

ARTICULO

Comparación de la técnica de Inmunoseparación Magnética y el Método Convencional para el aislamiento de *Salmonella spp.* en leche pasteurizada contaminada artificialmente.Petrola Maribel ^{1,2}, Pinto Andrealicia ³, Luigi-Sandoval Teresita ⁴, Rojas Tomás ⁵

¹Departamento de Bioquímica, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

² Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela..

³Laboratorio Clínico Cesar Sánchez Font. Área de Bacteriología. Edo. Carabobo. Venezuela.

⁴Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bacteriología, Escuela de Bioanálisis Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela.

⁵Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Venezuela.

Correspondencia: Petrola Maribel

E-mail: maribelpetrola@hotmail.com.

Recibido: Febrero 2011 **Aceptado:** Julio 2011

RESUMEN

La leche pasteurizada es un excelente sustrato para *Salmonella* por lo que requiere un minucioso control de calidad que garantice la inocuidad para su consumo. El objetivo de la presente investigación fue comparar las técnicas de Inmunoseparación Magnética (ISM) y el Método Convencional (MC) para la detección de *Salmonella spp.* en leche pasteurizada contaminada artificialmente. Se trabajó con seis grupos de muestras de leche pasteurizada inoculadas con 50 cel/mL de *Salmonella spp.* más 1×10^3 cel/mL de un "coctel" de Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella boydii* y *Enterobacter cloacae*). Se evaluó el crecimiento de *Salmonella* mediante el MC (COVENIN 1291-2004) e ISM, utilizando diferentes protocolos de esta última, variando el factor de dilución de la muestra (sin dilución y 10^3) y el número de lavados (3 y 5). Resultados: Se logró recuperar *Salmonella spp.* mediante ISM a partir del caldo de enriquecimiento selectivo y pre-enriquecimiento del MC. La ISM redujo a tres días el tiempo de obtención de resultados con respecto al MC. Aplicando ISM directamente en leche pasteurizada inoculada, no se logró recuperación bacteriana. Se demostró que el factor dilución de la muestra no influyó en los resultados de la ISM, mientras que el número de lavados durante la técnica sí fue determinante. El MC logró recuperar *Salmonella spp.* en 100% (n=30) de las muestras. Conclusión: La

aplicación de la ISM para el aislamiento de *Salmonella* spp. en muestras de leche pasteurizada reduce significativamente el tiempo de obtención de resultados con respecto al MC.

Palabras clave: Leche, *Salmonella* spp., inmunoseparación magnética.

ABSTRACT

Comparison of Magnetic Immunoseparation technique and the conventional method for isolation of *Salmonella* spp. from artificially contaminated pasteurized milk.

Pasteurized milk is an excellent substrate for *Salmonella* and therefore requires a thorough quality control to ensure its safety for human consumption. The aim of this study was to compare the techniques of Magnetic Immunoseparation (MIS) and the conventional method (CM) for the detection of *Salmonella* spp. in artificially contaminated pasteurized milk. Six groups of pasteurized milk samples were artificially contaminated with 50 cells/mL of *Salmonella* spp. plus 1×10^3 cells/mL of a "cocktail" of *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella boydii* and *Enterobacter cloacae*). *Salmonella* growth by MC (COVENIN 1291-2004) and MIS was evaluated using different protocols of the latter, varying the dilution factor (without dilution and 10^3) and the number of washes (3 and 5). Results: We succeeded in recovering *Salmonella* spp. by MIS from selective enrichment broth and pre-enrichment of CM. The MIS reduced the time for obtaining results down to three days with respect to CM. Bacterial recovery was not achieved by applying MIS directly into inoculated pasteurized milk. It was shown that the sample dilution factor did not influence MIS results, while the number of washings during the procedure greatly influenced them. The CM was able to recover *Salmonella* spp. in 100% (n=30) of the samples. Conclusion: The application of the MIS for the isolation of *Salmonella* spp. in samples of pasteurized milk significantly reduces the time for obtaining results with respect to CM.

