

**Análisis comparativo de técnicas de PCR en la detección de *Escherichia coli*, en
leche cruda y productos lácteos procesados**

Marisol Villalobos Hernández

Luz Ángela Puerto González

Asesora

Dra. Carolina Riascos Cuero

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería ECBTI
Programa de Biotecnología Alimentaria

2025

Declaración de Derechos de Propiedad Intelectual

Los autores de la presente propuesta manifestamos que conocemos el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conocemos el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de esta monografía. En primer lugar, agradecemos a nuestros asesores, por su guía, apoyo constante y valiosas recomendaciones durante todo el proceso de investigación y redacción.

También agradecemos a nuestros familiares y amigos, por su comprensión, paciencia y motivación, que fueron fundamentales para mantenernos enfocadas y perseverantes.

A todos ustedes, nuestro más profundo reconocimiento y gratitud.

Resumen

La presente monografía abordó el estudio y aplicación de las técnicas moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la detección de *Escherichia coli* (*E. coli*) en leche cruda y sus derivados procesados, destacando su relevancia en el aseguramiento de la inocuidad alimentaria dentro de la industria láctea. Este trabajo buscó evidenciar cómo la biotecnología, a través de herramientas moleculares avanzadas, permite fortalecer los sistemas de diagnóstico, control sanitario y trazabilidad en la producción de alimentos. Durante el desarrollo del documento se realizó una revisión teórica y técnica sobre la evolución de la PCR, sus variantes más utilizadas (convencional, en tiempo real, multiplex y digital), así como las técnicas híbridas que combinan la amplificación genética con métodos de separación inmunomagnética, biosensores y análisis en tiempo real. Estas tecnologías demostraron una capacidad superior para detectar y cuantificar la *E. coli* con alta sensibilidad, reduciendo significativamente los tiempos de diagnóstico en comparación con los métodos microbiológicos tradicionales mejorando la trazabilidad, la rapidez y la confiabilidad de los controles sanitarios, contribuyendo a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos.

El análisis comparativo realizado evidenció que la PCR en tiempo real (qPCR) y la PCR multiplex constituyen las herramientas más eficientes para el control microbiológico en productos lácteos, al permitir la identificación simultánea de múltiples genes de virulencia o resistencia y proporcionar resultados cuantitativos en pocas horas. No obstante, el estudio reconoció que las variantes más avanzadas, como la PCR digital (dPCR) o la PCR-HCR, aunque ofrecen alta precisión y sensibilidad, aún presentan limitaciones por sus elevados costos y requerimientos tecnológicos. Asimismo, el documento incluyó un análisis bibliométrico del

rendimiento científico global, evidenciando un crecimiento sostenido en las investigaciones relacionadas con el uso de la PCR en la detección de *E. coli*.

Palabras claves: Inocuidad alimentaria, Detección molecular, PCR, *Escherichia coli*, análisis del ADN.

Abstract

This monograph addressed the study and application of Polymerase Chain Reaction (PCR) molecular techniques in the detection of *Escherichia coli* (*E. coli*) in raw milk and its processed derivatives, highlighting their relevance in ensuring food safety within the dairy industry. This work sought to demonstrate how biotechnology, through advanced molecular tools, can strengthen diagnostic, health control, and traceability systems in food production. During the development of the document, a theoretical and technical review was conducted on the evolution of PCR, its most commonly used variants (conventional, real-time, multiplex, and digital), as well as hybrid techniques that combine genetic amplification with immunomagnetic separation methods, biosensors, and real-time analysis. These technologies demonstrated a superior ability to detect and quantify *E. coli* with high sensitivity, significantly reducing diagnostic times compared to traditional microbiological methods, improving the traceability, speed, and reliability of health controls, and contributing to the prevention of foodborne diseases.

The comparative analysis showed that real-time PCR (qPCR) and multiplex PCR are the most efficient tools for microbiological control in dairy products, as they allow the simultaneous identification of multiple virulence or resistance genes and provide quantitative results in a few hours. However, the study acknowledged that more advanced variants, such as digital PCR (dPCR) or PCR-HCR, although offering high precision and sensitivity, still have limitations due to their high costs and technological requirements. The document also included a bibliometric analysis of global scientific performance, showing sustained growth in research related to the use of PCR in the detection of *E. coli*.

Keywords: Food safety, Molecular detection, PCR, *Escherichia coli*, DNA analysis

Tabla de Contenido

Introducción	16
Planteamiento del Problema	18
Justificación.....	20
Objetivos	22
Objetivo General	22
Objetivos Específicos	22
Marco Teórico	23
Inocuidad Alimentaria y Detección Molecular en la industria Láctea.	23
Características y Beneficios Nutricionales de la Leche.	24
Factores de Contaminación en Productos Lácteos.	26
Calidad de la Leche Cruda.	26
Procesamiento y Manipulación.	26
Condiciones de Almacenamiento.	27
Fermentación y Cambios Químicos.	27
Normatividad y Gestión de la Cadena Láctea.	28
Métodos de Control y Técnicas de Detección.	28
Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).	29
Pasteurización y Tratamientos Térmicos.	29
Tratamientos no Térmicos.	30
Técnicas para la Detección de Patógenos.	30
Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA).	32

Escherichia coli	32
Listeria monocytogenes	33
Salmonella spp.	34
Campylobacter jejuni	34
Staphylococcus aureus.	34
Técnicas de Cultivo Microbiológico.	35
Técnicas Moleculares de PCR para la Detección de Microorganismos.....	35
Normativas Nacionales e Internacionales que Regulan la Seguridad Alimentaria.	36
Metáfora del Árbol de la Ciencia.	37
Análisis Bibliométrico.....	38
Metodología	40
Estrategia de Búsqueda de Información	40
Criterios de Inclusión y Exclusión.	41
Criterios de inclusión.	41
Criterios de exclusión.....	41
Análisis Bibliométrico.....	41
Clasificación de Artículos: Metáfora del Árbol de la Ciencia.	42
Evaluación Crítica de las Técnicas de PCR.	42
Análisis Comparativo de Ventajas y Desventajas.	42
Impacto y Relevancia del Análisis.	43
Técnicas Moleculares de PCR Utilizadas para la Detección de <i>E. coli</i> en la Industria Láctea	43

PCR Convencional.....	43
Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	44
Ejemplos de PCR Convencional en la Detección de <i>E. coli</i>	48
PCR-IMS (PCR con Separación Inmunomagnética).	51
Inmunomagnética (IMS), Propidio Monoazida (PMA) y PCR Convencional.	53
ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR) y la RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA PCR).....	54
PCR-ELISA.....	54
PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction PCR).....	56
PCR Convencional Combinada con Perlas Magnéticas Funcionalizadas con Polilisina (PLL-MB-PCR).	57
PCR en Tiempo Real (qPCR).....	59
Ejemplos de qPCR en la detección de <i>E. coli</i>	60
Inmunomagnética Combinada con PCR en Tiempo Real (IMS-RTiPCR).	61
HRM-PCR (High-Resolution Melting PCR).	62
PCR Múltiplex.....	63
Ejemplos de PCR Multiplex en la detección de <i>E. coli</i>	64
Inmunoensayo de Flujo Lateral, Basado en PCR Multiplex.	67
PCR Multiplex en Tiempo Real.	68
RT – PCR.....	71
Ejemplos de RT-PCR en la detección de <i>E. coli</i>	72

La PCR Anidada.....	73
Ejemplos de PCR Anidada en la Detección de E. coli	74
Ventajas y Desventajas de las Técnicas Moleculares de PCR para la Detección de <i>Escherichia coli</i> en Leche Cruda y Productos Lácteos Procesados.....	76
PCR Convencional.....	76
PCR en tiempo real (qPCR).....	79
PCR Multiplex.....	81
Inmunomagnética (IMS) Acoplada a la PCR.....	84
PCR-ELISA.....	85
PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction).....	85
Ventajas y Desventajas de las Técnicas de PCR Según los Autores y su Frecuencia de Uso en la Literatura.....	86
PCR en Tiempo Real (qPCR).....	87
PCR multiplex.....	87
PCR Multiplex en Tiempo Real.....	87
Inmunomagnética (IMS) Acoplada a PCR o qPCR.....	88
PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction).....	88
PCR digital.....	89
Análisis Bibliométrico del Rendimiento	90
Publicaciones y citas.....	90
Fuentes más Relevantes.....	94
Producción por Fuente a lo Largo del Tiempo.....	95
Autores más Relevantes.....	96

Indicadores de Producción y Citación.....	98
Conclusiones	103
Recomendaciones	105
Referencias Bibliográficas	106

Siglas y Abreviaturas

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ARN:** Ácido Ribonucleico
- BAL:** Bacterias Acido lácticas
- blaOXA:** Beta-lactamasa de clase D
- BlaTEM:** β -lactamasa tipo TEM
- BLEE:** Betalactamasas de espectro extendido
- BPG:** Buenas Prácticas Ganaderas
- BPM:** Buenas Prácticas de Manufactura
- DALYs:** Años de vida ajustados por discapacidad
- dNTP:** Nucleótidos de desoxirribonucleótidos trifosfatos
- dPCR:** Reacción en Cadena Polimerasa Digital
- E. coli:*** *Escherichia coli*
- EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EMA:** Etidio monoazida
- EPEC:** *E. coli* Enteropatógena
- ERIC-PCR:** PCR por secuencias consenso intergénicas de Enterobacterias
- ETA:** Enfermedades Transmitidas por Alimentos
- EtBr:** Bromuro de Etidio
- ETEC:** *Escherichia coli* Enterotoxigénica
- HPP:** Procesamiento por Alta Presión
- HRM-PCR:** PCR de Fusión de Alta Resolución
- IMS:** Inmunomagnética
- IMS-RTiPCR:** Inmunomagnética Combinada con PCR en Tiempo Real
- INVIMA:** Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
- LFIA:** Análisis Inmunocromatográfico de Flujo Lateral
- LOD:** Límite de Detección
- LPS:** lipopolisacárido
- MDR:** *E. coli* multirresistente
- ng/ μ L:** Nanogramos por mililitro

NGS: Secuenciación de Nueva Generación

NMP: Número Más Probable

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR-ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

PCR-HCR: PCR de Reacción en Cadena de Hibridación

PCR-IMS: PCR con Separación Inmunomagnética

PLL-MB-PCR: PCR Combinada con Perlas Magnéticas Funcionalizadas con Polilisina

PMA: tratamiento con Monoazide de propidio

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

RAPD-PCR: PCR de ADN Polimórfico Amplificado al Azar

REFP: patrón de fragmentación de enzimas de restricción

RT – PCR: Reacción en Cadena Polimerasa de transcripción Inversa

STEC: *E. coli* productora de toxina Shiga

Stx: Toxinas Shiga

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

UFC/mL: Unidad Formadora de Colonias por mililitro

UV: Luz Ultravioleta

UV-C: Radiación Electromagnética que proviene del sol

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Proceso de amplificación mediante la PCR</i>	46
Figura 2 <i>Producción Científica Anual</i>	91
Figura 3 <i>Producción por Fuente a lo Largo del Tiempo</i>	95
Figura 4 <i>Productividad Científica por País Scopus</i>	98
Figura 5 <i>Productividad Científica por Web ofscience</i>	100

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Términos clave</i>	40
Tabla 2 <i>Fuentes Más Relevantes</i>	94
Tabla 3 <i>Autores Más Relevantes</i>	97

Introducción

La seguridad alimentaria es un pilar fundamental en la salud pública y la industria de alimentos, especialmente en el sector lácteo, donde la presencia de microorganismos patógenos representa un riesgo significativo para los consumidores. Dentro de estos microorganismos, *Escherichia coli* (*E. coli*), particularmente sus cepas patógenas como *E. coli* O157:H7, ha sido identificada como una de las principales causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) debido a su capacidad para producir toxinas Shiga y generar afecciones graves como la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (OMS, 2021).

Los productos lácteos, incluidos la leche cruda y los productos procesados como quesos y yogures, pueden actuar como vehículos de transmisión de *E. coli*, especialmente cuando se comprometen las condiciones higiénico-sanitarias en la producción, procesamiento y almacenamiento. A pesar de la implementación de métodos tradicionales de detección microbiológica, como los cultivos en medios selectivos, estos presentan limitaciones en cuanto a tiempo de respuesta y sensibilidad, lo que dificulta la identificación temprana de patógenos en matrices alimentarias complejas (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014).

Ante estas limitaciones, las técnicas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han revolucionado la microbiología de los alimentos, permitiendo una detección rápida, específica y altamente sensible de *E. coli*. Existen diferentes variantes de PCR que han sido aplicadas con éxito en el diagnóstico de patógenos en productos lácteos, incluyendo; PCR Convencional, utilizada para la amplificación específica de genes diana en *E. coli*, PCR en Tiempo Real (qPCR), que permite cuantificar la carga bacteriana con alta precisión, PCR Multiplex, capaz de detectar múltiples genes de patogenicidad en una sola reacción, PCR

Digital (dPCR), una variante avanzada con mayor precisión en la cuantificación de ADN patógeno (Huang et al., 2022).

El objetivo de esta monografía fue el de analizar y comparar las técnicas moleculares de PCR empleadas para la detección microbiológica de *E. coli* en leche cruda y productos lácteos procesados a través de una revisión exhaustiva de la literatura científica. Para ello, se analizaron los avances en estas metodologías, sus ventajas y limitaciones en términos de sensibilidad, especificidad y aplicabilidad en la industria láctea.

El análisis de la literatura permitió identificar tendencias en la investigación, avances en el desarrollo de nuevas técnicas y la importancia de implementar estrategias de detección confiables para mejorar la seguridad de los productos lácteos. A su vez, esta revisión puede contribuir a la optimización de los protocolos de vigilancia microbiológica y la toma de decisiones en la industria de alimentos, favoreciendo la protección del consumidor y el cumplimiento de normativas internacionales de inocuidad alimentaria (FAO, 2021).

De igual manera buscó proporcionar una visión integral sobre la aplicación de técnicas moleculares en el control de calidad de la leche y sus derivados, destacando la importancia de metodologías eficientes en la detección de *E. coli* para mitigar los riesgos asociados a su presencia en los productos lácteos destinados al consumo humano.

Planteamiento del Problema

La inocuidad alimentaria es un pilar fundamental de la salud pública y la industria alimentaria, ya que la contaminación microbiana en los alimentos puede desencadenar brotes de enfermedades con graves consecuencias sanitarias y económicas. Dentro de los patógenos asociados a la contaminación de alimentos, *E. coli* se destaca como un microorganismo de interés debido a su impacto en la salud humana, su prevalencia en productos lácteos y su rol como indicador de contaminación fecal (Ranjbar et al., 2018).

En particular, la leche y sus derivados son altamente susceptibles a la contaminación microbiana debido a su composición nutricional rica en proteínas, grasas y minerales, que proporciona un ambiente ideal para el crecimiento bacteriano (González-Rodríguez et al., 2020). A pesar de la implementación de procesos como la pasteurización, la posibilidad de contaminación post-procesamiento sigue representando un riesgo, lo que hace necesaria la aplicación de herramientas de detección altamente sensibles y específicas (Griffiths, 2010).

E. coli es un microorganismo ampliamente utilizado como indicador, su presencia en la leche cruda y en productos lácteos sugiere fallas en las prácticas de higiene y puede estar asociada con la presencia de otros patógenos entéricos de mayor peligrosidad, como *Salmonella* spp. o *Listeria monocytogenes* (Rojas-Herrera & González-Flores, 2006).

Más allá de su rol como indicador, algunas cepas de *E. coli* poseen una gran relevancia clínica y epidemiológica. Dentro de estos grupos, se incluye cepas como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), entre otras, que son responsables de infecciones gastrointestinales graves en humanos. En particular, la cepa *E. coli* O157:H7 ha sido relacionada con brotes de síndrome urémico hemolítico (SUH), una afección que puede derivar en insuficiencia renal aguda, principalmente en niños y personas inmunocomprometidas

(Choi et al., 2011). La contaminación con *E. coli* en leche y productos lácteos ha sido documentada en numerosos estudios, con reportes de brotes en distintos países, lo que subraya la necesidad de mejorar los sistemas de monitoreo y control.

Además del impacto en la salud humana, *E. coli* es un patógeno relevante en la industria láctea debido a su asociación con la mastitis bovina, una de las enfermedades más frecuentes en el ganado lechero. La mastitis causada por *E. coli* no solo afecta la productividad y calidad de la leche, sino que también genera pérdidas económicas significativas para los productores debido a la reducción en la producción y el aumento de los costos de tratamiento y prevención (Gourlart & Mellata, 2022).

Ante estos factores, la detección precisa y temprana de *E. coli* en la leche cruda y los productos lácteos es esencial para garantizar la seguridad alimentaria. Tradicionalmente, los métodos microbiológicos han sido utilizados para la identificación de *E. coli*, sin embargo, estos presentan limitaciones en cuanto a tiempo de respuesta y sensibilidad (Hernández, 2020). En este sentido, el desarrollo de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), convierte al diagnóstico molecular en una herramienta fundamental para fortalecer el control sanitario de los alimentos, mejorar la seguridad alimentaria y prevenir brotes de enfermedades transmitidas por patógenos. (Huertas-Caro et al., 2019).

Este estudio permitió identificar las técnicas moleculares basadas en PCR que se han utilizado en la detección de *Escherichia coli* en leche cruda y productos lácteos procesados, junto con sus principales ventajas, limitaciones y aplicaciones prácticas en el control de calidad microbiológica, debido a que su implementación estratégica puede contribuir a la mejora de las prácticas diagnósticas y a la promoción de una mayor inocuidad alimentaria en el sector lácteo.

Justificación

La seguridad alimentaria es un aspecto crítico en la industria láctea, ya que la contaminación microbiológica representa un riesgo significativo para la salud pública. Entre los microorganismos patógenos asociados con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), *E. coli* es una de las principales bacterias de interés, debido a su potencial para causar infecciones graves, su presencia en leche cruda y productos lácteos procesados, y su utilidad como indicador de calidad microbiológica (Gómez et al., 2011).

La leche y sus derivados son productos altamente perecederos que pueden contaminarse en cualquier etapa de la cadena productiva. A pesar de la aplicación de procesos como la pasteurización, la posibilidad de recontaminación post-procesamiento subraya la importancia de métodos sensibles y específicos para la detección de patógenos. La detección de *E. coli* es crucial, ya que ciertas cepas como *E. coli* O157:H7 pueden causar enfermedades severas, incluyendo síndrome urémico hemolítico, que afecta especialmente a niños y personas inmunocomprometidas (OMS, 2021).

Los métodos microbiológicos tradicionales han sido la base para la detección de *E. coli*, pero presentan limitaciones como largos tiempos de respuesta y menor sensibilidad en muestras con baja carga bacteriana. En este contexto, las técnicas moleculares basadas en PCR han revolucionado la microbiología de alimentos, permitiendo una detección más rápida y precisa (Palomino-Camargo & González-Muñoz, 2014). La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) permite la amplificación específica del ADN de *E. coli*, facilitando su identificación con alta sensibilidad.

Existen diversas variantes de PCR que se han implementado para mejorar la detección de *E. coli* en productos lácteos: PCR convencional, utilizada para la detección cualitativa de la

presencia de genes específicos de *E. coli*. PCR en tiempo real (qPCR), que ofrece detección cuantitativa con mayor precisión y rapidez. PCR con transcripción inversa (RT-PCR), aplicada en el análisis de ARN para detectar genes expresados por bacterias activas. PCR múltiple, que permite detectar simultáneamente varios genes diana de diferentes patógenos en una misma reacción. PCR anidada, utilizada para aumentar la sensibilidad en muestras con baja concentración de ADN bacteriano (Palomino Camargo C. et al., (2014).

El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) en Colombia regula el control microbiológico de alimentos y ha promovido la estandarización de técnicas moleculares para la detección de patógenos en la industria láctea. Sin embargo, aún persisten desafíos en la optimización y selección del método más eficiente, dependiendo del tipo de muestra y los recursos disponibles (Huertas-Caro et al., 2019).

El estudio de Huertas- Caro et al., (2019) compara las técnicas moleculares de PCR más utilizadas para la detección de *E. coli* en leche cruda y productos lácteos procesados, con el fin de evaluar sus ventajas y limitaciones. Donde tradicionalmente su detección se ha realizado mediante métodos microbiológicos convencionales (cultivos, aislamiento, pruebas bioquímicas), aunque son confiables y de bajo costo, presentan limitaciones importantes, como el largo tiempo de obtención de resultados (de días a semanas) y una menor sensibilidad y especificidad. El estudio concluye que las técnicas moleculares representan una alternativa moderna y eficaz frente a los métodos convencionales, ya que ofrecen una mayor sensibilidad, especificidad y rapidez, reduciendo el tiempo de diagnóstico de días a horas y permitiendo la identificación de factores de patogenicidad, virulencia y resistencia a fármacos. Sin embargo, también se reconoce que su alto costo y la necesidad de personal capacitado y equipos especializados limitan su aplicación generalizada en todos los laboratorios.

Objetivos

Objetivo General

Analizar de forma comparativa las técnicas de PCR empleadas para la detección de *Escherichia coli* en leche cruda y productos lácteos procesados, a través de una revisión de bibliográfica.

Objetivos Específicos

Describir las técnicas de PCR que se han utilizado en la industria de alimentos lácteos con el fin de realizar la detección de *E. coli*.

Determinar las ventajas y desventajas de cada una de las técnicas de PCR que se han utilizado para la detección de *E. coli* en leche cruda y en productos lácteos procesados.

Desarrollar un análisis bibliométrico de las características de la bibliografía encontrada sobre las técnicas de PCR que se han utilizado para realizar la detección de *E. coli* en leche cruda y en productos lácteos procesados.

Marco Teórico

Inocuidad Alimentaria y Detección Molecular en la industria Láctea

La inocuidad alimentaria comprende el conjunto de principios, normas y prácticas destinadas a garantizar que los alimentos sean seguros para el consumo humano. Su propósito es identificar y controlar los peligros que puedan afectar la salud del consumidor, incluidos microorganismos patógenos, toxinas y otros agentes dañinos. En la industria alimentaria, la presencia de bacterias, virus, hongos y parásitos representa una amenaza significativa para la salud pública (Patange & Thorat, 2022). En este contexto, las técnicas moleculares se han consolidado como herramientas fundamentales para el control sanitario de los alimentos, debido a su rapidez, precisión y confiabilidad. A diferencia de los métodos microbiológicos tradicionales, que suelen ser más lentos y menos específicos, estas técnicas permiten detectar material genético de patógenos en pocas horas, lo que facilita una respuesta oportuna ante posibles riesgos de contaminación (Andrade et al., 2010).

Entre las metodologías más empleadas se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su variante en tiempo real (qPCR), que posibilitan la identificación de genes asociados a virulencia y resistencia antimicrobiana con un mínimo margen de error (Huertas-Caro et al., 2019). Su aplicación en la industria alimentaria permite detectar niveles muy bajos de contaminación antes de que los productos lleguen al consumidor, contribuyendo al fortalecimiento de los estándares de calidad. Asimismo, estas técnicas apoyan el cumplimiento de normativas internacionales orientadas a garantizar la inocuidad de los alimentos. Organismos como la Comisión del Codex Alimentarius y entidades regulatorias nacionales, como el INVIMA en Colombia, promueven el uso de métodos de detección rápidos para verificar la ausencia de

patógenos en productos alimentarios listos para consumo, fortaleciendo los sistemas de vigilancia y la confianza del consumidor (Codex Alimentarius, 2020; INVIMA, 2022).

En conjunto, el uso de técnicas moleculares constituye un pilar esencial para asegurar la inocuidad alimentaria, proteger la salud pública y cumplir con las exigencias regulatorias a nivel global, especialmente en productos de alto riesgo como los lácteos.

Características y Beneficios Nutricionales de la Leche

La leche es un alimento básico y esencial en muchas culturas, reconocida por su riqueza nutricional y su papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la salud humana. Su composición equilibrada en macronutrientes y micronutrientes la convierte en una fuente confiable de energía, proteínas, grasas y minerales esenciales. Uno de los beneficios más relevantes de la leche es su alto contenido de calcio, vital para el fortalecimiento óseo y la prevención de enfermedades como la osteoporosis (Li et al., 2023). Además, su consumo ha sido asociado a mejoras en el desarrollo muscular y la regulación del sistema inmune gracias a la presencia de bioactivos con propiedades antimicrobianas según la FAO (2021).

En este contexto, uno de los componentes más destacados de la leche son sus proteínas, las cuales representan aproximadamente un 3,2% de su composición total. Estas se dividen principalmente en dos grupos: las caseínas, que conforman alrededor del 80%, y las proteínas del suero, que representan el 20% restante. Las caseínas son esenciales en la coagulación durante la elaboración de productos lácteos fermentados, mientras que las proteínas del suero, como la lactoglobulina y la lactoalbúmina, tienen propiedades funcionales que las hacen valiosas tanto en la nutrición humana como en la industria alimentaria FDA (2023). Asimismo, estas proteínas son consideradas de alto valor biológico, ya que contienen todos los aminoácidos esenciales requeridos por el cuerpo humano. La leche se considera un alimento completo y equilibrado, con

una alta densidad de nutrientes respecto a su contenido calórico. Aporta proteínas de alto valor biológico, hidratos de carbono (principalmente lactosa), grasas, vitaminas A, B2, B12 y D, y minerales esenciales como calcio, fósforo y magnesio, todos ellos fundamentales para el crecimiento, la salud ósea, dental y el funcionamiento metabólico. (Fernández et al., 2015).

