

**Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real acoplado a separación inmunomagnética (PCR<sub>TR</sub>-IMS) como método alternativo para la detección rutinaria de *Salmonella* spp. en carne de res en México**

Gloria Marisol Castañeda-Ruelas <sup>a</sup>

José Roberto Guzmán-Uriarte <sup>b</sup>

José Benigno Valdez-Torres <sup>b</sup>

Josefina León-Félix <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Culiacán, Sinaloa, México.

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC., Biología Molecular y Genómica Funcional. Carretera a El Dorado Km 5.5, Col. Campo El Diez, 80129, Culiacán, Sinaloa, México.

\*Autor de correspondencia: [ljosefina@ciad.mx](mailto:ljosefina@ciad.mx)

**Resumen:**

*Salmonella* es una bacteria patógena considerada una amenaza para la industria alimentaria, siendo relevante su detección oportuna. El objetivo del estudio fue evaluar la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real acoplado a separación inmunomagnética (rtPCR-IMS) como método alternativo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-114-SSA1-1994) para la detección de *Salmonella* en carne de res. Los parámetros evaluados fueron límite de detección, sensibilidad, especificidad, selectividad (inclusión y exclusividad), y grado de concordancia entre ambos métodos para la detección de *Salmonella* en muestras de carne de res presuntivas y contaminadas artificialmente. La incidencia de *Salmonella* en las muestras presuntivas de carne (n= 60) osciló de 20.0 a 21.6 % por ambos métodos. En las muestras

inoculadas (n= 60), la tasa de detección de *Salmonella* por rtPCR-IMS (93.3 %) y NOM-114-SSA1-1994 (98.3 %) mostró una coincidencia de 56 ocasiones con una desviación negativa. La comparación de rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994 en carne de res reportó una exactitud de 98.3 %, sensibilidad de 98.2 %, especificidad de 100 % y selectividad de 100 %. El límite de detección para ambos métodos fue 1-5 UFC·25 g<sup>-1</sup> de carne. El análisis estadístico indica que el rtPCR-IMS es equivalente al método de referencia para la detección de *Salmonella* en carne de res. Estos resultados advierten la alta incidencia de *Salmonella* en carne de res y proponen al rtPCR-IMS como un método idóneo y rápido para el control de *Salmonella* en la industria cárnica.

**Palabras clave:** Carne, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), *Salmonella*, Separación Inmunomagnética (IMS).

Recibido: 28/05/2021

Aceptado: 03/02/2022

## Introducción

*Salmonella* es un grupo de bacterias Gram negativas que comprende >2,600 serotipos clasificados en dos especies, *S. enterica* (incluye seis subespecies) y *S. bongori*. Entre estos, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (>1,500 serotipos) es el principal grupo responsable de enfermedades en el hombre denominadas “salmonelosis”<sup>(1)</sup>. Las principales manifestaciones clínicas son fiebre entérica (tifoidea y paratifoidea) y gastroenteritis causadas por los serotipos tifoideos y no tifoideos de *Salmonella*, respectivamente<sup>(2)</sup>. La estimación global anual de la salmonelosis es de >25 millones de casos de fiebre entérica y 153 millones de casos de gastroenteritis con ~300 mil muertes, las cuales se asocian mayormente al consumo de alimentos contaminados<sup>(3)</sup>. Actualmente, la salmonelosis es una de las cuatro principales enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) a nivel mundial<sup>(4)</sup>.

*Salmonella* está ampliamente distribuida en la naturaleza y puede sobrevivir en una gran variedad de alimentos (origen animal y hortalizas), los cuales se han identificado como vehículos de transmisión de la bacteria<sup>(2,4,5)</sup>. La naturaleza zoonótica de los serotipos no tifoideos de *Salmonella* señala a los animales como el principal factor de riesgo para exponer a la bacteria al medio ambiente y transferir al patógeno a los humanos durante la producción, manipulación o consumo de los alimentos<sup>(6)</sup>. La vigilancia de *Salmonella* debe basarse en métodos de detección confiables que favorezcan la inocuidad alimentaria<sup>(7)</sup>.

La detección de *Salmonella* en los alimentos puede ser compleja, debido a que las bacterias a menudo se encuentran en concentraciones bajas en los alimentos. Otro aspecto que dificulta la detección del microorganismo en un alimento es el proceso de elaboración, los microorganismos de fondo y el tipo de matriz alimentaria<sup>(8)</sup>. Esto puede advertir un riesgo sanitario y justificar la necesidad de métodos oportunos para la detección de patógenos relevantes como es *Salmonella*<sup>(7)</sup>.

El método de cultivo es considerado el estándar de oro para el aislamiento y la detección de microbios patógenos en los alimentos<sup>(9)</sup>. El método de cultivo para la detección de *Salmonella* implica una etapa de pre-enriquecimiento no selectivo, seguido de enriquecimiento selectivo y sembrado en agares selectivo, y posterior caracterización bioquímica y serológica de colonias presuntivas, permitiendo obtener un resultado negativo o positivo en 4 y 6-7 días, respectivamente<sup>(9)</sup>. El consumo de tiempo, mano de obra y reactivos que involucra este método son un inconveniente para la detección rápida de *Salmonella* en la industria alimentaria<sup>(7)</sup>.