Key words: Milk, *Salmonella* spp, magnetic immunoseparation.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que una gran diversidad de alimentos puede servir como vehículo de transmisión de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), el consumo de productos lácteos ha sido mayormente asociado con la diseminación de este tipo de enfermedades. La frecuente aparición de brotes infecciosos asociados con el consumo de la leche pasteurizada ha motivado que algunos investigadores recomienden la implementación de mecanismos reguladores adicionales post-pasteurización de la leche (1-5).

Entre los agentes etiológicos transmitidos por productos lácteos se encuentran especies del Género *Salmonella*. Los procedimientos convencionales para aislar y detectar *Salmonella* en alimentos abarcan un tiempo promedio de 72 a 96 horas, por lo que se han hecho grandes esfuerzos para desarrollar métodos alternativos que reduzcan este tiempo (1). La técnica de Inmunoseparación Magnética (ISM) reduce el tiempo de muestreo al utilizar un proceso de inmunocaptura de microorganismos, mediante el empleo de microperlas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-salmonella (1,6).

En el presente trabajo se planteó como objetivo comparar la técnica de Inmunoseparación Magnética y el Método Convencional sugerido en la normativa venezolana (7) para el aislamiento de *Samonella* spp. en leche pasteurizada contaminada artificialmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación. El presente estudio es de tipo experimental.

Muestras de leche. Se utilizaron 30 muestras (n=30), de 500 mL c/u, de leche entera pasteurizada, de la misma marca comercial, recolectadas de manera aleatoria en establecimientos comerciales, en la ciudad de Valencia, Venezuela. Las mismas fueron evaluadas para la detección de *Salmonella* mediante el MC sugerido en la normativa venezolana (control negativo sin contaminación artificial). Se establecieron 6 grupos de estudio conformados por 5 muestras cada uno; cada grupo fue sometido a protocolos diferentes de ISM para la recuperación de *Salmonella*.

Cepas para la contaminación artificial de las muestras de leche pasteurizada. Se utilizó una cepa de *Salmonella entérica Serovar enteritidis* (*S. enteritidis*) (Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, CVCM 497). Este aislado se mantuvo viable por repiques en agar cerebro corazón (ACC) semisólido incubado a temperatura ambiente (24°C), realizando subcultivo una vez al mes. Se utilizaron cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Shigella boydii* y *Enterobacter cloacae* de la bacterioteca del Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo. Los aislados se mantuvieron viables por repiques en ACC.

Perlas magnéticas. Las perlas magnéticas (Dynabeads® anti-*Salmonella*) fueron obtenidas comercialmente. Dichas perlas contienen anticuerpos anti-*Salmonella* purificados, adsorbidos y covalentemente unidos a la superficie. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para su utilización (Dynal, Biotech ASA, Oslo, Noruega USA).

Preparación del inóculo a emplear en la contaminación artificial de la leche pasteurizada. El aislado de *S. enteritidis* se cultivó en caldo de soya tripticasa (CST) incubándose a 35°C por 18 horas. Se tomó un volumen (1 mL) de este cultivo y se preparó una dilución en buffer fosfato salino-Tween 20 (PBS-T20), ajustándose la densidad de aproximadamente $1,5 \times 10^9$ células/mL según el patrón de MacFarlan N° 5, utilizando un espectrofotómetro (Spectronic-20, Bausch-Lomb, EE.UU.) a una longitud de onda de 520nm. Posteriormente, se realizaron siete diluciones decimales en PBS-T20, con la finalidad de inocular las unidades experimentales con aproximadamente 5×10 cel/mL; para esto se tomó un volumen de 0,33 mL de la última dilución realizada (siempre se realizaron los respectivos controles de inóculo). En el caso de las cepas de enterobacterias (*E. coli*, *K. oxytoca*, *S. boydii* y *E. cloacae*) utilizadas para la preparación del “coctel bacteriano,” se procedió a repetir el procedimiento mencionado para *S. enteritidis*, obteniendo esta vez un inóculo de 1×10^3 cel/mL.

Preparación de las unidades experimentales y contaminación artificial con la suspensión de *Salmonella entérica Serovar enteritidis* y coctel de enterobacterias. Todas las unidades experimentales (n=30) se contaminaron simultáneamente con 50 cel/mL de *S. enteritidis* y con 1×10^3 cel/mL de enterobacterias provenientes del coctel anteriormente preparado.

