

Artículo Original

DetECCIÓN RÁPIDA DE *Salmonella* EN LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA MEDIANTE INMUNOSEPARACIÓN MAGNÉTICA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Rapid detection of *Salmonella* in raw and pasteurized milk by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction.

Luigi Teresita^{1,3*}, Rojas Legna², Valbuena Oscar^{2,3}.

¹Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. ²Departamento de Biología de la Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad de Carabobo. ³Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA-UC). Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. República Bolivariana de Venezuela.

Recibido enero 2013 - Aceptado mayo 2013

RESUMEN

Se utilizó la técnica inmunoseparación magnética-reacción en cadena de la polimerasa (IMS-PCR) como método rápido de detección de *Salmonella* en leche cruda y pasteurizada. El proceso implicó pre-enriquecimiento en agua peptonada 0,1 % durante 24 horas a 37 °C, con posterior inmunoseparación (IMS) con perlas magnéticas (Dynabeads®) anti-*Salmonella*. Los inmunocomplejos obtenidos fueron sometidos a extracción de ADN, el cual sirvió de molde para la amplificación del gen *invA* por PCR. Adicionalmente, las muestras fueron analizadas mediante cultivo convencional para detección de *Salmonella* (APHA). Como control de la efectividad de las técnicas, se contaminaron muestras de leche pasteurizada con 10² y 10⁵ UFC/mL de *Salmonella*, para ser empleadas como controles del sistema de IMS-PCR. Los resultados obtenidos indicaron ausencia de *Salmonella* en ambos tipos de muestras: leche cruda y leche pasteurizada, reflejando adecuados procesos higiénico-sanitarios en la obtención y manipulación de la leche cruda, así como óptimo proceso térmico de la leche pasteurizada. En las muestras controles la IMS-PCR y el método convencional detectaron el organismo blanco, con porcentajes de sensibilidad y especificidad del 100 %. El tiempo de ensayo para detección de *Salmonella* fue de 27 horas, por lo que esta herramienta de diagnóstico rápido sería de gran valor para la industria láctea de Venezuela.

PALABRAS CLAVE

Salmonella, leche, inmunoperlas, PCR.

ABSTRACT

Immunomagnetic separation-polymerase chain reaction technique (IMS-PCR) was used as a rapid method for detection of *Salmonella* in raw and pasteurized milk. The process involved pre-enrichment by 0,1 % peptone water for 24 hours at 37 °C, and subsequent immunomagnetic separation (IMS) with anti-*Salmonella* magnetic beads (Dynabeads®). The immunocomplexes obtained were subjected to DNA extraction which served as a template for amplification by PCR *invA*. In addition, samples were analyzed by conventional culture for *Salmonella* (APHA). As techniques efficiency control, pasteurized milk samples were contaminated with 10² and 10⁵ CFU/mL of *Salmonella* to be used in the IMS-PCR system. The results indicated absence of *Salmonella* in the two analyzed samples: raw and pasteurized milk, reflecting an appropriate hygienic-sanitary procedure in obtaining and handling of raw milk, as well as, optimum thermal processing of pasteurized milk. In the control samples the IMS-PCR and conventional method detected the target organism, with percentages of sensitivity and specificity of 100 %. The assay time for detection of *Salmonella* was 27 hours, thus, this fast diagnostic tool would be of great value from Venezuela dairy industry.

KEY WORDS

Salmonella, milk, immunobeads, PCR.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son una causa importante de morbimortalidad a nivel mundial, los patógenos implicados con mayor frecuencia son *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter*. En América Latina las ETAs representan alrededor del 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda [1]. En un alto porcentaje de ETAs no es factible identificar al patógeno responsable, debido a que el vehículo alimentario implicado ya no se encuentra disponible para el análisis. Por otra parte, los resultados bacteriológicos consumen mucho tiempo ya que los métodos convencionales para la detección de patógenos en alimentos son laboriosos, incluyen preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, siembra en medios de cultivo selectivos, confirmación bioquímica y serológica en algunos casos. En este sentido, surge la necesidad de estandarizar métodos rápidos y eficientes para la detección de agentes causales, lo cual incide de manera positiva en el control de los microorganismos y en la prevención de las enfermedades que causan [2-6]. Entre estas enfermedades se encuentran las infecciones causadas por *Salmonella*, las cuales representan la causa más común de brotes de origen alimentario a nivel mundial. Los alimentos que presentan un mayor riesgo de contaminación por *Salmonella* son las carnes crudas, pollo, pescado, huevo, así como la leche y sus derivados, por tal motivo, la detección de este género bacteriano constituye uno de los principales retos para el sistema de salud pública [2].