Actualmente se han desarrollado métodos moleculares rápidos como el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su variante en tiempo real (rtPCR), que permiten la detección de *Salmonella* en un tiempo corto (24-72 h) en diversos alimentos<sup>(10-12)</sup>. Pruebas inmunológicas, bioquímicas y biosensores también se han propuesto como métodos rápidos<sup>(8)</sup>. Los métodos moleculares son útiles como herramientas de detección reduciendo la mano de obra y el tiempo de respuesta en comparación con los métodos de cultivo<sup>(12)</sup>. Sin embargo, la precisión de los métodos moleculares puede limitarse por la presencia de sustancias inherentes del alimento (sales biliares, bilirrubina, hemoglobina, urea, polisacárido, heces y antígenos y ADN, que pueden interferir con los resultados<sup>(13)</sup>.

La separación inmunomagnética (IMS) se ha utilizado para el aislamiento de *Salmonella* en diferentes matrices alimentarias<sup>(8,14-16)</sup>. Las IMS mejora la sensibilidad y especificidad de detección de *Salmonella* en los alimentos debido a las perlas de poliestireno anti-*Salmonella* que capturan a la bacteria, y ésta puede ser identificada por métodos de cultivo, inmunológicos o moleculares<sup>(17)</sup>. Recientemente se han desarrollado métodos que combinan las tecnologías IMS y rtPCR, que prescinden de la extracción de ADN y concentran al microorganismo por IMS después de un enriquecimiento primario de <24 h<sup>(10,11,18)</sup>.

En México, *Salmonella* representa un tema concerniente para la salud pública y la industria alimentaria. La Dirección General de Epidemiología de México reporta anualmente 28,815 casos de fiebres tifoidea y 78,681 casos de otras salmonelosis a nivel nacional<sup>(19)</sup>. Pero, la identificación de estos casos como ETA no está esclarecida. A pesar de que, en México, *Salmonella* se ha identificado como agente contaminante de carne de pollo<sup>(20,21)</sup>, carne de puerco<sup>(21)</sup>, carne de res<sup>(21-23)</sup>, vegetales<sup>(24)</sup> y huevo<sup>(25)</sup>.

La detección oportuna de *Salmonella* en la carne de res es de especial interés dado su elevada frecuencia (28.9 a 32.4 %) en el alimento<sup>(21-23)</sup> y la relevancia de la producción (1,960 t) y consumo per cápita (14.8 kg) anual de carne en México<sup>(26)</sup>. Además, el ganado y las aves se han identificado como reservorios de *Salmonella*<sup>(27)</sup>. En México, el método de cultivo es el estándar de oro para la detección de *Salmonella* en los alimentos, cuyo proceso puede resultar laborioso y requerir mucho tiempo (4 a 7 días) para obtener resultados finales<sup>(28)</sup>. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue realizar una validación interna del método comercial de rtPCR-IMS para la detección de *Salmonella* en carne de res, y comparar su eficiencia con el método de cultivo de referencia empleado en México.

## Material y métodos

### Descripción del estudio

El estudio de validación interna del método de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real acoplado a separación inmunomagnética (rtPCR-IMS) para la detección de *Salmonella* en carne de res se evaluó respecto al método de cultivo de referencia en México “NOM-114-SSA1-1994”<sup>(28)</sup>, como se especifica en el manual de validación de métodos microbiológicos alternativos propuesto por la ISO16140:2003<sup>(29)</sup>. La validación del método de rtPCR-IMS se realizó en muestras de carne de res presuntivas y contaminadas artificialmente. Los parámetros evaluados fueron límite de detección, sensibilidad, especificidad, selectividad, y el grado de concordancia entre los métodos.

### Cepas bacterianas

La cepa de *Salmonella* ATCC 35664 se utilizó como control de referencia para el ensayo de validación. Una colonia pura se transfirió a 30 ml de caldo de soya tripticaseína (TSB; Becton Dickinson) y se incubó durante 4 h en un baño de agua a  $35 \pm 2$  °C con agitación constante. Una alícuota del cultivo se utilizó para inocular 50 ml de TSB para obtener una absorbancia (DO) de 0.1 a 600 nm. Este subcultivo se incubó en las mismas condiciones hasta obtener una DO 1.0 ( $\lambda = 600$  nm). Diluciones seriadas y recuento de placa en agar entérico Hektoen (Becton Dickinson) se realizaron para estandarizar las concentraciones de 1-5, 6-10, 1-15 y 16-30 UFC·100  $\mu\text{l}^{-1}$ .

Un listado de 60 cepas clasificadas como *Salmonella* (n= 30) y no-*Salmonella* (n= 30) se usaron para el parámetro de selectividad (Cuadro 1). La selección de las cepas no-*Salmonella* fue con base a las características bioquímicas que comparten con *Salmonella* o por ser considerados agentes contaminantes de la carne. La mayoría de las cepas no-*Salmonella* correspondían a cultivos de colección y se obtuvieron comercialmente. Las cepas *Salmonella*

se obtuvieron del laboratorio, cuya identificación se realizó previamente con pruebas moleculares. Todas las cepas se cultivaron en TSB a 37 °C por 24 h.

