

Microbiología sanitaria

Armida Zúñiga-Estrada,* Fausto Tejeda-Trujillo,** Fanny Concha-Valdéz,*** Norma Heredia-Rojas****

RESUMEN. La microbiología sanitaria estudia a los microorganismos de interés en el agua y alimentos, así como los factores ecológicos que determinan su sobrevivencia, crecimiento e inactivación. El tipo de microorganismo que se identifique en un producto dependerá de la forma en que estos se han elaborado, transportado, almacenado, manejado o preparado para su consumo. El garantizar la inocuidad de los alimentos tiene impacto a nivel individual y colectivo; en aspectos económicos, sociales y sanitarios y representa un tema de interés en Salud Pública. La microbiología sanitaria es una ciencia que debe estar contextualizada a las necesidades regionales y del país, con una amplia vinculación entre la academia, la industria y las áreas gubernamentales, contando con la infraestructura necesaria y con personal calificado, aplicando tecnología de vanguardia, teniendo como base un marco normativo suficiente y actualizado y desarrollando investigación básica y aplicada. La aplicación de técnicas modernas para el análisis microbiológico de agua y alimentos permite evidenciar riesgos microbianos e identificar prácticas que puedan comprometer la inocuidad de los mismos, así como realizar la vigilancia y control sanitario, para abatir riesgos a la salud.

Palabras clave: Microbiología sanitaria, métodos modernos, riesgos microbianos, enfermedades transmitidas por los alimentos.

ABSTRACT. Sanitary Microbiology is a science based on the detection of risks associated with the production, manufacture and consumption of foods and water. It has been established that environment facts determine the survival, growing and inactivation of the microorganisms. These risks are commonly associated with the presence of microbiological hazards and represent a serious problem from the Public Health viewpoint. The types of microorganisms presents in products will depend of the way they have been elaborated, transported, stored, taking or prepared before eating. The guarantee of safety foods have impacted both to single and collective level; and also in economics, social and sanitaries aspects. The sanitary microbiology like a science must be in context to the regional and national needs, with an important vinculation between different sectors of the society such as academy, industry and government, taking care of infrastructure and qualified personal, based on novel technology, actualized normative and making basical and applied research. The application of novel technology for the microbiological analysis of water and foods allows to show the microbial risk and also identify practices that compromise the safety of themselves, with the final proposes of diminish or eliminate healthy risk due the food consumption.

Key words: Sanitary microbiology, modern methods, microbial hazards, food transmitted diseases.

La microbiología sanitaria: Elemento fundamental en las acciones de salud pública

Los riesgos asociados a la presencia de peligros microbianos en el agua y en los alimentos son motivo de seria preocupación desde el punto de vista de la salud pública. La caracterización de estos peligros, en la actualidad, es una actividad fundamental de los servicios de epidemiología, de vigilancia sanitaria y de laboratorio. Estas actividades se realizan en laboratorios privados, universitarios y de dependencias gubernamentales, como los Laboratorios de Salud Pública que dependen de la Secretaría de Salud.

Cada entidad federativa cuenta con un Laboratorio de Salud Pública, todos ellos conforman la Red Nacional de Laboratorios que constituyen un elemento fundamental en la protección contra riesgos sanitarios, al hacer la detección de microorganismos indicadores y patógenos en muestras de aguas y alimentos. El marco analítico básico de estos laboratorios incluye la detección de grupos indicadores, patógenos específicos como: *Vibrio* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Brucella* spp y *Listeria monocytogenes*, así como de toxinas (micotoxinas, toxina estafilocócica y biotoxinas marinas), entre otras.

Estas unidades representan el sustento analítico de la protección contra riesgos sanitarios, ya que realizan el análisis de los productos que se encuentran asociados a riesgos. Las metodologías se basan tanto en las señaladas en las Normas Oficiales Mexicanas, como en normas internacionales y se trabaja con validación de métodos. En los laboratorios estatales, se ha implantado un sistema de calidad, lo que ha permitido la autorización bajo la norma NMX-17025 y en algunos casos la certificación con normas ISO 9000.

* Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Laboratorio Estatal de Salud Pública. Secretaría de Salud de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. zuniga@uaeh.reduaeh.mx.

** Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos. Dpto. de Microbiología. Facultad de Cs. Químicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Pue. ftejeda@siu.buap.mx.

*** Laboratorio de Microbiología. Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yuc. cvaldez@tunku.uady.mx.

**** Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás, N.L. norma@microbiosymas.com

En esta presentación se aborda la situación actual de la microbiología sanitaria en nuestro país, en la que se incluye la prevalencia de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) y su relación con las normas ofi-

ciales mexicanas, el importante papel que desempeñan los manejadores de alimentos y finalmente se presenta los métodos modernos y nuevas tendencias en el análisis microbiológico de los alimentos.

Enfermedades transmisibles por alimentos y las normas oficiales mexicanas: ¿Un problema de salud pública resuelto?

A la satisfacción de la necesidad biológica y al placer por el consumo de los alimentos, inevitablemente se asocia un riesgo a la salud, generado por factores químicos, físicos y biológicos, éstos últimos son aquellos cuyo agente etiológico es un microorganismo o productos de su metabolismo, que llegan al individuo a través del consumo de alimentos contaminados.

Tanto los productores como los comerciantes, y aún en el hogar, no se suele dar a la inocuidad de los alimentos, la importancia relevante acorde con los efectos que tienen en la población. Esta desatención trae como consecuencia la presentación de enfermedades transmisibles por alimentos (ETAs), principalmente de etiología microbiana.¹ El problema de las ETAs, no es exclusivo de países como el nuestro, aunque con matices distintos, se presenta en todo el mundo, incluso en países desarrollados, que destinan considerables recursos para generar y asegurar la inocuidad de los alimentos. Tal situación se presenta en EUA, en donde el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC), estima que anualmente se presentan 80 millones de casos de ETAs; de los cuales aproximadamente 350 mil ameritan hospitalización y de ellos fallecen alrededor de 5 mil. El costo estimado de estos padecimientos es de alrededor de 10 mil millones de dólares.¹³ En países en vías de desarrollo, esta desatención es más acentuada. Oficialmente, en nuestro país se presentan alrededor de 5.7 millones de casos de diarrea al año, aunque se desconoce cuántos de ellos tienen como origen el consumo de alimentos contaminados (Boletín Semanal de Epidemiología, Secretaría de Salud, México). Fernández-Escartín,⁷ ha estimado que en México el número de casos de ETAs asciende a más de 350 millones por año, alrededor de cuatro veces más que el número de casos que se presentan en EUA, lo que generaría un costo económico muy elevado.

Para garantizar la inocuidad de los alimentos, los productores y las autoridades sanitarias realizan actividades como análisis de alimentos, verificación de establecimientos, cumplimiento de normas y reglamentos. Estos procedimientos son muy limitados entre otras cosas debido a la representatividad de las muestras, tiempo de estancia y cambios de actitud en el personal durante la verificación, etc.

Así, para garantizar la producción de alimentos inocuos, es necesario: 1. Conocer las fuentes y mecanismos de contaminación a los alimentos. 2. Realizar estudios acerca del des-

tino final de los microorganismos en los alimentos. 3. Realizar estudios epidemiológicos de ETAs completos, que generen información acerca de alimentos más frecuentemente involucrados, patógenos más frecuentes, fuentes y mecanismos de contaminación, dosis infectiva, factores desencadenantes, etc. De esta forma se contará con información fehaciente y se podrán tomar medidas preventivas adecuadas para la prevención de estos episodios. Por ejemplo, en EUA se cuenta con los siguientes datos.²

1. Alimentos epidemiológicamente implicados en brotes de ETAs: carne (incluyendo aves), pescados y mariscos, y frutas y verduras.
2. Lugares donde con mayor frecuencia se presentan los brotes de ETAs son: restaurante/café, hogar, escuela, iglesia, día de campo y campamento.
3. Factores desencadenantes de los brotes: temperatura de almacenamiento inapropiada, pobre higiene personal, cocimiento inadecuado, equipo contaminado y alimento de fuente insegura.

La aparición de algunas normas oficiales (no más de 40 de ellas), en el área de la inocuidad microbiana de los alimentos, tiene como objetivo el proteger la salud del consumidor. No obstante requieren ser actualizadas y deben considerar estudios realizados en nuestro país, ya que la mayoría de ellas toman como referencias normas de los EUA.