Complementando esta función proteica, la leche también contiene grasas que representan entre un 3,5% y 4,5% de su volumen total, dependiendo de factores como la raza del animal, su dieta y la etapa de lactancia. Estas grasas están compuestas por una mezcla compleja de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos. En particular, los ácidos grasos de cadena corta, como el ácido butírico, poseen propiedades antiinflamatorias y han sido asociados con beneficios metabólicos según la FDA (2023).

Finalmente, la leche destaca por ser una fuente natural de minerales esenciales. Entre ellos, el calcio sobresale por su función en la formación y mantenimiento de huesos y dientes, además de participar en procesos como la contracción muscular y la coagulación sanguínea. Junto a este mineral, el fósforo también cumple un rol importante en la salud ósea y la producción de energía celular. Por otra parte, el potasio contribuye al equilibrio de líquidos y la función cardíaca, mientras que el magnesio participa en múltiples reacciones enzimáticas del organismo. Además, la leche contiene oligoelementos como zinc, yodo y selenio, los cuales desempeñan funciones clave en la inmunidad y la función tiroidea. De acuerdo con Griffiths (2010), la biodisponibilidad de estos minerales es elevada gracias a la acción sinérgica de componentes como la lactosa y las caseínas, lo que convierte a la leche en un alimento estratégico para una nutrición adecuada, particularmente en etapas críticas del crecimiento humano.

Factores de Contaminación en Productos Lácteos

La contaminación microbiológica de los productos lácteos puede ocurrir en cualquier etapa de la producción debido a que la leche por su alta composición rica en agua, proteínas y azúcares, es altamente susceptible a la contaminación microbiológica en todas las etapas de la cadena productiva, desde la recolección de la leche hasta el almacenamiento y distribución del producto final. Diversos patógenos de interés en salud pública, como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.*, se han asociado con brotes transmitidos por lácteos (Oliver et al., 2005). Algunos de los factores que aumentan este riesgo incluyen:

Calidad de la Leche Cruda

La leche cruda constituye la primera fuente de riesgo. Su calidad depende de múltiples factores, incluyendo el estado sanitario de los animales, las condiciones de higiene en el ordeño y el ambiente de la producción. La leche no pasteurizada puede contener bacterias provenientes de vacas infectadas, equipos de ordeño mal higienizados o contaminación ambiental en las instalaciones de producción. Oliver et al., (2005) destacan que la contaminación cruzada ambiental por estiércol, polvo, agua contaminada y la persistencia de microorganismos en biofilms de equipos de ordeño son factores críticos que comprometen la inocuidad desde la fase primaria. El Codex Alimentarius (2020) establece que el cumplimiento de criterios microbiológicos desde la producción primaria es indispensable para reducir estos riesgos.

Procesamiento y Manipulación

El procesamiento industrial busca garantizar la seguridad mediante técnicas como la pasteurización, la fermentación y la maduración. Sin embargo, prácticas inadecuadas de higiene

durante la pasteurización, fermentación o maduración de productos lácteos pueden favorecer la proliferación de microorganismos patógenos (Oliver et al., 2005). Además, la recontaminación post-pasteurización es una amenaza constante si no se cumplen adecuadamente las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

Condiciones de Almacenamiento

El almacenamiento bajo refrigeración constituye una medida fundamental para prolongar la vida útil y preservar la inocuidad de los lácteos. No obstante, existen algunos patógenos que pueden sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de refrigeración, como *Listeria monocytogenes*, que son capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse en condiciones de frío, lo que representa un riesgo en productos como el queso blando y la leche fresca (Chen et al., 2022). En este sentido, el control estricto de la cadena de frío y la reducción de los tiempos de distribución y comercialización resultan esenciales para minimizar la proliferación de bacterias resistentes a bajas temperaturas.

Fermentación y Cambios Químicos

Durante la producción de yogur, la fermentación controlada, llevada a cabo por bacterias ácido-lácticas (BAL), es una estrategia tecnológica que contribuye a la seguridad de los productos lácteos fermentados. Estas bacterias convierten la lactosa en ácido láctico, reduciendo el pH y mejorando la seguridad del producto. Por otra parte, producen metabolitos antimicrobianos como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos que refuerzan la protección microbiológica (Fernández et al., 2014). La eficiencia de estas bacterias está influenciada por factores como el pH, la temperatura y la cepa utilizada, los cuales determinan su viabilidad y la producción de metabolitos con beneficios tecnológicos y funcionales. (Fernández et al., 2014).

Normatividad y Gestión de la Cadena Láctea

El cumplimiento de normativas nacionales e internacionales es esencial para reducir riesgos microbiológicos en la producción láctea. La regulación de los productos que contienen BAL es esencial para garantizar su inocuidad y asegurar información adecuada al consumidor. A nivel internacional, el Codex Alimentarius ha establecido directrices relacionadas con la producción, etiquetado y comercialización de alimentos, promoviendo buenas prácticas de higiene y transparencia en la industria. En Colombia, la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN) establece lineamientos para garantizar la calidad higiénico-sanitaria a lo largo de la cadena láctea, promoviendo la implementación de Buenas Prácticas Ganaderas (BPG) como eje fundamental para garantizar la inocuidad, trazabilidad, bienestar animal y sostenibilidad del sistema productivo (FEDEGAN, s.f.). Estos lineamientos se articulan con el marco regulatorio nacional e internacional, constituyendo una base técnica que permite al sector lácteo avanzar hacia estándares superiores de competitividad y cumplimiento normativo. La orientación de FEDEGAN converge con el Codex Alimentarius, el cual define principios y criterios microbiológicos aplicables a los alimentos, con el propósito de salvaguardar la salud del consumidor, favorecer el comercio justo y armonizar los requisitos entre países miembros (Codex Alimentarius, 2020). Estas disposiciones constituyen un soporte regulatorio integral para la producción láctea responsable, asegurando la protección de los consumidores y la competitividad en mercados internacionales.

Métodos de Control y Técnicas de Detección

Para garantizar la seguridad microbiológica de los productos lácteos, es fundamental aplicar estrategias de control en cada fase de la producción. Entre las principales medidas se incluyen:

Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son esenciales para minimizar el riesgo de contaminación cruzada durante el procesamiento y almacenamiento, ya que la correcta higiene del personal y el adecuado mantenimiento de los equipos desempeñan un papel clave en la reducción de patógenos en productos lácteos (Yeh et al., 2021). En este marco, el control preventivo en la cadena láctea se concibe como un sistema integrado de gestión del riesgo microbiológico que combina medidas de prevención en la explotación primaria, la aplicación de BPM y programas de verificación analítica para disminuir la probabilidad de ingreso y proliferación de patógenos. Desde la perspectiva biotecnológica, dicho control incorpora la selección y uso de cultivos iniciadores funcionales con actividad bioprotectora, el diseño higiénico de las instalaciones y la vigilancia mediante métodos analíticos sensibles que permitan la toma de decisiones en tiempo real (Anumudu et al., 2024; Ağagündüz et al., 2022).

Pasteurización y Tratamientos Térmicos

La pasteurización es un procedimiento altamente eficiente que elimina los microorganismos dañinos y, al mismo tiempo, preserva las características nutricionales del producto. Dependiendo del tipo de lácteo, se ajustan las temperaturas y los tiempos de tratamiento para asegurar la calidad y seguridad del producto final (Haas et al., 2025). En esta misma línea, Monteiro et al., (2023) señalan que la pasteurización y otros tratamientos térmicos validados constituyen la barrera más fiable para la inactivación de patógenos termolábiles en matrices lácteas; no obstante, la cinética de inactivación depende de factores como el contenido graso y proteico, así como de la resistencia intrínseca de los microorganismos objetivo. Por ello, la validación debe realizarse mediante curvas D/z específicas para cada combinación patógeno-matriz (Moiseenko et al., 2023; Vinocunga-Pillajo, 2024).

Tratamientos no Térmicos

Putri et al., (2024) describen que las estrategias no térmicas (HPP, luz pulsada, UV-C, tratamientos por plasma frío; además de biopreservación mediante bacteriocinas o consorcios de BAL y bacteriófagos) constituyen alternativas eficaces para reducir cargas microbianas preservando atributos sensoriales y componentes nutricionales. Estas tecnologías requieren validación por matriz para establecer parámetros de operación (presión, dosis UV, tiempo) que aseguren inactivación microbiológica sin generar subpoblaciones subletales con consecuencias indeseadas.

Técnicas para la Detección de Patógenos

Métodos Convencionales. La eficacia de los métodos convencionales puede potenciarse con protocolos de enriquecimiento dirigidos y con procedimientos estandarizados, además de la incorporación de controles internos de proceso que permitan evaluar la recuperación microbiana en matrices ricas en grasas y proteínas, como la leche y quesos frescos (Merchán et al., 2019).

Métodos Moleculares. Los métodos tradicionales de detección microbiológica, como el cultivo en medios selectivos, han sido reforzados con técnicas moleculares más sofisticadas. Entre ellas, la PCR en tiempo real (qPCR) se destaca como una de las herramientas más eficientes para la detección rápida y precisa de patógenos como *E. coli* y *Listeria monocytogenes* en productos lácteos, lo que contribuye a un control sanitario más eficaz (Madi et al., 2022). En esta misma línea, Wang et al., (2018) indican que plataformas de qPCR de alto rendimiento y la digital PCR (dPCR) permiten vigilancia multiplex, cuantificación absoluta y una reducción significativa en el tiempo de obtención de resultados, por lo que su integración en programas de verificación y respuesta rápida en la cadena láctea es cada vez más habitual. Sin embargo, la interpretación de los resultados debe considerar la posible detección de ADN no viable; por ello,

se recomiendan protocolos combinados, como el tratamiento con monoazida de propidio (PMA) o etidio monoazida (EMA), o el análisis dirigido a ARN, cuando la decisión regulatoria requiere evidencia de viabilidad.

Métodos Inmunológicos. Zhao et al., (2023) y revisiones sobre técnicas inmunológicas señalan que ELISA y pruebas rápidas inmunocromatográficas (LFIA) constituyen herramientas de cribado eficaces para control de lote y verificación en planta, ofreciendo tiempos a resultado en horas y costos moderados; sin embargo, su sensibilidad y especificidad dependen fuertemente de la calidad del reagente inmunológico y de las estrategias de preparación de muestra en matrices lácteas, donde interferentes (grasa, proteínas) reducen la sensibilidad práctica si no se aplican pretratamientos adecuados (Zhao et al., 2023).

Métodos Basados en Biosensores y Nanotecnologías. Wang et al., (2018) y Zhao et al., (2023) documentan avances substanciales en biosensores electroquímicos y ópticos para detección de patógenos en alimentos: las plataformas mejoradas con nanomateriales (nano-electrodos, nanopartículas metálicas) incrementan la sensibilidad y permiten LOD competitivos con qPCR en condiciones controladas. Estas tecnologías ofrecen lectura cuantitativa y potencial de uso on-site (portable), lo que favorece la toma de decisiones operativas en planta (Wang et al., 2018; Zhao et al., 2023).

No obstante, la literatura enfatiza que la transferencia de los sensores desde laboratorio a planta exige superar retos de interferencia por matriz, estandarización de protocolos de extracción y enriquecimiento y validación multicéntrica para asegurar reproducibilidad y aceptabilidad regulatoria. La implementación práctica requiere además el diseño de flujos de confirmación (sensor → qPCR/cultivo) para decisiones regulatorias.

Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)

Las ETA representan un desafío significativo para la salud pública y la industria alimentaria. Estas enfermedades son causadas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con microorganismos patógenos, sus toxinas o productos químicos peligrosos. Los síntomas de las ETA pueden variar desde leves hasta severos y pueden incluir diarrea, vómitos, fiebre y dolor abdominal (Schmid et al., 2013; Oliver et al., 2011). La presencia de *E. coli* en leche cruda y productos lácteos es una causa común de ETA que pueden resultar en una significativa enfermedad grave, que puede incluir síndrome urémico hemolítico (SUH) en casos severos, así como en pérdidas económicas considerables debido a los retiros de productos y la pérdida de confianza del consumidor.

La implementación de prácticas de seguridad alimentaria rigurosa en programas de vigilancia y control puede reducir significativamente la incidencia de ETA y mejorar la seguridad alimentaria a nivel global (Wang et al., 2018).

E. coli y otros patógenos de importancia en la transmisión de ETA a través de alimentos incluyen *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* y *Staphylococcus aureus*, los cuales pueden encontrarse en productos lácteos no pasteurizados, carnes crudas o poco cocidas, y vegetales contaminados (OMS, 2021). Estos microorganismos están asociados con enfermedades graves como listeriosis, salmonelosis, campilobacteriosis y toxiinfecciones estafilocócicas, que pueden afectar especialmente a niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas (Mayo Clinic, 2023).

Escherichia coli

El serotipo *E. coli* O157:H7 es uno de los patógenos más virulentos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), especialmente en productos lácteos

contaminados. Su capacidad patogénica se debe, en gran parte, a la producción de toxinas Shiga (*Stx1* y *Stx2*), que interrumpen la síntesis de proteínas en las células del huésped, causando daño celular severo y muerte celular programada (apoptosis) (Ripodas et al., 2017). Estas toxinas se unen a receptores específicos en las células eucariotas, desencadenando una respuesta inflamatoria intensa que puede derivar en colitis hemorrágica y en casos graves, en síndrome urémico hemolítico (SUH), una afección potencialmente mortal caracterizada por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (Fratamico & Genhring, 2014).

Las consecuencias de las infecciones por *E. coli* O157:H7 pueden ser graves y de larga duración. Brotes registrados a nivel mundial han resultado en miles de hospitalizaciones y múltiples muertes, afectando especialmente a niños, ancianos y personas inmunocomprometidas (Fratamico & Genhring, 2014).

En el contexto de los productos lácteos, *E. coli* es un patógeno particularmente preocupante debido a su capacidad proliferarse en la glándula mamaria de las vacas y causar brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Aguilera et al., 2014).

Listeria monocytogenes

Es un patógeno que representa un gran desafío para la industria láctea, ya que tiene la sorprendente capacidad de crecer a bajas temperaturas y alcanzar niveles peligrosos durante el almacenamiento de productos lácteos. Esta característica la convierte en un riesgo constante, especialmente porque puede sobrevivir incluso en condiciones de refrigeración, lo que facilita la contaminación de los productos terminados. Varios estudios realizados en España han demostrado la presencia de *L. monocytogenes* en productos lácteos. (Rodríguez et al., 2001). Este microorganismo puede sobrevivir a lo largo de todo el proceso de fabricación y maduración en la mayoría de las variedades de queso.

Salmonella spp.

Las salmonelosis son enfermedades de origen alimentario vinculadas principalmente al consumo de carne de cerdo y de ave crudas o poco cocidas. Ambas producen principalmente gastroenteritis aguda, aunque en individuos inmunocomprometidos pueden provocar complicaciones graves, como infecciones sistémicas o reacciones inmunes postinfecciosas. En un estudio en Bélgica, estas dos enfermedades representan el mayor número de infecciones bacterianas confirmadas de origen alimentario, pero hasta la fecha no se había calculado su impacto total en salud poblacional utilizando métricas estandarizadas como los años de vida ajustados por discapacidad (DALYs por sus siglas en inglés) que combinan mortalidad y discapacidad, la salmonelosis mantiene una tendencia descendente y estable, reflejando los efectos positivos de las medidas de control implementadas en la cadena alimentaria. (de Noordhout et al., 2015).

Campylobacter jejuni

Según estudio realizado en el Reino Unido se evidenció que la colonización intestinal por *C. jejuni* es bastante común en vacas lecheras, y que la leche cruda puede contaminarse fácilmente durante el ordeño o al entrar en contacto con agua superficial contaminada juega un papel crucial en la infección de los bovinos, y que los métodos microbiológicos tradicionales no reflejan adecuadamente los riesgos reales. Por lo tanto, los autores subrayan que solo a través de la pasteurización y la implementación estricta de controles microbiológicos específicos se puede asegurar la seguridad de la leche. (Humphrey & Beckett, 1987).

Staphylococcus aureus

Este microorganismo afecta la mastitis en vacas principalmente causando infecciones intramamarias tanto clínicas como subclínicas, que resultan en inflamación del tejido mamario,

abscesos, cicatrices y una notable reducción en la producción de leche. Esta bacteria puede causar mastitis aguda o crónica, colonizando con más de una cepa. Se identificó un estudio que empleó el análisis del patrón de fragmentación de enzimas de restricción (REFP) para identificar variaciones de cepas de *S. aureus* en casos naturales de mastitis subclínica bovina. (Young et al., 2001).

Técnicas de Cultivo Microbiológico

Estas técnicas tradicionales son fundamentales en la microbiología de alimentos y han sido la base para la detección e identificación de microorganismos patógenos en los productos lácteos. A pesar de los avances en técnicas moleculares, los métodos de cultivo siguen siendo indispensables debido a su capacidad para confirmar la viabilidad de los microorganismos y proporcionar información sobre su crecimiento y comportamiento en diferentes condiciones ambientales (Guaña-Moya et al., 2017).

Los métodos de cultivo microbiológico incluyen la siembra en medios de cultivo selectivos y diferenciales, que permiten la identificación preliminar de patógenos basándose en características morfológicas y bioquímicas. La cuantificación de microorganismos mediante técnicas como el recuento en placa y la prueba de Número Más Probable (NMP) proporciona datos esenciales para evaluar la carga microbiana en los productos lácteos y asegurar el cumplimiento de los estándares de seguridad alimentaria (Jin-Qian, 2017).

Las técnicas de cultivo también son cruciales para la identificación de patógenos emergentes y la evaluación de la resistencia a antimicrobianos.

Técnicas Moleculares de PCR para la Detección de Microorganismos

Los métodos moleculares son técnicas basadas en el análisis de material genético (ADN o ARN) o proteínas para identificar y cuantificar microorganismos o sustancias específicas en las

muestras alimentarias. Estos métodos incluyen la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), secuenciación de próxima generación (NGS), hibridación de ácidos nucleicos y ensayos inmunológicos moleculares (Guaña-Moya et al., 2017).

La aplicación de técnicas moleculares ha permitido avances significativos en la detección y control de patógenos en la industria alimentaria. Por ejemplo, la PCR en tiempo real permite la amplificación y detección simultánea de múltiples patógenos en una sola reacción, lo que mejora la eficiencia del diagnóstico y la precisión en la identificación de contaminantes (Lim et al., 2021). Además, la secuenciación de próxima generación (NGS) ha facilitado el análisis genómico completo de microorganismos, proporcionando información detallada sobre su virulencia y resistencia a antibióticos (Liu et al., 2025). Estos avances han sido cruciales para el desarrollo de estrategias de control más efectivas y la mejora de la seguridad alimentaria (Zhang et al., 2022).

Normativas Nacionales e Internacionales que Regulan la Seguridad Alimentaria

Cada país tiene su propio conjunto de regulaciones para la seguridad alimentaria, basadas en las recomendaciones del Codex Alimentarius y adaptadas a sus necesidades y contextos específicos. Por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) son responsables de regular la seguridad de los productos alimenticios en ese país (FDA, 2023).

Las normativas colombianas que regulan la producción, procesamiento y comercialización de la leche y sus derivados están publicadas en diversas fuentes oficiales. A continuación, se indican algunas de las principales normativas y dónde pueden consultarse:

Decreto 616 de 2006: Establece el reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano. Este decreto está disponible en el Gestor Normativo de la Función Pública.

Decreto 2838 de 2006: Modifica parcialmente el Decreto 616 de 2006 y dicta otras disposiciones relacionadas con los requisitos para la leche destinada al consumo humano. Puede consultarse en la página de normatividad de la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN).

Resolución 2310 de 1986: Reglamenta aspectos relacionados con los derivados lácteos, incluyendo definiciones, requisitos de procesamiento, composición, transporte y comercialización. Está disponible en el sitio web del Ministerio de Salud y Protección Social.

Resolución N. 1407 del 2022 establece los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas destinadas para consumo humano, en el cual se establece que los productos lácteos no deben presentar *E. coli*, ya que este patógeno debe estar en ausencia, de lo contrario si algunos de los productos lácteos contienen presencia de dicho patógeno es indicativo de una mala manipulación o contaminación.

La Comisión del Codex Alimentarius, establecida por la FAO y la OMS, es una entidad internacional que desarrolla normas alimentarias para proteger la salud de los consumidores y asegurar prácticas equitativas en el comercio de alimentos. Según la FAO (2021), "las normas del Codex son la referencia mundial en seguridad alimentaria y son utilizadas por muchos países para desarrollar sus propias regulaciones".

Metáfora del Árbol de la Ciencia

La metáfora del árbol del conocimiento es un concepto que invita a explorar y apreciar la diversidad del conocimiento humano, mostrando su unidad subyacente y la interconexión entre

diferentes disciplinas. Este sistema jerárquico permite visualizar la relación entre distintos campos del saber, promoviendo un enfoque interdisciplinario y una comprensión profunda del conocimiento.

Este sistema tiene diversas aplicaciones prácticas en áreas como la educación, la ciencia y el ámbito empresarial. En educación, ayuda a los estudiantes a comprender la relación entre diferentes disciplinas y fomenta un aprendizaje integrado. En ciencia, facilita a los investigadores contextualizar sus estudios y promueve la colaboración entre disciplinas, contribuyendo a avances científicos. En el ámbito empresarial, puede ser utilizado para comprender la interconexión entre diferentes áreas de conocimiento. (Klein, 2014).

Por otro lado, González, (2004) explora cómo la práctica científica se define como una entidad multidimensional, donde el lenguaje utilizado en la investigación y las afirmaciones aceptadas por los científicos son componentes clave. Se destaca la importancia de estrategias metodológicas innovadoras, como la metáfora fiscalista y organicista, en la actividad científica.

Análisis Bibliométrico

Los resultados de la búsqueda se cargaron en el software Bibliometrix, una herramienta gratuita que permite el procesamiento y análisis eficiente de grandes volúmenes de datos. A través de esta plataforma, se extrajo información clave como los autores más citados, tendencias en la investigación, evolución de publicaciones a lo largo del tiempo, palabras clave más relevantes y principales fuentes de publicación. Además, se identificaron las técnicas de PCR utilizadas en la detección de *E. coli* en leche y productos lácteos, así como sus aplicaciones, ventajas y limitaciones.

El análisis bibliométrico permitió visualizar la distribución de los estudios en diferentes regiones, evaluar la frecuencia de aparición de metodologías específicas y detectar vacíos en la

literatura que puedan orientar futuras investigaciones. Estos datos fueron sistematizados y organizados para su posterior interpretación y discusión en el desarrollo de la monografía.

Metodología

Estrategia de Búsqueda de Información

Se realizó una búsqueda exhaustiva de artículos científicos en la e-biblioteca virtual de la UNAD, utilizando las bases de datos Scopus y Web of Science, seleccionadas por su cobertura internacional y rigor en la indexación de publicaciones científicas. La búsqueda se limitó a documentos publicados entre el 1 de enero de 2003 y el 31 de diciembre de 2025, en inglés, español o portugués, y al tipo de documento "artículo de revista científica".

Para optimizar la búsqueda, se utilizaron operadores booleanos y términos clave como: *Escherichia coli AND PCR AND leche cruda, técnicas moleculares AND detección de patógenos AND productos lácteos, seguridad alimentaria AND E. coli AND qPCR y contaminación microbiológica en lácteos AND diagnóstico molecular.*

Tabla 1

<i>Términos clave</i>		
Fuentes de datos	Wos	Scopus
Años de búsqueda	2003-2024	
Día de búsqueda	21/02/2025	
Filtro	Título	
Tipo de documento	Documentos científicos tipo artículo	
Clase de revista	Incluye todos	
Ecuación de búsqueda	(("Polymerase chain reaction" OR "PCR") AND ("Escherichia coli" OR "Dairy Foods" OR "cheese" OR "butter" OR "milk cream" OR "milk cheese" OR "Dairy products" OR "curd" OR "fermented milks" OR "Dairy preparation"))	
Documentos encontrados	58	51
Total	109	

Nota. En esta tabla se evidencia los términos clave.

Criterios de Inclusión y Exclusión

Criterios de inclusión

Estudios que analicen el uso de técnicas moleculares basadas en PCR para la detección de *E. coli* en leche cruda o productos lácteos procesados.

Criterios de exclusión

Artículos que no aborden la detección de *E. coli* en lácteos.

Estudios enfocados únicamente en métodos microbiológicos tradicionales sin componente molecular.

Publicaciones sin respaldo académico o con información desactualizada.

Análisis Bibliométrico

Los resultados seleccionados fueron procesados con el software Bibliometrix, que permite el análisis de grandes volúmenes de datos bibliográficos. A través de esta herramienta, se extrajo información clave como:

Autores más citados, evolución de publicaciones, palabras clave relevantes, técnicas de PCR utilizadas, principales revistas y regiones geográficas productoras de conocimiento.

