



Nº7 Septiembre 2011

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS FENOTÍPICO Y MOLECULAR PARA IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS.

**María Luisa Carrillo-Inungaray
Rocío Crystabel López González
Brenda Alvarado Sánchez
Mayra Aguilar Zárate**

Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

maluisa@uaslp.mx

Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), representan un creciente problema de salud pública a nivel mundial. Las más frecuentes son las ocasionadas por *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*, razón por la que es importante su identificación en los alimentos. Para tal fin, existen métodos basados en las características bioquímicas del microorganismo -método fenotípico- y en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) -

método molecular. El primer método no implica gran inversión económica pero si de más recursos humanos para la preparación de medios de cultivo y el registro de resultados, además de que requiere de varios días para su desarrollo. El segundo método necesita de más presupuesto, ya que parte del proceso es automatizado, sin embargo tiene mayor sensibilidad para detectar e identificar microorganismos a través de pruebas simples y específicas y se realiza en pocas horas. En México se ha limitado el uso de métodos moleculares a la investigación privada, porque aún no se han validado como métodos oficiales.

Palabras clave: Fenotípico, PCR, patógenos en alimentos, *Salmonella*.

Introducción

La microbiología sanitaria del agua y los alimentos es una de las muchas especialidades en las que se desenvuelve la microbiología. Tres razones fundamentales justifican el estudio de los microorganismos en los alimentos: son causa de su deterioro, pueden provocar enfermedad en la población y son utilizados para obtener variedades de alimentos. Una deficiente calidad sanitaria de los alimentos se traduce en daños de variada naturaleza para las poblaciones implicadas. Los daños incluyen presentación de enfermedades, gastos de atención médica, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos, daño al turismo, y causa de muerte (Fernández, 2000).

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen uno de los principales problemas de seguridad alimentaria (OMS, 2007). Ésta existe cuando todas las personas, en todo momento, tienen acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos que satisfagan sus necesidades alimentarias y las preferencias de alimentos para una vida activa y saludable (FAO, 2008). Los patógenos están presentes en el entorno del alimento: agua, utensilios, equipo, materias primas, ingredientes y aditivos, envases, fauna y seres humanos, por lo que el método usado para la detección de los microorganismos

durante el procesamiento y distribución de los alimentos, es de gran interés para la salud pública.

En esta revisión se describen las enfermedades transmitidas por alimentos y se hace énfasis en las características de *Salmonella* spp. Así mismo, se describe el método de detección fenotípica para la detección e identificación de microorganismos patógenos presentes en los alimentos y se compara con la eficiencia y efectividad del método molecular por PCR.

Enfermedades transmitidas por alimentos

La Organización Mundial de la Salud define a las enfermedades transmitidas por los alimentos como las enfermedades, generalmente infecciosas o tóxicas en la naturaleza, causadas por agentes que entran al cuerpo a través de la ingestión de alimentos. En Estados Unidos, por ejemplo, se estima que cada año ocurren alrededor de 76 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, lo que da como resultado 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes (OMS, 2007). En México el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) menciona las infecciones intestinales en segundo lugar dentro de la morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades (Tabla 1) (INEGI, 2010).

Tabla 1. Tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades, 2005 a 2008 en México.

Causa de casos nuevos de enfermedad	Por cada 100 mil habitantes			
	2005	2006	2007	2008
Infecciones respiratorias agudas	25,013.70	22,112.20	23,287.80	22,609.40
Infecciones intestinales por otros organismos y las mal definidas	4,476.70	4,386.00	4,363.40	4,407.20
Infección de vías urinarias	2,988.30	2,861.20	2,916.70	3,041.70

Úlceras, gastritis y duodenitis	1,346.70	1,708.50	1,746.20	1,767.10
Hipertensión arterial	487.8	686.4	492.6	698.6
Otitis media aguda	709.0	659.0	631.6	624.7
Amebiasis intestinal	716.7	615.9	543.4	498.5
Gingivitis y enfermedad periodontal	422.5	471.9	458.9	481.3
Diabetes mellitus no insulino dependiente (Tipo II)	373.3	366.8	382.6	371.6
Conjuntivitis	250.5	302.7	331.4	352.9
Otras helmintiasis	376.5	326.5	314.8	305.3
Varicela	306.0	263.8	299.3	303.7
Asma y estado asmático	272.6	257.1	281.0	280.0
Candidiasis urogenital	334.9	322.4	297.5	277.4
Intoxicación por picadura de alacrán	233.0	262.8	256.6	254.9