Finalmente es importante destacar que el análisis microbiológico del alimento elaborado no es suficiente para garantizar su inocuidad. En la actualidad, se han desarrollado sistemas operativos que sólo difieren en acciones menores, pero que parten de principios similares y se encaminan hacia objetivos comunes. Entre estos se encuentra el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP por sus siglas en inglés).⁷ Su principal objetivo es prevenir las ETAs mediante el control de todas las etapas del procesamiento de los alimentos, desde la producción hasta su consumo. Para ello se requiere un amplio acervo de información técnica y un vasto conocimiento acerca de la ecología de los microorganismos con significado sanitario y de su comportamiento en los alimentos. El sistema también requiere la intervención de expertos que simplifiquen la información con el fin de que la puedan aplicar personas no especializadas.¹⁴

Prevalencia del gen *spvB* en cepas de *Salmonella* spp. Aisladas de manejadores de alimentos con y sin diarrea

El 85% de las infecciones originadas por *Salmonella* spp se asocia a bebidas o alimentos contaminados. La manipulación de alimentos, sobre todo por portadores asintomáticos que los contaminan a través de la vía fecal-oral origina a menudo brotes epidémicos (restaurantes, banquetes).⁸ Por lo que la gastroenteritis puede ser prevenida con un manejo adecuado en la preparación de alimentos, y por ello, los esfuerzos para el control de las infecciones por *Salmonella* debería de enfocarse en detectar la bacteria en alimentos y en educar a las personas involucradas en la preparación de alimentos y en el correcto manejo de los mismos.

Las salmonelas producen varios factores de virulencia, entre los que se destacan los plásmidos de virulencia.¹⁰ Éstos varían en tamaño, dependiendo del serotipo, pero tienen una región altamente conservada de 8 Kb como responsable de su virulencia,¹⁵ la cual contiene un grupo de cuatro genes estructurales, *spvA*, *spvB*, *spvC* y *spvD*, que son transcritos como un operón y son regulados "in vitro" durante la fase estacionaria de crecimiento y por el medio ambiente intracelular.⁴ Matsui y cols.¹² determinaron que los genes *spvB* y *spvC* pueden remplazar la virulencia del plásmido completo en el serotipo *Typhimurium* después de ser inoculados subcutáneamente en ratones. La proteína SpvB es una ADP ribosiltransferasa y parece ser la principal responsable de la virulencia del locus *spv*.¹¹ Por esta razón, sólo se estudió la prevalencia del gen *spvB* en cepas de *Salmonella* spp para establecer si estaba relacionado con la presencia de diarrea, ya que hasta ahora sólo se ha establecido en modelos animales.

En el presente trabajo se estudiaron 229 cepas de *Salmonella* spp aisladas de manipuladores de alimentos con y sin diarrea, 87 y 142 respectivamente. También se utilizaron cepas testigo; una positiva que presentaba el plásmido *spv* y una negativa, sin él. Todas las cepas fueron tipificadas en el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la SSA. Se purificó el ADN plasmídico de todas cepas de acuerdo al método descrito por Engebrecht y cols.⁵ La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aplicó de acuerdo con Kramer y Coen¹⁰ para amplificar un fragmento de aproximadamente 200 pb del gen *spvB* y en todas las reacciones se pusieron los controles. Todos los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los resultados se visualizaron mediante la observación del gel teñido con bromuro de etidio en un transluminador de luz ultravioleta (Fig. 1). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de χ^2 del programa estadístico Epi-stat.

Se identificaron más de 30 serotipos diferentes, entre los más frecuentes en orden descendente: *S. Agona*, *Meleagri-*

dis, *Anatum*, *Typhimurium*, *Havana*, *Mbandaka*, y otros. De las 87 cepas aisladas de manejadores de alimentos que presentaron diarrea, a 30 (34.5%) se les detectó el gen *spvB* y a las 57 (65.5%) restantes no. De las 142 cepas de manipuladores de alimentos sin diarrea, a 62 (43.7%) se les detectó el gen *spvB* y a las otras 80 (56.3%) no. De esta forma, un total de 92 (40.2%) cepas amplificaron el gene *spvB* mientras que en 137 (59.8%) no se observó que existiera una relación estadísticamente significativa entre la presencia del gen *spvB* y la presencia de diarrea en los manipuladores de alimentos ($\chi^2 = 1.528601$ y $p = 0.2163226$).