Este análisis facilitó la identificación de vacíos en la literatura, la evaluación de tendencias y la sistematización de datos para una interpretación integral en el desarrollo del trabajo.

Clasificación de Artículos: Metáfora del Árbol de la Ciencia

Para organizar y clasificar la literatura recopilada, se aplicó la metáfora del árbol de la ciencia (Robledo et al., 2014; Valencia-Hernández et al., 2020), que facilita la visualización jerárquica del conocimiento científico:

Raíz: Estudios fundamentales que establecen la base del conocimiento en la detección de *E. coli* mediante PCR. Aquí figuran las bases teóricas, antecedentes y esto nos representa la base sólida sobre la que se construyó todo lo demás.

Tronco: Investigaciones no tan antiguas ni tan recientes, pero que amplían y desarrollan estos conocimientos. Representan el cuerpo principal de la investigación, porque se establecen argumentos y presentan hallazgos; es el soporte que sostiene toda la investigación.

Hojas: Estudios emergentes y de vanguardia que representan las tendencias actuales y futuras en este campo (Robledo et al., 2014). Muestran los detalles con datos específicos, evidencias y las citas bibliográficas representativas.

Evaluación Crítica de las Técnicas de PCR

Los artículos fueron revisados cualitativamente para evaluar la calidad metodológica, relevancia científica, conexiones entre enfoques diagnósticos y se prestó especial atención a la descripción detallada de las variantes de PCR utilizadas (convencional, en tiempo real, múltiple), sus aplicaciones específicas y resultados obtenidos en la detección de *E. coli*.

Análisis Comparativo de Ventajas y Desventajas

Con base en los resultados del análisis bibliométrico y la revisión de las técnicas moleculares, se elaboró una síntesis comparativa que resume las ventajas y limitaciones de las

distintas variantes de PCR aplicadas en productos lácteos. Este insumo permite valorar la efectividad, precisión, costos y tiempos de respuesta de cada metodología.

Impacto y Relevancia del Análisis

El estudio facilitó la identificación de las técnicas moleculares clave para la seguridad alimentaria, destacó los progresos tecnológicos en diagnóstico microbiológico y señaló las áreas que necesitan mayor desarrollo científico. Además, esta revisión bibliográfica aporta información esencial para optimizar los protocolos de detección de patógenos en la industria láctea y para guiar la formulación de políticas públicas en salud y control de calidad. (Palomino & Muñoz, 2014; Huang et al., 2022).

Técnicas Moleculares de PCR Utilizadas para la Detección de *E. coli* en la Industria Láctea

PCR Convencional

La PCR se ha consolidado como una herramienta fundamental en el control microbiológico de los alimentos, debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez en la detección de secuencias genéticas específicas de *E. coli* (Yeh et al., 2021). A diferencia de los métodos tradicionales de cultivo microbiológico, que pueden tardar días en proporcionar resultados, la PCR permite detectar la presencia del ADN bacteriano en pocas horas, incluso en muestras con bajas concentraciones del patógeno (Schmitz et al., 2022). Variantes de esta técnica han optimizado aún más esta aplicación, permitiendo la cuantificación exacta de *E. coli* en productos alimenticios.

La implementación de esta tecnología en la industria alimentaria no solo mejora la eficiencia del control de calidad, sino que también contribuye a la prevención de brotes de

enfermedades transmitidas por alimentos, garantizando productos más seguros para el consumo humano (Huang et al., 2022).

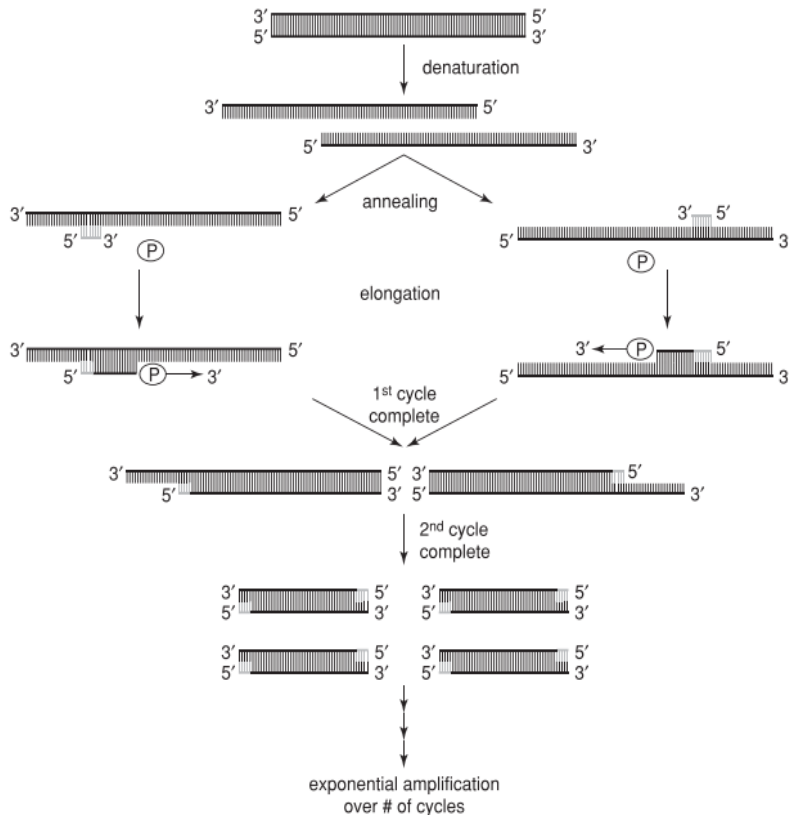
Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Es una técnica revolucionaria de biología molecular que permite la amplificación específica de fragmentos de ADN en un corto período de tiempo. Su funcionamiento se basa en ciclos térmicos repetitivos que incluyen tres etapas fundamentales:

Desnaturalización. En esta primera fase, la mezcla de reacción se calienta a temperaturas entre 92 y 96°C durante 20 a 30 segundos, lo que provoca la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas del ADN, separando la doble hélice en hebras simples. Este paso es crucial para exponer las secuencias diana y permitir la unión de los cebadores en la siguiente fase. Los principales componentes involucrados en esta etapa son el ADN molde, que contiene la secuencia a amplificar, y el tampón de reacción, que mantiene un ambiente químico óptimo para la actividad enzimática.

Alineamiento o Hibridación. Tras la desnaturalización, la temperatura se reduce a un rango de 50-65°C durante 20 a 40 segundos, permitiendo que los cebadores se unan a sus secuencias complementarias en el ADN molde. Los cebadores son pequeños fragmentos de oligonucleótidos de entre 18 y 25 nucleótidos de longitud, diseñados para delimitar la región de interés. Su correcta hibridación es esencial para garantizar la especificidad de la amplificación. En esta etapa, la concentración de Mg^{2+} en la mezcla es un factor crítico, ya que influye en la eficiencia del apareamiento de los cebadores y en la actividad de la ADN polimerasa.

Extensión. En esta fase, la temperatura se incrementa a 72°C, la temperatura óptima para la actividad de la ADN polimerasa termoestable (como por ejemplo la Taq polimerasa). La enzima cataliza la síntesis de una nueva hebra de ADN añadiendo nucleótidos de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) en dirección 5' → 3' tal como se evidencia en la Figura 1, utilizando la hebra molde como guía. La duración de este paso varía dependiendo del tamaño del fragmento de ADN a amplificar, estableciéndose en ~1 minuto por cada 1,000 pares de bases. Cada uno de estos ciclos se repite entre 30 y 40 veces, lo que permite la amplificación exponencial del ADN (Hussain et al., 2025).

Figura 1*Proceso de amplificación mediante la PC*

Nota: Fuente. Imagen tomada de current protocols in molecular biology (Kuslich et al., 2019).

Análisis del Producto de Amplificación de la PCR. En la PCR convencional, la eficiencia de la reacción se evalúa mediante electroforesis en gel de agarosa, una técnica utilizada para la separación de ácidos nucleicos en función de su tamaño y carga eléctrica dentro de un campo eléctrico. La matriz de agarosa actúa como un filtro molecular, permitiendo la migración del ADN hacia el ánodo (+) debido a la carga negativa conferida por los grupos fosfatos. Para la visualización de las ampliaciones, se emplea bromuro de etidio (EtBr), un agente intercalante que se une al ADN de doble cadena y emite fluorescencia bajo luz

ultravioleta (UV). Dado su carácter mutagénico y teratógeno, su manipulación requiere estrictas medidas de bioseguridad (Green & Sambrook, 2019a; Tamay de Dios et al., 2013). Sin embargo, se han desarrollado alternativas, ya que, a pesar de los excelentes resultados observados con el bromuro de etidio, se ha demostrado es mutagénico y genotóxico. Por ejemplo, en el estudio publicado por (Bawane et al., 2024), evaluó algunas alternativas más seguras al bromuro de etidio (EtBr) para la visualización de ácidos nucleicos. Colorantes fluorescentes como ADN Stain G, SYBR™ Safe, EZ-Vision® In-Gel, LabSafe™, así como GelGreen®, GelRed® y Diamond™ Nucleic Acid Dye, que actúan por intercalación con el ADN y emiten fluorescencia tras excitación con luz UV o azul y que diferencia del EtBr, estos colorantes presentan baja permeabilidad celular y menor toxicidad, lo que reduce riesgos para el usuario y el medio ambiente. Otro estudio comparativo mostró que la mayoría de estos colorantes mostraron mejor desempeño en el método de poststaining (tinción del gel luego de la electroforesis de ADN), con alta sensibilidad y sin alterar la movilidad del ADN. Algunos, como ADN Stain G, SYBR™ Safe y EZ-Vision® In-Gel, también funcionaron bien en el método de precasting (Adición del colorante antes de la solidificación del gel de agarosa), mientras que el preloading (adición del colorante al buffer de carga), resultó inadecuado para casi todos los colorantes, debido a la baja sensibilidad y la alteración en la migración del ADN. Estos resultados sugieren que la elección del método de tinción es clave para optimizar la visualización y minimizar efectos adversos sobre el análisis electroforético.

Para la correcta interpretación de los resultados de electroforesis en gel de agarosa, las ampliaciones se cargan junto con un marcador de peso molecular, que contiene una muestra comercial de ADN con fragmentos de tamaños conocidos que sirve como calibrador para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN en la muestra por comparación de la distancia migrada

(Reinoso et al., 2022).

Ejemplos de PCR Convencional en la Detección de *E. coli*

Algunos autores han resaltado el uso de la PCR convencional en la detección de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) en leche cruda ejemplo de ello es el artículo publicado por Otero et al., (2017) En el que, analizaron la presencia de STEC en leche de tanque de ovejas y en el ambiente de granjas en Castilla y León, España, aplicando inmunoensayo, cultivo y PCR convencional para la detección de los genes *stx1* y *stx2*.

De 388 muestras de leche analizadas, el 45.4% resultaron positivas por PCR para *stx*, aunque el inmunoensayo no detectó la toxina en ninguna muestra. Además, se aislaron 47 cepas de STEC, incluidas cuatro del serotipo O157:H7, tres de muestras obtenidas de leche y una de muestras obtenidas de agua. Estos resultados sugieren que la leche cruda de oveja puede actuar como reservorio de STEC, aunque la prevalencia de serotipos altamente patogénicos es baja.

La implementación de la PCR convencional en controles de higiene en la producción lechera es clave para reducir la contaminación y garantizar la seguridad de los productos lácteos. Además, es una herramienta confiable para la detección cualitativa de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), permitiendo identificar la presencia de los genes *stx1* y *stx2* con alta sensibilidad.

Otros autores como Megawer et al., (2020), utilizaron la PCR convencional para la detección del gen *wzy*, responsable de la polimerización del antígeno O, un componente clave del lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*. La PCR se aplicó sobre 200 muestras de productos lácteos, incluyendo leche cruda, crema fresca, yogur y queso. Cabe destacar que, previamente, se había

realizado un aislamiento e identificación serológica de diferentes serogrupos de *E. coli*, incluyendo el serogrupo O157, por lo que la PCR fue utilizada como prueba confirmatoria de la identidad de los aislamientos. Los resultados revelaron una alta prevalencia de *E. coli* en leche cruda (75%), crema fresca (62,5%) y queso tipo Kareish (80%). De manera interesante, al comparar yogur de producción artesanal e industrial, se observó presencia de *E. coli* únicamente en el artesanal (25%), mientras que en las muestras industriales no se detectó la bacteria, lo cual resalta la importancia de las condiciones higiénicas en el procesamiento.

Sin embargo, es importante considerar una limitación del enfoque molecular empleado. Aunque la detección del gen *wzy* es útil para confirmar la presencia del antígeno O y, por tanto, establecer el serogrupo, su presencia no permite diferenciar entre cepas comensales y patógenas, ya que muchas cepas no patógenas también poseen este gen. Además, la detección de *wzy* no permite identificar los factores clásicos de virulencia de *E. coli* como *stx1/2* (toxinas Shiga), *eae* (intimina), *bfpA*, entre otros, que son fundamentales para clasificar a las cepas en sus distintos patotipos (EHEC, EPEC, ETEC, etc.). Por lo tanto, aunque el enfoque del artículo es valioso desde un punto de vista epidemiológico, sería recomendable complementarlo con la detección de genes de virulencia específicos para evaluar adecuadamente el riesgo sanitario asociado a las cepas aisladas.

Un interesante uso que se le dio a la PCR convencional es la identificación de genes de *E. coli* relacionados con la multiresistencia a antibióticos. (Mwasinga et al., 2023). En este estudio se detectó *E. coli* multirresistente (MDR) en muestras de leche cruda de vaca y se caracterizaron sus perfiles de resistencia antimicrobiana. Para ello, se aislaron 418 muestras mediante métodos convencionales de cultivo para el aislamiento de *E. coli*, seguidos de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana utilizando el método de difusión en disco en agar Mueller-Hinton según el

protocolo de Kirby-Bauer. Posteriormente, se realizó la detección molecular de genes de resistencia mediante PCR, enfocándose principalmente en genes codificantes de β -lactamasas como *blaCTX-M*, *blaTEM* y *blaOXA*. Los resultados revelaron una elevada frecuencia de resistencia a ampicilina (50%), tetraciclinas (40.1%) y cefotaxima (15%). De manera relevante, en los aislados resistentes a cefotaxima se identificaron los genes *blaCTX-M* y *blaTEM*, lo que confirma la presencia de mecanismos de resistencia asociados a β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), representando un riesgo significativo para la salud pública, así como un desafío para la industria alimentaria, debido al potencial de diseminación de bacterias multirresistentes a través de la cadena de producción y consumo de leche cruda. Teniendo en cuenta lo anterior, un enfoque interesante se encuentra en el artículo de Chandrakar et al., (2022), en el cual se llevó a cabo la identificación de *E. coli*, no directamente en muestras de leche cruda, sino en moscas domésticas capturadas en tiendas de leche en Raipur, India. Se recolectaron 150 moscas, de las cuales se aislaron 45 cepas de *E. coli*, lo que corresponde a una prevalencia del 30%. De estos aislamientos, el 37,8% fueron productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y portadores de genes de resistencia a tetraciclinas y quinolonas. Lo destacable de este estudio es que resalta el papel de las moscas domésticas como vectores potenciales de *E. coli* multirresistente, lo cual representa un riesgo significativo para la inocuidad alimentaria y la salud pública, especialmente en entornos donde se comercializan alimentos de origen animal. Aunque no era el objetivo principal del artículo, se evidencia la importancia del uso de la PCR convencional, en combinación con diferentes metodologías de cultivo, tanto para la identificación de *E. coli* como para la detección de diversos genes asociados a la resistencia a antimicrobianos.

Por otra parte, la combinación de PCR convencional con técnicas complementarias ha

permitido el desarrollo de enfoques avanzados que mejoran la sensibilidad, especificidad y aplicabilidad de esta técnica en el ámbito de la seguridad alimentaria. Algunos de esos enfoques son:

PCR-IMS (PCR con Separación Inmunomagnética)

En esta técnica se emplean perlas magnéticas funcionadas con anticuerpos específicos para capturar selectivamente patógenos antes de la amplificación, lo que permite su detección en matrices alimentarias altamente complejas, como leche cruda, carne procesada y otros productos derivados de origen animal. Esta estrategia es especialmente útil para la identificación de bacterias de difícil aislamiento, como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella spp.*, ya que facilita la concentración del microorganismo diana, reduciendo la presencia de contaminantes e inhibidores de la reacción (Baylis, 2009; Caro et al., 2006; Mercanoglu Taban & Aytac, 2019; Wang et al., 2014).

Ejemplo de ello es el artículo publicado por Karns et al., (2007), quienes analizaron en muestras de leche la presencia de genes codificantes de factores de virulencia asociados con *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), haciendo uso de la PCR convencional, pero también de la PCR en tiempo real. De ese modo 859 muestras fueron recolectadas y enriquecidas en caldo EC, aumentando así la biomasa. Posterior a dicho enriquecimiento se llevó a cabo una separación inmunomagnética de bacterias O157:H7 con perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales anti *E. coli* O157 y a partir de dichos aislados se llevó a cabo la extracción de ADN. y se identificaron genes como *rfbO157* que codifica enzimas implicadas en la síntesis del antígeno O157, el gen *fliC*, que codifica una proteína estructural del flagelo y el gen *hlyA*, que codifica una hemolisina enterohemorrágica. Los tres genes dan una alta probabilidad de que se

trate de una cepa EHEC O157:H7. Lo interesante del artículo fue el uso de esta PCR convencional, como una alternativa a 15 muestras cuyos resultados fueron dudosos mediante PCR en tiempo real, esta última identificó genes como *eaeA*, γ -*tir*, *stx1*, *stx2*, *lacZ*. Entonces a pesar de algunas de estas muestras analizadas contenían genes asociados a EHEC y al serotipo O157:H7, ninguna mostró una combinación de genes *rfbO157*, *fliC*, *hlyA* y *stx*, es posible que pertenezcan a EHEC de un serotipo distinto, también con una alta capacidad patogénica y de relevancia para la seguridad alimentaria.

Otro ejemplo en el que abordan la separación inmunomagnética, y la PCR convencional se muestra en el artículo de (Luo et al., 2017). A pesar de que en este artículo los autores no quieren identificar *E. coli* sino *Listeria.monocytogenes* en leche pasteurizada. La separación inmunomagnética resultó ser una efectiva herramienta de preconcentración y purificación en matrices complejas como la leche. Allí los autores resaltan que esta tecnología se encuentra entre las más eficientes para separar y concentrar patógenos, sin embargo, también se resalta un problema de esta metodología y es su eficiencia cuando se aplica a grandes volúmenes de más de 10 ml, por lo que requeriría mayor cantidad de Ac y perlas magnéticas aumentando significativamente los costos. Para superar esto, los autores proponen una separación inmunomagnética en dos pasos, primero, anticuerpos monoclonales anti-*L.monocytogenes* y marcados con biotina se adicionaron a un volumen grande 10 mL y luego se agregan las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina, que se unen a los anticuerpos biotinilados ya adheridos a las bacterias esto permite una reacción antígeno anticuerpo más eficiente ya que los anticuerpos estas libres y móviles en solución antes de unirse a las perlas, lo que permitió límites de detección de 8×10^1 UFC/mL en leche pasteurizada en un tiempo menor a 7 horas.

Este enfoque permite límites de detección bajos aumentando la sensibilidad, en

volúmenes mayores y sin aumentar el gasto de recursos de reactivos. Lo anterior representa una mejora significativa frente a los métodos de cultivo tradicionales, que requieren entre 24 y 48 horas para obtener resultados. Sin embargo, la PCR convencional utilizada en este procedimiento presenta ciertas limitaciones, especialmente en términos de rapidez y capacidad de cuantificación, en comparación con técnicas más avanzadas como la PCR en tiempo real (qPCR), que permite una detección más rápida y cuantitativa. A pesar de ello, la integración con la separación inmunomagnética (IMS) resalta la importancia de combinar distintas metodologías para optimizar la precisión en la detección y caracterización de patógenos en alimentos.

Inmunomagnética (IMS), Propidio Monoazida (PMA) y PCR Convencional

Los métodos moleculares que involucran análisis de ADN, incluida la PCR y sus diferentes variantes, no diferencian el ADN proveniente de bacterias viables y no viables, así que una forma superar este problema es a través del uso previo de reactivos como la Monoazida de Propidia (PMA, por sus siglas en inglés), que va a permear la membrana de las células dañadas y se intercalara en el ADN, inhibiendo la amplificación de este ADN. es así que algunos artículos como el de (Wang et al., 2014), desarrollaron un método rápido, sensible y específico para la detección de *E. coli* O157:H7, combinando la separación inmunomagnética, así como el pretratamiento con PMA, además del uso de un control interno de amplificación RNA ribosomal 16S (permite verificar si hay inhibidores en la muestra, si no amplifica indica inhibición, lo cual evita falsos negativos), en una PCR convencional. Lo interesante es que, al comparar esta metodología con la PCR convencional sola, los autores evidenciaron un límite de detección menor, de tal forma que solo la PCR ese límite fue de 10^4 UFC/mL y cuando se combinó con la separación inmunomagnética, más el pretratamiento con PMA fue de $2,1 \times 10^2$ UFC/mL indicando una mayor sensibilidad.

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR) y la RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA PCR)

Estas dos técnicas han sido ampliamente utilizadas para la tipificación molecular de cepas bacterianas, permitiendo analizar la diversidad genética de los patógenos y rastrear su origen en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. La ERIC-PCR utiliza secuencias repetitivas conservadas en el genoma de bacterias de la familia Enterobacteriaceae (comprende bacilos Gram negativos, en su mayoría anaerobios facultativos, ampliamente distribuidos en el intestino de humanos y animales, así como en agua, suelo y alimentos; incluye especies comensales y patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Klebsiella*, relevantes en salud y control de calidad alimentaria) (Janda & Lopez, 2021), para generar patrones específicos de amplificación, mientras que la RAPD-PCR emplea cebadores de secuencia aleatoria para amplificar fragmentos polimórficos, lo que facilita la caracterización de cepas y la identificación de relaciones epidemiológicas en estudios de trazabilidad alimentaria. En este contexto, la RAPD-PCR se basa en la amplificación aleatoria de fragmentos de ADN polimórficos, mientras que la ERIC-PCR utiliza regiones repetitivas conservadas en el genoma bacteriano, ambas generan perfiles únicos de amplificación (Chandrakar et al., 2022; Zago et al., 2007).

PCR-ELISA

Como una alternativa a análisis del producto post PCR, se desarrolló la PCR-ELISA, que permite detectar estos productos de forma más sensible y específica que la electroforesis en gel, usando una detección basada en anticuerpos y colorimetría de tal forma que se extrae ADN bacteriano, se llevan a cabo los diferentes ciclos de amplificación, y el análisis se da mediante una ELISA de dichos amplicones. Por ejemplo (Fach et al., 2001), llevaron a cabo la identificación de la bacteria *E. coli* STEC y no STEC en leche contaminada artificialmente. Así, posterior a la

extracción se realizó la PCR y posterior a la amplificación el ADN fue desnaturalizado con NaOH/EDTA y la detección se llevó a cabo mediante una ELISA en sándwich, detectando genes *stx*. se emplearon sondas marcadas con biotina y dioxigenina para la captura y detección de los productos amplificados, y luego de la hibridación, se añadieron anticuerpos anti digoxigenina, conjugados con peroxidasa de rábano, así como el sustrato de tetrametilbencidina.

La especificidad del ensayo PCR-ELISA fue evaluada utilizando 94 cepas productoras de toxina Shiga (STEC) y 84 cepas no-STEC. Todas las cepas STEC presentaron valores de absorbancia superiores a 3,5, mientras que las cepas no-STEC mostraron valores consistentemente bajos, inferiores a 0,07, lo que demuestra una alta especificidad del método para la detección de los genes *stx1* y *stx2*. Se estableció un punto de corte de 0,1 unidades de absorbancia, definido como el valor promedio de los controles negativos más tres desviaciones estándar. En cuanto a la sensibilidad, se determinó que el límite de detección del ensayo fue aproximadamente de 10^2 UFC/ml, basado en diluciones seriadas de cepas STEC representativas (O26:H11, O8:H19 y O157:H7). A concentraciones iguales o superiores a 10^4 UFC/ml, se observaron absorbancias elevadas (3,365–4,000), mientras que valores cercanos al umbral de positividad fueron registrados en diluciones de 10^2 – 10^3 UFC/ml, lo que indica que el ensayo es capaz de detectar cantidades muy bajas de bacterias objetivo. A pesar de su alta sensibilidad y especificidad, el uso del PCR-ELISA ha sido limitado debido a la complejidad de su protocolo, que incluye múltiples pasos post-amplificación, y a la aparición de técnicas más rápidas y automatizables como la PCR en tiempo real. Además, la menor disponibilidad de kits comerciales y la dificultad para estandarizar el procedimiento han contribuido a que su uso sea menos frecuente en investigaciones recientes.

PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction PCR)

En la búsqueda de formas más eficientes de llevar a cabo la PCR convencional, (Liang et al., 2020), desarrollaron un método de amplificación dual PCR-HCR (Hybridation Chain Reaction), para la detección de *E. coli* O157:H7 en leche. De esta manera en la primera amplificación se combinan cebadores, uno con capacidad bloqueadora y otro marcado con biotina, dirigidos al gen *fliCh7*, específico de esta cepa, los productos generados luego de la PCR con el uso de estos cebadores que contienen una región de cadena sencilla y otra doble con biotina (ss-ds ADN- biotina), que son capturadas mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. La segunda reacción que ocurre es la HCR, que actúa como una segunda etapa de amplificación de señal, la cual fue detectada por fluorescencia usando SYBR Green I, que se intercala en el ADN de doble cadena generada (Dirks & Pierce, 2004). Con esta doble amplificación el método desarrollado por estos autores alcanza un límite de detección de $7,2 \times 10^1$ UFC/mL (sin la amplificación por HCR, no se detectaron señales por debajo de 10^3 UFC/mL), y fue eficaz en muestras de leche descremada artificialmente contaminadas, con lo cual es importante resaltar que al llevar a cabo esta misma metodología en muestra contaminadas requeriría un previo enriquecimiento, lo cual aumentaría el tiempo. A pesar de que esta técnica mejora la sensibilidad y especificidad respecto a la PCR convencional, su implementación en la industria láctea podría enfrentar desafíos relacionados con la complejidad del protocolo y la necesidad de reactivos especializados.

Para la detección rutinaria de *E. coli* en leche, métodos como la PCR en tiempo real siguen siendo más prácticos debido a su rapidez y facilidad de automatización. No obstante, en situaciones donde la detección de bajas concentraciones de patógenos es crítica, la PCR-HCR podría ser una herramienta valiosa para reforzar la vigilancia microbiológica y minimizar el

riesgo de contaminación en productos lácteos.

PCR Convencional Combinada con Perlas Magnéticas Funcionalizadas con Polilisina (PLL-MB-PCR)

Finalmente, el uso de perlas magnéticas funcionadas con poli-L-lisina (PLL-MB) ha mejorado significativamente la captura y purificación de ADN en matrices complejas, facilitando su detección por PCR. Estas nanopartículas tienen la capacidad de unirse electrostáticamente a las moléculas de ADN, lo que permite su extracción eficiente incluso en muestras con bajos niveles de material genético, como alimentos altamente procesados (Deng et al., 2021).

Siguiendo esta línea de optimización en la detección molecular (Deng et al., 2021), propusieron una estrategia basada en PCR convencional combinada con perlas magnéticas funcionadas con polilisina (PLL-MB-PCR), enfocándose en la detección de *E. coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en productos lácteos. La incorporación de perlas magnéticas recubiertas con polilisina permitió capturar bacterias mediante interacciones electrostáticas, facilitando su concentración y purificación antes de la amplificación por PCR. Esta estrategia redujo la interferencia de la matriz alimentaria y mejoró la eficiencia en la extracción de ADN, logrando un límite de detección de 7×10^2 UFC/mL para *E. coli* O157:H7 en leche. Su aplicación representa un avance en la detección rápida y eficiente de patógenos en matrices lácteas, fortaleciendo los sistemas de control microbiológico.

La funcionalización de perlas magnéticas con polilisina en la PCR convencional es un aspecto clave en la optimización de la detección de *E. coli* en leche. La poli L-lisina, debido a su carga positiva, facilita la captura de células bacterianas con carga negativa mediante interacciones electrostáticas, lo que permite concentrar y purificar el ADN antes de la

amplificación. Este enfoque mejora la eficiencia de extracción y minimiza la interferencia de la matriz láctea, optimizando la sensibilidad y especificidad del método.

Aunque la incorporación de perlas magnéticas recubiertas con polilisina aporta una ventaja en la preconcentración de bacterias, su implementación puede también requerir pasos adicionales que aumentan el tiempo total del análisis en comparación con técnicas más directas como la PCR en tiempo real. A pesar de esta limitación, la estrategia PLL-MB-PCR representa un avance significativo en la detección de *E. coli* en leche, proporcionando una herramienta eficaz para mejorar la vigilancia microbiológica y garantizar la seguridad de los productos lácteos.

Todas estas variantes han demostrado ser herramientas fundamentales en el ámbito de la seguridad alimentaria, permitiendo la detección rápida y precisa de microorganismos patógenos en productos de origen animal y vegetal. Su implementación ha optimizado los procesos de control microbiológico, contribuyendo a la reducción del riesgo de brotes de enfermedades de transmisión alimentaria y al cumplimiento de normativas sanitarias internacionales, garantizando así la inocuidad de los alimentos y la protección de la salud pública.

En este contexto diferentes variantes de la PCR se han desarrollado y son útiles en el diagnóstico microbiológico al incorporar un sistema cuantitativo, permitiendo no solo la detección, sino también la cuantificación precisa de microorganismos como *E. coli*, en alimentos como la leche, fortaleciendo así los sistemas de vigilancia y control sanitario.

A pesar de todas las variantes y ventajas que se han desarrollado alrededor de la PCR convencional, ésta presenta limitaciones en términos de rapidez y cuantificación. Según los estudios revisados, la PCR en tiempo real (qPCR) podría ser una alternativa más eficiente, al

proporcionar resultados cuantitativos en menor tiempo y sin necesidad de electroforesis en gel.

PCR en Tiempo Real (qPCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR) se distingue por la cuantificación en tiempo real de una secuencia de ADN específica durante la amplificación, en contraste con la PCR convencional, cuya detección del producto ocurre únicamente en la fase final de la reacción. La qPCR proporciona una mayor sensibilidad y precisión en la cuantificación del ADN, evitando las limitaciones del análisis de punto final, donde las reacciones pueden alcanzar la fase de saturación y generar resultados equívocos (Jyothy et al., 2020).

El principio de la qPCR se basa en la detección de fluorescencia emitida por moléculas marcadas de forma específica, ya sea por intercalación en el ADN de doble cadena o mediante sondas dirigidas a secuencias diana. La señal fluorescente es proporcional a la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo, permitiendo determinar la concentración inicial del templado con alta especificidad. Los termocicladores de qPCR combinan una plataforma térmica de alta precisión, una fuente de excitación óptica (láser o lámpara de tungsteno), una cámara de detección de fluorescencia de alta sensibilidad y software especializado para el procesamiento y análisis cuantitativo de los datos (Dymond, 2013; Tamay de Dios et al., 2013).

La detección de la amplificación en qPCR se basa en la emisión de señales fluorescentes, las cuales pueden generarse mediante dos estrategias principales. Una de ellas es el uso de sondas intercalantes, como SYBR Green I, que se unen inespecíficamente a la doble hebra de ADN y emiten fluorescencia proporcional a la cantidad de producto amplificado. Aunque esta técnica es ampliamente utilizada por su sencillez y bajo costo, puede generar señales

inespecíficas si se forman dímeros de cebadores o productos de amplificación no deseados (Harshitha & Arunraj, 2021). La otra estrategia consiste en el uso de sondas específicas, como TaqMan, que contienen un fluoróforo en su extremo 5' y un quencher en su extremo 3'. Durante la amplificación, la actividad exonucleasa de la polimerasa degrada la sonda, separando el fluoróforo del quencher y permitiendo la emisión de fluorescencia. Este método ofrece una alta especificidad, ya que solo genera señal cuando el ADN diana es amplificado.

La qPCR permite la cuantificación absoluta del ADN mediante curvas estándar, determinando la concentración exacta de una secuencia diana, y la cuantificación relativa, comparando la abundancia de un gen de interés con respecto a un gen de referencia. Estos enfoques son esenciales en estudios de expresión génica, detección de patógenos, análisis de carga viral y evaluación del número de copias de ADN, proporcionando datos precisos y reproducibles en investigación biomolecular y diagnóstico molecular (Dymond, 2013).

Ejemplos de qPCR en la detección de *E. coli*

Un ejemplo del uso de la qPCR es el estudio realizado por (Sadeq et al., 2018), quienes determinaron la presencia de genes de virulencia en *E. coli* (gen *hlyA*, hemolisina A) y en *Staphylococcus aureus* (gen *sea*, enterotoxina estafilocócica A) en muestras de leche cruda de búfala provenientes de una provincia de Irak. Para la detección, utilizaron la sonda fluorescente SYBR Green. Se analizaron 24 muestras mediante qPCR, identificándose 4 muestras positivas para *S. aureus* y 7 para *E. coli*, lo que representa una prevalencia del 29,2%. Esta prevalencia fue considerablemente menor en comparación con la reportada en otros países, como Estados Unidos (66,6%) y España (58,6%). Aunque el estudio se centró en aspectos epidemiológicos, los resultados demuestran que es posible implementar qPCR como herramienta de diagnóstico

molecular incluso en países con recursos económicos limitados.

Otro artículo muestra también el uso de la qPCR en estudios de prevalencia. Así, (Pakbin et al., 2023) en este estudio, evaluó la prevalencia de *E. coli* del serogrupo O157 en 144 muestras de leche cruda y otras matrices alimentarias mediante qPCR en tiempo real con SYBR Green, utilizando análisis de curva de fusión dirigido al gen *rfbA*. La técnica fue validada mostrando alta sensibilidad y especificidad, con un límite de detección de $1,0 \times 10^1$ UFC/mL. Los resultados indicaron que el 2,77% de las muestras de leche cruda resultaron positivas para *E. coli* O157.

El estudio destaca la qPCR como una metodología altamente eficiente para la detección de *E. coli* O157, resaltando su rapidez, sensibilidad y adaptabilidad. Logrando resultados confiables sin necesidad de un enriquecimiento previo de las muestras, algo que normalmente se considera esencial para mejorar la detección bacteriana. Además, el hecho de alcanzar un bajo límite de detección sin controles adicionales de inhibidores refuerza la idea de que este método es no solo sensible, sino también robusto y práctico. Esto representa una ventaja importante al reducir tiempos y costos, lo que facilita su uso en análisis rutinarios de seguridad alimentaria.

Inmunomagnética Combinada con PCR en Tiempo Real (IMS-RTiPCR)

El uso de separación inmunomagnética también se ha volcado en conjunto con la qPCR. (Mercanoglu Taban & Aytac, 2019), desarrollaron una estrategia basada en separación inmunomagnética combinada con PCR en tiempo real (IMS-RTiPCR) los autores optimizaron un método rápido y específico para la detección de *E. coli* O157:H7 (EHEC) en leche cruda. Para ello, se contaminó artificialmente leche cruda y carne molida con diferentes concentraciones de EHEC (10^1 , 10^3 y 10^5 UFC/mL), y se aplicó un pre-enriquecimiento no selectivo a 35 °C durante 8 horas, seguido de la captura con microesferas magnéticas o sin ella. Luego, se identificaron las

células de EHEC mediante la técnica de RTiPCR.

El estudio también evaluó la eficiencia del método sin pre-enriquecimiento, y se encontró que el uso de microesferas magnéticas específicas por sí solo no mejoró la detección en muestras de leche y carne, resultando en falsos negativos a menos que se realizara el pre-enriquecimiento de 8 horas. El método completo puede realizarse en menos de 9 horas, con un límite mínimo de detección de 10^3 UFC/mL, lo que lo convierte en una técnica sencilla y rápida con gran potencial para su implementación en el cribado rutinario de EHEC en análisis microbiológicos, superando en rapidez a técnicas convencionales. De forma similar a lo descrito por Park et al., (2020), en muestras de leche contaminadas de forma artificial se realizó un pre-enriquecimiento de 1 hora en caldo peptona agua junto con perlas unidas a anticuerpos anti *E. coli* O157. Esto permitió aumentar ligeramente la cantidad bacteriana y favorecer la formación adecuada de complejos antígeno-anticuerpo en la muestra antes de la aplicación de la separación inmunomagnética. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN y la cuantificación mediante qPCR, lo que redujo la duración total del proceso a 3 horas, siendo uno de los protocolos más cortos reportados en la literatura. Además, los límites de detección obtenidos fueron bajos.

HRM-PCR (High-Resolution Melting PCR)

Una variante o técnica complementaria de la qPCR es HRM-PCR (High-Resolution Melting PCR), que se basa en el análisis del perfil de fusión o curva de “melting”, de los productos amplificados por PCR, así, después de la amplificación del ADN, este se calienta lentamente y lo que se mide es la disminución de la fluorescencia dada por el desacoplamiento de la sonda intercalante SYBR Green (que solo se une al ADN de doble cadena). Lo interesante es que esta técnica permite detectar diferencias muy pequeñas en la secuencia de ADN

(mutaciones, polimorfismos), ya que dichas diferencias afectan la temperatura de desnaturalización del ADN (Tong & Giffard, 2012). De esta forma algunos autores han hecho uso de esta metodología, un ejemplo de ello es la publicación de (Shan et al., 2024), que utilizó un método que combina qPCR con análisis de fusión de alta resolución, para la sub-tipificación de cinco tipos de *E. coli* diarreogénica, STEC, ETEC, EIEC, EAEC, EPEC que son de alta importancia en salud pública. La técnica mostró una sensibilidad y especificidad del 100% con límite de 0,5 y 1 ng/μL al identificar el gen *invE*, con una alta repetibilidad. Así mismo se llevó a cabo una validación en 45 muestras de leche inoculadas artificialmente con cepas clínicas, demostrando que la matriz Teniendo en cuenta lo anterior, se hace evidente que en la industria láctea la implementación de técnicas como la PCR en tiempo real qPCR representa una herramienta fundamental para garantizar la seguridad alimentaria. Su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, superior a la de la PCR convencional permiten la detección temprana de patógenos como *E. coli* en leche y productos derivados, incluso en niveles bajos de contaminación. Esto es crucial para prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, cumplir con las normativas sanitarias vigentes y proteger la salud del consumidor, sin afectar la eficiencia de los procesos productivos.

PCR Múltiplex

La PCR multiplex es una variante de la PCR, que posibilita la amplificación simultánea de múltiples secuencias diana en una sola reacción mediante el uso de distintos pares de cebadores específicos. Esta metodología optimiza el tiempo y los recursos, permitiendo la detección simultánea de varios patógenos, genes de resistencia antimicrobiana o mutaciones genéticas en una única muestra, lo que la hace altamente eficiente en el ámbito clínico y microbiológico (Elnifro et al., 2000). Esta PCR implica utilizar más de una pareja de cebadores

en cada reacción, se pueden emplear hasta ocho cebadores. Este tipo de PCR es adecuado para la detección de distintos genes simultáneamente en la misma reacción, en un mismo tubo. Los productos pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa. La Multiplex PCR es frecuentemente usada en diagnóstico médico, ya que ahorra templado, tiempo y gastos, pero requiere una cuidadosa optimización, porque primero deben optimizarse cada reacción por separado (Hussain et al., 2025; Kabiraz et al., 2023; Zhu et al., 2020).

Ejemplos de PCR Multiplex en la detección de *E. coli*

La combinación de PCR convencional y PCR multiplex es una estrategia eficiente para la detección y tipificación de *E. coli* en alimentos. Por ejemplo (Wei et al., 2018), utilizaron PCR multiplex convencional en la detección simultánea de *E. coli* O157: H7 *S. aureus* y *Salmonella spp* en medios de cultivo y matrices alimentarias artificiales, se diseñaron cebadores dirigidos a los genes *rfbE*, *nuc* e *invA*, específicos de cada patógeno. Es de resaltar que la sensibilidad de la técnica disminuyó levemente al ser usada en la matriz alimentaria (10^3 UFC/mL en cultivos puros y 10^4 UFC/mL en leche estéril contaminada artificialmente), a pesar de ellos el método demostró ser rápido específico y reproducible. En ese orden de ideas (Mohammadi & Abiri, 2013), llevaron a cabo un estudio epidemiológico para determinar la prevalencia de cepas EPEC en muestras de leche cruda de vaca recolectadas en granjas de un provincia Iraní. Se analizaron 206 muestras por PCR multiplex convencional, teniendo como blanco los genes *eaeA*, *stx1* y *stx2*. Los resultados indicaron que el 8.25% (17 muestras) de las muestras fueron positivas para *eaeA* y negativas para *stx1* y *stx2*, lo que confirma la presencia de cepas EPEC. Estos hallazgos sugieren que la leche cruda puede actuar como vehículo de transmisión de EPEC, por lo que se recomienda implementar medidas preventivas estrictas para reducir la contaminación bacteriana de origen animal en productos lácteos.

También (Kumar et al., 2013) desarrollaron un ensayo de PCR multiplex para la detección específica de *E. coli* O157:H7 en muestras de leche. Esta técnica se centró en la amplificación de los genes *uidR* (presente en todas las cepas de *E. coli*) y *fliCH7* (específico del antígeno flagelar H7 de *E. coli* O157:H7), generando productos de 152 pb y 625 pb, respectivamente. El método mostró alta especificidad al diferenciar *E. coli* O157:H7 de otras bacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus*. Aplicado a 24 muestras de leche cruda, detectó *E. coli* O157:H7 en una muestra sin enriquecimiento previo y en tres muestras adicionales tras un enriquecimiento de 4 horas en caldo CT-SMAC, mientras que ninguna muestra de leche pasteurizada resultó positiva.

Por otro lado (Caro et al., 2006), investigaron la presencia de *E. coli* O157:H7 en leche cruda de oveja en España utilizando PCR multiplex para detectar los genes *rfbO157* y *fliCH7*, amplificando fragmentos de 259 pb y 625 pb, respectivamente. Además, las cepas confirmadas fueron analizadas para genes de virulencia (*stx1*, *stx2*, *eaeA* y *ehxA*), con una mayor prevalencia de *stx2*. Se detectó *E. coli* O157:H7 en un 3.5% de las muestras analizadas, evidenciando que la leche de oveja puede estar contaminada con cepas potencialmente patógenas. Estudios similares como el realizado en quesos frescos artesanales elaborados con leche cruda en Lombardia Italia, (Bernini et al., 2010), realizaron dos PCR multiplex convencionales, una directamente sobre el ADN extraído de las muestras de queso (enfoque independiente de cultivo) y otra sobre ADN de células cultivables recuperadas en medios selectivos. Los genes *ipaH* (*E. coli* enteroinvasiva) y *stx* (*E. coli* productora de toxina Shiga) se detectaron solo en muestras con previo cultivo mientras que el método independiente de cultivo subestimó la presencia. Los genes de enterotoxinas estafilocócicas de *S. aureus* se encontraron en tres quesos (gen *sea* en los tres quesos, y los genes *sed* y *sej* solo en dos) lo que sugieren que algunos quesos artesanales podrían

representar un riesgo para la salud del consumidor.

Además de los estudios ya mencionados, la literatura científica reporta múltiples trabajos en los que se ha empleado la PCR multiplex convencional para estudios epidemiológicos enfocados en la prevalencia de bacterias como *E. coli* en matrices alimentarias, especialmente productos lácteos y, en particular, leche, en diversas regiones del mundo (Cremonesi et al., 2005; Omiccioli et al., 2009; Rey et al., 2006; Zago et al., 2007). A pesar de no ser una técnica de reciente aparición, esta metodología ha demostrado resultados relevantes en términos de sensibilidad y especificidad, no solo para la detección de *E. coli*, sino también para la subtipificación de sus variantes patogénicas y la identificación simultánea de otros géneros bacterianos de interés en la industria alimentaria láctea. No obstante, la mayoría de estos estudios no son recientes, lo que podría atribuirse al surgimiento de nuevas tecnologías, incluyendo variantes avanzadas de la propia PCR multiplex. A pesar de ello en la actualidad autores han llevado a cabo estudios en leche destinados al diagnóstico de mastitis subclínica, la cual, de forma indirecta, puede estar asociada a la presencia de patógenos zoonóticos transmitidos por alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, entre otros.

Es el caso de Solanki & Devi (2024), un estudio realizado en Rajasthan comparó la eficacia de la PCR multiplex con métodos convencionales, como el cultivo bacteriano y las pruebas bioquímicas, para la detección de bacterias asociadas a mastitis subclínica en vacas y búfalas. La PCR multiplex mostró una mayor sensibilidad diagnóstica, detectando *S. aureus* en el 32,5% y *E. coli* en el 8% de las muestras, frente a los valores obtenidos mediante cultivo y caracterización fenotípica (27% para *S. aureus* y 6,5% para *E. coli*) y al 45% de muestras positivas obtenidas mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT). Estos resultados evidencian la superioridad de la PCR en términos de sensibilidad. Además, esta técnica permite

la identificación simultánea de múltiples patógenos en una sola reacción, lo que representa un beneficio significativo frente a los métodos tradicionales que requieren procedimientos separados para cada microorganismo. Otra característica destacable es la rapidez: mientras que los métodos convencionales pueden tardar más de 48 horas en ofrecer resultados, la PCR multiplex permite obtener un diagnóstico en pocas horas. No obstante, como se ha señalado previamente, esta técnica no permite discriminar entre ADN bacteriano proveniente de bacterias viables o no viables, lo cual representa una limitación a considerar en su aplicación diagnóstica.

Inmunoensayo de Flujo Lateral, Basado en PCR Multiplex

Una de las principales características de la PCR multiplex convencional es la necesidad de realizar un análisis post-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo, existen alternativas más recientes, como el caso de (Zhao et al., 2023), desarrollaron un inmunoensayo de flujo lateral, basado en PCR multiplex y el uso de nanopartículas de oro, lo que permitió identificar de forma simultánea a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *E. coli* O157:H7, tres de los principales agentes causantes de enfermedades alimentarias. Primero, se cultivaron las bacterias y se realizaron diluciones para obtener distintas concentraciones. También se contaminó artificialmente carne de pollo para probar el método. Luego, se extrajo el ADN mediante un método simple y se realizó una PCR multiplex, en la cual cada fragmento amplificado quedó marcado con dos etiquetas: un grupo tiol (-SH) en el extremo forward para unirse a las nanopartículas de oro, y un marcador específico en el extremo reverso (biotina, FITC o digoxina), uno para cada tipo de bacteria. Posteriormente, se añadieron las nanopartículas de oro conjugadas con los productos de PCR. Se armó una tira de flujo lateral con tres líneas de prueba: T1 con anticuerpos anti-biotina para detectar *Listeria monocytogenes*, T2 con anticuerpos anti-FITC para *Salmonella Typhimurium* y T3 con anticuerpos anti-digoxina para *E.*

coli O157:H7. Si la muestra contiene alguna bacteria, la línea correspondiente se tiñe de rojo debido al color característico del oro; en caso contrario, no aparece ninguna banda. Lo interesante es que el procesamiento dura alrededor de 4 horas (sin necesidad de un enriquecimiento en caldo nutritivo previo), además los límites de detección fueron $0,3 \times 10^1$ a $3,5 \times 10^2$ UFC/mL para las tres bacterias.

Estos estudios evidencian el papel clave de la PCR multiplex en la detección rápida y precisa de *E. coli* en productos lácteos, proporcionando alternativas confiables a los métodos tradicionales de cultivo y aislamiento. Su implementación en el control de calidad permite una identificación eficiente de cepas patogénicas, contribuyendo a la seguridad alimentaria y a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos.

En la detección de *E. coli* en leche y otras matrices lácteas, la PCR multiplex convencional permite identificar varios patógenos al mismo tiempo en una sola reacción, siendo un método cualitativo y accesible para muchos laboratorios. Sin embargo, debido a que requiere electroforesis para visualizar los resultados, puede ser un proceso más lento y con menor sensibilidad, lo que dificulta la detección en muestras con baja carga bacteriana. Por otro lado, la PCR multiplex en tiempo real (qPCR) ofrece una detección más rápida y sensible al cuantificar el ADN durante la amplificación, además de permitir una mejor diferenciación entre cepas y mayor especificidad. Aunque la qPCR implica costos y equipos más especializados, su rapidez y precisión la hacen especialmente útil para el análisis rutinario en la industria láctea.

PCR Multiplex en Tiempo Real

El uso de PCR multiplex en tiempo real para la identificación de *E. coli* en leche representa una mejora significativa en términos de rapidez, precisión y alcance diagnóstico. La

posibilidad de detectar simultáneamente múltiples patotipos diarrogénicos mediante la amplificación de genes de virulencia específicos optimiza la vigilancia microbiológica en la industria láctea, permitiendo un control más eficiente de la seguridad alimentaria. Autores como (Liu et al., 2025) han desarrollado protocolos de qPCR multiplex para la detección simultánea de *Salmonella spp.*, *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* en muestras de leche, con el diseño de “cebadores” específicos para los genes *invA*, *stx1*, *entFM* y *mpl*, respectivamente. Adicionalmente para evitar falsos positivos, las muestras bacterianas se trataron con SDS y PMA para diferenciar células viables de muertas. El método optimizado mostró un límite de detección de 10^2 UFC/mL, comparable con el método de recuento en placa, y permitió detectar rápidamente las bacterias viables en leche en menos de 7 horas.

