimentos^{6,19,28}.

ANEXOS

A. FABRICANTE O PROVEDOR DE CADA METODO RÁPIDO DESCRITO.

Método rápido	Marca	Fabricante/proveedor
Placas delgadas con película plástica	RIDA [®] COUNT	r-biopharm
	Petrifilm [™]	3M [™]
Medios cromogénicos y fluorogénicos	Placa SlimPlate	BIOCONTROL
	ColiComplete [®]	Thermo SCIENTIFIC
	Agar BCM [®]	BIOSYNTH [®] CHEMISTRY & BIOLOGY
	Agar RAMBACH	MERCK MILLIPORE
	Agar XLT 4	BD Helping all people live healthy lives
	Agar MSRV	Thermo SCIENTIFIC
	Agar Rainbow	BIOLOG, Food & Beverage Safety
	Fluorocult [®]	MERCK MILLIPORE
Sistemas miniaturizados y sistemas automatizados	API [®]	BIOMÉRIEUX
	Sistema Crystal ID [®]	BIOSCMIC Industrias
	Micro ID [®]	Remel [™]
	Micro Scan [®]	SIEMENS
Sistema Vitek	BIOMÉRIEUX	
M.I. Separación inmunomagnética	Dynabeads [®]	Life technologies
M.I. Aglutinación en látex (LA) y aglutinación pasiva inversa en látex (RLPA)	RIM [™]	Tehermo SCIENTIFIC [™]
	Prolex [™]	PRO-LAB DIAGNOSTICS
M.I. Inmunodifusión	1,2 Test [®]	BIOCOTROL
M.I. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	Assurance [®] EIA	BIOCONTROL
	TECRA [™]	3M [™]
	Transia [®] card	TAROM APPLIED TECHNOLOGIES LTD.
	Rapid Check	ROMER Romer Labs [®]
	VIP [®] GOLD	BIOCONTROL
M.I. Análisis de inmunofluorescencia	VIDAS [®]	BIOMÉRIEUX
M.M. Métodos de hibridación	GENE-TRAK [®]	NEOGEN [®] CORPORATION
	AccuProbe [®]	SESE SOUTH EAST STAR ENTERPRISES
M.M. Reaccion de la PCR	BAX [®]	DU PONT [®]
	ANSR [™]	NEOGEN [®] CORPORATION

Acotaciones: M.I. Métodos inmunológicos, M.M. Métodos moleculares.

Método rápido	Marca	Fabricante/proveedor
B. Eléctricos	Bacterometer [®] ,	BIOMÉRIEUX
	Bac Trac [™] , µ-Trac [™]	SY-LAB MICROBIOLOGY
B. Fibra óptica	RAPTOR [™]	RESEARCH INTERNATIONAL
B. Sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR)	BIACORES	GE Healthcare
	Spreeta [™]	Texas Instruments
	Rejchert SR7000	Direct INDUSTRY
O. Filtración por membrana hidrofóbica (HGMF)	NEOGEN [®] , ISO-GRID [®]	NEOGEN [®] CORPORATION
O. Sistema de siembra para recuento de células viables (SPLC)	Easy Spiral [®]	Interscience for microbiology
	Eddy Jet 2	IUL
O. MALDI-TOF	microflex [®]	BRUKER
	VITEK [®] MS	VITEK [®] MS

Acotaciones: B.: Biosensores, O.: Otros.

B. RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE CADA METODO RÁPIDO.

Método rápido	Marca	Reconocimiento internacional
Placas delgadas con película plástica	RIDA [®] COUNT	NO
	Petrifilm [™]	Recuento de aerobios AOAC 990.12 Hongos y levaduras AOAC 997.02 E.coli y coliformes AOAC 991.14 <i>Staphylococcus aureus</i> AOAC 2003.11
Medios cromogénicos y fluorogénicos	Placa SlimPlate	Recuento de aerobios AOAC 2002.07 Hongos y levaduras AOAC 2002.11 Coliformes AOAC 2005.03
	ColiComplete [®]	FDA
	Agar BCM [®]	FDA
	Agar RAMBACH	FDA
	Agar XLT 4	FDA
	Agar MSRV	FDA
	Agar Rainbow	FDA
Fluorocult [®]	FDA	
Sistemas miniaturizados y sistemas automatizados	API [®]	<i>Salmonella</i> 20E AOAC 978.24
	Sistema Crystal ID [®]	FDA
	Micro ID [®]	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp</i> AOAC 989.12
	Micro Scan [®]	<i>Salmonella</i> AOAC 978.24
	Sistema Vitek	<i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> . AOAC 2011.17 Gram positivos AOAC 2012.02
M.I. Separación inmunomagnética	Dynabeads [®]	FDA
M.I. Aglutinación en látex (LA) y aglutinación pasiva inversa en látex (RLPA)	RIM [™]	FDA
	Prolex [™]	FDA
M.I. Inmunodifusión	1,2 Test [®]	AOAC 989.13
M.I. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	Assurance [®] EIA	<i>Salmonella</i> EIA AOAC 999.08 <i>Listeria</i> EIA AOAC 996.14 EHEC EIA AOAC 996.10
	TECRA [™]	TECRA <i>Salmonella</i> AOAC 989.14 TECRA <i>Listeria</i> AOAC 995.22 TECRA Enterotoxina estafilocócica AOAC 993.06
	Transia [®] card	FDA
	Rapid Check	NO
	VIP [®] GOLD	VIP <i>Salmonella</i> AOAC 999.09 VIP <i>Listeria</i> AOAC 997.03 VIP EHEC AOAC 996.09

Acotaciones: M.I. Métodos inmunológicos.

Método rápido	Marca	Reconocimiento internacional
M.I. Análisis de inmunofluorescencia	VIDAS®	<i>Salmonella</i> AOAC 2004.03 <i>Listeria</i> AOAC 2004.02 Enterotoxina estafilocócica AOAC 2007.06
M.M. Métodos de hibridación	GENE-TRAK®	FDA
	AccuProbe®	NO
M.M. Reacción de la PCR	BAX®	<i>Salmonella</i> AOAC 2003.09 <i>Listeria</i> AOAC 2003.12
	ANSR™	<i>Salmonella</i> AOAC 2013.14
B. Eléctricos	Bacterometer®, Bac Trac™, μ-Trac™	FDA NO
	RAPTOR™	NO
B. Fibra óptica	BIACORES	NO
	Spreeta™	NO
B. Sensor de resonancia de plasmón superficial (SPR)	Rejchert SR7000	NO
	NEOGEN®, ISO-GRID®	FDA
O. Sistema de siembra para recuento de células viables (SPLC)	Easy Spiral®	NO
	Eddy Jet 2	NO
O. MALDI-TOF	microflex®, VITEK® MS	NO NO

Acotaciones: M.I. Métodos inmunológicos, M.M. Métodos moleculares B.: Biosensores, O.: Otros.

REFERENCIAS

LIBROS, TESIS Y MANUALES.