**Cuadro 1:** Microorganismos utilizados para la prueba de selectividad

Prueba de inclusividad			Prueba de exclusividad		
Cepas	No	Referencia	Cepas no	No	Referencia
<i>Salmonella</i>			<i>Salmonella</i>		
<i>S. Agona</i>	1	CIAD A.C	<i>Bacillus subtilis</i>	1	Ambiental
<i>S. Albany</i>	1	CIAD A.C	<i>Candida Albicans</i>	1	ATCC 10231
<i>S. Anatum</i>	1	CIAD A.C	<i>Citrobacter freundii</i>	1	LEM 04001
<i>S. B monofásica</i>	1	CIAD A.C	<i>Citrobacter freundii</i>	1	LEM-04001
<i>S. C1 monofasica</i>	1	CIAD A.C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	LEM-04003
<i>S. Cayar</i>	1	CIAD A.C	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	ATCC 13048
<i>S. Cholerasuis</i>	1	CIAD A.C	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	LEM-04013
<i>S. Enteritidis</i>	1	CIAD A.C	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	LIBM-01003
<i>S. F</i>	1	CIAD A.C	<i>Escherichia coli</i>	1	LEM-01005
<i>S. Gaminara</i>	1	CIAD A.C	<i>Escherichia coli</i>	1	ATCC 25922
<i>S. Give</i>	1	CIAD A.C	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	1	CENAPA700728
<i>S. Haviana</i>	1	CIAD A.C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	ATCC 13883
<i>S. Infantis</i>	1	CIAD A.C	<i>Listeria innocua</i>	1	ATCC 33090
<i>S. Luciana</i>	1	CIAD A.C	<i>Listeria ivanovvi</i>	1	ATCC 19119
<i>S. Meliagridis</i>	1	CIAD A.C	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	Ambiental
<i>S. Minnesota</i>	1	CIAD A.C	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	ATCC 7694
<i>S. Montevideo</i>	1	CIAD A.C	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	ATCC 7644
<i>S. Muenchen</i>	1	CIAD A.C	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	Ambiental
<i>S. Newport</i>	1	CIAD A.C	<i>Proteus mirabilis</i>	1	ATCC 12453
<i>S. Oranienburg</i>	2	CIAD A.C	<i>Proteus mirabilis</i>	1	LEM-03011
<i>S. Saintpaul</i>	2	CIAD A.C	<i>Proteus vulgaris</i>	1	LEM-06070
<i>S. San Diego</i>	1	CIAD A.C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	ATCC 27853
<i>S. Senftenberg</i>	1	CIAD A.C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	LEM-01002
<i>S. Sohanina</i>	1	CIAD A.C	<i>Rhodococcus equi</i>	1	LEM-01019
<i>Salmonella sp</i>	1	CIAD A.C	<i>Rhodococcus equi</i>	1	ATCC 6939
<i>S. Typhimurium</i>	1	CIAD A.C	<i>Shigella flexneri</i> Gpo. B	1	ATCC 12022
<i>S. Thompson</i>	1	CIAD A.C	<i>Shigella flexneri</i>	1	LEM-04004
<i>S. Weltevreden</i>	1	CIAD A.C	<i>Shigella sonnei</i>	1	ATCC 9290
		CIAD A.C	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	ATCC 25923
		CIAD A.C	<i>Staphylococcus epidermis</i>	1	ATCC 12228

Las siglas representan: CIAD A.C. (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.), CENAPA (Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal), ATCC (American Type Culture Collection), LEM (código interno), LIBM (código interno)

## Colección de las muestras de carne de res

Para el estudio se recolectaron 60 muestras de carne cruda de res que consistían en carne tipo molida (n= 20), pulpa negra (n= 20) y pulpa redonda (n= 20) procedentes de tres mercados ubicados en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México. El número de muestras de carne se asignó de acuerdo con la recomendación mínima sugerida por la ISO16140:2003<sup>(29)</sup>. Se tomaron muestras de 500 g de carne, las cuales se colocaron en bolsas de plástico estériles y transportadas en refrigeración al laboratorio para su posterior análisis. El estudio contempló realizar el análisis en las muestras presuntivas para simular los efectos reales de contaminación que ocurren en la naturaleza, y en muestras de carne contaminadas artificialmente.

### Análisis de las muestras de carne de res presuntivas

Se homogenizaron 50 g de carne de res con 50 ml de agua destilada estéril en un triturador a 230 rpm por 2 min. Posteriormente, la muestra se dividió equitativamente en porciones de 25 ml para el método de rPCR -IMS y NOM-114-SSA1-1994.

### Análisis de las muestras de carne de res contaminadas artificialmente

Se utilizaron las muestras de carne de res clasificadas como negativas para *Salmonella* por ambos métodos. Una porción de 100 g de carne de res se homogenizó con 100 ml de agua destilada estéril durante 2 min a 230 rpm, y se separaron equitativamente en dos porciones de 50 ml; una porción se usó como control negativo y la porción restante para la contaminación de la carne con *Salmonella*. La porción contaminada se homogeneizó durante 2 min a 230 rpm, y subsecuentemente se dividió el homogenizado en dos porciones de 25 ml para su análisis por ambos métodos. Paralelamente, se incluyó un control negativo bajo las mismas condiciones. La selección del inóculo correspondió al límite de detección que permite una recuperación fraccional de la bacteria por alguno de los métodos.

### Límite de detección

Para establecer el límite de detección relativa, se prepararon cinco niveles de inóculo de *Salmonella*: 0, 1-5, 6-10, 1-15 y 16-30 UFC·25 ml<sup>-1</sup>. A partir de las muestras de carne de res clasificadas como negativas para *Salmonella*, se tomaron 250 g de muestra y se homogeneizaron con 250 ml de agua destilada estéril durante 2 min a 230 rpm en un homogeneizador automático (Stomacher 400 Circulador). El homogenizado se fraccionó en 10 porciones de 25 ml para su inoculación con *Salmonella*: porción 1-2 (0 UFC·25 ml<sup>-1</sup>), porción 3-4 (1-5 UFC·25 ml<sup>-1</sup>), porción 5-6 (6-10 UFC·25 ml<sup>-1</sup>), porción 7-8 (1-15 UFC·25 ml<sup>-1</sup>) y porción 9-10 (16-30 UFC·25 ml<sup>-1</sup>). Los niveles de inóculo añadidos se corroboraron

mediante el método de recuento en placa en agar entérico Hektoen, y los tipos de porciones se repartieron equitativamente para su análisis para ambos métodos. El límite de detección corresponderá a la concentración más pequeña del inóculo que se pueda detectar en la muestra en el 50 % de las ocasiones por los métodos<sup>(29)</sup>.