(INEGI, 2010)

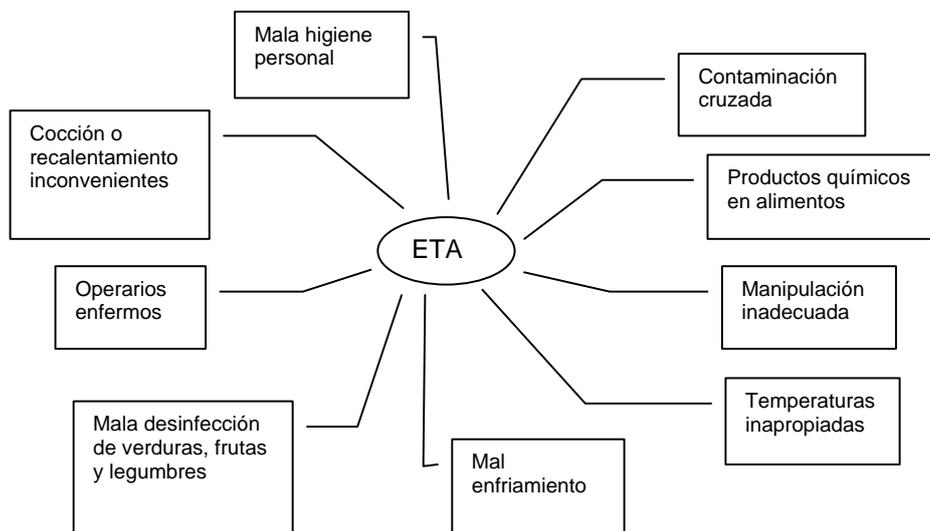
Patógenos en alimentos

Los microorganismos de interés sanitario en los alimentos incluyen, de manera convencional, bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, virus, parásitos microscópicos o sus estados de huevecillo o larvario, y ciertas algas microscópicas. Se encuentran involucrados en dos áreas fundamentales de la microbiología sanitaria: como causa de deterioro de los alimentos y como agentes etiológicos de enfermedades asociadas a su consumo (Fernández, 2000). Estos agentes etiológicos se asocian a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) que continúan siendo una amenaza a la salud pública en todo el mundo y son una causa importante de morbilidad, los factores que ocasionan ETA se

muestran en la Figura 1. Las bacterias más frecuentemente asociadas a casos de infecciones por consumo de alimentos contaminados aparecen en listadas en la Tabla 2 (Rojas y González, 2006).

La epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos ha cambiado en las últimas tres décadas, en parte debido a que emergen patógenos recientemente reconocidos y patógenos reconocidos anteriormente incrementan su aparición o se asocian con alimentos o con nuevos vectores alimentarios. Dentro de los más relevantes se encuentran *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*.

En México, según la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud (2011), la intoxicación alimentaria de origen bacteriano ocasionó 13079 casos de enfermedades diarreicas a nivel nacional durante 2010 y en 2011 hasta la semana 20 se reportan 8711 casos.



(Fernández, 2000).

Figura 1. Factores que intervienen en enfermedades transmitidas por alimentos.

Tabla 2. Bacterias patógenas en alimentos.