1. Adams, M. y Moss, M., 2000. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza. pp. 150-155.
2. Almaraz, E., 2006. Manual: *Automatización en el área de microbiología*. México.
3. Alonso, L. y Poveda, J., 2008. *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm™ 3MTM para el análisis de alimentos*. Bogotá.
4. Calleja, S., 2011. *Manual CTO de medicina y cirugía*. 8va ed. CTO. pp. 5-9.
5. Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C. y Martínez, M., 2005. *BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL*, Tébar. pp. 345-347.
6. Doyle, M., Beuchat, L. y Montville, T. 2001. *Food Microbiology FUNDAMENTALS AND FRONTIERS*. 2nd ed. ASM PRESS. pp. 775-793.
7. Fiorentino, S., Gutiérrez, M., Rueda, N y Rodríguez, J., 1994. *La Inmunología en el Diagnóstico Clínico*. CEJA. pp. 76-78.
8. Forbes, B. 2007. *Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico*. 12va ed. Médica Panamericana. pp. 120-123, 129-131.
9. Fuentes, X., Castiñeiras, M. y Queraltó, J., 1998. *Bioquímica clínica y Patología molecular*. 2da ed. Reverté. pp. 311-312.
10. García, J., 2007. *Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación*. Hidalgo.
11. Gómez, D., 2002. *Auxiliares Sanitarios*, MAD. pp. 547-548.
12. González, V., García E., Ruiz, O., 2005. *Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria*, CEIM. pp. 33-36.
13. ICMSF., 2000. *Microorganisms in foods 1*. 2a ed. Acribia: Toronto. pp. 8-1.
14. Koneman, W. y Allen, S., 2008. *Koneman Diagnóstico microbiológico* .6ta ed. Médica Panamericana. pp. 123-125.
15. LIDIAV. e IICA., 2001. *Manual para el procesamiento y control microbiológico de alimentos*, Asunción: República de Paraguay. pp.26.
16. Martínez, B., 2004. *El manejo higiénico de los alimentos*, Limusa. pp. 98-101.
17. Pallás, V., Escobar, C., Rodríguez, P. y Marcos, J., 2008. *HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS EN FITOPATOLOGÍA*, Mundi-Prensa. pp. 155-159.
18. Pascual, M., 2005. *Enfermedades de origen alimentario*. Díaz de Santos. pp. 41-45.
19. Ray, J. y Bhunia, A., 2010. *Fundamentos de microbiología de alimentos*. 4ta ed. Mc Graw Hill. pp. 18, 315-324.
20. Soriano, J., 2007. *MICOTOXINAS EN ALIMENTOS*, Díaz de Santos. pp. 103-105.
21. Tortora, G., Funke, B. y Case, C., 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9a ed. Médica Panamericana. pp. 300, 542-543.
22. Vasudevan, D, Sreekumari, S. y Vaidanathan, K., 2011. *Texto de BIOQUÍMICA*. 6ta ed. Cuéllar Ayala. pp. 606-607.

ARTÍCULOS

23. Álvarez, D., Gamazo, C. Echarri, N. 1999. Nuevo método de captura de *Salmonella*: la filtración inmunomagnética. *ANALES Sis San Navarra*, (Vol.22, No.3), pp. 9-15.
24. Barrera, L., Drago, M., Zamora, A., Gomez, F., Sainz, T., Mendoza, F. 2004. Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, (Vol.17, No.1), pp. 42-55.
25. Cássia, R., Nunes, A., Juliano, R., Lemos y F., Beiro, J., 2008. Detection of *Salmonella* sp. in chicken cuts using immunomagnetic separation. *Brazilian Journal of Microbiology*, (Vol. 39), pp. 173-177.
26. Díaz, M., Rodríguez, C. y Zhurbenko, R., 2013. Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, (Vol.51, No.1).
27. Fernández, F., López, L. y Pascual, A. 2013. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, (Vol.31, No.1), pp. 20-25.
28. Fung, D., 2002. Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, (Vol. 1), pp. 3-22.
29. Gilchrist, J., Campbell, J., Donnelly, C., Peeler, J. y Delaney, M., 1973. Spiral Plate Method for Bacterial Determination. *Applied Microbiology*, (Vol.25, No.2), pp. 244-252.
30. Gutiérrez, L., Montiel E., Aguilera, P. y González, M., 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud pública Méx* (Vol.42, No.6), pp. 490-495.
31. Jiménez, C. y León, D., 2009. Biosensores: Aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. VITAE, *REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA* (Vol. 16, No. 1), pp. 144-154.
32. Legarraga, P., Moraga, M., Lam, M., Geoffroy, E., Zumarán, C. y García, P., 2013. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Revista chilena de infectología*, (Vol.30, No.2).
33. Leotta, G., 2009. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, (Vol. 41), pp. 63-64.
34. María, M., Diego, L. y Sonia, F., 2009. Comparación de condiciones de cultivo para el aislamiento y recuento simultáneo de levaduras de suelos de bosques nativos de *Nothofagus* spp. (Fagaceae) de la Patagonia Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, (Vol. 44, No.3-4), pp. 229-238.