Una característica particular de la qPCR multiplex es la necesidad de utilizar sondas específicas, como las tipo TaqMan, o colorantes intercalantes como SYBR Green, para permitir la detección de múltiples dianas genéticas en una sola reacción. En el caso de las sondas TaqMan, estas deben estar conjugadas con diferentes fluorocromos (como FAM, VIC, TET o NED) que emiten señales fluorescentes distintas, lo que permite identificar simultáneamente cada uno de los blancos amplificados.

(Hodzic et al., 2023), desarrollaron y validaron un sistema de qPCR multiplex con sondas tipo TaqMan para la detección simultánea de ocho patógenos transmitidos por alimentos: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica*. Se diseñaron ensayos específicos para cada patógeno utilizando regiones conservadas del genoma, evaluadas mediante análisis BLAST para garantizar la especificidad. La homología con otras especies fue baja (11-

57%), lo cual confirmó una alta especificidad. Además, se optimizaron las temperaturas de alineamiento y el tamaño de los amplicones para permitir la multiplexación eficiente. La técnica logró detectar todos los patógenos a concentraciones tan bajas como 10^1 UFC/10 g o mL en la mayoría de las matrices alimentarias (carnes, leche, huevos, vegetales, frutas), las cuales fueron contaminadas artificialmente para su evaluación y además fueron previamente enriquecidas en caldo tripticasa de soya.

La sensibilidad fue particularmente alta para *E. coli* O157:H7, *S. aureus* y *Salmonella spp.*, mientras que *C. jejuni* y *Y. enterocolitica* que presentaron límites ligeramente superiores (10^2 UFC) en ciertas muestras. Además, la estrategia de etiquetado combinatorial (MCPC - combinan varios fluorocromos en distintas proporciones o combinaciones para poder detectar simultáneamente más objetivos en una sola reacción), permitió detectar varios patógenos simultáneamente sin perder sensibilidad ni especificidad, superando limitaciones comunes en la qPCR multiplex. La extracción y concentración previas de las muestras ayudaron a eliminar inhibidores y mejorar la sensibilidad. Comparado con PCR convencional, cultivo o qPCR con SYBR Green, este método es más sensible, rápido y versátil. Sin embargo, no distingue entre células viables y no viables, lo que puede sobreestimar la carga bacteriana; por ello, se recomienda usarlo junto con colorantes intercalantes o análisis de pre-rRNA.

Otros autores no solo han logrado validar este tipo de qPCR multiplex para la detección de *Campylobacter spp.* Por ejemplo (Fonseca et al., 2025), validó un kit comercial basado en qPCR (sistema BAX®) para detectar *Campylobacter spp.* en leche cruda de vaca y queso artesanal, comparado con el método tradicional microbiológico avalado por las normas ISO. Se observó que componentes naturales de la leche, como lactoferrina y el sistema lactoperoxidasa, inhibían la detección bacteriana, por lo que se aplicó un tratamiento térmico y un paso de

enriquecimiento secundario con caldo Bolton, lo cual mejoró significativamente la sensibilidad del método qPCR. Se obtuvo límite de detección de 2.04×10^{-1} UFC/mL con qPCR, comparable al método tradicional (2.378×10^{-1} UFC/ mL). En el estudio de sensibilidad, la qPCR alcanzó 93.1% frente al 96.5% del método de referencia, con una precisión relativa del 97%.

El sistema utiliza PCR en formato multiplex junto al kit comercial basado en qPCR (sistema BAX®), permite detectar simultáneamente el género *Campylobacter* y diferenciar las especies *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, mediante sondas específicas dirigidas a genes como *hipO*, *asp* y *glyA*, respectivamente. Esta estrategia acorta el tiempo de análisis a 48 h y mejora la identificación en comparación con los métodos tradicionales avalados por la norma ISO, que pueden tardar hasta 10 días. Además, este enfoque molecular validado podría adaptarse para detectar otros patógenos relevantes en alimentos, como *E. coli*, mediante el diseño de cebadores y sondas específicas para genes característicos como *uidA* o *stx*, ampliando así su utilidad en el control microbiológico de productos lácteos (Manfreda et al., 2003; Olson et al., 2025).

RT – PCR

La PCR con transcripción reversa (RT-PCR) es una herramienta molecular que permite detectar y amplificar ARN mensajero (ARNm) bacteriano, lo que resulta especialmente útil para identificar bacterias viables en muestras de alimentos. Esta técnica combina la acción de la transcriptasa reversa, que convierte el ARN en ADN complementario (ADNc), con la amplificación posterior mediante PCR (Manfreda et al., 2003; Olson et al., 2025). En el caso de bacterias patógenas presentes en productos alimentarios como la leche, la RT-PCR dirigida a genes específicos permite no solo su identificación, sino también evaluar su viabilidad, ya que el ARNm es una molécula inestable que se degrada rápidamente tras la muerte celular (Manfreda et

al., 2003; Olson et al., 2025). Por ello, la detección de ARNm actúa como un marcador confiable de bacterias vivas, diferenciándolas de aquellas que han sido eliminadas por tratamientos térmicos u otros procesos. Esta capacidad convierte a la RT-PCR en una técnica valiosa para el control microbiológico en alimentos, al ofrecer una alternativa más rápida y sensible que los métodos de cultivo convencionales (Azinheiro et al., 2021).

Ejemplos de RT-PCR en la detección de *E. coli*

Todas las variantes de PCR mencionadas hasta el momento se basan en la detección de ADN, sin embargo, Choi y Lee (2011) evaluaron la especificidad y sensibilidad de una técnica de RT-PCR para detectar *E. coli* O157:H7 viable en leche. Se diseñaron varios pares de cebadores dirigidos a los genes *rfbE* y *wbdN*, específicos del antígeno O157. Los resultados mostraron que solo las cepas de *E. coli* O157:H7 dieron productos amplificados, mientras que otras bacterias (incluyendo otras enterobacterias y Gram positivos) no generaron señal, lo que indica alta especificidad. También se evaluó la sensibilidad de diferentes juegos de cebadores RT-PCR dirigidos a *E. coli* O157:H7 en leche inoculada artificialmente con concentraciones de 1×10^6 a 1×10^1 UFC/mL. Se encontró que el par de cebadores RFB10-RFB11 fue el más sensible, logrando detectar hasta 10 células por mililitro, lo cual representa una mejora significativa respecto a estudios anteriores (Choi & Lee, 2011).

En este artículo también se evaluó el efecto de tratamientos bactericidas, como el calor y agentes desinfectantes y RNasa A, sobre la capacidad del RT-PCR para detectar bacterias viables. Además, se evidenció que el tratamiento térmico a 121 °C durante 15 minutos fue el más eficaz para eliminar la señal de RT-PCR mientras que el mismo tiempo a 65°C no se vio inhibido, indicando que destruye el ARN mensajero bacteriano. Estos resultados indican que, el

ARNm es un marcador fiable de viabilidad bacteriana, ya que se degrada rápidamente tras la muerte celular. Por ello, la combinación de tratamiento térmico, RNasa A y cebadores sensibles como RFB10-RFB11 permite detectar específicamente bacterias viables de *E. coli* O157:H7 con alta sensibilidad (hasta 10 células/mL), sin requerir cultivo previo (Choi & Lee, 2011).

Cabe resaltar que uno de los principales inconvenientes con las PCR retrotranscriptasa es que el ARN es un tipo de nucleótido lábil y puede verse afectado por diversas razones lo cual podría ser una de las razones para no ser tan utilizado en estudios de prevalencia en diferentes matrices alimentarias.

La PCR Anidada

Emplea dos rondas de amplificación sucesivas con pares de cebadores diferentes para mejorar la sensibilidad y especificidad de la detección. La primera amplificación genera un fragmento de ADN más extenso, que luego sirve como templado para una segunda PCR más específica. Este método es particularmente útil en la detección de microorganismos en muestras con baja concentración de ADN, reduciendo la amplificación inespecífica y los falsos positivos (Green & Sambrook, 2019b).

La técnica de PCR anidada se considera una alternativa prometedora para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 en matrices complejas como la leche, donde la presencia de inhibidores naturales, como grasas, proteínas y sales de calcio, puede afectar la eficiencia de amplificación en métodos (Zbrun et al., 2024). A diferencia de la PCR estándar o de variantes como la PCR multiplex, la PCR anidada utiliza dos rondas sucesivas de amplificación con pares de iniciadores diferentes (externos e internos), lo que, en teoría, mejora tanto la sensibilidad como la especificidad del ensayo.

Ejemplos de PCR Anidada en la Detección de E. coli

Algunos autores como (Tian et al., 2022) han hecho uso de este tipo de PCR de forma interesante ellos utilizaron un método de separación inmunomagnética estandarizado en el laboratorio en el cual, utilizaron la proteína recombinante de OmpA, que es un componente ampliamente distribuido en la membrana externa de *E. coli* este se utilizó para la generación de anticuerpos monoclonales en ratones BALB/c. Estos anticuerpos se acoplaron a perlas magnéticas para capturar selectivamente bacterias en muestras de leche contaminadas artificialmente. Posteriormente, los productos inmunoprecipitados se analizaron por PCR anidada, alcanzando un límite de detección de 10^2 UFC/mL.

Respecto a este tipo de PCR, se encontraron pocos artículos en la literatura de la industria de alimentos. Sin embargo, un estudio realizado por Madi & Al-Samarai (2022) evaluó la eficacia de la PCR anida basada en el gen *B1* para la detección de *Toxoplasma gondii* en muestras de leche de cabras lactantes. Esta técnica permitió identificar la presencia de ADN del parásito en el 28.7% (23/80) de las muestras analizadas, evidenciando una alta tasa de infección en animales aparentemente sanos. La elección de la PCR anidada, en lugar de una PCR convencional o cuantitativa (qPCR), probablemente se debió a su mayor sensibilidad y especificidad, particularmente útil en muestras con baja carga genética del patógeno, como ocurre en la leche. Además, al tratarse de un entorno con recursos potencialmente limitados, la PCR anidada representa una opción técnicamente accesible que no requiere equipamiento especializado como en el caso de la qPCR. Al utilizar dos rondas sucesivas de amplificación, esta técnica mejora la detección de secuencias específicas del parásito, reduciendo el riesgo de falsos negativos y aumentando la confiabilidad de los resultados.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la utilidad de la n-PCR como herramienta diagnóstica sensible para la identificación directa de *T. gondii* en productos lácteos, con implicancias tanto veterinarias como en salud pública. Asimismo, esta metodología puede extrapolarse al diagnóstico de otras enfermedades de origen alimentario, como la detección de *E. coli* patógena en leche, donde la necesidad de detectar pequeñas cantidades de ADN bacteriano entre una matriz compleja también exige técnicas de alta sensibilidad como la PCR anidada.

Por otra parte, como se mencionó en la introducción, la PCR digital es una técnica que divide la muestra en miles de micro-reacciones para detectar y cuantificar ADN o ARN con alta precisión y sensibilidad, ofreciendo una cuantificación absoluta y reduciendo falsos positivos. En la microbiología de alimentos se fomenta cada vez más su uso, por ejemplo (Wang Meng et al., 2018) identificaron *Salmonella thyphimurium* en muestras de leche artificialmente contaminadas, los autores lograron límites de detección mucho más bajos de los que previamente se han observado con otros tipos de PCR, $1,0 \times 10^{-4}$ ng/uL. Este resultado muestra como esta metodología es mucho más sensible, aunque no evita que se deban hacer previos enriquecimientos, y/o tratamientos con PMA. Otros autores han realizado la identificación de *Salmonella spp.* en muestras de leche (Du et al., 2021). Aunque el límite de detección fue un poco mayor, es mayor al del artículo anterior con $1,0 \times 10^{-1}$ UFC/mL, lo que confirma que es una técnica mucho más sensible aunque probablemente más costosa comparado con la PCR convencional o incluso con la qPCR.

Ventajas y Desventajas de las Técnicas Moleculares de PCR para la Detección de *Escherichia coli* en Leche Cruda y Productos Lácteos Procesados

PCR Convencional

La PCR convencional ha sido ampliamente utilizada en la industria de alimentos como una herramienta efectiva para la detección de *E. coli*, especialmente en productos lácteos como la leche. Uno de sus principales beneficios es su accesibilidad técnica y económica es que, no requiere equipos especializados como los necesarios para la PCR en tiempo real, lo que la convierte en una opción viable para laboratorios con recursos limitados. Esta ventaja fue destacada en varios de los estudios analizados, en los cuales la PCR convencional fue empleada para la identificación de genes específicos de virulencia de *E. coli*, como *stx1*, *stx2*, *eae* y *wzy*, así como para la detección de mecanismos de multirresistencia presentes en cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos, lo que representa un aspecto de relevancia directa para la salud pública. Así, (Megawer et al., 2020; Mwasinga et al., 2023), llevaron a cabo los estudios en países de medianos y bajos ingresos como Egipto y Zambia respectivamente; donde no solo identificaron genes de virulencia como *wzy* involucrado en la síntesis del LPS, sino que además, genes de resistencia a un antibiótico como cefotaxima un cefalosporina de tercera generación (en *E.coli* aislada de leche), lo cual evidencia la utilidad de la PCR convencional, principalmente en regiones donde el acceso a tecnologías más innovadoras se dificulta, sin embargo teniendo un impacto relevante en salud pública. Además, también se hace uso de esta técnica en países con mayor capacidad tecnológica, y particularmente (Otero et al., 2017), identificó factores de virulencia, principalmente asociados a *E. coli* productora de toxina shiga, siendo interesante que al llevar a cabo inicialmente pruebas de inmunoensayo, se produjeron resultados negativos, comparado con la PCR convencional en la cual la identificar genes *stx* se

detectaron 176 de 388 muestras positivas, lo que evidencia la mayor sensibilidad y utilidad de esta técnica en comparación con metodologías microbiológicas más tradicionales.

El aislamiento o enriquecimiento previo fue necesario en algunas de las publicaciones consultadas, esto permitió una validación confiable del patógeno en cuestión, así como una validación rápida respecto a la identificación netamente microbiológica. Por ejemplo (Caro et al., 2006) identificó la presencia de *E. coli* 0157:H7 en muestras de leche cruda de oveja en un tiempo de alrededor de 30 horas, que resulta inferior a la metodología solo en cultivo; además analizaron genes de virulencia *stx*, pero además dentro de esas cepas STEC, las que contenían otros genes de virulencia como *ehxA* y *eaeA*.

La PCR convencional también es valorada por su versatilidad que permite adaptar los protocolos según el tipo de muestra o el objetivo del análisis (detección de serotipos, resistencia antimicrobiana, factores de virulencia), un ejemplo de ello es el artículo publicado por (Chandrakar et al., 2022), el cual llevó a cabo un estudio para identificar de forma indirecta resistencia y mecanismos de resistencia bacteriana; a través de la identificación de *E. coli* y presencia de principalmente betalactamasas, en moscas domesticas encontradas en la leche y carne en tiendas de la ciudad de Raipur en India, evidenciando la transmisión de dichos mecanismos de resistencia a el sector de los alimentos, y aunque no es el objetivo del estudio si evidencia la versatilidad de la PCR convencional y su aplicación en diferente matrices. En esa misma línea de identificación de resistencia a antibióticos (Patange & Thorat, 2022). También en la India se identificó dichos mecanismos en leche cruda de búfalo, queriendo abordar al menos de forma indirecta la causa de infecciones urinarias, gastrointestinales así como de septicemia en la región de Mumbai, logrando a través de la PCR convencional hallazgos interesantes.

Otra ventaja destacable es su alta especificidad, ya que el diseño de cebadores puede orientarse hacia regiones genéticas muy conservadas o exclusivas de cepas patógenas. Esta especificidad, cuando está bien validada, permite distinguir claramente entre cepas comensales y patógenas, algo fundamental en el análisis de alimentos como la leche, donde la presencia de *E. coli* no siempre indica riesgo si no se trata de una cepa virulenta.

Además, la PCR convencional ha demostrado ser útil como método de confirmación rápida en protocolos multietapa; Por ejemplo, tras un enriquecimiento previo o un aislamiento por cultivo, se utiliza la PCR convencional para verificar la identidad genética del microorganismo. Esto la convierte en una herramienta útil en combinación con otros métodos, sin necesidad de un rediseño completo del flujo de trabajo del laboratorio (Bickley et al., 1996; Riffon et al., 2001; Rossen et al., 1992).

Aunque su sensibilidad no alcanza los niveles de la PCR en tiempo real (Quigley et al., 2012), en los estudios incluidos en la monografía se observó que, con una preparación adecuada de las muestras y un buen diseño de cebadores así como la elección de adecuados controles positivos y negativos, la PCR convencional puede detectar adecuadamente *E. coli* en matrices complejas como la leche; por ejemplo (Mohammadi & Abiri, 2013), identificaron *E. coli* enteropatógena en leche cruda, y utilizaron como controles negativos *E. coli* STEC (productora de toxina shiga) ATCC 43890 (*stx1*) ATCC 43889 (*stx2*), así como un control positivo EPEC ATCC 43887 (*bfpA*). También (McKillip et al., 2000), llevó un estudio en el cual logra identificar la sensibilidad de la PCR convencional en matrices complejas como productos lácteos pudiendo alcanzar una sensibilidad de $1,0 \times 10^2$ a $1,0 \times 10^4$ dependiendo de la metodología de extracción del material genético, lo cual no es malo, y que además dependiendo el diseño de

cebadores la especificidad puede aumentar, sin embargo la carga bacteriana suele ser una limitante relevante.

En el contexto de la industria alimentaria, y particularmente en la detección de *E. coli* en leche, tanto la PCR convencional como la PCR en tiempo real (qPCR) han demostrado ser herramientas eficaces. Sin embargo, existen diferencias sustanciales entre ambas técnicas que condicionan su aplicabilidad, eficiencia y utilidad en entornos industriales.

PCR en tiempo real (qPCR)

La PCR en tiempo real (qPCR) representa una evolución técnica importante respecto a la PCR convencional. Su principal diferencia radica en la capacidad de cuantificar el ADN en tiempo real a través del uso de sondas fluorescentes o intercalantes, eliminando así la necesidad de pasos posteriores de visualización. Esta característica no solo reduce el tiempo total del análisis, sino que también minimiza el riesgo de contaminación cruzada y errores de interpretación (Shahrajabian & Sun, 2024). En esta revisión se evidencia que la qPCR ha sido empleada de manera creciente en la industria láctea, especialmente para el monitoreo rápido de *E. coli* STEC con la particularidad de la necesidad de previo enriquecimiento bacteriano, pero no necesariamente cultivo y aislamiento previo, por ejemplo (Sadeq et al., 2018), quien realizó previo enriquecimiento durante la noche en caldo cerebro corazón, y a partir de este último si llevó a cabo la obtención del ADN bacteriano.

Aunque otros autores, como Pakbin et al., (2023), estandarizaron una metodología basada en la centrifugación por gradiente de densidad, no fue necesario realizar ningún enriquecimiento o cultivo previo antes de la PCR en tiempo real, obteniendo resultados interesantes, como un tiempo de identificación reducido de 3 a 5 horas. Además, el límite de detección para este método fue de 1×10^0 a 1×10^3 UFC/mL, dependiendo de la matriz, lo cual es de gran relevancia

en términos de tiempo. Sin embargo, bajo esta metodología se requieren algunos reactivos y equipos cuyo costo podría incrementar los gastos en comparación con el uso exclusivo del enriquecimiento previo.

Una estrategia interesante en la detección de *E. coli* enterohemorrágica fue desarrollada por Delannoy et al., (2022), en la cual además de identificar genes como *stx*, *eae* y *wzy*, se identificaron nuevos genes diana, entre ellos *espK*, *espV*, *ureD*, *Z2098* y CRISPR_{O26:H11}. No obstante, se hace evidente que tanto el previo enriquecimiento como la separación inmunomagnética resultaron necesarios. Además, se identificó una posible nueva variante en Europa para este tipo de bacteria, *EHEC O80*. Es importante resaltar que, a diferencia de la PCR convencional, la qPCR proporciona datos cuantitativos, lo que permite realizar análisis epidemiológicos más profundos y establecer correlaciones más precisas.

Otro aspecto diferenciador importante es la automatización. La qPCR puede integrarse fácilmente en plataformas robóticas o sistemas de análisis en línea, lo cual es altamente valorado en industrias que requieren control de calidad continuo (Lamas et al., 2016). En contraste, la PCR convencional sigue dependiendo de pasos manuales, como la electroforesis, que son más propensos a errores humanos y dificultan su uso en monitoreo en tiempo real. No obstante, la PCR convencional aún mantiene ciertas ventajas frente a la qPCR en determinados contextos. Por ejemplo, en investigaciones o laboratorios donde se requiere análisis cualitativo inicial o confirmación de aislamiento bacteriano tras cultivo, su bajo costo y la posibilidad de analizar múltiples muestras sin inversión en tecnología avanzada hacen que siga siendo útil.

En resumen, aunque ambas técnicas permiten detectar *E. coli* en leche con altos niveles de especificidad, la PCR en tiempo real ofrece ventajas claras en cuanto a velocidad, sensibilidad, automatización y manejo de matrices complejas, lo que la hace más adecuada para

aplicaciones industriales de rutina. Por su parte, la PCR convencional sigue siendo una herramienta sólida para estudios preliminares, confirmación de resultados y uso en entornos con recursos limitados. La elección entre una u otra dependerá de los objetivos del análisis, la infraestructura disponible y la etapa del proceso de control de calidad en la que se apliquen.

PCR Multiplex

Ahora bien, al analizar el uso de técnicas más avanzadas como la PCR multiplex convencional y la PCR multiplex en tiempo real, se observa una clara evolución en los enfoques de diagnóstico aplicados a la detección de *E. coli* en leche. En la revisión hecha, varios estudios optaron por métodos multiplex con el fin de aumentar la eficiencia analítica, permitiendo detectar simultáneamente múltiples genes de virulencia en una sola reacción. La multiplexación en este formato reduce el número de reacciones necesarias, disminuyendo el consumo de reactivos y tiempos operativos, un aspecto valorado en laboratorios con alto volumen de muestras. Esto representa una ventaja clave en matrices alimentarias como la leche, donde pueden estar presentes diversas variantes patógenas de *E. coli*, cada una con perfiles genéticos distintos (Bernini et al., 2010; Cremonesi et al., 2005; Omiccioli et al., 2009; Solanki & Devi, 2024).

La PCR multiplex convencional ha sido una herramienta particularmente útil en estudios orientados a la caracterización de cepas de *E. coli*, permitiendo detectar genes como *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, entre otros, en una misma muestra (Bernini et al., 2010). Esta técnica ofrece un equilibrio entre accesibilidad y poder analítico, ya que permite ampliar el espectro de detección. Por ejemplo (Wei et al., 2018), que detectó tres tipos bacterianos simultáneamente *E. coli*, *Salmonella* y *S. aureus* en muestras de leche, después de etapas de enriquecimiento en medio Luria Bertani, hecho que como ya ha sido descrito en esta revisión permite mejorar recuentos

bacterianos en casos de bajos inóculos, en este caso particular el límite de detección fue de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, siendo relevante que los autores lo compararon tras la realización de PCR individual para cada bacteria, y encontraron un límite de detección homologado, por lo cual la PCR multiplex logró reducir tiempo y costos.

La PCR multiplex convencional, requiere que los productos de la amplificación sean analizados a través de electroforesis de agarosa principalmente, sin embargo, esto puede conducir a contaminación cruzada o resultados falsos positivos (Zhou et al., 2017). Por otra parte, cuando se requiere una mayor sensibilidad, precisión cuantitativa y velocidad en la obtención de resultados, la PCR multiplex en tiempo real se posiciona como la opción más robusta. Esta variante combina la multiplexación con las ventajas inherentes a la qPCR, como la detección en tiempo real, la cuantificación exacta del ADN y la reducción del riesgo de contaminación post-PCR. En la revisión realizada, esta técnica fue destacada en estudios que analizaban simultáneamente hasta cuatro o más genes en muestras de leche o queso, logrando detectar presencia de cepas STEC incluso en niveles bajos sin necesidad de cultivo previo. Además, al emplear sondas específicas para cada diana genética, la qPCR multiplex reduce el riesgo de amplificaciones inespecíficas que pueden afectar los resultados en la PCR. Por ejemplo (Liu et al., 2025), llevó a cabo multiplex qPCR en la detección simultánea de 5 tipos bacterianos, incluyendo STEC, además utilizaron SDS-PMA y la sonda Taq Man, lo que permitió una sensibilidad con límite de detección de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL, siendo un muy buen límite comparado principalmente con los resultados obtenidos en la PCR convencional, y muy similar respecto a lo que otros autores han logrado encontrar para este mismo tipo de qPCR multiplex (Hodzic et al., 2023), con incluso límites de $1,0 \times 10^1$ UFC/mL.

Una característica crítica que diferencia a ambas técnicas es la capacidad de integración en sistemas automatizados. Mientras que la PCR multiplex convencional continúa dependiendo de pasos manuales como la electroforesis para la visualización de los amplicones, la qPCR multiplex permite el análisis inmediato y digitalizado de los datos, algo particularmente relevante en industrias lácteas que buscan implementar controles microbiológicos en tiempo real. Según (Postollec et al., 2011), la implementación de qPCR multiplex ha permitido en muchas plantas procesadoras de alimentos la transición hacia modelos de vigilancia microbiológica continua, lo que ha reducido significativamente los tiempos de respuesta ante contaminaciones. A pesar de esto, la PCR multiplex convencional sigue siendo una alternativa sólida en investigaciones exploratorias, validación de genes objetivo y estudios donde se requiere flexibilidad en el diseño de los cebadores.