Microorganismos	Trastorno que ocasiona	Posible producto portador
<i>Arcobacter</i> spp.	Diarrea, bacteremia	Carne de aves
<i>Bacillus cereus</i>	Diarrea, vómitos	Arroz, especias, productos lácteos y cárnicos
<i>Campylobacter</i> spp.	Diarrea	Carne de aves y res, leche cruda
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo, vómitos	Pescado, miel y alimentos enlatados
<i>Clostridium perfringens</i>	Diarrea, dolor abdominal	Carne de res y aves, salsas
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea, colitis hemorrágica, Síndrome hemolítico-urémico	Carne de res y productos lácteos
<i>Listeria</i> spp.	Listeriosis	Paté, leche, queso suave, carne, mariscos y ensalada de col.
<i>Salmonella</i> spp.	Gastroenteritis	Carne de res y aves, leche, huevos crudos
<i>Shigella</i> spp	Disentería bacilar, fiebre, calambres	Mayonesa, vegetales crudos, leche, aves, productos lácteos
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicación estafilocócica	Leche cruda
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	Ostras crudas, pescado
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Yersiniois	Leche o agua contaminada, tofu, canales de cerdo

(Rojas y González, 2006)

Epidemiología

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Desde el punto de vista epidemiológico *Salmonella* spp. se puede clasificar en tres grupos:

a) Las que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales. En este grupo se encuentran la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis.

b) Las que infectan sólo al hombre: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella paratyphi C* y que se transmiten en forma directa o indirecta de una persona a otra.

c) Las que están adaptadas a un huésped en especies animales: *S. abortusovis*, a los ovinos; *S. abortusequi*, a los equinos y *S. gallinarum*, a las aves.

La salmonelosis es una gastroenteritis aguda, acompañada de cefalalgia, dolores abdominales súbitos, diarrea, náuseas, fiebre y vómitos. Tiene un período de incubación de 6 a 72 horas, generalmente entre 12 a 36 horas y la gastroenteritis persiste de 24 a 72 horas. La dosis infectiva es de 10^5 a 10^8 microorganismos. La transmisión que oscila entre varios días a varias semanas, ocurre durante toda la evolución de la infección. Se transmite por la ingestión de alimentos provenientes de animales infectados, incluye huevos crudos o parcialmente cocidos y sus productos; carnes y sus derivados; leche cruda y productos lácteos; agua contaminada; aves de corral (especialmente pollo y pavo). También se informaron brotes por el consumo de frutas, jugo de frutas y hortalizas crudas contaminadas y por la transmisión de persona a persona por la vía fecal-oral, en especial cuando existe diarrea (Caffer y Terragno, 2001).

En México y Estados Unidos se han presentado brotes (Tabla 3) que son 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 diseminación de *Salmonella*, así como de otros gérmenes patógenos en los alimentos.

Tabla 3. Brotes importantes de salmonelosis.

País	Año	Reporte	<i>Salmonella</i> involucrada
México	1979	Tomates, se reportaron 18,864 casos	<i>Salmonella typhi</i>
Estados Unidos	1985	Leche contaminada, 16,284 casos confirmado y 197,581 casos no reportados estimados	<i>Salmonella typhimurium</i>
Estados Unidos	2008	Chiles jalapeños y serranos, tomates; 1,329 casos de abril julio de 2008 y 52,826 casos no reportados estimados	El serotipo <i>Saintpaul</i> de <i>Salmonella entérica</i>
Estados Unidos	2009	Crema de cacahuete, 529 casos confirmados y 22,500 enfermos estimados	<i>Salmonella typhimurium</i>
Estados Unidos	2010	Alfalfa, 33 casos confirmados	<i>Salmonella typhi</i>
Estados Unidos	2010	Huevos contaminados, 3,182 casos confirmados	<i>Salmonella enteritidis</i>

(CDC, 2009)

En México, con respecto a la morbilidad en el año 2003, la salmonelosis ocupó el vigésimo cuarto lugar dentro de todas las causas de enfermedad con 103,815 casos e incidencia de 99.62 por 100 000 habitantes; para el año 2008 ocupó el décimo noveno lugar dentro de las veinte principales causas de enfermedad con 122,422 casos e incidencia de 114.75 por cada 100 000 habitantes, es decir sufrió un aumento entre el periodo 2003-2008 (Secretaría de Salud, 2009).