### Prueba de selectividad

La prueba de selectividad de los métodos se realizó *in vitro* sin el uso de muestras de carne de res y la selección del inóculo bacteriano se realizó según las especificaciones de la ISO16140:2003<sup>(29)</sup>. Para cada bacteria (Cuadro 1) se estandarizó un inóculo a una absorbancia de 1.0 ( $\lambda= 600$  nm) en ambos ensayos. Para el ensayo de exclusividad se ajustó una concentración de  $10^4$  UFC·100  $\mu\text{l}^{-1}$  en 225 ml de agua peptonada. Mientras que, en el ensayo de inclusividad se ajustó la concentración de 100 UFC·100  $\mu\text{l}^{-1}$  en 225 ml de los medios de enriquecimiento utilizados por los métodos rtPCR -IMS (agua peptonada) y NOM-114- SSA1-1994 (caldo lactosado), y la posterior adición de 100  $\mu\text{l}$  de un pool de las cepas empleadas en la prueba de exclusividad. Todos los cultivos fueron evaluados por los métodos de rtPCR -IMS y NOM-114- SSA1-1994.

### Método de cultivo de referencia (NOM-114-SSA1-1994)

Muestras de carne (25 ml) se enriquecieron con 225 ml de caldo de lactosa (Becton Dickinson) y se incubó a  $35 \pm 2$  °C durante  $24 \pm 2$  h. Posteriormente, se transfirieron alícuotas de 1 ml del cultivo a 10 ml de caldo Selenito Cistina (Becton Dickinson) y a 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (Becton Dickinson), para su incubación a  $35 \pm 2$  °C durante 24 h. Una vez completada la incubación, se inocularon alícuotas de 10  $\mu\text{l}$  de los cultivos previos en agar entérico Hektoen (Becton Dickinson), Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Becton Dickinson) y agar *Salmonella-Shigella* (Becton Dickinson), y se incubaron a  $35 \pm 2$  °C por 24 h. A partir de los agares, se seleccionaron colonias presuntivas (n= 3) de *Salmonella* para su identificación mediante pruebas bioquímicas primarias (agar de hierro de azúcar triple, agar de lisina y hierro y caldo de urea), API 20E (Biomereux NC) y pruebas serológicas basadas en la detección de antígeno O polivalente (InDRE)<sup>(28)</sup>. Paralelamente, se incluyeron un control negativo (medio sin bacteria) y un control positivo (*Salmonella* ATCC 35664).

### Método rtPCR-IMS

La detección de *Salmonella* se realizó de acuerdo con las condiciones del proveedor (www.biocontrolsys.com ). Todos los reactivos necesarios para la preparación de la reacción rtPCR para *Salmonella* (GDS *Salmonella* Tq 71008) están disponibles comercialmente por Assurance GDS<sup>®</sup>, BioControl System Inc. Una porción de 25 ml de muestra se enriqueció con 225 ml de agua de peptona tamponada (Becton Dickinson), y se incubó a  $35 \pm 2$  °C por

24 h. Posteriormente, se transfirió 1 ml del enriquecimiento previo a la placa de concentración que contenía 20 µl de reactivo de concentración (perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-*Salmonella*), y se mezcló por 10 min en un homogeneizador automático (Vortex Mixed Biocontrol Sistema Bellevue). Las perlas magnéticas se extrajeron con una pipeta magnética (Pick Pen™ Biocontrol System Bellevue), se lavaron con 1 ml del tampón por 7 seg, y se transfirió a una placa que contenía 35 µl del reactivo de resuspensión. Con una pipeta multicanal, se transfirieron 20 µl del tampón de resuspensión con las perlas inmunomagnéticas, y se depositaron en los tubos de PCR, que previamente contenían la sonda, los oligonucleótidos y la ADN Taq-polimerasa (5- Prime). Finalmente, los tubos se colocaron en la máquina de rtPCR. Paralelamente, se incluyeron un control negativo (medio sin bacteria) y un control positivo (*Salmonella* ATCC 35664). Todas las muestras analizadas por el ensayo de rtPCR-IMS se evaluaron nuevamente a partir del enriquecimiento original utilizando el método de referencia para verificar la detección de *Salmonella*.

### Análisis estadístico

Los parámetros de validación del método rtPCR-IMS se basaron en la comparación de los acuerdos positivos (AP), acuerdos negativos (AN), desviaciones positivas (DP) y desviaciones negativas (DN) de los resultados obtenidos en la detección de *Salmonella* en las muestras de carne en comparación al método de NOM-114-SSA1-1994. Los parámetros se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$\text{Exactitud} = \frac{AP+AN}{AP+AN+DP+DN} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Especificidad} = \frac{AN}{AN+DP} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{AP}{AP+DN} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{Falsos positivos} = 100\% - \% \text{ sensibilidad} \quad (4)$$

$$\text{Falsos negativos} = 100\% - \% \text{ especificidad} \quad (5)$$

$$\text{Valores discordantes (Y)} = DP + DN \quad (6)$$

El grado de concordancia entre los métodos (rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994) se determinó por el índice kappa y la prueba de McNemar ( $\chi^2$ ) con significancia del 5%.