Salmonella es una bacteria ampliamente estudiado por el cuadro patológico que desarrolla en el huésped, que continúa abriendo interrogantes debido al mecanismo de ac-

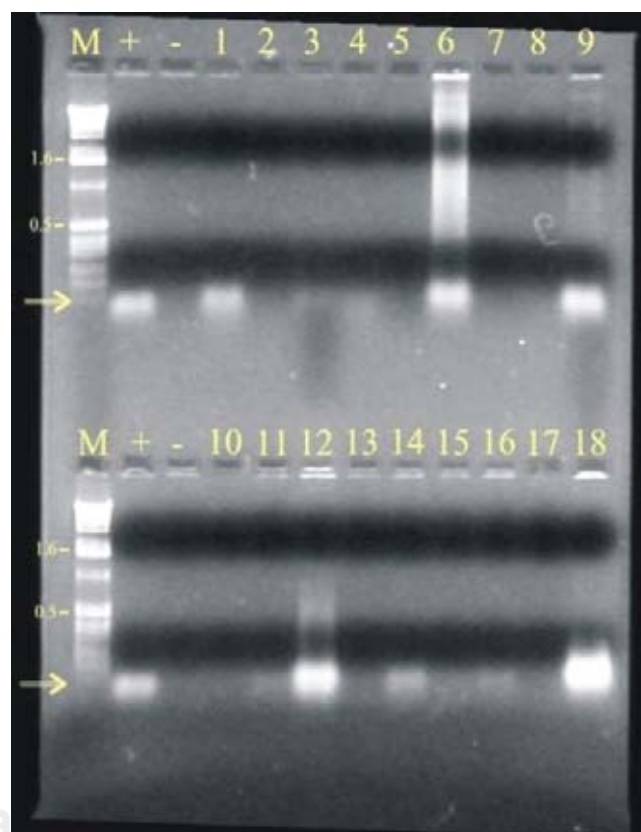


Figura 1. Amplificación del gen *spvB* de cepas de *Salmonella* spp aisladas de manejadores de alimentos. Se observan los fragmentos de aproximadamente 200 pb. (M) Marcador (1 Kb DNA Ladder); (+) control positivo, cepa de *Salmonella* *spvB*⁺; (-) control negativo, cepa de *Salmonella* *spvB*⁻; y (1-18) diferentes cepas de *Salmonella* estudiadas.

ción de los factores de virulencia expresados durante la infección. Uno de éstos, son los plásmidos asociados a la virulencia, denominados *spv*. Se sabe que existe una fuerte relación entre la presencia de estos plásmidos y la septicemia, pero no existen suficientes estudios que demuestren su relación con la diarrea en humanos.

Por esta razón, en este trabajo se quería demostrar la relación que guardaban estos plásmidos con la presencia de diarrea en personas relacionadas en la preparación de alimentos, que son un grupo involucrado en la diseminación del microorganismo cuando se trata de portadores asintomáticos. En un estudio realizado por Matsui¹² se demostró que la sola presencia de los genes *spvB* y *spvC* son suficientes para conferir la virulencia del plásmido completo en el serovar *Typhimurium*, por este motivo se procedió a la detección del gene *spvB*, tratando de demostrar la relación que jugaba el plásmido *spv* con la diarrea.

En un estudio realizado por Concha y cols.³ en población infantil, en el que se investigó la frecuencia del gene *spvB* en niños con y sin diarrea, encontraron que sí había una relación entre la presencia del gene *spvB* con el proceso diarreico, y que además existía una relación con los serotipos *Typhimurium* y *Enteritidis*, que fueron los más frecuentes. En este trabajo únicamente se aislaron 22 cepas pertenecientes a estos dos serotipos, por lo que se consideró que existía una menor frecuencia del gene *spvB*.

Es importante resaltar que hay un número elevado de cepas aisladas de manejadores de alimentos sin diarrea que contienen al plásmido, lo que nos indicaría que la presencia del mismo no garantiza la transformación del microorganismo en patógeno sino que posiblemente se encuentren involucrados otros mecanismos de virulencia.