En definitiva, tanto la PCR multiplex convencional como la PCR multiplex en tiempo real ofrecen herramientas potentes para la detección simultánea de múltiples genes de *E. coli* en leche. La elección entre una u otra depende de factores como los recursos disponibles, el tiempo de análisis requerido, la necesidad de cuantificación, y el nivel de automatización buscado. En escenarios donde la precisión y la rapidez son críticas, como en líneas de producción o análisis de brotes, la qPCR multiplex se posiciona como una opción superior. En cambio, para laboratorios con fines investigativos o recursos limitados, la PCR multiplex convencional sigue siendo una estrategia efectiva, económica y suficientemente sensible para garantizar un diagnóstico confiable.

Dado que las matrices alimentarias, como la leche, presentan una alta complejidad debido a su composición rica en proteínas, grasas, azúcares y sales minerales, se generan importantes desafíos técnicos para la detección microbiológica, especialmente cuando se utilizan métodos

moleculares como la PCR. Estos componentes pueden actuar como inhibidores en la reacción enzimática, afectar la eficiencia de la extracción del ADN y enmascarar la presencia del microorganismo objetivo. Frente a estas dificultades, se han desarrollado variantes avanzadas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objetivo de mejorar la sensibilidad, especificidad y robustez de los ensayos en condiciones reales de muestreo. En la revisión realizada, se identificaron diversas estrategias que combinan la PCR con tecnologías complementarias para superar las limitaciones de las matrices complejas.

Inmunomagnética (IMS) Acoplada a la PCR

Un ejemplo de ello es la separación inmunomagnética (IMS) acoplada a la PCR en tiempo real (qPCR). Esta técnica utiliza microesferas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos que capturan de forma selectiva a *E. coli* desde la muestra líquida (como la leche), permitiendo así una preconcentración y purificación del patógeno antes de la amplificación molecular. Esto no solo reduce la interferencia de la matriz, sino que también aumenta la probabilidad de detección en muestras con baja carga microbiana. Según Li et al., (2023), esta combinación ha demostrado ser altamente eficaz en alimentos lácteos, reduciendo los falsos negativos y acortando el tiempo total del análisis a menos de 6 horas.

Además, este tipo de combinaciones tecnológicas permite sortear uno de los mayores retos en microbiología alimentaria: la necesidad de detectar células viables y no simplemente fragmentos de ADN residual. En este sentido, el uso de IMS garantiza que se están recuperando microorganismos intactos, lo cual es fundamental en análisis de inocuidad donde se debe confirmar la viabilidad del patógeno.

PCR-ELISA

Otro método destacado es la PCR-ELISA, que integra la sensibilidad de la amplificación génica con la facilidad de lectura propia de los inmunoensayos en fase sólida. Esta metodología ofrece una alternativa útil en laboratorios donde no se dispone de equipamiento de qPCR, ya que la detección final puede realizarse mediante un lector de ELISA estándar. Según Madi & Al-Samarai (2022), esta técnica ha demostrado ser útil para detectar *E. coli* y otras bacterias entéricas en productos lácteos, con un nivel aceptable de sensibilidad y menor riesgo de contaminación cruzada durante la manipulación pos-PCR. Asimismo, permite cierta automatización del proceso y mejora la trazabilidad del resultado.

También se han reportado metodologías que emplean beads de poli-L-lisina combinadas con PCR convencional. En este caso, la captura de bacterias ocurre por interacción electrostática, facilitando la concentración de los patógenos desde medios líquidos sin necesidad de anticuerpos específicos, lo cual puede representar una ventaja en términos de costo y disponibilidad de insumos. Estas estrategias pueden ser particularmente útiles en entornos donde se busca una solución más económica o adaptable a distintas cepas bacterianas sin requerir reactivos altamente especializados (Tong et al., 2012).

PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction)

Otra variante de interés es la técnica PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction) con detección dual por fluorescencia. Esta metodología permite amplificar la señal sin depender únicamente de la replicación del ADN blanco, utilizando mecanismos de hibridación secuencial que generan múltiples señales fluorescentes a partir de un solo evento de unión. En aplicaciones en leche, este tipo de sistemas ha mostrado gran promesa para detectar cargas bacterianas muy bajas en presencia de sustancias inhibitoras (Wang et al., 2021). Además, al no requerir

termocicladores sofisticados, estas tecnologías emergentes podrían facilitar la descentralización del diagnóstico hacia entornos rurales o de bajo presupuesto.

En conjunto, estas variantes reflejan una evolución significativa de la PCR tradicional, adaptándose a las necesidades específicas del sector alimentario. Las mejoras introducidas no solo optimizan la precisión y rapidez del diagnóstico, sino que también permiten trabajar de forma más eficiente en matrices altamente interferentes como la leche. La integración de pasos de pretratamiento selectivo, concentraciones magnéticas o sistemas de amplificación de señal contribuye a reforzar la seguridad alimentaria mediante una detección más eficaz de patógenos como *E. coli* en productos lácteos.

Ventajas y Desventajas de las Técnicas de PCR Según los Autores y su Frecuencia de Uso en la Literatura

En la revisión realizada se observa una clara prevalencia en el uso de la PCR convencional, utilizada por una mayoría de los autores como Doyle, Otero, Bickley, Rossen, y Mohammadi, lo cual evidencia su rol histórico y su accesibilidad en estudios de detección microbiológica en alimentos. Esta técnica ofrece ventajas como su bajo costo, menor requerimiento de equipamiento especializado y facilidad de ejecución en laboratorios de mediana capacidad. Sin embargo, desde el punto de vista técnico, presenta limitaciones importantes, como la necesidad de una mayor concentración inicial de ADN y un tiempo total de análisis que puede superar las 4 horas, debido a la necesidad de una etapa post-PCR con electroforesis para visualizar los productos amplificados (Rossen et al., 1992; Bickley et al., 1996). Además, su sensibilidad se ve afectada por la presencia de inhibidores en matrices complejas como la leche cruda, lo cual puede conducir a falsos negativos.

PCR en Tiempo Real (qPCR)

Frente a ello, técnicas como la PCR en tiempo real (qPCR) han sido cada vez más adoptadas, como se evidencia en trabajos de autores como Rui Li (2016), Karns (2007), y Deng (2021). Estas metodologías permiten una detección más sensible (en el rango de 10^2 UFC/mL e incluso menos) y aceleran los tiempos de obtención de resultados a menos de 2 horas, al evitar pasos adicionales como la electroforesis. Además, la cuantificación en tiempo real permite no solo confirmar la presencia de *E. coli*, sino también estimar la carga microbiana, lo cual es crucial en matrices alimentarias donde los niveles de contaminación determinan la inocuidad del producto (Nielsen & Andersen, 2003; Dong et al., 2018). No obstante, requieren equipos costosos y un diseño de sondas y cebadores más complejo, lo cual representa una barrera técnica y económica para su implementación masiva en algunos contextos.

PCR multiplex

Por su parte, la PCR multiplex, empleada por autores como Kim (2008), Wang Meng, et al. (2018), y Bernini (2010), permite detectar simultáneamente múltiples genes de virulencia en una sola reacción, optimizando el uso de muestras y reduciendo el tiempo y los costos por análisis. Esta técnica puede detectar múltiples patotipos de *E. coli* en una sola corrida de PCR, lo cual es particularmente útil en estudios de trazabilidad y vigilancia epidemiológica. Sin embargo, desde una perspectiva técnica, requiere una optimización compleja para evitar competencia entre cebadores, lo cual puede comprometer la eficiencia de amplificación de algunos blancos (Kim et al., 2008).

PCR Multiplex en Tiempo Real

En el mismo sentido, la PCR multiplex en tiempo real, como la utilizada por Kumar (2013) y Shan (2024), representa una evolución técnica destacable al combinar la multiplexación

con la detección rápida y cuantitativa de qPCR. Puede lograr límites de detección por debajo de 10^2 UFC/mL en matrices alimentarias, con alta especificidad y tiempos de análisis de menos de 2 horas. Esto la convierte en una herramienta poderosa en el control microbiológico de alimentos como la leche, aunque, como desventaja, mantiene los altos requerimientos de diseño molecular y equipamiento especializado (Kumar et al., 2023; Shan et al., 2024).

Inmunomagnética (IMS) Acoplada a PCR o qPCR

Otras técnicas híbridas utilizadas por los autores revisados buscan mejorar la sensibilidad en matrices alimentarias complejas. Por ejemplo, la separación inmunomagnética (IMS) acoplada a PCR o qPCR, como en los trabajos de Caro (2006), Baylis (2009), permite una concentración previa de las bacterias objetivo mediante anticuerpos unidos a perlas magnéticas, reduciendo la interferencia de compuestos inhibitorios de la leche. Esta combinación ha permitido detectar cargas bacterianas tan bajas como 1.0×10^1 a 1.0×10^2 UFC/mL, mejorando la especificidad y reduciendo falsos negativos, aunque requiere etapas adicionales de pretratamiento que incrementan el tiempo y la complejidad del análisis (Caro et al., 2006).

PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction)

Asimismo, técnicas más innovadoras como la PCR-HCR (Hybridization Chain Reaction) para amplificación dual de señal fluorescente (Liang, 2020) o el uso de beads de poli-L-lisina (Deng, 2021), se destacan por aumentar la eficiencia en la captura de células y mejorar la señal de detección, alcanzando límites inferiores a 10^2 UFC/mL incluso en muestras con alta carga de inhibidores. Aunque prometedoras, estas metodologías aún enfrentan barreras de estandarización y costo que limitan su adopción en entornos industriales.

En resumen, las técnicas de PCR utilizadas por los autores reflejan una transición progresiva hacia métodos más sensibles, rápidos y automatizados, motivada por la necesidad de

adaptarse a matrices alimentarias complejas como la leche. Mientras la PCR convencional sigue siendo la más ampliamente empleada por su simplicidad, las técnicas como la PCR en tiempo real y sus variantes multiplex dominan los estudios más recientes por su alta sensibilidad, velocidad y precisión. Esta evolución técnica responde a exigencias más estrictas en la industria alimentaria, donde se requiere no solo confirmar la presencia de patógenos como *E. coli*, sino hacerlo con alta fiabilidad y en tiempos compatibles con los flujos de producción.

PCR digital

Como se vio en el capítulo anterior la PCR digital permite obtener una alta sensibilidad, ya que divide la muestra en miles de microrreacciones independientes y realiza un conteo directo de moléculas, proporcionando cuantificación absoluta sin necesidad de curvas estándar. Al realizar la búsqueda de la literatura no se encontraron propiamente artículos donde identificaran *E. coli* en leche o productos lácteos a través de esta metodología, por el contrario, se identificaban otros géneros bacterianos. Sin embargo y de forma interesante (Wang Meng et al., 2018) llevaron a cabo una comparación entre la PCR digital y la qPCR para identificar *Salmonella* en leche, donde identificaron que la PCR digital podría llegar a ser 10 veces más sensible además de presentar menor sensibilidad a los inhibidores presentes en las matrices complejas como la leche. Ahora bien, la PCR digital requiere un equipo especial que sea capaz de generar esos miles de microrreacciones, además de la lectura de los resultados. Es por ello que como desventaja la PCR digital a pesar de la increíble sensibilidad puede resultar poco costo efectiva si se compara con otras metodologías descritas anteriormente.

Análisis Bibliométrico del Rendimiento

La bibliometría constituye una herramienta valiosa para analizar y evaluar los resultados de la investigación académica. Se ha comprobado que impulsa el avance científico en múltiples formas; facilita la evaluación del progreso alcanzado, permite identificar las fuentes más confiables de información científica, reconoce a los principales actores del ámbito académico y proporciona una base sólida para valorar nuevos desarrollos. Uno de sus aportes clave es la aplicación de criterios objetivos en la evaluación de la producción investigativa, lo cual la convierte en un recurso cada vez más apreciado para medir la calidad y productividad académica (Solano et al., 2009).

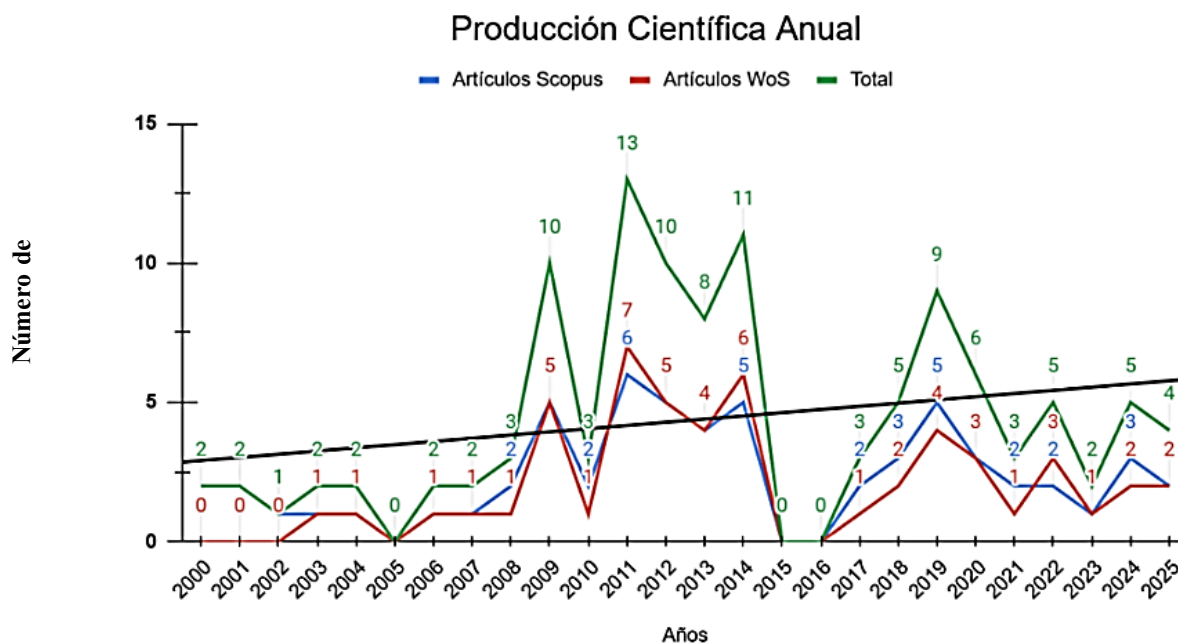
Publicaciones y citas

Al analizar la producción científica obtenida a través de SCOPUS y Web of Science (WoS), se evidencia que en WoS desde el año 2000 al 2002 no se encontraron artículos relacionados, sin embargo, es notable que entre 2003 2008 se encontró al menos una publicación (figura 2). La gran mayoría de los artículos son relacionados con el uso de PCR convencional para la identificación de un único gen de *E. coli* y otros géneros bacterianos en diferentes productos lácteos principalmente leche (Aslam et al., 2003; Bottero et al., 2004; Lee et al., 2006; McKillip et al., 2000), además de que de forma interesante en ese rango de tiempo en algunos artículos se probó la combinación de la PCR y en análisis de los productos de amplificación a través de ELISA (Daly et al., 2002; Fach et al., 2001), lo cual para ese momento resultó novedoso aunque no necesariamente representó mayor facilidad y reproducibilidad. Además, vale la pena resaltar que entre 2006 y 2008 varios autores implementaron variaciones de la PCR convencional; como la PCR con retro transcripción, para mejorar la identificación del material genético viable (Lee et al., 2006), la PCR multiplex, que permite identificar varios genes blancos

en una sola “corrida de PCR, lo que de una u otra manera optimiza los tiempos y el costo (García et al., 2008).

Figura 2

Producción Científica Anual



Nota. Elaboración propia.

De forma interesante se evidencia el inicio de la implementación de una variación más automatizada y rápida de la PCR como la PCR en tiempo real (Karns et al., 2007; Martucciello et al., 2008). Esto último toma sentido ya que la primera PCR en desarrollarse fue la PCR convencional (Mullis, 1994) en 1984, y luego surgieron diferentes variaciones.

En el año 2009 se evidenció un incremento en la producción bibliográfica con 5 artículos para ambos casos (WoS y Scopus) (figura 2); la PCR multiplex fue la más utilizada tanto en su variación convencional como en tiempo real (Jitender Singh et al., 2009; Omiccioli, et al., 2009; Riyaz-Ul-Hassan et al., 2009; Singh et al., 2009). Las principales bacterias identificadas fueron

E. coli, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp* y *Shiguelia spp*. por otra parte, aunque en el 2010 se redujo la producción, ésta incrementó en el 2011 siendo el año de mayor producción científica (con 7 artículos en WoS y 6 en Scopus), manteniéndose, aunque no en la misma cantidad hasta el año 2014 (figura 2). En ese rango de tiempo se evidencia que la metodología más usada fue la PCR multiplex (Chiang et al., 2012; Choi & Lee, 2011; Gautam et al., 2012; Kim et al., 2014; Madic et al., 2011; Mancusi & Trevisani, 2014; Miszczycha et al., 2012; Mohammadi & Abiri, 2013; MR, 2010; Wang, Li, Yang, et al., 2014), y aunque la PCR multiplex en tiempo real ha adquirido una relevancia creciente por su rapidez y capacidad se evidencia que la PCR multiplex convencional siguió siendo usada de forma importante durante este periodo, entre otros aspectos debido a su menor costo y facilidad de implementación. Paralelamente, se han desarrollado estrategias complementarias para mejorar la detección y diferenciación bacteriana. Entre ellas destaca la identificación de otros blancos genéticos, como el ARNr 16S, una región altamente conservada característica de los procariotas y ampliamente empleada en estudios filogenéticos y de diagnóstico.

De igual modo, se han incorporado métodos para incrementar la sensibilidad en la detección de células viables, como el uso de propidio monoazida (PMA) o dodecil sulfato de sodio (SDS), tal como se describió en capítulos anteriores. Asimismo, la purificación inmunomagnética, aplicada tanto a las bacterias como a su ADN, se ha convertido en una técnica valiosa para enriquecer las muestras y optimizar el proceso de identificación molecular. Por otra parte, durante los años 2015 y 2016 no se identificaron artículos en ninguna de las bases de datos consultadas (WoS y Scopus) (figura 2). A partir de 2017 se observa un incremento sostenido en el número de publicaciones, alcanzando su punto máximo en 2019, con un total de cuatro artículos indexados en WoS y cinco en Scopus (figura 2). Este aumento sugiere un creciente

interés de la comunidad científica en la temática a partir de esa fecha, posiblemente relacionado con el desarrollo de nuevas metodologías y la mayor disponibilidad de herramientas moleculares.

En este mismo rango de tiempo se evidencia nuevamente un predominio de los estudios que emplearon PCR multiplex; sin embargo, en esta ocasión la técnica se encuentra casi en su totalidad asociada a la PCR en tiempo real, lo que refleja la preferencia por métodos más rápidos y sensibles. De manera complementaria, varios de estos trabajos incorporan el uso de propidio monoazida (PMA) para discriminar células viables, así como procedimientos de separación inmunomagnética (Dong et al., 2018; Mercanoglu Taban & Aytac, 2019; Nurjayadi et al., 2019).

En los años posteriores se evidencia que el número de artículos oscila entre 1 y 3 por años en ambas bases de datos, sin embargo, lo más interesante es el advenimiento de variaciones importantes de la PCR como por ejemplo el uso de PCR digital, y su comparación en cuanto a los límites de detección respecto a la PCR en tiempo real (Du et al., 2021; Shahrajabian & Sun, 2024), donde como se mostró en capítulos anteriores, puede llegar a ser 10 veces más sensible. Además de que para estos años no solo identificaron la presencia o ausencia de bacterias en la leche, sino también el perfil de resistencia bacteriana (Mwasinga et al., 2023), que resulta de mayor importancia en salud pública. Por otro lado, la PCR anidada resultó de gran utilidad en la identificación bacteriana con mayor sensibilidad (Cenci-Goga et al., 2004; Madi & Al-Samarai, 2022; Zbrun et al., 2024), a pesar de que el objetivo no era la identificación de *E. coli* muchos de los resultados pueden ser extrapolados. Finalmente, en el 2025 los artículos, donde se encontró uno para cada base de datos, se evidencia la combinación de la PCR retrotranscriptasa multiplex en tiempo real (Liu et al., 2025), con lo cual se evidencia la búsqueda de una mayor sensibilidad, rapidez y fiabilidad en el desarrollo de metodologías como la PCR, además de la orientación

hacia nuevas secuencias, como algunas secuencias repetitivas BOX, que permiten una mejor diferenciación entre *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. y *E. coli* (Bilung et al., 2025).

Fuentes más Relevantes

Este análisis muestra las revistas donde se han publicado más artículos dentro de la base analizada, lo que permite identificar las principales fuentes de disseminación científica en el campo.

Tabla 2

Fuentes Más Relevantes

Revistas	Artículos Scopus	Artículos WoS	Total
Journal of dairy science	6	7	7
International journal of food microbiology	6	5	5
Journal of food protection	4	3	4
Letters in applied microbiology	3	2	4
Journal of pure and applied microbiology	3	1	4
Food microbiology	2	2	4
Foodborne pathogens and disease	2	2	3
Korean journal for food science of animal resources	2	2	2
Foods and raw materials	1	2	2
Journal of applied microbiology	2	0	2
3 biotech	1	1	2
Applied and environmental microbiology	1	1	2
Arquivo brasileiro de medicina veterinaria e zootecnia	1	1	2
Brazilian journal of microbiology	1	1	2
Egyptian journal of veterinary science(egypt)	1	1	2
Food science and technology (brazil)	1	1	2
Indian journal of animal sciences	1	1	2
Indian journal of biotechnology	1	1	2
International dairy journal	1	1	2

Nota. En esta tabla se evidencia las fuentes más relevantes

Las revistas líderes como *Journal of Dairy Science* y *International Journal of Food Microbiology* son las fuentes más utilizadas, indicando un enfoque en microbiología alimentaria.

Así en Scopus para ambas revistas se evidenciaron 6 publicaciones científicas para cada una mientras que en WoS, se evidenció una mayor cantidad en el *Journal of Dairy Science* con 7 publicaciones y 5 para el *International Journal of Food Microbiology* (tabla 2). De forma interesante estas dos revistas corresponden según el *Scimago Journal Ranking* al Cuartil 1, que es el más alto con impactos de 1,63 y 1,25 respectivamente. Al analizar el tipo de artículos y las metodologías utilizadas, se observa que en el *International Journal of Food Microbiology*, tanto en Scopus como en WoS, predominan trabajos asociados con epidemiología molecular, en los cuales se identifican diferentes géneros bacterianos en productos alimenticios, principalmente lácteos. *E. coli* aparece de forma recurrente, y otra particularidad es que, en la mayoría de los casos, la metodología empleada fue la PCR en tiempo real (Delannoy et al., 2022; Derzelle et al., 2011; Mancusi & Trevisani, 2014; Masoud et al., 2012). Por otro lado, cuando se mira que sucedía con el *Journal of Dairy Science*, es notorio que hay una mayor diversidad en las metodologías utilizadas. Por ejemplo, se utilizan estrategias más novedosas de como la funcionalización de perlas inmunomagnéticas con poly-L lisina para un mejor aislamiento bacteriano, que en el caso particular correspondía a *S. aureus* (Deng et al., 2021), o por ejemplo el uso *high resolution melting* en la PCR tiempo real lo cual resultó muy útil inicialmente en la determinación de la pureza del producto, pero además en la identificación de especies y subespecies bacterianas en una matriz compleja (Shan et al., 2024). Y también la adición de PMA y SDS para amplificar los productos solamente de las bacterias viables (Dong et al., 2018; Wang, Li, Zhang, et al., 2014).