Para minimizar el tiempo de detección de patógenos como *Salmonella* en alimentos se han implementando métodos de biología molecular en el área de microbiología de alimentos, siendo la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR, según siglas en inglés), una de las más empleadas, ofreciendo un diagnóstico confiable y rápido, permite la detección de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo [7], sin embargo, la PCR puede ser inhibida por una variedad de factores, entre ellos, alimentos y muestras con altas concentraciones bacterianas [8]. Ante esta problemática, se han

desarrollado metodologías alternativas, previas a la PCR, entre las que se encuentra la concentración por inmunoseparación magnética (IMS, según siglas en inglés), fundamentada en la reacción específica del microorganismo de interés con reactivos inmunológicos (ligados a partículas magnéticas), mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Completada la reacción, los microorganismos pueden retirarse del sustrato utilizando un magneto [4].

La IMS permite la separación específica de una bacteria blanco a partir de la microbiota que puede estar presente en un alimento [9], haciendo posible la separación de ADN inespecífico o factores que interfirieran con el proceso de PCR. Adicionalmente favorece la recuperación rápida de los microorganismos deseados [10-12], constituyendo una alternativa al cultivo en medios selectivos, sistema que requiere más tiempo, y que se ha utilizado ampliamente para el enriquecimiento de patógenos transmitidos por alimentos [4]. Sin embargo, entre las limitaciones de la IMS se refiere que podrían darse uniones inespecíficas [3,13] y que la eficiencia de la técnica está condicionada por la cantidad y calidad de la flora asociada presente en la matriz del alimento, recomendando aplicar la IMS con otros métodos rápidos como ELISA o PCR y de esta manera aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica [14].

La técnica molecular basada en la inmunoseparación magnética-reacción en cadena de la polimerasa (IMS-PCR), está creando expectativas en el diagnóstico molecular de las enfermedades transmitidas por alimentos ya que a diferencia de los métodos tradicionales, que requieren casi una semana para dar un resultado definitivo, usando IMS-PCR se logra en uno a tres días, traducándose en un balance positivo en la economía de las empresas [10], así como para las instituciones de salud pública del Estado. El objetivo de esta investigación fue emplear la técnica IMS-PCR para la detección rápida de *Salmonella* en leche cruda y pasteurizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Las cepas *Salmonella* Enteritidis y *Shigella flexneri*, utilizadas en la presente investigación, pertenecen a la colección del Centro de Investigaciones de Microbiología Ambiental de la Universidad de Carabobo (CIMA-UC). Fueron mantenidas y subcultivadas en cuñas de agar infusión cerebro-corazón (BHI, Brain Heart Infusión) (HIMEDIA®, Mumbai, India) y

reactivadas en caldo BHI 24 horas previas a cada ensayo.

Perlas magnéticas. Las perlas paramagnéticas (Dynabeads® anti-*Salmonella*) están conjugadas a anticuerpos anti-*Salmonella* purificados, adsorbidos y covalentemente unidos a la superficie. Las inmunoperlas se encontraban suspendidas en solución buffer fosfato (PBS) pH 7,4 con 0,1 % de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,02 % de azida de sodio (NaN_3), las cuales se dispensaron en microtubos estériles y se mantuvieron a 4 °C antes de su uso, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Muestras. Las muestras fueron obtenidas de varios municipios del estado Carabobo. Se analizaron 100 muestras de leche entera pasteurizada de una misma marca, obtenidas en 20 expendios comerciales del municipio Valencia (abastos, panaderías y supermercados), en cada local se muestrearon por día 5 unidades del producto, 40 muestras de leche cruda extraída mediante ordeño manual matutino; 30 de ellas provenientes de una receptoría de leche ubicada en el sector Urama del municipio Juan José Mora y 10 provenientes de una pequeña finca productora de quesos artesanales, ubicada en el municipio San Diego, las muestras de leche fueron recolectadas mediante muestreo probabilístico de tipo aleatorio simple. Para evaluar o establecer controles de la IMS-PCR, fueron contaminadas artificialmente 10 de las 100 muestras de leche pasteurizada con dos inóculos de *Salmonella* a concentraciones distintas: 5 muestras con 10^5 UFC/mL e igual número con 10^2 UFC/mL.