Aplicación del método convencional para la recuperación y aislamiento de *Salmonella*. Todas las muestras de leche pasteurizada contaminadas

experimentalmente fueron evaluadas empleando el método convencional para la determinación de *Salmonella* en alimentos, sugerido en la normativa venezolana (7).

Aplicación de ISM a partir de las muestras de leche pasteurizada post contaminación artificial (n=5). Se tomó 1 mL de la muestra de leche contaminada artificialmente y se depositó en tubos Eppendorf de 1,5 mL, donde previamente se colocaron 20 μ L de Dynabeads®. Esta mezcla fue colocada en vórtex durante diez minutos a temperatura ambiente y bajas revoluciones. Posteriormente, los tubos se colocaron en el equipo de inmunoseparación, aplicándose un campo magnético para la concentración de las esferas. El sobrenadante fue descartado, retirándose el magneto y resuspendiéndose el inmunoseparado en solución de lavado (PBS-T20 salino, pH 7,4); este procedimiento de lavado fue repetido tres veces consecutivas.

De la suspensión obtenida en el último lavado se procedió a sembrar alícuotas de 25 μ L en placas con agar *Salmonella-Shigella* (SS) y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) respectivamente, incubándose a 35°C por 24 horas. Se realizó el recuento de colonias típicas. Una muestra aleatoria constituida por cinco colonias típicas de los aislamientos fue confirmada como *S. enteritidis*, a través de tinción de Gram y caracterización fenotípica siguiendo el procedimiento convencional

Aplicación de ISM a partir de la etapa de pre-enriquecimiento de la metodología analítica convencional para el aislamiento de *Salmonella*. El protocolo convencional para el aislamiento de *Salmonella* se inicia con una etapa de pre-enriquecimiento (7). Al finalizar el período de incubación de esta etapa, se aplicó la ISM tanto directamente al caldo de pre-enriquecimiento (n=5) como a una dilución (10^3) del mismo en PBS-T20 (pH 7,4) (n=5), en ambos casos realizando un total de tres lavados de tres minutos cada uno durante la aplicación de la técnica.

Aplicación de ISM a partir de la etapa de enriquecimiento selectivo de la metodología analítica convencional para el aislamiento de *Salmonella*. Se aplicó la ISM a partir del caldo Selenito-Cistina (SC) post-incubación de 6 horas a temperaturas de 37 °C y 44 °C (n=5), respectivamente (7); también, se utilizó como muestra el caldo SC diluido por un factor de 10^3 en PBS-T20 (pH 7,4) (n=5) realizando en ambos casos un total de tres lavados. Por último, se realizó la IMS a partir del caldo SC (diluido por un factor de 10^3 en PBS-T20) aumentando en este caso el número de lavados a un total de cinco.

Análisis de los datos. Se compararon los resultados de la IMS con los obtenidos mediante el método de cultivo convencional, considerándose positivo o negativo a todo resultado donde se observó o no crecimiento de *Salmonella* en placas con medios selectivos y, de ser positivo, confirmadas fenotípicamente. No se consideró tomar el porcentaje de recuperación de microorganismos dado que, como refiere Olsvik y col. (8), la enumeración de unidades formadoras de colonias (UFC) debe tomar en consideración que cada colonia no es siempre el producto de una sola célula.

RESULTADOS

En 100% (n=30) de las muestras de leche pasteurizada utilizadas como control negativo (previo a la contaminación artificial), no se recuperó *Salmonella spp.* mediante el MC sugerido en la normativa venezolana (7).

Cuando se aplicó la ISM para la recuperación de *Salmonella* a partir de la etapa de pre-enriquecimiento de la metodología analítica convencional, en todas las muestras analizadas se obtuvo un recuento promedio mayor a 10^2 UFC/mL para *S. enteritidis* y para *E. coli* proveniente del coctel, tanto directamente del caldo de pre-enriquecimiento como de la dilución (10^3) del mismo en PBS-T20 (pH 7,4) Al aplicar la ISM al caldo de enriquecimiento selectivo (sin dilución) (n =5) y a una dilución del mismo en PBS-T20 (n=5), realizando un total de tres lavados, la recuperación de *S. enteritidis* fue por debajo de 1×10 UFC/mL en 100% de las muestras analizadas; mientras que, cuando se aumentó el número de lavados a cinco, se obtuvo mejor recuperación de *S. enteritidis*. (Tabla 1).

