

Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera.¹

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli*. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden conducir a otros padecimientos; por ejemplo, es posible que una infección con la cepa O157:H7 de *E. coli* provoque el síndrome hemolítico urémico (SHU) con secuelas de insuficiencia renal crónica.¹

Las ETA constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su ocurrencia, el surgimiento de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables, el aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y el impacto socioeconómico que ocasionan. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de

la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento²⁻⁴ o por el empleo de materia prima contaminada,^{5,6} pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado.

El control de los microorganismos causantes de ETA, por parte tanto de las autoridades sanitarias como de las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico que se utiliza para su detección.

La detección y la investigación de los brotes de ETA constituye uno de los principales retos para el Sistema de Salud Pública, pues requiere obtener, de manera oportuna y eficaz, información médica (datos personales, síntomas, etc.) y análisis de laboratorio de los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en su elaboración e, incluso, de las manos de las personas involucradas en la manipulación del alimento.

Tradicionalmente, las infecciones se diagnostican mediante el cultivo de muestras de alimentos que se suponen contaminados y la identificación de las bacterias que crecen en los medios de cultivo, con base en criterios morfológicos y fisiológicos que quizá dependan de factores ambientales o genéticos.⁷ Por otro lado, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en

un estado viable pero no cultivable (VPNC), debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Además, la obtención de resultados puede tomar días^{8,9} o semanas;^{10,11} por ejemplo, los métodos convencionales para la detección de *Salmonella* requieren de 3 a 4 días para indicar resultados negativos y más de siete para confirmar un resultado positivo.¹²

Un alto porcentaje de los casos de ETA no puede asociarse con algún alimento en particular o no es factible identificar al patógeno responsable, debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran; asimismo, el vehículo alimentario implicado ya no se encuentra disponible para su análisis, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal.

Recientemente, se han desarrollado varios procedimientos alternativos para la tipificación y la identificación de bacterias. Uno de ellos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que consiste en la amplificación selectiva de una secuencia blanco flanqueada por secuencias cortas de polinucleótidos (usualmente de entre 10 y 30 nucleótidos) llamadas iniciadores o cebadores.

El éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos causantes de ETA de-

pende, entre otros factores, de la elección correcta de la secuencia blanco, la cual debe permitir la identificación del microorganismo de interés, independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN procedente de microorganismos concomitantes o de la muestra misma.

Las regiones genómicas más comúnmente empleadas en el diseño de cebadores para la identificación de microorganismos patógenos son las relacionadas con los genes que codifican para toxinas y proteínas antigénicas específicas. En la detección y el diagnóstico de *E. coli*, por ejemplo, las secuencias blanco por excelencia han sido los genes que codifican para las dos variantes de la toxina Shiga, STX1 y STX2,^{13,14} aunque también se han utilizado genes que codifican para proteínas de virulencia accesorias como el *eaeA* (intimina) y el *hlyA* (hemolisina).¹³⁻¹⁸

En la práctica, cuando se aplican las técnicas de PCR al análisis de ácidos nucleicos en matrices complejas como los alimentos, la eficiencia de la amplificación puede reducirse significativamente por la presencia de sustancias inhibitorias como la hemoglobina, la lactoferrina, los polisacáridos, las grasas o las proteínas.^{9,19} 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.^{20,21}

La detección y la identificación de los patógenos implicados en las ETA es una parte fundamental de la vigilancia epidemiológica, por lo que es necesario estandarizar las técnicas a fin de implementar la vigilancia y el control de dichos microorganismos y prevenir las enfermedades que producen.

Durante la última década se han reportado numerosos ensayos de PCR para la detección de microorganismos patógenos en matrices alimenticias, pero ninguno ha sido validado por

laboratorios diferentes para su uso cotidiano, lo que dificulta la reproducibilidad de los resultados entre distintos grupos de trabajo.²²⁻²⁴

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 enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* en alimentos.²² 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.