Nuevas tendencias en el análisis microbiológico de alimentos

Armida Zúñiga Estrada, Fausto Tejeda Trujillo, Fanny Concha Valdéz y Norma Heredia-Rojas.

Los métodos rápidos y la automatización en microbiología es un campo de estudio dinámico que conjunta la utilización de métodos microbiológicos, bioquímicos, fisiológicos, inmunológicos, serológicos y moleculares para el aislamiento, la detección, caracterización y enumeración rápida de microorganismos y sus productos. El avance reciente de muchos de estos métodos, ha sido posible gracias a los avances tecnológicos de los microprocesadores y las computadoras. Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen uno de los problemas más diseminados del mundo contemporáneo, la gran mayoría de las cuales tiene un origen microbiológico, por lo que la búsqueda de métodos rápidos que puedan asegurar una buena calidad de los productos es una necesidad real. En los últimos 25 años los microbiólogos de alimentos han empezado a adaptar técnicas rápidas y automatizadas en sus laboratorios y actualmente existe un gran interés por su búsqueda y su utilización rutinaria.

Un método rápido es aquel que es más rápido, sencillo o confiable que lo convencional. El hablar de metodologías rápidas es algo subjetivo. Sin embargo, en lo que todos concuerdan es que estos métodos han revolucionado y lo seguirán haciendo, la forma de realizar los análisis microbiológicos.

Aunque un método rápido pueda ser llevado a cabo en un tiempo muy corto, como es el caso de un ensayo serológico, siempre se partirá de un cultivo aislado o de un medio de enriquecimiento, lo cual alargará el tiempo real del ensayo de 24 a 48 h. Los métodos rápidos también tienen otras limitaciones como la aparición de tecnologías nuevas que

requieren de tiempo para estandarizarse, en la mayoría de los casos se requiere confirmación de resultados positivos, además que se debe tomar en cuenta las interferencias debidas a los componentes del alimento. Los métodos moleculares se basan en la detección del gen no de su actividad, lo que no nos demuestra que en ese momento el gen de interés esté activado. Los ensayos rápidos normalmente están dirigidos hacia un solo microorganismo y en la mayoría de los casos, se requiere buscar a un grupo de microorganismos, lo que eleva el costo final del análisis.⁶

Otra dificultad radica en que existen numerosos ensayos, lo cual hace difícil la selección del más adecuado y también que muy pocos métodos se encuentran validados, lo que hace difícil también su utilización. A continuación se describirán brevemente algunos de estos métodos que se emplean frecuentemente:

Sistemas de cuantificación microbiológica.

1. Sistemas modificados de siembra en placas: Utilizan placas ya preparadas en diferentes formatos que permiten detectar y en ocasiones enumerar microorganismos específicos, tales como las placas 3M™ Petrifilm™ y el sistema Simplate.
2. El sistema de estriado en espiral, en donde en una misma placa de cultivo se tienen 5 diluciones, minimizando trabajo y reactivos.
3. Sistemas basados en impedancia (resistencia al flujo de una corriente alternante que es pasada a través de un material

conductor) / conductancia, en donde se mide el cambio de corriente eléctrica en un medio de cultivo, el cual varía como resultado de variaciones metabólicas, tal como el Rabbit Impedance Detection System y el sistema Mathus.⁹

Sistemas de identificación microbiana. Existen muchos métodos, algunos de ellos son:

1. Los sistemas de identificación bioquímica como una modificación a las técnicas tradicionales, tal como los sistemas Api o Microbac que comprenden celdillas con pruebas bioquímicas en miniatura.⁶
2. Sistemas que detectan actividad enzimática, los cuales no requieren que el microorganismo crezca mucho, por lo que en 2 horas podemos tener resultados preliminares. Este principio es utilizado por el sistema Micro-ID.
3. Sistemas automatizados que se basan en el perfil bioquímico (Vitek 2) o en la utilización de fuentes de carbono (Biolog).