## Resultados

### Límite de detección

El Cuadro 2 muestra la capacidad de los métodos de rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994 para la detección de los diferentes niveles de contaminación de *Salmonella* en carne de res. El límite de detección para el método de rtPCR-IMS fue de 1 – 5 UFC·25 g<sup>-1</sup>. No se obtuvieron productos de PCR de las muestras no inoculadas.

## Sensibilidad, especificidad y exactitud

El Cuadro 3 resume los acuerdos (AP y AN), las desviaciones (DP y DN) y los parámetros de validación relativa del ensayo de rtPCR-IMS para la detección de *Salmonella* en las muestras de carne de res. La tasa de detección de *Salmonella* en las muestras presuntivas (n = 60) mediante el análisis de rtPCR-IMS (21.6%) y NOM-114-SSA1-1994 (20.0 %) no fue suficiente para calcular los parámetros de validación.

En las 60 muestras de carne contaminadas artificialmente (1-5 UFC·25 ml<sup>-1</sup>), los ensayos de rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994 detectaron a *Salmonella* en 56 (93.3 %) y 59 (98.3 %) veces, respectivamente. Los métodos coincidieron en la detección de *Salmonella* en 59 ocasiones: 56 AP y 3 AN. Solo se obtuvo una DN (detectada por NOM-114 pero no por rtPCR-IMS). La rtPCR-IMS presentó una sensibilidad de 98.2 % (56/57), especificidad de 100 % (3/3) y exactitud de 98.3 % (59/60). Los índices de concordancia (k = 0.85 y  $\chi^2 = 1.0$ ) y el valor discordante (Y= 1), indicaron que el ensayo de rtPCR-IMS y el método de referencia (NOM-114-SSA1-1994) coinciden en los criterios estadísticos (Cuadro 3). Todas las muestras de carne no inoculadas fueron negativas para *Salmonella* por ambos métodos.

## Selectividad

Los métodos de rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994 presentaron 100 % de exclusividad y 100 % de inclusividad. Ninguno de los métodos reportó reacciones cruzadas. La Figura 1 muestra las amplificaciones del método de rtPCR-IMS correspondientes a la prueba de inclusividad y exclusividad.

## Discusión

*Salmonella* representa una amenaza para la salud pública y la industria alimentaria a nivel mundial<sup>(5)</sup>, y en México no es la excepción<sup>(19,20-25)</sup>. Los resultados de este trabajo exhiben la alta persistencia de *Salmonella* en las muestras presuntivas de carne de res (20 a 21.6 %), como previamente lo han expuesto algunos estudios en México<sup>(21-23)</sup>. Los métodos microbiológicos convencionales sirven de base para el análisis de rutina en muchos laboratorios de seguridad alimentaria y salud pública debido a la facilidad de uso, la fiabilidad de los resultados, la alta sensibilidad y especificidad<sup>(8)</sup>. No obstante, el tiempo de análisis (5 a 7 días) de los métodos de cultivo se observa como una limitante. La incorporación de los métodos moleculares rápidos para la detección de *Salmonella* en los alimentos permite una intervención temprana y hace posible la protección preventiva del consumidor<sup>(10,11,18)</sup>.

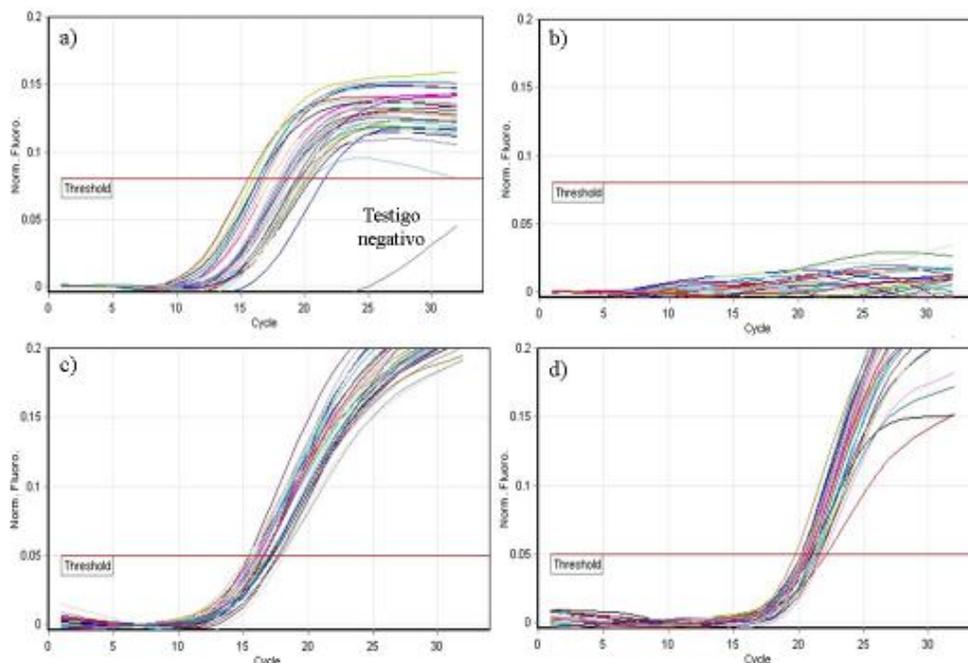
El límite de detección del método de rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994 fue de 1 – 5 UFC·25 g<sup>-1</sup> en carne de res, que corresponde a la concentración más baja evaluada. Del total