35. Martín, R., 2010. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. *Real Academia Nacional de Farmacia*, (Vol.31), pp. 67-92.
36. Pierre-Edouard F., 2013. Modern clinical microbiology: new changes and solutions. *nature reviews/ microbiology*, (Vol. 11).
37. Pihilip, I. y Lowrence, J., 2002. Comparison of Visual Immunoassay and Chromogenic Culture Medium for the Presence of *Listeria* spp. in Foods. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, (Vol. 85), pp. 1201-1205.
38. Rojas, T., Peñuela, A., Pernía, G., Perdomo, M., Gil, M. y Reyes, D., 2009. Viabilidad de un aislado de *Escherichia coli* O157:H7 en queso tipo Guayanés usando separación inmunomagnética como herramienta de recuperación. *Kasmera*, (Vol.37), pp. 51-61.
39. Sandoval, L., 2004. Enterococcus, Aplicación de la técnica de separación inmunomagnética para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de leche. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, (Vol.24, No.1-2).
40. Sharma, H., Agarwal, M., Goswami, M., Sharma, A., Rai, R. y Murugan, M., 2013. Biosensors: tool for food borne pathogen detection. *Veterinary World*, (Vol.6, No.12) pp. 968-973.

SITIOS DE INTERNET CONSULTADOS

41. 3M México. 3M Food Safety. 2013. Pruebas para microorganismos indicadores. [en línea] (actualizado en 2013). Disponible en: http://solutions.3m.com.mx/wps/portal/3M/es_MX/FSD_LA/FoodSafety/product-applications/one/ [Último acceso 2 de septiembre 2013]
42. 3M México. 3M Food Safety. 2014. Pruebas 3M Tecra test de Inmunoensayo Visual (VIA). [en línea] (actualizado en 2014). Disponible en: http://solutions.productos3m.es/wps/portal/3M/es_ES/FoodSafetyEU/FoodSafety/ProductInformation/ProductCatalogue/?PC_Z7_RJH9U5230ODK40IMRSPA7P2O65000000_nid=ZV3D346CSMbe11Q5VN1DGQgl [Último acceso 5 de mayo 2014]
43. ADVANCED INSTRUMENTS, INC. Products microbiology. 2013. Autoplate®. [en línea] (actualizado en 2013). Disponible en: <http://www.aicompanies.com/index.cfm/Products?industries=2> [Último acceso 7 de septiembre 2013]
44. BD Helping all people live healthy lives, Instruments. 2014. Cell analyzers. [en línea] Disponible en: <http://www.bdbiosciences.com/instruments/cell-analyzers-ruo.jsp> [Último acceso 11 de mayo 2014]
45. BD Helping all people live healthy lives, Products. 2014. Product catalog. [en línea] Disponible en: https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/223420.pdf [Último acceso 15 de enero 2014]
46. BECKMAN COULTER, Research & Discovery. 2014. Products and Services. Flow Cytometry. [en línea] Disponible en: <http://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products->