Métodos de detección de microorganismos patógenos en alimentos

Hay una serie de razones que justifican la necesidad de analizar los alimentos para determinar cualitativa o cuantitativamente sus microorganismos. Los principales objetivos del análisis microbiológico son asegurar: (1) que el alimento cumple ciertas normas estatutarias; (2) que se ajusta a normas internas establecidas por la compañía procesadora y a las externas exigidas por el comprador; (3) que las materias alimenticias que lleguen a la fábrica para ser procesadas cumplen las normas exigidas y las pactadas con el producto; (4) que se mantiene el control del proceso y la higiene en la línea de fabricación.

Métodos y técnicas convencionales de detección

Los métodos convencionales de detección de microorganismos requieren en primer lugar que la bacteria objeto del análisis forme una colonia en un medio de cultivo. Estos métodos no implican una inversión económica y un gasto en material excesivo. Sin embargo, necesitan mano de obra suficiente para la preparación de medios y registro de resultados. Además, puesto que se necesita un periodo de incubación, se requieren varios días ya que el microorganismo buscado puede ser minoritario respecto a la flora total y puede estar subletalmente lesionado, por esto deben incorporarse cultivos de recuperación o de enriquecimiento antes de utilizar los métodos selectivos (Rodríguez *et al.*, 2009).

Detección tradicional de Salmonella

La norma mexicana para la identificación de este microorganismo es la Norma oficial mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. En la cual describe el siguiente procedimiento tradicional para la identificación de *Salmonella*: Preparación de los alimentos para el aislamiento de *Salmonella*, aislamiento de *Salmonella*, Identificación bioquímica, identificación serológica, pruebas bioquímicas complementarias.

Métodos moleculares para detección de patógenos

Una mayor conciencia pública de la salud y el impacto económico relacionado con la contaminación de origen alimentario ha dado lugar a un mayor esfuerzo para desarrollar métodos más sensibles en la detección de patógenos y a su identificación. Los avances en la instrumentación e implementación de los descubrimientos de la bioquímica y la biología molecular permiten utilizar la información genética de los microorganismos como herramientas de identificación y cuantificación de aquéllos de interés para el hombre. Entre estos métodos destacan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (Olsen, 2000). La Tabla 4 muestra protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de microorganismos.

Tabla 4. Protocolos basados en la PCR para la detección de bacterias patógenas en alimentos (Rojas y González, 2006).

Microorganismo	Posible producto portador	Método utilizados	Referencia
<i>Arcobacter</i> spp.	Carne de aves	ERIC-PCR, RAPD-PCR	Houf <i>et al.</i> , 2002.
<i>Bacillus cereus</i>	Arroz, especias, productos lácteos y cárnicos.	PCR simple	Yamada <i>et al.</i> , 1999.
<i>Campylobacter</i> spp.	Carne de aves, cerdo y res, leche cruda.	PCR múltiple, PCR semi-anidado	Waage <i>et al.</i> , 1999 y Lai-King <i>et al.</i> , 1997.
<i>Clostridium botulinum</i>	Pescado, miel, Alimentos enlatados.	PCR-ELISA, PCR simple	Hielm <i>et al.</i> , 1998; Fach <i>et al.</i> , 2002 y Nevas <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium perfringens</i>	Carne de res y aves, salsas.	PCR dúplex	Fach y Popoff, 1997.

<i>Escherichia coli</i>	Carne de res y productos lacteos.	PCR múltiple, H-CM-PCR, PCR-TR, RT-PCR, QC-PCR	Chen <i>et al.</i> , 1998; Maurer <i>et al.</i> , 1999; Venkateswaran <i>et al.</i> , 1997 y McIngvale <i>et al.</i> , 2002.
<i>Listeria</i> spp.	Leche, queso suave, mariscos, carne.	PCR múltiple, PCR - DGGE, RT-PCR, PCR simple, PCR-TR	Cocolin <i>et al.</i> , 2002; Klein y Juneja, 1997 y Lampel <i>et al.</i> , 2000.
<i>Salmonella</i> spp.	Carne de res y aves, leche y huevos crudos.	PCR simple	Cohen <i>et al.</i> , 1996 y Lampel <i>et al.</i> , 2000.
<i>Shigella</i> spp.	Mayonesa, vegetales crudos, productos lacteos y aves.	PCR combinado con hibridización de ADN, PCR simple	Villalobo y Torres, 1998 y Lampel <i>et al.</i> , 2000.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leche cruda	PCR múltiple-ELISA, PCR múltiple	Omoe <i>et al.</i> , 2002 y Becker <i>et al.</i> , 1998.
<i>Vibrio cholerae</i>	Ostras crudas y pescado.	PCR-TR	Lyon, 2001
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Leche o agua contaminada.	PCR-TR	Jourdan <i>et al.</i> , 2000.