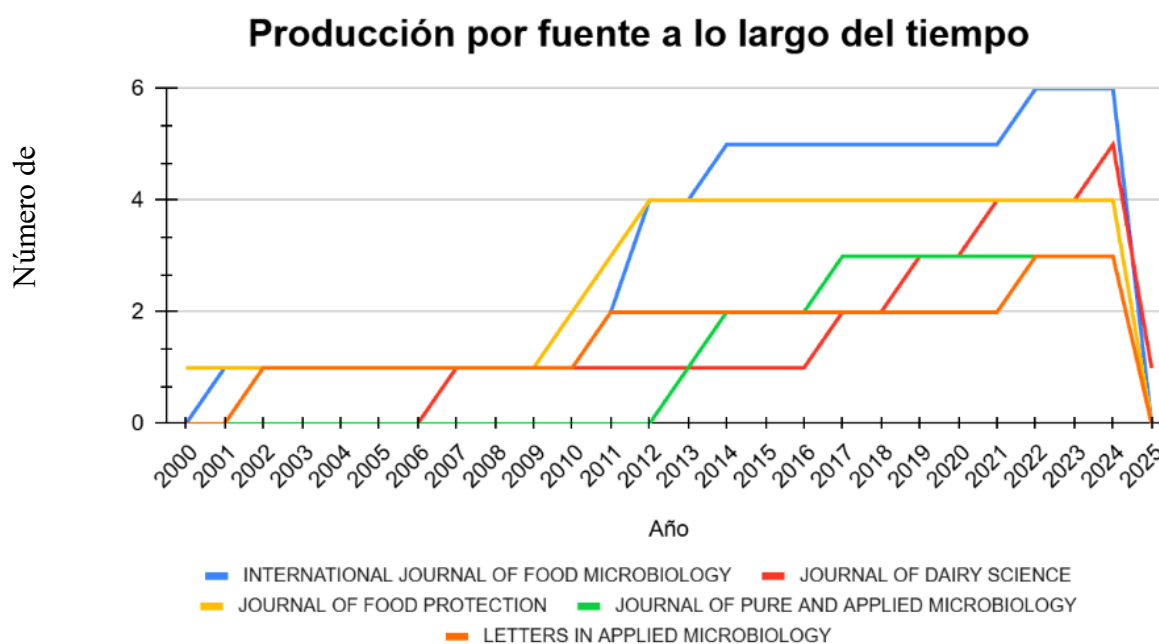
Producción por Fuente a lo Largo del Tiempo

Este análisis muestra la cantidad de artículos publicados por cada revista entre 2000 y 2025, lo que permite identificar tendencias de crecimiento y la evolución de su relevancia en el

campo. La Figura 3 evidencia que International Journal of Food Microbiology presenta el incremento más sostenido, consolidándose como la fuente con mayor producción hacia 2024. En conjunto, la figura refleja la diversificación de las fuentes científicas y el aumento progresivo de la producción académica en microbiología durante las últimas dos décadas.

Figura 3

Producción por Fuente a lo Largo del Tiempo



Nota. La figura muestra la evolución del número de publicaciones por revista entre los años 2000 y 2025, permitiendo identificar tendencias de productividad científica en las fuentes analizadas.

Autores más Relevantes

Este análisis identifica a los autores con mayor número de publicaciones en el conjunto analizado, evaluando también su contribución proporcional mediante el indicador de artículos fraccionados.

Tabla 3*Autores Más Relevantes*

Autores	Artículos Scopus	Artículos WoS	Total
XU H	5	0	5
BATISH VK	4	0	4
GROVER S	4	0	4
AUVRAY F	3	0	3
DE GARAM CP	3	0	3
FACH P	3	0	3
JAMET E	3	0	3
MADIC J	3	2	5
AGUILAR ZP	2	0	2
AMAGLIANI G	2	1	3
BRANDI G	2	0	2
BRUGÈRE H	2	0	2
DILASSER F	2	0	2
LIANG T	2	1	3
LIU J	2	1	3
LOUKIADIS E	2	0	2
MAGNANI M	2	0	2

Nota. En esta tabla se evidencia a los autores más relevantes.

Al llevar a cabo el análisis de bibliometrix para los autores con mayor producción científica, se evidencia que no necesariamente son los autores principales si no en la mayoría de los casos estos autores con mayor productividad se asocian por medio de la coautoría. Los 3 más productivos son Xu H, Batish VK, y Grover S.

Al analizar el Journal y la metodología usada en los artículos publicados, se evidencia, una predominancia del *Journal of Dairy Science*, para el caso de Xu, H (investigador de origen chino), y aunque hace uso de diferentes tipos de PCR en los artículos, lo interesante es que se basan principalmente en metodologías que mejoran la sensibilidad de la técnica como el uso de PMA y perlas inmunomagnética con poly L lisina, que permite detectar realmente el microorganismo de interés además de que el materia genético identificado es de bacterias viables (Chen et al., 2022; Deng et al., 2021; Wang & Youle, 2009; Wang, Li, Wang, et al., 2014; Zhou et al., 2017).

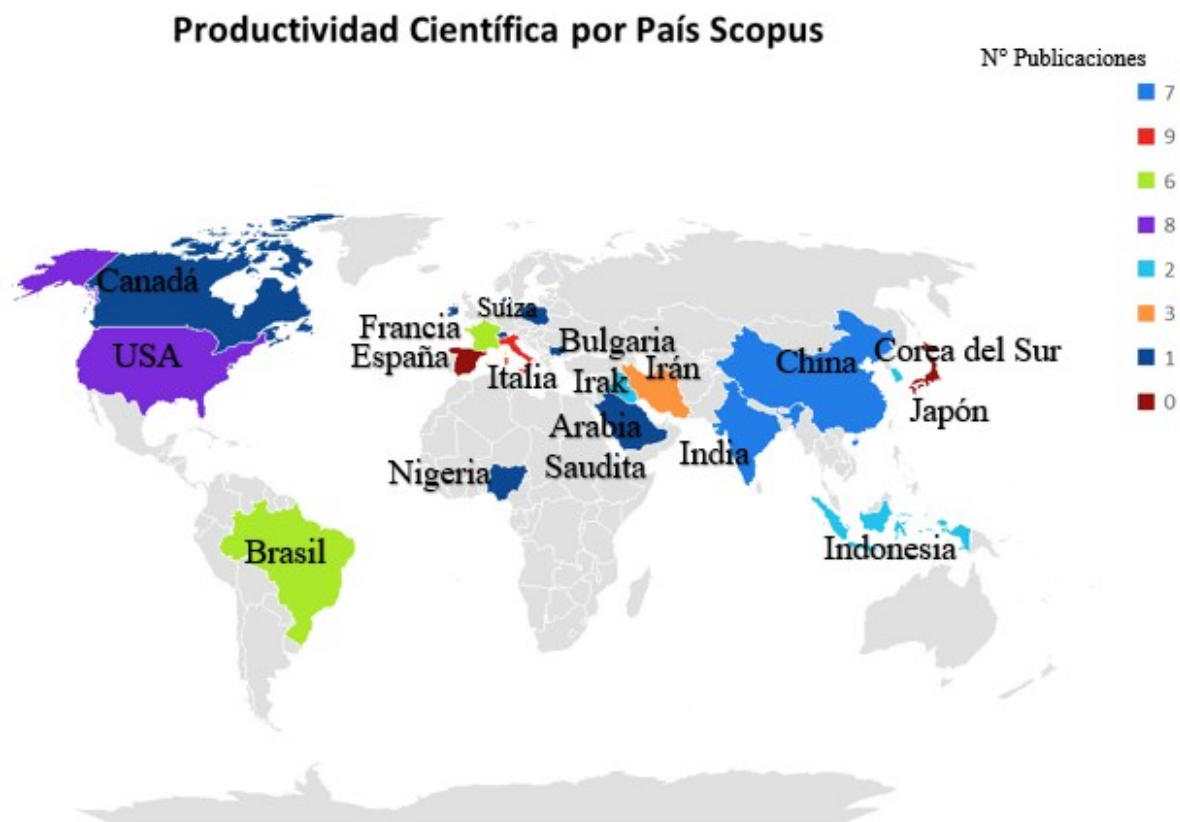
Por otro lado, las publicaciones de Batish VK, no se evidenció una predilección en las revistas publicadas, y tampoco en las metodologías usadas, de tal forma que Gautam se basa en la identificación del ARNrribosomal 16s, mientras que en la publicación con Jitender, utilizan la sonda *Scorpio* de una PCR en tiempo real, y en publicaciones de coautoría con Kumar, Singh se basa principalmente en PCR multiplex. Además, cuando se analizó los artículos de coautoría de Grover se evidencia que son los mismos que para Batish. Lo cual cobra sentido ya que ambos autores pertenecen a la Unidad de Biología Molecular, División de Microbiología Láctea, Instituto Nacional de Investigación en Productos Lácteos en Karnal India (Gautam et al., 2012; Jitender Singh et al., 2009; Singh et al., 2009).

Indicadores de Producción y Citación

Este análisis presenta el número de publicaciones científicas por país, lo que permite identificar las regiones con mayor generación de conocimiento, orientar posibles colaboraciones internacionales y comprender cómo se distribuye la actividad investigativa a nivel global. Las figuras 4 y 5 evidencian la productividad por país registrada en las bases de datos Scopus y Web of Science, respectivamente.

Figura 4

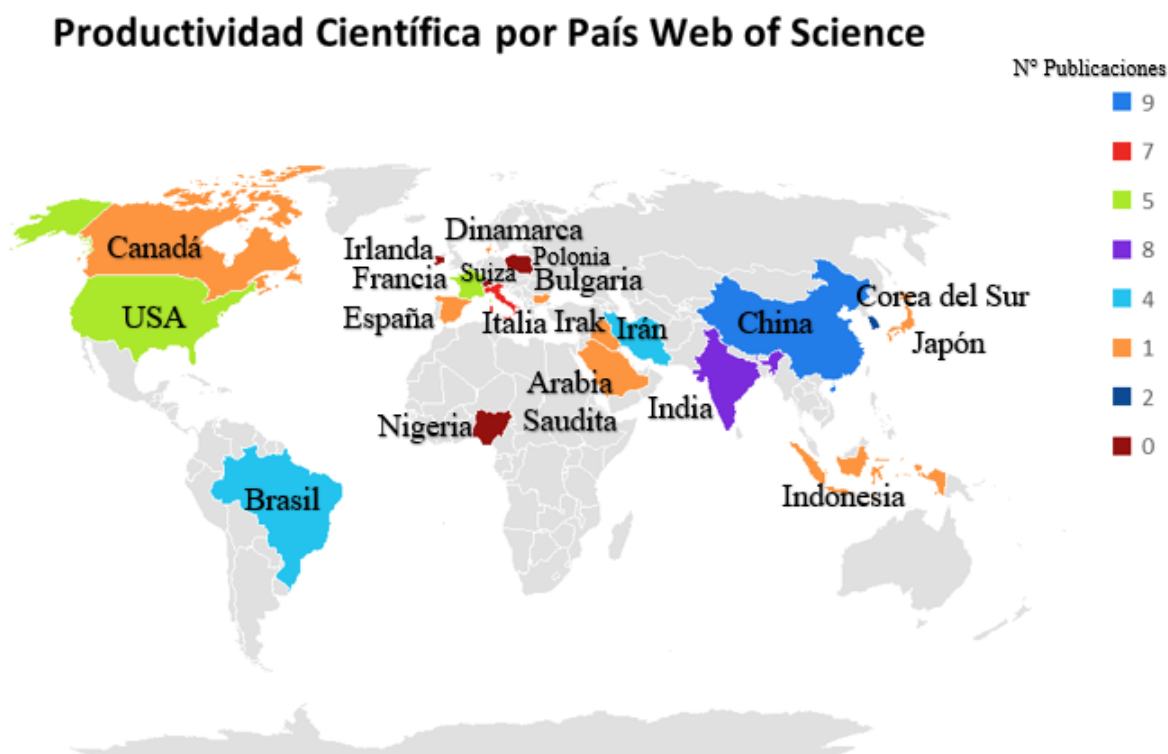
Productividad Científica por País Scopus



Nota. Esta figura muestra la distribución del número de publicaciones por país registradas en la base de datos Scopus.

Figura 5

Productividad Científica por Web of science



Nota. Esta figura presenta el número de publicaciones científicas por país indexadas en Web of Science.

Al analizar la producción científica por país, resulta interesante observar que China lidera con un total de 16 publicaciones, considerando conjuntamente las registradas en Web of Science y en Scopus, como se muestra en las Figuras 4 y 5, lo cual coincide con la tendencia mundial en muchas áreas del conocimiento (Baker, 2023). Así autores como (Chen et al., 2022; Chen et al., 2021; Deng et al., 2021; Liu et al., 2025; Shan et al., 2024), son una muestra representativa de que son principalmente publicaciones de los últimos años con el uso principalmente de las tecnologías más avanzadas. Liang et al. (2020), por ejemplo, utiliza la estrategia de

amplificación dual PCR-HCR combina la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la reacción en cadena por hibridación (HCR) para lograr una detección ultrasensible de *Escherichia coli* O157. Esta variación de la PCR amplifica el fragmento de ADN específico de la bacteria, generando suficiente material genético, y luego el producto obtenido activa la HCR, que forma largas cadenas de ADN marcadas y multiplica la señal de lectura. Esta combinación incrementa de forma notable la sensibilidad y especificidad, permitiendo identificar la bacteria incluso en concentraciones extremadamente baja.

Por otra parte, se evidencia que segundo y tercero en la lista de artículos tanto para WoS como para Scopus, se encuentran la Italia y la India, con 16 y 15 artículos respectivamente. La gran mayoría de estudios llevados a cabo en Italia no son tan recientes y se basan principalmente en estudios de epidemiología molecular en pequeñas regiones de Italia, ejemplo de ello es (Bernini et al., 2010), que utiliza una PCR multiplex convencional para la identificación de *E. coli* en quesos, o (Omiccioli et al., 2009) que previo a la PCR multiplex convencional usa la separación inmunomagnética como una técnica más adecuada para el aislamiento bacteriano.

En cuanto a la India, se evidencia que al igual que en Italia la mayoría de sus estudios son epidemiológicos, sin embargo al revisar las metodologías, resulta ser una mezcla de diferentes variaciones de la PCR es el caso de (Kumar et al., 2013) que realizó una PCR multiplex, esta última aunque quizás la técnica más utilizada, no es la que permite mejor sensibilidad y especificidad; mientras que (Harshitha & Arunraj, 2021) muestran la gran utilidad de la PCR y de su variante en tiempo real, y su importancia en la industria alimenticia.

Las gráficas 4 y 5 además nos muestran otros importantes países relevantes en este campo de investigación como son Brasil y Estados Unidos con 10 y 13 artículos cada uno, además de un país de oriente medio como Irán con 7 publicaciones. Los demás países, aunque relevantes sus

publicaciones al menos en número oscilan entre 1 y 2 lo cual es muy poco si se compara con los anteriormente mencionados. Pero en general muestra una clara tendencia de los países de oriente próximo y lejano a llevar a cabo investigaciones en este campo del conocimiento de la industria alimenticia en microbiología molecular aplicada a productos lácteos.

Conclusiones

Las técnicas moleculares de PCR constituyen herramientas fundamentales en la detección de *Escherichia coli* en productos lácteos, superando ampliamente a los métodos microbiológicos tradicionales en términos de sensibilidad, especificidad y tiempo de respuesta. En particular, variantes como la PCR en tiempo real (qPCR) y la PCR multiplex, anidada y digital permiten identificar con precisión serotipos patógenos como *E. coli* O157:H7, ofreciendo alternativas más sensibles y específicas.

La PCR convencional sigue siendo una técnica esencial por su bajo costo, accesibilidad y versatilidad. Aunque no permite cuantificación en tiempo real, mantiene un papel relevante en la confirmación de resultados, la validación de cepas y la detección cualitativa de genes de virulencia y resistencia antimicrobiana en *E. coli*.

La integración de la PCR con métodos complementarios, como la separación inmunomagnética (IMS), la incorporación de reactivos diferenciadores de viabilidad (PMA), y sistemas de amplificación dual (HCR o PCR-ELISA), ha mejorado significativamente la precisión diagnóstica y la capacidad de detectar cargas bacterianas muy bajas, reduciendo la incidencia de falsos positivos y elevando la confiabilidad diagnóstica en muestras lácteas.

Las variantes emergentes como la PCR-HCR y la PCR digital representan el futuro del diagnóstico molecular, al ofrecer límites de detección más bajos y alta precisión. Sin embargo, su adopción generalizada dependerá de la reducción de costos y de la disponibilidad de equipamientos avanzados.

El análisis bibliométrico realizado evidenció una tendencia creciente en la investigación sobre PCR aplicada a la detección de *E. coli* en productos lácteos, especialmente en países como

China, Italia e India. En contraste, América Latina muestra una producción más limitada, lo que señala la necesidad de fortalecer la investigación regional en inocuidad alimentaria.

La tendencia global apunta hacia la integración de técnicas moleculares más avanzadas como la PCR digital y la PCR con transcripción reversa multiplex, con el objetivo de mejorar la detección de patógenos viables, caracterizar genes de resistencia antimicrobiana y fortalecer los sistemas de trazabilidad y control en la industria láctea.

Recomendaciones

Promover la implementación de técnicas avanzadas de PCR en los laboratorios de control de calidad de la industria láctea, priorizando la qPCR y la multiplex qPCR en las etapas críticas de la cadena de producción, para garantizar una respuesta rápida y precisa ante la sospecha de contaminación, para mejorar la detección temprana de *E. coli*.

Es fundamental establecer protocolos unificados que consideren la complejidad de la matriz láctea (grasas, proteínas e inhibidores) con el fin de garantizar resultados reproducibles y comparables entre laboratorios nacionales e internacionales, adicional es importante fortalecer la capacitación técnica del personal en el manejo de técnicas moleculares, la interpretación de resultados y validación de protocolos.

Incentivar la adopción de tecnologías de alta precisión junto con las instituciones regulatorias y productoras deben fomentar la incorporación gradual de técnicas de qPCR, multiplex y digital PCR, que permiten una detección cuantitativa, sensible y rápida, optimizando los sistemas de inocuidad alimentaria, adaptadas a las necesidades de la industria nacional, con el fin de optimizar recursos y mejorar los sistemas de vigilancia microbiológica.

Actualizar y armonizar los protocolos de diagnóstico microbiológico con base en los avances moleculares recientes, integrando las recomendaciones derivadas del análisis bibliométrico, para alinear las prácticas locales con los estándares internacionales en seguridad alimentaria.

Impulsar la articulación entre instituciones académicas, centros de investigación, laboratorios oficiales y empresas del sector lácteo, para desarrollar sistemas de monitoreo colaborativo que permitan compartir datos, validar métodos y anticipar brotes asociados a *E. coli*.

Referencias Bibliográficas

- Abdulmajeed, M. A., Jafar, N. B. (2023). Investigation and molecular characterization of sigma toxin-producing *E. coli* 0157:H7 from meat and dairy products in Kirkuk. *Journal of Hygienic Engineering and design*. 42, 65-74.
- Aguilera Becerra Astrid Maribel, Urbano Cáceres Eliana Ximena, Jaimes Bernal Claudia Patricia. (2014). Pathogenic bacteria in raw milk: A public health and food safety problem. *Ciencia y Agricultura*. 11 (2), 83-93.
- Ahvanooei, M. R., Norouzian, M. A., & Vahmani, P. (2022). Beneficial effects of vitamins, minerals, and bioactive peptides on strengthening the immune system against COVID-19 and the role of cow's milk in the supply of these nutrients. *Biological trace element research*, 200(11), 4664-4677.
- Alcaide Fernández de Vega, F. (2019). Utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de las infecciones cutáneas. *Piel. Formación continuada en dermatología*, 2019, vol. 34, núm. 1, p. 40-44.
- Allmann, M., Höfelein, C., Köppel, E., Lüthy, J., Meyer, R., Niederhauser, C. Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Research in Microbiology*, 146(1), 85-97.
- Andrade R. B., Gemelli T., Dall Onder L. P., Cristina K., De Brito T., Barboza A. A. L., De Brito B. G. (2010). Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* S.P., *Salmonella* S.P., e *Listeria Monocytogenes*. *Arq inst. Biol., Sao Paulo*, v. 77, n 4, p. 741-750.

- Anumudu, C. K., Miri, T., & Onyeaka, H. (2024). Multifunctional applications of lactic acid bacteria: Enhancing safety, quality, and nutritional value in foods and fermented beverages. *Foods*, 13(23), 3714. <https://doi.org/10.3390/foods13233714>.
- Aslam, M., Hogan, J., & Smith, K. L. (2003). Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. *Food Microbiology*, 20(3), 345-350.
- Azineiro, S., Ghimire, D., Carvalho, J., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2021). Detection of Viable *Listeria monocytogenes* by Multiplex Reverse Transcriptase Real-time PCR, Using Two Target Genes. 2021 European Symposium on Food Safety.
- Baker, S. (2023). China overtakes United States on contribution to research in Nature Index. *Nature*.
- Batt, C. A. (1997). Molecular diagnostics for dairy-borne pathogens. *Journal of dairy science*, 80(1), 220-229.
- Baylis, C. L. (2009). Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 293-307.
- Bawane, H., Kadam, K., Mahale, V., & Kulkarni, R. (2024). Comprehensive assessment of 12 commercial DNA-binding dyes as alternatives to ethidium bromide for agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 45(5-6), 442-450.
- Bernini, V., Sgarbi, E., Bove, C. G., Gatti, M., & Neviani, E. (2010). A Polyphasic Approach To Detect Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and Diarrheagenic *Escherichia coli* in Raw Milk Italian Cheeses by Multiplex PCR. *Journal of food protection*, 73(12), 2281-2284.

- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Bickley, J., Short, J., McDowell, D., & Parkes, H. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in applied microbiology*, 22(2), 153-158.
- Bilung, L. M., Radzi, E. S., Tahar, A. S., Zulkharnain, A., Ngui, R., & Apun, K. (2025). BOX-PCR and ERIC-PCR evaluation for genotyping Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in raw milk. *Foods and Raw materials*, 13(2), 264-275.
- Bravo, A. (2013). Biotecnología agrícola y agroecología, ¿complementarias u opuestas? *Ciencia y Humanismo*, 68-77.
- Bottero, M. T., Dalmaso, A., Soglia, D., Rosati, S., Decastelli, L., & Civera, T. (2004). Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. *Molecular and Cellular Probes*, 18(4), 283-288.
- Bustin, S., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Caro, I., Fernández-Barata, V. M., Alonso-Llamazares, A., & García-Armesto, M. R. (2006). Detection, occurrence, and characterization of *Escherichia coli* O157: H7 from raw ewe's milk in Spain. *Journal of food protection*, 69(4), 920-924.
- Carrillo-Inungaray, M. L., López González, R. C., Alvarado Sánchez, B., & Aguilar Zárate, M. (2011). Comparación de los métodos fenotípico y molecular para identificación de patógenos en alimentos. *Tlatemoani: Revista Académica de Investigación*, (7), 1-20.

- Carvalho, R. N., Oliveira, A. N. d., Mesquita, A. J. d., Rezende, C. S. M., Mesquita, A. Q. d., & Romero, R. A. M. (2014). PCR and ELISA (VIDAS ECO O157®) *Escherichia coli* O157: H7 identification in Minas Frescal cheese commercialized in Goiânia, GO. *Brazilian journal of microbiology*, 45, 07-10.
- Cenci-Goga, B., Crotti, S., Costarelli, S., Rondini, C., Karama, M., & Bennett, P. (2004). Detection of tet (M) gene from raw milk by rapid DNA extraction followed by a two-step PCR with nested cebadores. *Journal of food protection*, 67(12), 2833-2838.
- Chandrakar, C., Shakya, S., Patyal, A., Jain, A., Ali, S., & Mishra, O. (2022). ERIC-PCR-based molecular typing of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from houseflies (*Musca domestica*) in the environment of milk and meat shops. *Letters in applied microbiology*, 75(6), 1549-1558.
- Chen, M., Lan, X., Zhu, L., Ru, P., Xu, W., & Liu, H. (2022). PCR mediated nucleic acid molecular recognition technology for detection of viable and dead foodborne pathogens. *Foods*, 11(17), 2675.
- Chiang, Y.-C., Tsen, H.-Y., Chen, H.-Y., Chang, Y.-H., Lin, C.-K., Chen, C.-Y., & Pai, W.-Y. (2012). Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157: H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. *Journal of microbiological methods*, 88(1), 110-116.
- Choi, S.-H., & Lee, S.-B. (2011). Improved detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in milk by using reverse transcriptase-PCR. *Food Science of Animal Resources*, 31(2), 158-165.

- Codex Alimentarius. (2020). Principles and guidelines for the establishment and application of microbiological criteria related to foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) & World Health Organization (WHO).
- Correa O A, et al. (2016). Diagnóstico molecular y biosensores. Colombia: Universidad de Córdoba. https://www.academia.edu/19329537/Diagnostico_molecular_y_biosensores.
- Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Castiglioni, B. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and cellular probes*, 19(5), 299-305.
- Daly, P., Collier, T., & Doyle, S. (2002). PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. *Letters in Applied Microbiology*, 34(3), 222-226.
- de Noordhout, C. M., Devleeschauwer, B., Lamarana, D., Haagsma, J., Havelaar, A., Quoilin, S., ... & Speybroeck, N. (2015). Current and future Disability-Adjusted Life Years (DALYs) of *Salmonella* and *Campylobacter* in Belgium. *Archives of Public Health*, 73, 1.
- Delannoy, S., Tran, M.-L., & Fach, P. (2022). Insights into the assessment of highly pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and raw milk cheeses by high throughput real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 366, 109564.
- Deng, M., Wang, Y., Chen, G., Liu, J., Wang, Z., & Xu, H. (2021). Poly-l-lysine-functionalized magnetic beads combined with polymerase chain reaction for the detection of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Journal of dairy science*, 104(12), 12342-12352.
- Departamento Nacional de Planeación (DNP). (2023). Plan Nacional de Desarrollo 2022-2026.