Procesamiento de las muestras. Las muestras de leche fueron sometidas a un proceso de preenriquecimiento, para ello se tomaron 25 mL de cada una (cruda, pasteurizada sin contaminación artificial y controles) y se mezclaron con 225 mL de agua peptonada al 0,1 % (HIMEDIA®, Himedia laboratories, Mumbai, India), se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se tomó 1 mL para la investigación de *Salmonella* por el método convencional según APHA, el cual contempla etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento selectivo-diferencial e identificación bioquímica y serológica [15]. Para la IMS, se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Luigi [3], la cual consistió en la inmuno-separación de la bacteria blanco a partir de una muestra preenriquecida (1 mL) con perlas adsorbidas de anticuerpos específicos, los complejos inmunes (bacterias-inmunoperlas) fueron luego separados con un magneto (MPC®-10, Dynal). Posteriormente, los inmunocomplejos se lavaron con PBS tres veces

en el caso de las muestras de leche cruda y dos lavados en las muestras de leche pasteurizada, con la finalidad de remover los restos de componentes de la leche, así como otros microorganismos pertenecientes a la microbiota de fondo. Finalmente los inmunocomplejos se resuspendieron en 100 µL de la solución de lavado PBS (Buffer fosfato salino + Tween 20 a 0,05 % V/V, pH 7). Una alícuota de 50 µL se sembró en agar *Salmonella-Shigella* (ASS) (DIFCO®, Difco Laboratories, Detroit, USA) y los 50 µL restantes fueron sometidos a extracción de ADN mediante choque térmico (calentamiento en termobloque a 100 °C durante 10 minutos). Se empleó un espectrofotómetro (Spectronic Genesys™ 2) para medir la absorbancia a dos longitudes de onda, UV 260 nm y 280 nm, de una dilución de ADN (10 µL de solución de ADN: 990 mL de agua libre de nucleasas). Se calculó el índice de pureza = $D.O_{260nm} / D.O_{280nm}$ y la concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}$) $[\text{ADN}] = 50 (\text{factor}) * x 100 (\text{dilución}) * D.O_{260nm}$ * (Factor = 50 µg de ADN lee una unidad de Absorbancia a 260 nm/ml). Se verificó la integridad del ADN extraído mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 2 %.

Los fragmentos de ADN obtenidos fueron sometidos directamente al análisis por PCR, almacenados a 4 °C para ser amplificados en las siguientes horas, o mantenidos en Biofreezer (Cool-lab™ Lab-line Instruments, Inc.) a -20 °C hasta su uso. En la PCR, se empleó un set de iniciadores u oligonucleótidos (Stylnva-JHO-2) 1: secuencia 5'-TCGTCATTCCATTACCTACC-3' y oligonucleótido 2: secuencia 5'-AAACGTTGAAAACTGAGGA-3', para amplificar una secuencia de ADN cromosómico de 119 pb correspondiente al gen *invA* (GenBank nº M90846) de *Salmonella* Typhimurium referido por Arnold y col. [16]. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, preparando previamente en microtubos estériles de 1,5 mL la siguiente mezcla: Master Mix 2X: 50 U/mL de Taq polimerasa, 400 µM de cada dNTP, 3 mM MgCl_2 (Promega, Madison, WI, EE.UU.) (25 µL), iniciador *invA1* 100pM/µL (3 µL), iniciador *invA2* 100pM/µL (3 µL), agua libre de nucleasa (14 µL). Por cada muestra a procesar se dispensaron en microtubos de 0,5 mL, 45 µL de la mezcla referida recién preparada y 5 µL del ADN extraído. Se llevaron inmediatamente al termociclador (MiniCycler™ MJResearch) con las siguientes condiciones: 94 °C- 3 minutos (1X), 94 °C-1 minuto, 55 °C-1 minuto, 72 °C-10 minutos (35X), 72 °C- 10 minutos (1X). Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis (7 µL + 3 µL de azul de

bromofenol/pozo) en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) a 120 V durante 45 minutos. Se visualizaron los resultados de la corrida electroforética en un transiluminador de luz UV para evaluar la presencia del amplicón (119 pb) y se realizó la fotodocumentación empleando una cámara Polaroid. Se incluyeron los respectivos controles de especificidad (DNA de *Shigella flexneri*), control negativo (sistema sin ADN templado) y control positivo (DNA de cepa de referencia de *Salmonella* Enteritidis). El protocolo de IMS-PCR aplicado en la presente investigación fue previamente estandarizado por los autores (en prensa).