- and-services/flow-cytometry/flow-cytometers/index.htm [Último acceso 11 de mayo 2014]
47. BIOCONTROL, Products. 2013. Quality Indicators. ColiComplete®. [en línea] Disponible en: <http://www.biocontrolsys.com/products/view/cc> [Último acceso 25 de octubre 2013]
 48. BIOCONTROL, Products. 2013. Quality Indicators. SimPlate®. [en línea] Disponible en: <http://www.biocontrolsys.com/products/segment/quality> [Último acceso 11 de septiembre 2013] BIOCONTROL, Products. 2014. Patógenos. 1-2 Test®. [en línea] Disponible en: <http://www.biocontrolsys.com/products/view/test> [Último acceso 5 de mayo 2014]
 49. BIOCONTROL, Products. 2014. Patógenos. Assurance® EIA, VIP® GOLD, TRANSIA® PLATE. [en línea] Disponible en: <http://www.biocontrolsys.com/products/segment/pathogens> [Último acceso 6 de mayo 2014]
 50. BiOLOG, Food & Beverage Safety. 2012. Rainbow Agar O157. [en línea] Disponible en: <http://www.biolog.com/products/?product=Microbial%20Detection%20using%20Chromogenic%20Media> [Último acceso 28 de octubre 2013]
 51. BIOMÉRIEUX, Inicio. 2014. Diagnóstico clínico. VITEK® MS. [en línea] Disponible en: http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?open=ARG_CLN_PRD&doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_63&pubparams.sform=1&lang=es_ar [Último acceso 25 de marzo 2014]
 52. BIO-RAD, Products. 2014. Electrophoresis and Blotting. Nucleic Acid Electrophoresis and Blotting. [en línea] Disponible en: <http://www.bio-rad.com/es-mx/category/nucleic-acid-electrophoresis-blotting> [Último acceso 19 de mayo 2014]
 53. BIOSYNTH® CHEMISTRY & BIOLOGY, Culture Media Technology. 2006. BCM® Listeria Monocytogenes. [en línea] Disponible en: http://www.biosynth.com/index.asp?topic_id=178 [Último acceso 15 de enero 2014]
 54. BIOSYNTH® CHEMISTRY & BIOLOGY, Culture Media Technology. 2006. E.coli Plating Media. [en línea] Disponible en: https://www.biosynth.com/index.asp?topic_id=177&g=19&m=254 [Último acceso 28 de octubre 2013]
 55. CONDA pronadisa, inicio. 2010. Productos. Medios cromogénicos. [en línea] Disponible en: <http://www.condalab.com/pdf/ChromogenicMediaSpanish.pdf> [Último acceso 25 de marzo 2014]
 56. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-109-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PROCEDIMIENTOS PARA LA TOMA, MANEJO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1994/p109ss194.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]

57. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1995/110-ssa1.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]
58. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1995/092-ssa1.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]
59. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS. <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1995/111-ssa1.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]
60. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE. <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1995/112-ssa1.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]
61. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-143-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO DE PRUEBA MICROBIOLÓGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES. <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1997/143-ssa1.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]
62. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-114-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA* EN ALIMENTOS. <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1995/114-ssa1.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]
63. DGN Dirección General de Normas. Consulta del catálogo de Normas Oficiales Mexicanas (NOM). NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN ALIMENTOS. <http://200.77.231.100/work/normas/noms/1995/115-ssa1.pdf> [Último acceso 13 de junio 2014]
64. Direct INDUSTRY, Productos. 2014. Análisis fisicoquímico. Biosensores. [en línea] Disponible en: <http://www.directindustry.es/fabricante-industrial/biosensor-81089.html> [Último acceso 20 de mayo 2014]
65. DUPONT™, Products & Services. 2014. Food diagnostics. RiboPrinter® system [en línea] Disponible en: http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/RiboPrinter_System/index.html [Último acceso 19 de mayo 2014]