Tabla 1. Recuperación mediante el método convencional e inmunoseparación magnética de *Salmonella enterica serovar Enteritidis* y Enterobacterias a partir de leche pasteurizada contaminada artificialmente

Condición Experimental	Dilución	No. Lavados	Agar	<i>S. enteritidis</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. boydii</i>	<i>E. cloacae</i>
Método convencional	NA	NA	SS	+++	+++	+++	+++	+++
			XLD	+++	+++	+++	+++	+++
			SS	-	-	-	-	-
IMS leche post contaminación artificial	1/0	3	XLD	-	-	-	-	
IMS caldo pre-enriquecimiento	1/0	3	SS	+++	-	+++	-	-
			XLD	+++	-	+++	-	-
IMS caldo pre-enriquecimiento	1/1000	3	SS	+++	-	+++	-	-
			XLD	+++	-	+++	-	-
IMS caldo enriquecimiento	1/0	3	SS	+ (*)	+ (*)	+++ (*)	+++ (*)	- (*)
			XLD	+ (**)	- (**)	++ (**)	+++ (**)	- (**)
			SS	+ (*)	+ (*)	+++ (*)	+++ (*)	+ (*)
			XLD	+ (**)	- (**)	+++ (**)	+++ (**)	- (**)
IMS caldo enriquecimiento	1/1000	3	SS	+ (*)	- (*)	- (*)	+++ (*)	- (*)
			XLD	+ (**)	- (**)	- (**)	+++ (**)	- (**)
			XLD	+ (*)	- (*)	- (*)	+++ (*)	- (*)
IMS caldo enriquecimiento	1/1000	5	SS	+++ (*)	- (*)	- (*)	- (*)	- (*)
			XLD	+ (**)	- (**)	- (**)	- (**)	- (**)
			XLD	+++ (*)	- (*)	- (*)	- (*)	- (*)
			XLD	+ (**)	- (**)	- (**)	- (**)	- (**)

No aplica (NA) (*): A partir del caldo de enriquecimiento selectivo post-incubación de 6 horas a 37°C. (**): A partir del caldo de enriquecimiento selectivo post-incubación de 6 horas a 44°C. SD: Sin diluir, SS: Agar Salmonella – Shigella, XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato - : Sin crecimiento a las 48 horas de incubación; +: 1- 10 UFC/mL; ++: 10- 10² UFC/mL; +++: >10² UFC/mL.

Con respecto a las enterobacterias provenientes del coctel inoculado, cuando el número de lavados se aumentó se logró una mínima recuperación de las mismas (Tabla 1). Por el contrario, la técnica de ISM aplicada directamente a la leche contaminada no logró la recuperación de las bacterias anteriormente descritas.

Mediante la aplicación del método convencional, se recuperó en todas las muestras de leche pasteurizada contaminadas artificialmente (n=30), tanto *S. enteritidis* como demás enterobacterias provenientes del coctel inoculado para el estudio de la flora acompañante.

DISCUSION

En el presente trabajo no se logró recuperación bacteriana mediante la ISM cuando se aplicó la técnica directamente en la leche pasteurizada; este hallazgo concuerda con las recomendaciones hechas por la empresa Dynal, Inc, que sugiere diluir la muestra en un caldo de pre-enriquecimiento, durante 24 horas, cuando la misma contenga componentes que pudieran interferir en los resultados de la inmunocaptura. Sin embargo, este punto es controversial, por cuanto otras publicaciones reportan que al analizar leche UHT o inclusive leche pasteurizada, se puede trabajar sin diluir la muestra (9).

Por otra parte, se puede aplicar la ISM a partir de la etapa de pre-enriquecimiento sin necesidad de llevar a cabo diluciones, lo que acorta el tiempo de muestreo ya que obvia la etapa de enriquecimiento selectivo del método convencional para el aislamiento de *Salmonella spp.* Adicionalmente, trabajos similares describen la ISM como un método muy simple y rápido para la detección de *Salmonella* en leche ya que reduce el tiempo de muestreo a un mínimo de uno a dos días con un procedimiento de fácil ejecución (10,11).