Análisis de los datos. Para comparar los resultados de la IMS-PCR con los obtenidos mediante el método de cultivo convencional fue calculado el índice de sensibilidad y especificidad. Los mismos se calcularon tal como lo describen Boer y Beumer [17]: Sensibilidad: $P/(FN + P) \times 100$, y la Especificidad: $N/(FP+N) \times 100$. Donde, “N” correspondió al número de verdaderos positivos; “P” fue el número de verdaderos positivos; “FN” el número de falsos negativos, y por último, “FP” que correspondió al número de falsos positivos.

RESULTADOS

Al aplicar la IMS-PCR a las muestras de leche cruda (n = 40) y pasteurizada sin contaminación artificial (n = 100), no se detectó presencia de *Salmonella*. Al cultivar alícuotas de inmunoseparados (post-IMS) en medio selectivo (ASS), fueron identificados otros microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae en muestras de leche cruda (n = 19), entre ellos, los géneros *Citrobacter* y *Proteus*, coincidiendo con los resultados al aplicar el método de cultivo convencional. Este crecimiento de flora banal no se obtuvo en las muestras de leche pasteurizada. La observación de los géneros bacterianos diferentes a *Salmonella* post-inmunoseparación en leche cruda, podrían resultar en falsos positivos, no obstante, al realizar la posterior PCR a partir de los inmunoseparados, se pudo corroborar la ausencia total de *Salmonella* en leche cruda y pasteurizada. En relación a los resultados obtenidos a partir de la IMS de las muestras controles (leche pasteurizada contaminada artificialmente con suspensiones de cultivos de *Salmonella* Enteritidis en el orden de 10^2 y 10^5 UFC/mL, luego de sembrar las suspensiones de inmunoseparados (inmunocomplejos) en medios selectivos, tal como se esperaba, solo se observó un crecimiento característico de *Salmonella*.

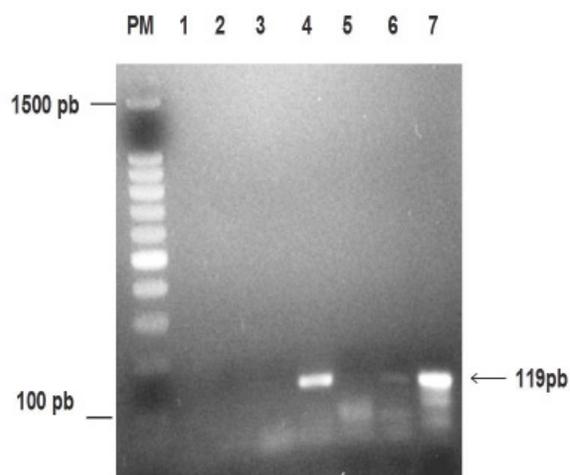


Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR en muestras de ADN aisladas a partir de los inmunocomplejos obtenidos luego de contaminar experimentalmente muestras de leche pasteurizada. PM: marcador de peso molecular de DNA 100 pb (Promega, Madison, WI, EEUU.); Carril 1= ADN de *Shigella flexneri*; Carriles 2 y 5= ADN de la muestra inmunoseparada contaminada con 10^2 UFC/mL de *Salmonella*; Carriles 3 y 6= ADN de la muestra inmunoseparada contaminada con 10^5 UFC/mL de *Salmonella*; Carril 4= ADN de la muestra inmunoseparada contaminada con 10^2 UFC/mL de *Salmonella*; Carril 7= ADN cromosómico de *Salmonella* Enteritidis (cepa de referencia).

DISCUSIÓN

Ambos métodos probados para la detección de *Salmonella* en leche, convencional e IMS-PCR, mostraron 100% de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, Coklin y col. [18], señalan la técnica de IMS-PCR más sensible que la inmunofluorescencia al investigar protozoarios en heces de vacas de ordeño. Resultados similares a favor de la técnica de biología molecular reportan Alcázar y col. [19], al analizar 120 muestras de quesos frescos y madurados para investigar la presencia de *Salmonella* por el método convencional y por PCR amplificando el gen *invA*, los tres casos positivos fueron detectados solo por PCR.