66. FSIS, 2004. Assessing the Effectiveness of the *Listeria monocytogenes* Interim Final Rule. Article [en línea] Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/Oppde/rdad/frpubs/97-013F/LM_Assessment_Report_2004.pdf [Último acceso 20 de enero 2014]
67. interscience, productos. 2013. Sembradores automáticos. Easy Spiral®. [en línea] (actualizado en 2013). Disponible en: <http://www.interscience.fr/Sembradores-automaticos> [Último acceso 7 de septiembre 2013]
68. IUL, Probenvorbereitung. 2013. Spiral Plater. Eddy Jet 2. [en línea] (actualizado en 2013). Disponible en: <http://www.iul-instruments.de/produkte/probenvorbereitung/spiralplater.html> [Último acceso 7 de septiembre 2013]
69. Life Technologies™, Brands 2014. Top products. Dynabeads®.Magnetic Beads.®.[en línea] Disponible en: <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/brands/product-brand/dynal.html> [Último acceso 9 de mayo 2014]
70. MERCK MILLIPORE, Microbiología. 2013. Agar para E.coli O157:H7. [en línea] Disponible en: http://85.238.132.4/centro-america/chemicals/agar-para-e-coli-0157-h7/MDA_CHEM-104036/p_M0ab.s1O9v4AAAEEnCa8I5OGP?attachments=APPL [Último acceso 28 de octubre 2013]
71. MERCK MILLIPORE, Microbiología. 2013. Rambach® agar for the identification Salmonella pdf. [en línea] Disponible en: http://www.merckmillipore.com/chemicals/rambach-agar/MDA_CHEM-107500/p_m2ab.s1LR1kAAAEWQ.EfVhTI?WFSimpleSearch_NameOrID=Rambach&BackButtonText=search+results [Último acceso 15 de enero 2014]
72. Microbiology INTERNATIONAL. Microbiology International 2013 catalog. WASP2. [en línea] (actualizado en 2013). Disponible en: <http://www.nxtbook.com/nxtbooks/microbiology/labsolutions/index.php> [Último acceso 7 de septiembre 2013]
73. NEOGEN®CORPORATION, Food Safety. ISO-GRID® /NEO-GRID®. [en línea]. Disponible en: http://www.neogen.com/FoodSafety/IG_NG_Index.asp [Último acceso 6 de octubre 2013]
74. PARTEC a System, Instrumentation. 2014. Flow Cytometry. [en línea] Disponible en: <http://www.partec.com/instrumentation/flow-cytometry.html> [Último acceso 11 de mayo 2014]
75. PRO-LAB DIAGNOSTICS, Catálogo. Termocicladores. [en línea] Disponible en: http://www.pro-lab.com.mx/home/index.php?option=com_content&view=category&id=19:termociclador&Itemid=6&layout=default [Último acceso 15 de mayo 2014]
76. PRO-LAB DIAGNOSTICS, PRODUCTS Listing. 2014. Prolex™. [en línea] Disponible en: <http://www.pro-lab.com/products.php> [Último acceso 10 de mayo 2014]
77. rapidmicrobiology, news. 2009. RIDA®COUNT One of the World's Fastest Yeast and Mold Tests. [en línea](actualizado el 10 de noviembre del 2009). Disponible

- en: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/338h9.php> [Último acceso 17 de septiembre 2013]
78. r-biopharm, Products. Food & Feed Analysis. Microbiology/Higiene. [en línea]. Disponible en: <http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/microbiology-higiene> [Último acceso 11 de septiembre 2013]
79. RESEARCH INTERNATIONAL, PRODUCTS. 2014. IDENTIFICATION TOOLS. RAPTOR. [en línea] Disponible en: http://www.resrchintl.com/RAPTOR_Bioassay_System.html [Último acceso 20 de mayo 2014]
80. ROMER Romer Labs, Productos 2012. Patógenos en alimentos. Rapid Chek®.[en línea] Disponible en: <http://www.romerlabs.com/es/products/food-pathogen-testing/salmonella/> [Último acceso 5 de mayo 2014]
81. SY-LAB MICROBIOLOGY, Products. 2014. Electric microbiology. BACTRAC 4300 y MICROTRAC 4200. [en línea] Disponible en: <http://microbiology.sylab.com/products/p/list/Product/category/mikro-category.html#product-overview> [Último acceso 20 de mayo 2014]
82. Thermo SCIENTIFIC, Remel Microbiology Products. 2013. Remel Catalog. [en línea] Disponible en: <http://www.remel.com/PDF/RemelCatalog.pdf> [Último acceso 28 de octubre 2013]
83. Thermo SCIENTIFIC, Remel Microbiology Products. 2014. MODIFIED SEMI-SOLID RAPPAPORT VASSILIADIS (MSRV) MEDIUM BASE. [en línea] Disponible en: http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0910&org=124&c=uk&lang=EN [Último acceso 15 de enero 2014]
84. U.S. Food and drugs administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual (BAM). 2008. [En línea] (actualizado en enero 2001). Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm> [Último acceso 17 de septiembre 2013]
85. UNI UNISCIENCE, Equipment. 2010. Electrophoresis. Pulsed Field. [en línea] Disponible en: <http://www.uniscience.com/campo-pulsado> [Último acceso 19 de mayo 2014]