de muestras inoculadas con  $1 - 5 \text{ UFC} \cdot 25 \text{ g}^{-1}$ , el método alternativo arrojó tres repeticiones negativas, de las cuáles solo dos se confirmaron como verdaderamente negativas por el método de referencia (Cuadro 2). La no detección por el método de rtPCR-IMS se puede explicar por la cantidad pequeña ( $1 - 5 \text{ UFC} \cdot 25 \text{ g}^{-1}$ ) de *Salmonella* en el enriquecimiento no selectivo, las consideraciones probabilísticas de inoculación o el efecto del enriquecimiento<sup>(30)</sup>. Widjoatmodjo *et al*<sup>(31)</sup> destacan la importancia del pre-enriquecimiento previo a la detección por PCR para aumentar su sensibilidad, dado que la mayoría de los métodos de PCR necesitan concentraciones altas de microorganismos para una adecuada detección. Similar a nuestros resultados, Notzon *et al*<sup>(30)</sup> y O'Regan *et al*<sup>(32)</sup> reportaron un límite de detección del método de rtPCR-IMS en carne de res de  $10-100 \text{ UFC} \cdot 25 \text{ g}^{-1}$ , y en carne de pollo de  $1-10 \text{ UFC} \cdot 25 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente. Estos métodos emplearon un enriquecimiento de 6 h<sup>(30)</sup> ó 24 h<sup>(32)</sup> previo a la detección por PCR. Por otra parte, se menciona<sup>(10)</sup> que la IMS es una alternativa para evitar el enriquecimiento secundario permitiendo la detección de 1-10 células en un periodo de incubación de 12 – 24 h. El límite de detección observado ( $1 - 5 \text{ UFC} \cdot 25 \text{ g}^{-1}$ ) con la rtPCR-IMS permitiría alinearse con los requerimientos normativos nacionales (NOM-213-SSA1-2002) que exigen la cero tolerancia de *Salmonella* en 25 g de carne cruda de res<sup>(33)</sup>.

Los datos obtenidos en las muestras presuntivas no permitieron determinar los parámetros de validación, debido a que los cálculos se realizan sobre una serie de resultados negativos obtenidos por el método de referencia, los cuales no pueden exceder el doble del número de los resultados positivos según lo estipulado en el manual de validación<sup>(29)</sup>. Por lo que este estudio, explica la validación del método de rtPCR-IMS para el análisis de *Salmonella* basado en muestras de carne de res contaminadas artificialmente. El grado de sensibilidad, especificidad, exactitud, y concordancia del método comercial de rtPCR-IMS con el método de cultivo de referencia valida su uso para el análisis de *Salmonella* en carne de res generando resultados idóneos en un tiempo de 24 h (Cuadro 2). Además, la tasa de falsos positivos (0 %) y falsos negativos (1.8 %) del método son bajas. Es importante señalar que los métodos moleculares no reemplazan las técnicas de cultivo, dado que los resultados positivos deben confirmarse por el método de referencia<sup>(34)</sup>.

Algunos estudios previos han expuesto la concordancia de protocolos de rtPCR-IMS con los métodos de cultivo de referencia para la detección de *Salmonella* en carne de res<sup>(30)</sup> y pollo<sup>(32,35)</sup>, resaltando su alto grado de sensibilidad (94 - 100 %), especificidad (80 - 94 %) y exactitud (89 – 100 %). Estas características determinadas en el método comercial de rtPCR-IMS (Cuadro 3) pueden atribuirse a que las perlas inmunomagnéticas contienen antígenos que permite concentrar al microbio de interés a partir de enriquecimientos no selectivos disminuyendo el tiempo de análisis<sup>(35)</sup>. Además, los oligonucleótidos empleados son capaces de detectar diferentes tipos de cepas de *Salmonella* (Figura 1).

**Figura 1:** Amplificaciones del método de rtPCR-IMS para la prueba de inclusividad y exclusividad



La figura a y b muestran la amplificación de las 30 cepas de *Salmonella* (25 serotipos diferentes) y las 30 cepas de no-*Salmonella*, respectivamente. La posición de las líneas respecto al umbral indican un resultado positivo (superior) o negativo (inferior). La figura c y d muestran la amplificación de los controles internos de la reacción (ICA) de las cepas incluidas en el ensayo de inclusividad (a) y exclusividad (b). Las de líneas ICA rebasaron el umbral por lo que se considera una reacción válida.

La desviación negativa (DN) observada entre los métodos (Cuadro 2), puede explicarse debido a que el método de cultivo contiene diversas etapas de enriquecimiento que favorecen la recuperación de células dañadas y el crecimiento del microorganismo de interés en comparación a los métodos rápidos<sup>(12)</sup>. También, la presencia de *Proteus*, *E. coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Enterobacter* en estado mucoide en el caldo de enriquecimiento pueden unirse a los anticuerpos de las perlas causando reacciones cruzadas e impidiendo la detección de *Salmonella*<sup>(35)</sup>. Ampliamente se ha descrito que el tipo de matriz y sus componentes químicos pueden afectar los resultados de los métodos moleculares<sup>(12-13)</sup>. En cuanto a los tres acuerdos negativos entre los métodos, puede atribuirse a la cantidad extremadamente baja del microorganismo después del enriquecimiento o que no existían células en el inóculo inicial. El valor de McNemar ( $\chi^2 = 1.0$ ,  $P = 0.317$ ) obtenido en este estudio cumplen con el parámetro de no significancia ( $\chi^2 < 3.84$ )<sup>(29)</sup>, y demuestra que no existe diferencia entre los métodos de rtPCR-IMS y el método NOM-114-SSA1-1994 para la detección de *Salmonella* en carne de res. Además, el índice Kappa revela una alta concordancia (0.85 o 85%) entre los métodos. Notzon *et al*<sup>(30)</sup> infirieron la equiparabilidad del método alterno de rtPCR-IMS con una concordancia de 85 % ( $k = 0.85$ ) y 87 % ( $k = 0.87$ ) para la detección de *Salmonella* en carne contaminadas artificial y naturalmente, respectivamente.