La detección y la prevención de ETA depende del esfuerzo conjunto de las autoridades normativas, sanitarias, industriales y educativas, cuyas investigaciones objetivas y detalladas conlleven a una disminución en los riesgos de contaminación de los alimentos. Para garantizar a los consumidores un alimento seguro e higiénico, es necesario el control de los microorganismos patógenos en todas las etapas de la producción, lo que implica disponer de métodos de diagnóstico que no sólo sean rápidos y sensibles, sino, sobre todo, altamente específicos. Los métodos clásicos de diagnóstico bacteriológico son laboriosos, requieren tiempo y no es posible identificar todas las cepas aisladas, por lo cual la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones. El desarrollo y la automatización de los métodos de PCR abren una gran oportunidad para su aplicación como herramientas analíticas en microbiología y control de calidad de los alimentos, debido a su rapidez, alta sensibilidad y eficiencia para la de-

tección temprana de los patógenos. De ese modo, contribuirán notablemente a la prevención tanto de ETA como de sus consecuencias.

Mtra. Tania González Flores,
Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera,
Unidad Sureste del Centro
de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño
del Estado
de Jalisco, A. C.
Guadalajara, Jalisco, México.

Referencias

1. Rosas GA, Acosta VM. Manual de manejo higiénico de los alimentos. Mexico, D.F.: Secretaría de Salud, 2001.
2. Autio T, Hielm S, Miettinen M, Jöberg A-M, Aarnisalo K, Björkroth J et al. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:150-155.
3. Hyttiä E, Hielm S, Björkroth J, Korkeala H. Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E strains isolated from fish and fishery products. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2057-2064.
4. Millemann Y, Gaubert S, Remy D, Colmin C. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *yphimurium* bovine isolates from farm meat. *J Clin Microbiol* 2000;38:2204-2209.
5. Hielm S, Björkroth J, Hyttiä E, Korkeala H. Prevalence of *Clostridium botulinum* in finnish trout farms: Pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:4161-4167.
6. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L et al. 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* 2002;68:5870-5876.
7. Scheu P, Berghof K, Stahl U. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol* 1998;15:13-31.
8. Herman L, De Block J, Waes G. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:4141-4146.
9. Gentry-Weeks C, Hutcheson H, Kim L, Bolte D, Traub-Dargatz J, Morley P et al. Identification of two phylogenetically related organisms from feces by PCR for detection of *Salmonella spp.* *J Clin Microbiol* 2002;40:1487-1492.

10. Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Denef J, Cocito C, Gala J. Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. paratuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol* 2000;38:3048-3054.
11. Bannantine J, Baechler E, Zhang Q, Li L, Kapur V. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis with *Mycobacterium avium* subsp. avium reveals potential diagnostic sequences. *J Clin Microbiol* 2002;40:1303-1310.
12. Bhagwat A. Rapid detection of *Salmonella* from vegetable rinse-water using real-time PCR. *Food Microbiol* 2004;21:73-78.
13. Reischl U, Youssef M, Kilwinski J, Lehn N, Zhang W, Karch H et al. Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2002;40:2555-2565.
14. Wang G, Clark C, Rodgers F. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:3613-3619.
15. Fagan P, Hornitzky M, Bettelheim K, Djordjevic S. Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:868-872.
16. Paton A, Paton J. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111 and rfbO157. *J Clin Microbiol* 1998;36:598-602.
17. Franck S, Bosworth B, Moon H. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microbiol* 1998;36:1795-1797.
18. Normanno G, Dambrosio P, Quaglia N, Montagna D, Chiocco D, Celano G. Typing of *Escherichia coli* O157 strains isolated from fresh sausage. *Food Microbiol* 2004;21:79-82.
19. Fach P, Popoff M. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4232-4236.
20. Lampel K, Orlandi P, Kornegay L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:4539-4542.
21. Wilson I. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:3741-3751.
22. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: Towards an international standard. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:290-296.
23. Lubeck P, Wolffs P, On S, Ahrens P, Radstrom P, Hoorfar J. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: Assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5664-5669.
24. Lubeck PS, Cook N, Wagner M, Fach P, Hoorfar J. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: Validation in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5670-5672.