Abreviaturas:

ERIC = Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

PCR-TR = PCR en tiempo real

RAPD = Random Amplified Polymorphic ADN

H-CM-PCR = Hibridación-captura magnética-PCR

QC-PCR = PCR competitivo cuantitativo

RT-PCR = PCR transcriptasa reversa

DGGE = Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores, *primers* o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Mullis, 1990).

Constituyentes de la PCR

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos *primers* que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultrapura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 µl), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable (Barrera *et al.*, 1993).

Ventajas y desventajas en la detección de patógenos mediante PCR

Las principales ventajas del uso de la PCR en la detección e identificación de bacterias causantes de ETA radica en tres aspectos fundamentales: su sensibilidad, su especificidad y su capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestras. Adicionalmente estos métodos identifican microorganismos que no pueden ser estudiados por técnicas convencionales o que no pueden cultivarse en substratos artificiales (Scheu *et al.*, 1998).

Entre los factores que limitan la aplicación de la PCR en la identificación de microorganismos patógenos en muestras de alimentos, destaca la presencia de sustancias que pueden ejercer un efecto inhibitorio sobre la reacción, como la hemoglobina, la lactoferrina, los polisacáridos, las grasas, las proteínas y iones metálicos presentes en las matrices alimenticias. La repercusión de estos compuestos en la obtención de resultados falso-negativos puede eliminarse

empleando pasos de preenriquecimiento o polimerasas apropiadas, así como membranas selectivas (Gentry, 2002).

Otra de las limitaciones de las técnicas de PCR descritas radica en que la amplificación del material genético se produce tanto en las células viables como en las muertas. Para resolverlo, cada vez se utiliza más la técnica de PCR que emplea como enzima una transcriptasa inversa, por lo que esta técnica se ha propuesto para la detección e identificación de microorganismos viables, entre los que destacan bacterias patógenas e indicadores de contaminación (Mayoral *et al.*, 2005).

Estandarización y validación de protocolos para la identificación de patógenos basados en PCR

Recientemente, se desarrolló en varios laboratorios europeos el proyecto denominado "Food-PCR", cuyo objetivo es la validación y estandarización de las metodologías de PCR para la detección y el control de los patógenos *Campylobacter* spp. termofílico, *E. coli* O157, *Yersinia enterocolítica*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos. Estos estudios proponen pruebas simples y específicas para la detección de patógenos, y los resultados obtenidos pueden facilitar la comparación y el intercambio internacional de datos epidemiológicos, así como favorecer la implementación de estas metodologías en otros laboratorios (Malorny *et al.*, 2003).

Aunque muchos laboratorios de diagnóstico alrededor del mundo han implementado métodos de PCR para la detección de patógenos, existen algunos parámetros como, la extracción del ADN, la elección de *primers* y el tipo de programa de la PCR, que pueden afectar la eficiencia de la reacción, con lo que los resultados de las pruebas desarrolladas o publicadas por algún laboratorio en ocasiones pueden ser difíciles de reproducir en otros laboratorios.

La identificación por PCR a partir de una muestra directa del alimento disminuye el tiempo requerido para la obtención de resultados, sin embargo debido a que la extracción de ADN se realiza directamente del alimento, disminuye

la fiabilidad del método, esto es por el aumento de inhibidores (antes mencionados) en la extracción del ADN los cuales pueden afectar la PCR.

La identificación por PCR a partir de colonias bacterianas aisladas en placas de agar selectivo también puede acortar el tiempo por varios días en la obtención de resultados frente a las técnicas tradicionales como la confirmación por métodos serológicos o bioquímicos. Actualmente se han implementado metodologías en donde la preparación de la muestra consta de un sólo enriquecimiento de las células del patógeno en estudio como es el caso de la *Salmonella* (Croci, 2004).