Un método selectivo es aquel que permite detectar al analito que se está examinando, y que puede garantizar que la señal detectada solo puede ser un producto de ese analito específico<sup>(29)</sup>. En este sentido el método de rtPCR-IMS fue capaz de discriminar a *Salmonella*, dado que detectó las 30 cepas de *Salmonella* correspondiente a 25 diferentes serotipos aún en presencia de otros microorganismos, y no generar interferencia con las cepas diferentes a *Salmonella*. Mercanoglu & Griffiths<sup>(36)</sup> han reportado que la combinación de rtPCR y IMS para la detección de *Salmonella* presentan una selectividad del 100%, atribuyéndose esta propiedad al efecto de las perlas inmunomagnéticas y la selección de los oligonucleótidos empleados.

## Conclusiones e implicaciones

Los resultados proponen a la rtPCR-IMS como un método eficiente para la detección rápida de *Salmonella* spp. en carne de res dado que no presentó diferencias con el método de referencia (NOM-114-SSA1-1994), aportando la ventaja de detectar al microorganismo en un tiempo corto (24 h) y en una concentración mínima (1 UFC·25 g<sup>-1</sup>) y sin causar reacciones cruzadas con otros microorganismos que se encuentran como microbiota natural en la carne de res. La incorporación de este tipo de métodos a la industria alimentaria y laboratorios microbiológicos permitirán una respuesta rápida para asegurar la inocuidad de los alimentos y prevenir el riesgo de enfermedades. Adicionalmente, se alerta a las autoridades sanitarias sobre la alta incidencia de *Salmonella* en la carne cruda a fin de incluir controles a lo largo de la cadena alimentaria.

## Agradecimientos

Se agradece el apoyo técnico del QFB. Jesús Héctor Carrillo Yáñez, responsable del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional y al Fondo S0007-2006-1. SAGARPA-CONACYT. Proyecto No. 48134 por el financiamiento para el desarrollo de la investigación.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses, financieros o de otra índole.

## Literatura citada:

1. Ryan MP, O'Dwyer J, Adley CC. Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen *Salmonella*. *BioMed Res Int* 2017;1-6.

2. Eng SK, Pusparajaha P, Mutalibc NSA, Sera HL, Chand KG, Lee L. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 2015;8(3):284–293.
3. Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleeschauwer B, *et al.* World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS Med* 2015;12(12): e1001921.
4. OMS. Organización Mundial de la Salud. *Salmonella* (non-typhoidal). Ginebra, 2020. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
5. Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World* 2019;12(4):504-521.
6. Andino A, Hanning I. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Sci World J* 2015;2015:1-16.
7. Wang J, Li Y, Chen J, Hua D, Li Y, Deng H, Li Y, *et al.* Rapid detection of food-borne *Salmonella* contamination using IMBs-qPCR method based on pagC gene. *Braz J Microbiol* 2018;49:320–328.
8. Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control* 2015;47:264e276.
9. Ahmed OB, Asghar AH, Abd El-Rahim IH, Hegazy A. Detection of *Salmonella* in food samples by culture and polymerase chain reaction methods. *J Bacteriol Parasitol* 2014;5(3):1000187.
10. Mercanoglu TB & Aytac SA. Application of magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for detection of *Salmonella* spp. in chicken meats. *Euro Food Res Technol* 2009;229(4):623-628.
11. Anderson A, Pietsch K, Zucker R, Mayr A, Müller-Hohe E, Messelhäusser U, Sing A *et al.* Validation of a duplex real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products. *Food Anal Methods* 2011;4:259–267.
12. Thung TY, Lee E, Wai GY, Pui CF, Kuan CH, Premarathne JM, Nurzafirah M *et al.* A review of culture-dependent and molecular methods for detection of *Salmonella* in food safety. *Food Res* 2019;3(6):1-6.

13. Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(4):583-607.
14. Skjerve E, Olsvik O. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. *Int J Food Microbiol* 1991;14(1):11-17.
15. Zheng Q, Mikš-Krajnik M, Yang Y, Xu W, Yuk HG. Real-time PCR method combined with immunomagnetic separation for detecting healthy and heat-injured *Salmonella* Typhimurium on raw duck wings. *Int J Food Microbiol* 214;186:6-13.
16. Zheng Q, Mikš-Krajnik M, Yang Y, Lee SC, Yuk HG. Evaluation of real-time PCR coupled with immunomagnetic separation or centrifugation for the detection of healthy and sanitizer-injured *Salmonella* spp. on mung bean sprouts. *Int J Food Microbiol* 2016;2(222):48-55.
17. Yang, X, Li H, Wu Q, Zhang J, Chen L. Comparison of direct culture, immunomagnetic separation/culture, and multiplex PCR methods for detection of *Salmonella* in food. *Food Sci Technol Res* 2015;21(5):671-675.
18. Jeníková G, Pazlarová J, Demnerová K. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Int Microbiol* 2000;3:225-229.
19. DGE. Dirección General de Epidemiología. Distribución de casos nuevos de enfermedad por fuente de notificación en los Estados Unidos Mexicanos 2019. México, 2021. [https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/morbilidad/nacional/distribucion\\_casos\\_nuevos\\_enfermedad\\_fuente\\_notificacion.pdf](https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/morbilidad/nacional/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_fuente_notificacion.pdf) .
20. Rodríguez R, Gómez F, Vázquez H, Corona JL, Mendoza MY. Presencia de *Campylobacter* y *Salmonella* en pollo a la venta en Gómez Palacio Durango, México. *Rev Electrón Vet* 2016;17(6):1-7
21. Villalpando-Guzmán S, Ramón C, Natividad-Bonifacio I, Curiel-Quesada E, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. Frecuencia, susceptibilidad antimicrobiana y patrón de adherencia de *Salmonella enterica* aislada de carne de pollo, res y cerdo de la Ciudad de México. *Rev Chil Infectol* 2017;34(5):458-466.
22. Bello-Pérez LA, Ortiz-Dillanes DM, Pérez-Memije E, Castro-Domínguez V. *Salmonella* en carnes crudas: un estudio en localidades del estado de Guerrero. *Salud Públ Méx* 1989;32(1):74-79.

23. Rubio M, Martínez JF, Hernández R, Bonilla C, Méndez RD, Núñez JF, Echeverry M. Detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* in beef at points of sale in Mexico. Rev Mex Cienc Pecu 2012;4(1):107-115.
24. Quiroz-Santiago C, Rodas-Suárez O, Vázquez C, Fernández FJ, Quiñonez-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from México. J Food Protec 2009;72(6):1279–1282.
25. Mancera A, Vázquez J, Ontiveros ML, Durán S, López D, Tenorio V. Identificación de *Salmonella enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México. Téc Pecu Méx 2005;43(2):229-237.
26. COMECARNE. Consejo Mexicano de Carne. Compendio estadístico 2018. México. 2018. <https://www.inforural.com.mx/wp-content/uploads/2019/05/Compendio-Estad%C3%ADstico-2018-VF.pdf>.
27. Jiménez M, Martínez-Urtaza J, Chaidez C. Geographical and temporal dissemination of *Salmonellae* isolated from domestic animal hosts in the Culiacan Valley, Mexico. Microbial Ecol 2011;61:811-820.
28. DOF. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. México, 1994.
29. ISO. International Standardization Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods (ISO 16140:2003). International Organization for Standardization. Geneva, 2003.
30. Notzon A, Helmuth R, Bauer J. Evaluation of an immunomagnetic separation–real-time PCR assay for the rapid detection of *Salmonella* in meat. J Food Protec 2006;69(12):2896–2901.
31. Widjojoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BHI, Verhoef J. Evaluation of the Magnetic Immuno PCR Assay for rapid detection of *Salmonella*. Eur J Clinic Microbiol Infec Dis 1991;10(11):935-938.
32. O'Regan E, McCabe E, Burgess C, McGuinness S, Barry T, Duffy G, Whyte P, Fanning S. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. BMC Microbiol 2008;21(8):156.
33. DOF. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. México. 2002.
34. Bindun SC, Kim HT, Benjakul S. Rapid pathogen detection tools in seafood safety. Curr Opin Food Sci 2018;20:92-99.

35. Dos Santos RC, Conceição D, Nunes-Moreira A, Ramos RJ, Goularte FL, Carvalhal JB, Guimaraes-Aleixo JA. Detection of *Salmonella* sp in chicken cuts using immunomagnetic separation. Braz J Microbiol 2008;39(1):173-177.
36. Mercanoglu TB & Griffiths MW. Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef, and alfalfa sprouts. J Food Protec 2005;68(3):557-561.

**Cuadro 2:** Límite de detección de *Salmonella* en las muestras de carne mediante los métodos de rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994

No. de réplica	rtPCR-IMS				NOM-114-SSA1-1994					
	1-5 UFC	6-10 UFC	11-15 UFC	16-30 UFC	0 UFC	1-5 UFC	6-10 UFC	11-15 UFC	16-30 UFC	0 UFC
1	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-
2	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-
3	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-
4	+/+/-*	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-
5	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-	+/+/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-
6	+/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/-/-

+ = *Salmonella* sp. fue detectada en la muestra; - = *Salmonella* sp. no fue detectada en la muestra.

\*El ensayo fue negativo, pero la confirmación por el método de referencia fue positiva a partir del enriquecimiento original.

**Cuadro 3:** Comparación de los métodos de rtPCR-IMS y NOM-114-SSA1-1994 para la detección de *Salmonella* en carne de res

Muestra	Resultados*				Y No	Sensibilidad (%)	Falso negativo (%)	Especificidad (%)	Falso positivo (%)	Exactitud (%)	$\chi^2$	Kappa
	AP	DP	AN	DN								
Presuntivas	5	7	41	7	14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Contaminadas**	56	0	3	1	1	98.2	1.8	100	0	98.3	1.0 ( <i>P</i> =0.317)	0.85

\*AP (acuerdo positivo): Detección del patógeno por ambos métodos. AN (acuerdo negativo): No detección del patógeno por ambos métodos. DP (desviación positiva): Detección del patógeno por el método alterno, pero no por el método de referencia. DN (desviación negativa): Detección del patógeno por el método de referencia, pero no por el método alterno. ND (no determinado).

\*\*Los resultados corresponden a muestras de carnes inoculadas con una concentración de 1-5 UFC·25 ml<sup>-1</sup> de *Salmonella* ATCC 35664.