Al analizar el tiempo empleado para la detección de *Salmonella* mediante IMS-PCR, se tiene que en la presente investigación fue de 27 horas, contrario a los 4 o 5 días utilizados para la confirmación de *Salmonella* por el método convencional. Esta disminución en el tiempo de detección es comparable a la citada por Taban y col. [6], quienes recomiendan el uso de IMS-PCR para investigar *Salmonella* en muestras de leche por ser un método rápido (16 horas) y sensible ($1-10$ UFC/mL). Otros autores como Garbaccio y Cataldi

[20], Yang y col. [21] y Foddai y col. [22], también han evaluado el método de IMS-PCR para la detección de patógenos de interés, reportando un considerable acortamiento del tiempo de diagnóstico microbiológico. Asimismo, Yáñez y col. [23], al detectar *Salmonella* aplicando PCR en tiempo real (PCR-TR) y el método convencional en alimentos de la vía pública, aunque no concentraron previamente con IMS, también sugieren el uso de la PCR por observar diferencia con respecto al tiempo, PCR-TR permitió resultados a las 24 horas.

En cuanto a la detección de microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae posterior a la IMS en muestras de leche cruda, los autores indican que esto puede deberse entre otras razones a la adherencia inespecífica de las bacterias a las perlas, como consecuencia de la naturaleza rugosa de estas últimas, las cuales hacen posible que resulten atrapadas aunque no conjugadas a las inmunoperlas cierta cantidad de microbiota de fondo, generando células viables distintas a *Salmonella* en placas de agar [24], éstas podrían ser observadas como falsos positivos. La ausencia de tales microorganismos en las muestras de leche pasteurizada se puede explicar ya que las mismas han sido sometidas a un proceso tecnológico por lo que en muestras de leche cruda la probabilidad de uniones inespecíficas a las perlas es mayor, arrastrando bacterias presentes naturalmente en la leche y por contaminación fecal no conjugadas a las inmunoperlas. Otra explicación podría adjudicarse a las reacciones cruzadas con anticuerpo anti-*Salmonella* y otros géneros bacterianos, algunos de los microorganismos en los cuales se ha encontrado este fenómeno destacan: *Enterobacter agglomerans*, *Shigella*, *E. coli* y *Citrobacter* spp. [25], este último, fue identificado luego de la IMS en la presente investigación así como en investigaciones realizadas por Cudjoe y col. [26] y Ripabelli y col. [24].

A pesar de la observación de falsos positivos post-IMS, al realizar la PCR, se pudo comprobar la ausencia total de *Salmonella* logrando evidenciar la efectividad de la técnica empleando el gen *invA*, el cual ha sido reportado en la literatura de gran utilidad en la detección de *Salmonella* a partir de alimentos (16, 27, 28). Adicionalmente, se evita un aumento en el número de lavados o la realización de diluciones, proceso que genera pérdida de inmunoperlas [29] como consecuencia de los glóbulos de grasa o algún otro componente presente en la leche que atrapan gran cantidad de las mismas y hacen que se pierdan en los lavados [3,30].

CONCLUSIONES

1. Ambos métodos: IMS-PCR y el convencional, presentaron porcentajes de sensibilidad y especificidad del 100% para la detección de *Salmonella* en muestras de leche cruda y pasteurizada.

2. El tiempo de realización de la técnica de IMS-PCR para la detección de *Salmonella* en leche cruda y pasteurizada fue menor (27 horas) al compararlo con el método convencional (cuatro días), representando este factor un valor agregado de gran interés desde el punto de vista sanitario, epidemiológico e industrial para el diagnóstico microbiológico de patógenos como *Salmonella* que pueden estar presentes en la leche y representar un posible riesgo a la salud pública.

3. En la técnica de IMS, se sugiere incorporar un agente caotrópico como la úrea al buffer PBS tween 20, con la finalidad de evitar las uniones inespecíficas de las bacterias a las perlas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bonifaz V. Aplicaciones de la Epidemiología molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *BIOFARBO*. 2008; 16(1): 92-97.
- [2] Flores T, Herrera R. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública Méx.* 2005; 47: 388-390.
- [3] Luigi T. Aplicación de la técnica de separación inmunogenética para el aislamiento de *Escherichia coli* O157: H7 en muestras de leche. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2004; 24: 50-58.
- [4] Nou X, Arthur T, Bosilevac J, Brichita-Harhay D, Guerini, M, Kalchayanand N., *et al.* Improvement of immunomagnetic separation for *Escherichia coli* O157:H7 detection by the pickpen magnetic particle separation device. *J Food Prot.* 2006; 69: 2870-2874.
- [5] Rambabu L, Kaiser J. Rapid detection of foodborne pathogens by using molecular techniques. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 51-54.
- [6] Taban B, Mercanoglu U, Aytac S. Rapid detection of *Salmonella* in milk by combined immunomagnetic separation-polymerase chain reaction assay. *J Dairy Sci.* 2009; 92: 2382-2388.
- [7] Wang L, Li Y, Mustapha A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J Food Protect.* 2007; 70 (6): 1366-1372.
- [8] Khare M, Sharland M, Manyonda I, Rice P, Bland J, Griffiths P. Use of serial maternal urine cytomegalovirus PCR to detect primary CMV infection in seronegative pregnant women. *J Virol*

Methods. 2004; 119: 31-35.