Sistemas de identificación mediante métodos moleculares. Los más comunes y que actualmente están en el mercado incluyen:

1. Sistemas basados en la reacción de PCR, que contienen todos los constituyentes para que se lleve a cabo la reacción (BAX[®], GDS).
2. Sistemas basados en PCR de tiempo real (BioRad) que también contienen todos los ingredientes para una reacción exitosa.
3. Sistema de identificación automatizada basada en la secuencias de RNA 16s (RiboPrinter[®] Microbial Characterization System).
4. Sistemas basados en microarreglos en donde con un solo "chip" se pueden medir una gran cantidad de características genéticas (recién salido el sistema Biolog que se basa en características fenotípicas).

Métodos inmunológicos para detección y/o cuantificación de microorganismos. Estos métodos están sumamente difundidos.⁹ Algunos de los ensayos ofrecidos actualmente incluyen:

1. Sistemas basados en reacciones de inmunoprecipitación como el sistema 1-2 Test, el sistema VIP.
2. ELISA/ELFA: Existe una amplia variedad de ensayos con este principio (EIA, Tek, TECRA, VIDAS). Existe una amplia variedad de ensayos disponibles, la principal dificultad para su utilización radica en la selección adecuada del método ideal para el análisis particular que se requiere, por lo que en este aspecto se sugiere que siempre se evalúen varios y se determine en forma particular cuál es el más adecuado.

REFERENCIAS

1. Archer D.L. & J.E. Kvenberg. 1985. Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the United States. J. Food Prot. 48:887-894.
2. Bean N.H., J.S. Goulding, J.C. Lao & F.J. Angulo. 1996. Surveillance for foodborne-disease outbreaks in United States. 1988-1992. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45 No. SS-5.
3. Concha F., J. Flores, M.A. Puc & M. Heredia. 2004. Frecuencia del gen spvB en cepas de *Salmonella* spp aisladas de niños con y sin diarrea. Rev Biomed; 15:201-206.
4. El-Gedaily A., G. Paesold & M. Krause. 1997. Expression profile and subcellular location of the plasmid-encoded virulence (Spv) proteins in wild-type *Salmonella* dublin. Infect. Immun. 65:3406-3411.
5. Engebrecht J., R. Brent & M.A. Kaderbhai. 1995. Minipreps of plasmid DNA, pp.16-18. En: F. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds). Short protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc., USA.
6. Feng P. 2001. Development and impact of rapid methods for detection of foodborne pathogens. In: Doyle, M.P., L.K.R. beuchat and T.J., Monville (Eds). Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers, 2nd Edition. ASM Press, Washington DC pp. 773-774.
7. Fernández-Escartín E. 2000. Microbiología e inocuidad microbiana de los alimentos. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro.p. 392-395.
8. Goosney D.L., D. Knoechelmand & B. Finlay. 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Shigella*: Masters of host cell cytoskeletal exploitation. Emerg. Infect. Dis. 5:216-220.
9. Heredia N.L. & S. Garcia. 2004. Métodos rápidos de diagnóstico. En: Morales, A., I.O. Martínez, G.Alvarez and S. Lozano (Eds). Manual para el diagnóstico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR. Editado por el INIFAP. ISSN 1405-1915. pp. 29-33
10. Kramer M.F. & D.M. Coen. 1995. Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard procedure and optimization. pp.3-5. En: F. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl (Eds). Short protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc., USA.
11. Marcus S.L. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microb. Infect. 2:145-156.
12. Matsui H. 2001. Virulence plasmid-borne spvB and spvC can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. J. Bacteriol. 183:4652-58.
13. Olsen S.J., L.C. McKinnon, J.S. Goulding, N.H. Bean & L. Slutsker. 2000. Surveillance for foodborne-disease outbreaks -United States, 1993-1997. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 49/SS-1:1-63.
14. Tompkin R.B. 1990. The use of HACCP in the production in mat and poultry products. J. Food Prot. 53:795-803.
15. Tsois R.M. 1999. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. Infect. Immun. 67:4879-4885.

Correspondencia:

Armida Zúñiga-Estrada

Centro de Investigaciones Químicas.
Universidad Autónoma del Estado
de Hidalgo y Laboratorio Estatal de
Salud Pública. Secretaría de Salud de
Hidalgo. Pachuca, Hidalgo.
zunigae@uaeh.reduaeh.mx