- Derzelle, S., Grine, A., Madic, J., de Garam, C. P., Vingadassalon, N., Dilasser, F., Auvray, F. (2011). A quantitative PCR assay for the detection and quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in minced beef and dairy products. *International journal of food microbiology*, 151(1), 44-51.
- Diab, M. S., Tarabees, R., Elnaker, Y. F., Hadad, G. A., Saad, M. A., Galbat, S. A., Albogami, S., Hassan, A. M., Dawood, M. A. O., & Shaaban, S. I. (2021). Molecular Detection, Serotyping, and Antibiotic Resistance of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Isolated from She-Camels and In-Contact Humans in Egypt. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1021. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081021>.
- Dirks, R. M., & Pierce, N. A. (2004). Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(43), 15275-15278.
- Dong, L., Liu, H., Meng, L., Xing, M., Wang, J., Wang, C., Zheng, N. (2018). Quantitative PCR coupled with sodium dodecyl sulfate and propidium monoazide for detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4936-4943.
- Du, M., Li, J., Liu, Q., Wang, Y., Chen, E., Kang, F., & Tu, C. (2021). Rapid detection of trace *Salmonella* in milk using an effective pretreatment combined with droplet digital polymerase chain reaction. *Microbiological Research*, 251, 126838.
- Durantes, D. (2015). El Dogma Central de la Biología Molecular. Obtenido de Del laboratorio a las aulas: <https://investigarentiemposrevueltos.wordpress.com/2015/10/16/el-dogma-central-de-labiologia-molecular/>.
- Dymond, J. S. (2013). Explanatory chapter: quantitative PCR. In *Methods in enzymology* (Vol. 529, pp. 279-289). Elsevier.

- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 559-570.
- Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., & Grout, J. (2001). Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. *Journal of Applied Microbiology*, 90(5), 809-818.
- Federación Colombiana de Ganaderos. (s.f.). Normatividad - Cadena Láctea. FEDEGAN. Recuperado el 11 de febrero de 2025, de <https://www.fedegan.org.co/normatividad/cadena-lactea>.
- Fernández Fernández, E., Martínez Hernández, J. A., Martínez Suárez, V., Moreno Villares, J. M., Collado Yurrita, L. R., Hernández Cabria, M., & Morán Rey, F. J. (2015). Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutrición hospitalaria*, 31(1), 92-101.
- Fernández Villa, K. J., Chanci Echeverri, I. C., Wilches López, L., y Cardona Arias, J. A. (2014). Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido-lácticas y efecto inhibitor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: Revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Biosalud*, 13(1), 45–61.
- Fonseca, S. H., de Oliveira, A. M. G., Figueiredo, R. C., de Souza, B. M. S., Penna, C. F. d. A. M., de Vasconcelos Cançado, S., de Souza, M. R. (2025). Validation of qPCR methodology for detection of *Campylobacter* spp. in cow milk and Minas artisanal cheese. *Food Control*, 171, 111133.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). Prevención de la *E. coli* en los alimentos. https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/fcc/news/FAO_prevención.de.la.E.coli.en.los.alimentos_FCC_ES.pdf
- Food and Drug Administration (FDA). (2023). Milk pasteurization and food safety: Reducing foodborne illnesses. <https://www.fda.gov/>
- Fratamico, P. M., Gehring A.G. (2014). *Escherichia coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli*: Detection by Immunomagnetic Particle-Based Assays. *Journal of Food Microbiology*, 740-747.
- Garcia, P., Arcuri, E., Brito, M., Lange, C., Brito, J., & Cerqueira, M. (2008). Detection of *E. coli* O157: H7 experimentally inoculated in raw milk samples by conventional method and multiplex PCR. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 60, 1241-1249.
- Gautam, S. K., Suresh Kumar, S., Batish, V., Grover, S., & Mohanty, A. (2012). Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* in milk by 16S rRNA gene targeted PCR. *Indian Journal of Animal Sciences*, 82(2), 204.
- Gómez D, Lavayén S, Nario F, Piquin A, Zotta CM. (2011). Detección de microorganismos potencialmente patógenos en hogares de Mar del Plata. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* 45(3):441-5.
- González Carella, María Inés, Llinás Ester Isabel. (2004). La metáfora biológica y la práctica científica en Emile Durkheim. 13(3), 367 – 379.
- González-Rodríguez, Rebeca I., Jiménez-Escobar, Irma, & Gutiérrez-Castrellón, Pedro. (2020). Microbiota de la leche humana y su impacto en la salud humana. *Gaceta médica de México*, 156(Supl. 3), 58-66. Epub 25 de octubre de 2021.

- Goulart DB, Mellata M. (2022). *Escherichia coli* Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. *Front Microbiol.* Jul 7;13.
- Griffiths, M. W. (2010). The microbiological safety of raw milk. *Improving the safety and quality of milk*, 27-63.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019a). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb. top100388.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019b). Nested polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), pdb. prot095182.
- Guaña-Moya E., Arequipa E.Q, Pérez Fabara M.A. (2017). Trends in the use of technologies and behavior of technological consumers. *Ciencias Holguin, Rev. Trimestral.* (23) 2.
<https://www.redalyc.org/pdf/1815/181887959002.pdf>
- Diab, M. S., Tarabees, R., Elnaker, Y. F., Hadad, G. A., Saad, M. A., Galbat, S. A., Albogami, S., Hassan, A. M., Dawood, M. A. O., & Shaaban, S. I. (2021). Molecular Detection, Serotyping, and Antibiotic Resistance of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* Isolated from She-Camels and In-Contact Humans in Egypt. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(8), 1021.
- Haas Joanna, Bum Jin Kim, Zeynep Atamer, Chao Wu, David C. Dallas. (2025). Effects of high-temperature, short-time pasteurization on milk and whey during commercial whey protein concentrate production, *Journal of Dairy Science.* 108 (1), 257-271.
- Harshitha, R., & Arunraj, D. R. (2021). Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 49(5), 800-812.
- Hernández, M., Morera, N., Sánchez-Busó, L., González-Candelas, F., & Colomina, J. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico

- clínico. *Revista Argentina de Microbiología*. 52 (2) 150-161.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754119300811>
- Hodzic, E., Glavinic, A., & Wademan, C. (2023). A novel approach for simultaneous detection of the most common food-borne pathogens by multiplex qPCR. *Biomolecules and Biomedicine*, 23(4), 640.
- Huang, S., Tian, P., Kou, X., An, N., Wu, Y., Dong, J., Cai, H., Li, B., Xue, Y., Liu, Y., & Ji, H. (2022). The prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase *Escherichia coli* in raw milk and dairy farms in Northern Xinjiang, China. *International journal of food microbiology*, 381, 109908.
- Huertas-Caro, C., Urbano-Cáceres, E., & Torres-Caycedo, M. (2019). Diagnóstico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), 513-528.
- Humphrey, T. J., & Beckett, P. (1987). *Campylobacter jejuni* in dairy cows and raw milk. *Epidemiology and Infection*, 98(3), 263–269.
- Hussain, S. M., Sharif, A., Bashir, F., Ali, S., Javid, A., Hussain, A. I., Naeem, E. (2025). Polymerase Chain Reaction: A Toolbox for Molecular Discovery. *Molecular Biotechnology*, 1-13.
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). (2022). Reglamento técnico sobre criterios microbiológicos para la leche y productos lácteos en Colombia. Bogotá, Colombia.
- Janda, J. M., & Lopez, D. L. (2021). The family enterobacteriaceae. In *Practical handbook of microbiology* (pp. 353-362). CRC Press.

- Jin-Qian, M. (2017). Polymerase chain reaction: Principles and applications in food microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 137, 1-10.
- Jitender Singh, J. S., Batish, V., & Sunita Grover, S. G. (2009). A Scorpion probe-based real-time PCR assay for detection of *E. coli* O157: H7 in dairy products.
- Jyothy, A., Sabu, S. T., & Dharan, S. S. (2020). Real Time PCR or Quantitative PCR (QPCR) a Revolution in modern science. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(11), 249-264.
- Kabiraz, M. P., Majumdar, P. R., Mahmud, M. C., Bhowmik, S., & Ali, A. (2023). Conventional and advanced detection techniques of foodborne pathogens: A comprehensive review. *Heliyon*, 9(4).
- Karns, J., Van Kessel, J., McClusky, B., & Perdue, M. (2007). Incidence of *E. coli* O157: H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. *Journal of dairy science*, 90(7), 3212-3219.
- Kim H. (2008). SEL, a Selective enrichment Broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*. 74; 4853-4866.
- Kim, J.-H., Rhim, S.-R., Kim, K.-T., Paik, H.-D., & Lee, J.-Y. (2014). Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in Low-fatted Milk by Multiplex PCR. *Korean journal for food science of animal resources*, 34(5), 717.
- Klein, J. T. (2014). Interdisciplinarity and the role of knowledge in the context of education and research: A study of the tree metaphor in academic discourse. *Journal of Higher*

- Education Policy and Management, 36(2), 123-135.
- <https://doi.org/10.1080/1360080X.2014.885436>
- Kumar, A., Grover, S., & Batish, V. K. (2013). Application of multiplex PCR assay based on uidR and fliCH7 genes for detection of *Escherichia coli* O157: H7 in milk. *The Journal of general and applied microbiology*, 59(1), 11-19.
- Kumar, R., Singh, S., & Gupta, A. (2023). Impact of Post-Processing Handling and Storage on the Microbial Safety of Dairy Products. *International Journal of Dairy Technology*, 76(1), 45-53.
- Kuslich, C. D., Chui, B., & Yamashiro, C. T. (2019). Overview of PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 18(1), e27.
- Lamas, A., Franco, C. M., Regal, P., Miranda, J. M., Vázquez, B., & Cepeda, A. (2016). High-throughput platforms in real-time PCR and applications. In *Polymerase chain reaction for biomedical applications*. IntechOpen.
- Lee, J.-W., Bannerman, D., Paape, M., Huang, M.-K., & Zhao, X. (2006). Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Veterinary Research*, 37(2), 219-229.
- Liang, T., Wu, X., Chen, B., Liu, J., Aguilar, Z. P., & Xu, H. (2020). The PCR-HCR dual signal amplification strategy for ultrasensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7 in milk. *Lwt*, 130, 109642.
- Liu, P., Shi, C., Wang, Y., Gao, H., Wang, S., & Ai, P. (2025). Simultaneous quantitative detection of viable *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Bacillus*

- cereus*, and *Listeria monocytogenes* in milk through multiplex real-time PCR. *Journal of Dairy Science*.
- Li, Y., Weng, P., Wu, Z., & Liu, Y. (2023). Extending the Shelf Life of Raw Milk and Pasteurized Milk with Plantaricin FB-2. *Foods*, 12(3), 608. <https://doi.org/10.3390/foods12030608>
- Lim HJ, Kang ER, Park MY, Kim BK, Kim MJ, et al. (2021) Development of a multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of four bacterial pathogens causing pneumonia. *PLOS ONE* 16(6): e0253402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253402>
- Loor-Giler, A., Robayo-Chico, M., Puga-Torres, B., Hernandez-Alomia, F., Santander-Parra, S., Piantino Ferreira, A., Muslin, C., & Nuñez, L. (2025). *Escherichia coli* O157:H7, a Common Contaminant of Raw Milk from Ecuador: Isolation and Molecular Identification. *Foods*, 14(3), 410.
- Luo, D., Huang, X., Mao, Y., Chen, C., Li, F., Xu, H., & Xiong, Y. (2017). Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7883-7890.
- Madi, E. H., & Al-Samarai, F. R. (2022). Using Elisa and nested PCR for detection of the toxoplasmosis in milk and the influence of infection and some factors on milk composition in the Iraqi local and Shami goats. *International journal of health sciences*, 6(S7), 3280-3288.
- Madic, J., de Garam, C. P., Brugère, H., Loukiadis, E., Fach, P., Jamet, E., & Auvray, F. (2011). Duplex real-time PCR detection of type III effector *tccP* and *tccP2* genes in pathogenic *Escherichia coli* and prevalence in raw milk cheeses. *Letters in applied microbiology*, 52(5), 538-545.

- Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C. P., Marault, M., Scheutz, F., Brugere, H., Auvray, F. (2011). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26: H11, O103: H2, O111: H8, O145: H28, and O157: H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 77(6), 2035-2041.
- Mancusi, R., & Trevisani, M. (2014). Enumeration of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157 and O26 in milk by quantitative PCR. *International journal of food microbiology*, 184, 121-127.
- Manfreda, G., De Cesare, A., Bondioli, V., & Franchini, A. (2003). Comparison of the BAX® System with a multiplex PCR method for simultaneous detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *International journal of food microbiology*, 87(3), 271-278.
- Martucciello, A., Astarita, S., Ruggia, A., Alfano, D., Morena, C., & Galiero, G. (2008). A survey on *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Escherichia coli* O157 presence in Campania buffalo mozzarella cheese by real-time PCR.
- Masoud, W., Vogensen, F. K., Lillevang, S., Al-Soud, W. A., Sørensen, S. J., & Jakobsen, M. (2012). The fate of indigenous microbiota, starter cultures, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus* in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2), 192-202.
- McKillip, J., Jaykus, L., & Drake, M. (2000). A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR. *Journal of applied microbiology*, 89(1), 49-55.

- Mayo Clinic. (2023). *E. coli*: Symptoms and causes. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>.
- Megawer, A., Hassan, G., Meshref, A., & Elnewery, H. (2020). Prevalence of *Escherichia coli* in milk and some dairy products in Beni-Suef governorate, Egypt. *Journal of Veterinary Medical Research*, 27(2), 161-167.
- Mercanoglu Taban, B., & Aytac, S. A. (2019). An evaluation of immunomagnetic separation-real-time PCR (IMS-RTiPCR) combined assay for rapid and specific detection of *Escherichia coli* O157: H7 in raw milk and ground beef. *Food Science and Technology*, 39(4), 955-961.
- Merchán, Nuri, Zurymar T, Saira, Niño, Leidy, & Urbano, Eliana. (2019). Determinación de la inocuidad microbiológica de quesos artesanales según las normas técnicas colombianas. *Revista chilena de nutrición*, 46(3), 288-294. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000300288>.
- Miszczycha, S. D., Ganet, S., Duniere, L., Rozand, C., Loukiadis, E., & Thevenot-Sergentet, D. (2012). Novel real-time PCR method to detect *Escherichia coli* O157: H7 in raw milk cheese and raw ground meat. *Journal of food protection*, 75(8), 1373-1381.
- Moiseenko, K. V., Begunova, A. V., Savinova, O. S., Glazunova, O. A., Rozhkova, I. V., & Fedorova, T. V. (2023). Biochemical and genomic characterization of two new strains of *Lactocaseibacillus paracasei* isolated from the traditional corn-based beverage of South Africa, Mahewu, and their comparison with strains isolated from kefir grains. *Foods*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/foods12010223>.

- Mohammadi, P., & Abiri, R. (2013). Isolation of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from raw milk in Kermanshah by polymerase chain reaction (PCR). *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(4), 1P.
- Monteiro G. M.L, Da Silva Mutz Yhan, De Abreu F. K, Alves do Rosario Denes K, Conte-Junior C.A. (2023) Combined UV-C Technologies to improve safety and Quality off ish and meat products: A systematic review. *Food*. 12. 1961
- Mullis, K. B. (1994). *The polymerase chain reaction* (Vol. 41). Springer science & business media.
- Mwasinga, W., Shawa, M., Katemangwe, P., Chambaro, H., Mpundu, P., M'kandawire, E., Munyeme, M. (2023). Multidrug-resistant *Escherichia coli* from raw cow Milk in Namwala District, Zambia: public health implications. *Antibiotics*, 12(9), 1421.
- Newell, D. G., & La Ragione, R. M. (2018). Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and emerging diseases*, 65, 49-71.
- Nielsen, E. M., & Andersen, M. T. (2003). Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 41(7), 2884-2893.
- Nurjayadi, M., Efrianti, U. R., Azizah, N., Kurniadewi, F., Saamia, V., Wiranatha, I. M., & Nastassya, L. (2019, December). Detection of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in artificially inoculated Milk sample using Real Time PCR method. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1402, No. 5, p. 055084). IOP Publishing.

- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., & Almeida, R.A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), 115-129.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., Bruce, I. J., & Magnani, M. (2009). Simultaneous direct detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk samples by magnetic extraction and multiplex PCR. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 17(2), 195-213.
- Oliver S., Murinda S., Jayarao BM. (2011). Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog Dis*. 8(3), 337-55.
- Olson, E. G., Bodie, A. R., Tarcin, H. A., Rubinelli, P. M., Applegate, S. F., Stephens, T. P.,...Ricke, S. C. (2025). Comparison of Media for the Detection of *Campylobacter jejuni* Using a Commercial RT-PCR System. *Pathogens*, 14(2), 166.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *E. coli*: Fact sheet on food safety and foodborne diseases. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
- Otero V. A, Sánchez Sergio (2017). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes' milk and sheep farm environment. *Small Ruminant Research*. 154; 110-114.
- Palomino-Camargo C., & González-Muñoz. Y (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y limitaciones. *Rev. Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 31 (3); 535-546.
- Pakbin, B., Brück, W. M., Brück, T. B., Allahyari, S., & Ashrafi Tamai, I. (2023). A quantitative prevalence of

- Escherichia coli* O157 in different food samples using real-time qPCR method. Food Science & Nutrition, 11(1), 228-235.
- Palomino Carolina & Muñoz Yuniesky. (2014). Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food: Advantages and limitations. Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 31. 535-546.
- Pakbin, B., Brück, W. M., Brück, T. B., Allahyari, S., & Ashrafi Tamai, I. (2023). A quantitative prevalence of *Escherichia coli* O157 in different food samples using real-time qPCR method. Food Science & Nutrition, 11(1), 228-235.
- Patange, V., & Thorat, V. D. (2022). Isolation of *Escherichia coli* from raw milk and detection of antibiotic resistance genes by blaTEM PCR. Indian Journal of Dairy Science, 75(6).
- Park, J. Y., Lim, M.-C., Park, K., Ok, G., Chang, H.-J., Lee, N., Choi, S.-W. (2020). Detection of *E. coli* O157: H7 in food using automated immunomagnetic separation combined with real-time PCR. Processes, 8(8), 908.
- Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., & Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. Food microbiology, 28(5), 848-861.
- Putri, D. A., Lei, J., Rossiana, N., & Syaputri, Y. (2024). Biopreservation of food using bacteriocins from lactic acid bacteria: Classification, mechanisms, and commercial applications. *International Journal of Microbiology*, 2024(1), 8723968.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T., Paul Ross, R., Fitzgerald, G., & Cotter, P. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. Journal of applied microbiology, 113(1), 96-105.

- Ranjbar, R., Safarpour Dehkordi, F., Sakhaei Shahreza, M. (2018). Prevalence, identification of virulence factors, O-serogroups and antibiotic resistance properties of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *Antimicrob Resist Infect Control* 7, 53.
- Reinoso, E. B., Dierker, S. A., & Moliva, M. V. (2022). Manual de herramientas moleculares: conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana.
- Rey, J., Sánchez, S., Blanco, J., De Mendoza, J. H., De Mendoza, M. H., Garcia, A., Alonso, J. (2006). Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International journal of food microbiology*, 107(2), 212-217.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., & Lagacé, J. (2001). Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 39(7), 2584-2589.
- Rípodas Navarro, A., Fernández Moreira, D., & Macho Martínez, M. (2017). Investigación de *Escherichia Coli* productor de toxinas Shiga (STEC) en carnes y derivados cárnicos. *Sanidad Militar*, 73(3), 147-152.
- Riyaz-Ul-Hassan, S., Syed, S., Johri, S., Verma, V., & Qazi, G. N. (2009). Application of a multiplex PCR assay for the detection of *Shigella*, *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Esch. coli* in milk. *Journal of dairy research*, 76(2), 188-194.
- Robledo, S., Osorio, G., & Lopez, C. (2014). Centro de Investigación de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. *Revista Vínculos*. 11(2), 6–16.
- Rodríguez E., Arques J. L., Gaya P., Nuñez, M., & Medina M. (2001). Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid

- bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. *Journal of Dairy Research*, 68(1), 131–137.
- Rojas-Herrera, R. A., & González-Flores, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 31(2), 69-76.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International journal of food microbiology*, 17(1), 37-45.
- Rui Li a, Xiao Tan (2016). Molecular screening and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail foods. *Food Control*. 60; 180-188.
- Sadeq, J., Fahed, K., & Hassan, H. (2018). Detection of *Escherichia coli* hlyA gene and *Staphylococcus aureus* Sea gene in raw milk of buffaloes using RT-PCR technique in AL-Qadisiyah province. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 32(1), 87-91. doi: 10.33899/ijvs.2018.153815.
- Schmid, D., Fretz, R., Buchner, G., König, C., Perner, H., Baumgartner, A., & Allerberger, F. (2013). Foodborne disease outbreaks in Austria, 2007-2011. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.021>.
- Schmitz, J. E., Stratton, C. W., Persing, D. H., & Tang, Y.-W. (2022). Forty years of molecular diagnostics for infectious diseases. *Journal of clinical microbiology*, 60(10), e02446-02421.
- Shan, S., Li, R., Xia, W., Tong, X., Huang, Y., Tan, Y. Liu, D. (2024). High-resolution melting real-time polymerase chain reaction assays for subtyping of five diarrheagenic *Escherichia coli* by a single well in milk. *Journal of Dairy Science*, 107(8), 5416-5426.

- Shahrajabian, M. H., & Sun, W. (2024). The significance and importance of dPCR, qPCR, and SYBR Green PCR kit in the detection of numerous diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 30(3), 169-179.
- Singh, J., Batish, V. K., & Grover, S. (2009). A molecular beacon-based duplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in milk and milk products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10), 1195-1201.
- Solanki, S., & Devi, D. (2024). Molecular Detection of Some Most Important Pathogenic Bacteria by Multiplex PCR for Diagnosis of Subclinical Mastitis in Bovine. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, 1-7.
- Solano López, Edita, Castellanos Quintero, Sara, López Rodríguez del Rey, María, & Hernández Fernández, Juana. (2009). La bibliometría: una herramienta eficaz para evaluar la actividad científica postgraduada. *MediSur*, 7(4), 59-62.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tong, S. Y., & Giffard, P. M. (2012). Microbiological applications of high-resolution melting analysis. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3418-3421.
- Valencia-Hernandez, D. S., et al. (2020). SAP algorithm for citation analysis: An improvement to tree of Science. *Ingeniería e Investigación*, 40(1).
<https://doi.org/10.15446/ing.investig.v40n1.77718>
- Wang, L., Li, P., Yang, Y., Xu, H., Aguilar, Z. P., Xu, H., Xiong, Y. (2014). Development of an immunomagnetic separation–propidium monoazide–polymerase chain reaction assay

- with internal amplification control for rapid and sensitive detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in milk. *International Dairy Journal*, 34(2), 280-286.
- Wang, L., Li, P., Zhang, Z., Chen, Q., Aguilar, Z. P., Xu, H.,...Xiong, Y. (2014). Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process. *Food Control*, 36(1), 119-125.
- Wang Meng, W. M., Yang JunJie, Y. J., Gai ZhongTao, G. Z., Huo ShengNan, H. S., Zhu JianHua, Z. J., Li Jun, L. J., Shi Feng, S. F. (2018). Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk.
- Wang, X., Li, J., & Zhou, Y. (2021). Multiplex PCR: An advanced tool for simultaneous detection of multiple pathogens in food safety assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 342, 108997.
- Wei, C., Zhong, J., Hu, T., & Zhao, X. (2018). Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* by multiplex PCR in milk. *3 Biotech*, 8, 1-7.
- Yeh, E. G., Anderson, T., & Patel, M. (2021). Good manufacturing practices in dairy processing: Reducing microbial contamination risks. *Food Quality and Safety Journal*, 45(6), 402-417
- Young F., Platt D., Logue, D., Ternent H., & Fitzpatrick J. (2001). Bovine *Staphylococcus aureus* mastitis: strain recognition and dynamics of infection. *Journal of Dairy Research*, 68(3), 377-388.
- Zago, M., Bonvini, B., Martín Platero, A. M., Mucchetti, G., Carminati, D., & Giraffa, G. (2007). Characterisation of *Escherichia coli* isolated from raw milk cheeses. *Annals of microbiology*, 57, 49-54.

- Zhao, D., Liu, J., Du, J., Liu, K., & Bai, Y. (2023). A highly sensitive multiplex lateral flow immunoassay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(6), 6577-6587.
- Zbrun, M. V., Moreno, N., Camussone, C. M., Signorini, M. L., & Primo, M. E. (2024). Comparison of real-time PCR and nested PCR based on the HlyA gene for the detection of *Listeria monocytogenes*. Application on cheese samples. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(2), 1783-1791.
- Zhang M, Wu J, Shi Z, Cao A, Fang W, Yan D, Wang Q, Li Y. (2022). Molecular Methods for Identification and Quantification of Foodborne Pathogens. *Molecules*. 27(23):8262. doi: 10.3390/molecules27238262.
- Zhou, B., Liang, T., Zhan, Z., Liu, R., Li, F., & Xu, H. (2017). Rapid and simultaneous quantification of viable *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in milk through multiplex real-time PCR. *Journal of dairy science*, 100(11), 8804-8813.
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *Biotechniques*, 69(4), 317-325.