[9] Park Y, Cho YH, Jee Y, Ko G. Immunomagnetic separation combined with real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of norovirus in contaminated food. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 4226-4230.

[10] Metzger-Boddien C, Khaschabi D, Schönbauer M, Boddien S, Schleiderer T y Kehle J. Automated high-throughput immunomagnetic separation-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk. *Int J Food Microbiol.* 2006; 110: 201-208.

[11] Civilini M, Venuti F, De Bertoldo M, Damante G. Recovery of *Salmonella typhimurium* from compost with the IMS-PCR method. *Waste Manage Res.* 2000; 18: 572-576.

[12] Lynch M, Leon-Velarde C, McEwen S, Odumeru J. Evaluation of an automated immunomagnetic separation method for the rapid detection of *Salmonella* species in poultry environmental samples. *J Microbiol Methods.* 2004; 58: 285-288.

[13] Rojas T, Vásquez Y, Reyes D, Martínez C, Medina L. Evaluación de la técnica de inmunoseparación magnética para la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche. *Arch Latinoam Nutr.* 2006; 56: 257-263.

[14] Petrola M, Pinto A, Luigi-Sandoval T, Rojas T. Comparación de la técnica de inmunoseparación magnética y el método convencional para el aislamiento de *Salmonella* spp. en leche pasteurizada contaminada artificialmente. *Salus.* 2011. 15 (3): 31-38.

[15] American Public Health Association (A.P.H.A.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3 th ed. Washington, USA. 1998; 80 pp.

[16] Arnold T, Scholz H, Marg H, Rosler U, Hensel A. Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *Salmonella* in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004; 51 (10): 459-463.

[17] Boer E, Beumer R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol.* 1999; 50: 119-130.

[18] Coklin T, Farber J, Parrington L, Bin C, Ross W, Dixon V. Immunomagnetic separation significantly improves the sensitivity of polymerase chain reaction in detecting *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2011; 23: 260-267.

[19] Alcázar M, Rubio L, Núñez E, Alonso M.

Detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en la vía pública en la ciudad de México. *Vet Méx.* 2006; 37(4): 417-429.

[20] Garbaccio S, Cataldi A. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev Arg Microbiol.* 2010; 42: 247-253.

[21] Yang Z, Shim W, Kim K, Chung D. Rapid detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples using immunomagnetic separation polymerase chain reaction (IMS-PCR). *J Agr Food Chem.* 2010; 58 (12):7135-7140.

[22] Foddai A, Elliott C, Grant I. Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells. *Appl Environ Microb.* 2010; 76(22): 7550-7558.

[23] Yáñez E, Máttar S, Durango A. Determinación de *Salmonella* spp. por PCR tiempo real y método convencional en canales de bovinos y alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Infectio.* 2008; 12(4): 246-253.

[24] Ripabelli G, Sammarco M, Grasso G. Evaluation of immunomagnetic separation and plating media for recovery of *Salmonella* from meat. *J Food Prot.* 1999; 62: 198-201.

[25] Blackburn C, Curtis W, Humpheson L, Pettit S. Evaluation of the vitek immunodiagnostic assay system (VIDAS) for the detection of *Salmonella* in foods. *Lett Microbiol.* 1994; 19: 32-36.

[26] Cudjoe K, Thorsen L, Sorensen T, Reseland J, Olsvik O. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faeces and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA. *Int J Food Microbiol.* 1991; 12: 313-321.

[27] Morales L, Hernández A, Cháidez C, Rendón G, Suslow T. Detección de *Salmonella* spp. en melón Cantaloupe en unidades de producción y unidad de empaque. *Agr Téc Méx.* 2009; 35 (2): 135-145.

[28] Chacón L, García C, Barrantes K, Achí R. Estandarización de un método de PCR para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2010; 30 (1): 18-23.

[29] Favrin S, Jassim S, Griffiths M. Application of a novel immunomagnetic separation bacteriofago assay for detection of *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 67: 217-224.

[30] Jenikova G, Pazlarova J, Demnerova K. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Int Microbiol.* 2000; 3: 225-229.