Conclusiones

El método molecular por PCR presenta mayor ventaja respecto al método fenotípico para la detección de patógenos en alimentos: sensibilidad, especificidad y capacidad de procesamiento de grandes cantidades de muestra. Sin embargo la aplicación generalizada en México está limitada porque en la normatividad para la realización de análisis de alimentos, aún no se ha validado como método oficial.

Referencias

1. Barrera, H.A., Ortiz, R., Rojas, A. y Reséndez, D. (1993). "Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular". *Ciencia y Desarrollo, Conacyt*, 18, 50-60.
2. Becker, K., Roth, R. y Peters, G. (1998). "Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene". *J Clin Microbiol*, 36, 2548-2553.

3. Caffer, M. I. y Terragno, R. (2001). *Manual de Procedimientos para la caracterización de Salmonella*. Servicio Enterobacterias - Departamento Bacteriología. Argentina.
4. Centres for Disease Control and Prevention (2009). Actualización de las investigaciones: Brotes infecciosos causados por *Salmonella Typhimurium*, 2008–2009. Consultado el 18 de febrero de 2010. [En línea] <http://www.cdc.gov/salmonella/es/typhimurium/>
5. Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C. y Comi, G. (2002). "Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods". *Appl Environ Microbiol*, 68, 6273-6282.
6. Cohen, H., Mechanda, S. y Lin, W. (1996). "PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp." *Appl Environ Microbiol*, 62, 4303-4308.
7. Chen, J., Johnson, R. y Griffiths, M. (1998). "Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture-hybridization PCR." *Appl Environ Microbiol*, 64, 147-152.
8. Croci, L., Delibato, E., Volpe, G., De Medici, D. y Palleschi, G. (2004). "Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, and the Standard Culture Method for Detecting *Salmonella* in Meat Products". *Appl Environ Microbiol*, 70, 1393–1396.
9. Espinoza, E., Revollo, S. y Espada, A. (2001). "Identificación de *Salmonella* spp. mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidado (Nested Pcr) y técnicas convencionales en huevos recolectados en los principales mercados de la ciudad de la Paz". *Vis Cientí.*, 200, 10-16.

10. Fach, P. y Popoff, M. (1997). "Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test". *Appl Environ Microbiol*, 63, 4232-4236.
11. Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Dargaignaratz, C. y Botella, L. (2002). "Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France". *Appl Environ Microbiol*, 68, 5870-5876.
12. Food and Agriculture Organization (2008). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Consultado el 18 de febrero de 2010. [En línea] <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0291s/i0291s00.pdf>
13. Fernández, E. (2000). *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro., México.
14. Gentry, W. C., Hutcheson, H., Kim, L., Bolte, D., Traub, D. J. y Morley, P. (2002). "Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella* spp." *J Clin Microbiol*, 40, 1487-1492.
15. Hielm, S., Björkroth, J., Hyytiä, E. y Korkeala, H. (1998). "Prevalence of *Clostridium botulinum* in finnish trout farm.: pulsedfield gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates". *Appl Environ Microbiol*, 64, 4161-4167.
16. Houf, K., De Zutter, L., Van Hoof, J. y Vandamme, P. (2002). "Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods". *Appl Environ Microbiol*, 68, 2172-2178.
17. Instituto Nacional de Estadística Geografía (2010). Anuarios de morbilidad 2000-2008. Consultado el 9 de mayo de 2010. [En línea] www.dgepi.salud.gob.mx

18. Jourdan, A., Johnson, S. y Wesley, I. (2000). "Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the ail gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*". *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 3750-3755.
19. Klein, P. y Juneja, V. (1997). "Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR". *Appl Environ Microbiol*, 63, 4441-4448.
20. Lai-King, N., Bin Kingombe, C., Yan, W., Taylor, D., Hiratsuka, K. y Malik, N. (1997). "Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridization and PCR". *Appl Environ Microbiol*, 63, 4558-4563.
21. Lampel, K. A., Orlandi P.A. y Kornegay, L. (2000). "Improved Template Preparation for PCR-Based Assays for Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens". *Appl Environ Microbiol*, 10, 4539-4542.
22. Lyon, W. (2001). "TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater". *Appl Environ Microbiol*, 67, 4685-4693.
23. Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. y Helmuth, R. (2003). "Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: Towards an international standard". *Appl Environ Microbiol*, 69, 290-296.
24. Maurer, J., Schmidt, D., Petrosko, P., Sánchez, S., Bolton, L. y Lee, M. (1999). "Development of primers to O-Antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR". *Appl Environ Microbiol*, 65, 2954-2960.
25. Mayoral, M. B., Martín, R., Sanz, A., Hernández, P., González, I. y García, T. (2005). "A reverse transcriptase PCR technique for the detection and viability assessment of *Kluyveromyces marxianus* in yogurt". *J Food Prot*, 69, 2210-2216.

26. McIngvale, S., Elhanafi, D. y Drake, M. (2002). "Optimization of reverse transcriptase PCR to detect viable Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*". *Appl Environ Microbiol*, 68, 799-806.
27. Mullis, K.B. (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Sci Am*, 262, 56-61.
28. Nevas, M., Hielm, S., Lindström, M., Horn, H., Koivulehto, K. y Korkeala, H. (2002). "High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction". *Int J Food Microbiol*, 72, 45-52.
29. Norma oficial mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Consultado el 18 de febrero de 2011. [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>
30. Organización Mundial de la salud (2007). *Iniciativa de la OMS para Estimar la Carga Mundial de Enfermedades de Transmisión Alimentaria*. Consultado el 18 de Febrero de 2011. [En línea] http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_05_FBD_July08_sp.pdf
31. Olsen, J .E. (2000). "ADN-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens". *Food Research Int*, 33, 257-266.
32. Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D., Ueda, S. y Shinagawa, K. (2002). "Detection of seg, seh, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring seg, seh, or sei genes". *J Clin Microbiol*, 40, 857-862.
33. Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C., Ayala, L. L., Rocha, R. J., Padilla, G. V. y Espinosa, H. T. (2009). "Detección de microorganismos mediante métodos moleculares". Universidad Autónoma de Coahuila. Consultado el 28 de

junio de 2011. [En línea]
<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/AQMmicroorganismos.html>

34. Rojas, H. A. y González, F. T. (2006). "Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa". *Bioquímica*, 31, 69-76.
35. Secretaría de Salud, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2009). Paratifoidea y otras Salmonelosis. Consultado el 20 de febrero de 2011. [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/epide>
36. Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud. Vigilancia Epidemiológica Semana 20, 2011. CUADRO 4.2. Casos por entidad federativa de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo hasta la semana epidemiológica 19 del 2011. [En línea] <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2011/sem20/pdf/cua4.2.pdf>
37. Scheu, P., Berghof, K. y Stahl, U. (1998). "Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction". *Food Microbiol*, 15, 13-31.
38. The PCR encyclopedia. Consultado el 28 de Mayo de 2011. [En línea] <http://www.pcr-encyclopedia.com/>
39. Ultra Sample Preparation Reagent Protocol. Applied Biosystems™. Consultado el 20 de marzo de 2010. [En línea] <http://www.hs.iastate.edu/online/classweb/Fall2009/FSHN/FSHN421/Notes/PrepMan%20Ultra%20Sample%20Prep%20Protocol.pdf>
40. Venkateswaran, K., Kamijoh, Y., Ohashi, E. y Nakanishi, H. (1997). "A simple filtration technique to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli*

O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR". *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4127-4131.

41. Villalobo, E. y Torres, A. (1998). "PCR for detection of *Shigella* spp. In mayonnaise". *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1242-1245.

42. Waage, A., Vardund, T., Lund, V. y Kapperud G. (1999). "Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay". *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1636-1643.

43. World Health Organization (2007). Food safety and foodborne illness. Consultado el 22 de octubre de 2009. [En línea] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>

44. Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N. y Venkateswaran, K. (1999). "Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice". *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1483-1490.