Es importante destacar, que el número de lavados durante la aplicación de la ISM es un factor determinante para la recuperación bacteriana; en los ensayos donde se realizaron sólo tres lavados, la recuperación de *Salmonella* fue mínima (0-10 UFC/mL); mientras que al realizar cinco lavados en las mismas condiciones la recuperación fue mayor a 10^2 UFC/mL. Sin embargo, para cada tipo de muestra o matriz alimentaria a analizar se debe estandarizar el número de lavados, considerando la composición físico química del alimento, por cuanto hay reportes que indican excelentes resultados de recuperación con tres lavados, pero los mismos fueron realizados con otro tipo de muestras (12,13).

Asimismo, el número de lavados realizados pudiera actuar sobre la capacidad competitiva de la carga de flora acompañante presente en la muestra y afectar los resultados de la técnica de ISM; en la presente investigación, la recuperación de enterobacterias provenientes del coctel inoculado fue mínima (menos de 10 UFC) al realizar cinco lavados con PBS-Tween 20; contrario a esto, cuando se efectuaron sólo tres lavados se recuperó más de 10^2 UFC de enterobacterias provenientes del coctel, lo cual probablemente se deba a competencia en la reacción inmunológica, uniones inespecíficas o reacciones cruzadas; por lo tanto, como lo establece Rojas y col., (14) la eficiencia de la técnica está condicionada por la cantidad y calidad de la flora asociada. A este respecto, Vermunt y col., (15) observaron gran cantidad de uniones inespecíficas debido a la elevada carga de flora acompañante en el momento de

la Inmuncaptura de *Salmonella* en muestras de alimentos, y recomendaron el uso de leche descremada al 4% como componente del buffer utilizado, como medio de incubación y solución de lavado, para disminuir la presencia de uniones inespecíficas, por ser esta sustancia un agente bloqueante de dichas uniones.

La temperatura de incubación del caldo de enriquecimiento selectivo previo a la ISM es otro de los factores que influyen en la recuperación bacteriana. La recuperación bacteriana obtenida por la ISM a partir del enriquecimiento selectivo pre incubada durante 6 horas a una temperatura de 37 °C fue mayor a la obtenida a partir de las muestras pre-incubadas a 44 °C. Se corrobora así lo afirmado por muchos autores, como Insunza y col. (16), quienes publican en su trabajo que la temperatura óptima para el crecimiento de *Salmonella spp.* es de 35°C a 37°C. En este estudio, la recuperación de *Salmonella spp.* por ISM fue similar a la obtenida por el método convencional, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (17). Sin embargo, Ribeiro y col. (18) lograron mayor recuperación de *Salmonella spp.* en muestras de alimentos, por métodos convencionales que por ISM.

En este punto, es fundamental recordar el acortamiento del tiempo para la obtención de resultados al utilizar la ISM, pues el aislamiento de *Salmonella* mediante el método de cultivo convencional incluye una etapa de pre-enriquecimiento, un enriquecimiento selectivo, un enriquecimiento diferencial, además del bioquimismo y la serología confirmatoria; en total, de cinco a siete días para la obtención de un resultado. Por otra parte, la ISM no solamente disminuye el tiempo de obtención de resultados; también se ha publicado su capacidad para minimizar efectos inhibitorios de algunos componentes de la leche sobre las reacciones en cadena de polimerasa (19). Por lo tanto, en la presente investigación se recomienda aplicar la ISM con otros métodos rápidos como ELISA o PCR y de esta manera aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica.

Financiamiento: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Nassib TA, Eldin MZ, El-Sharoud W. Assessment of the presence of *Salmonella spp* in Egyptian dairy products using various detection media. Lett. Appl Microbiol 2003; 37: 405 – 409.
2. Olsen SJ, Ying M, Davis MF, Deasy M, Holland B, Lampietro L., et al. Multidrug-resistant *Salmonella typhimorium* Infection from milk contaminated after pasteurization. Emer Infect Dis 2004; 10: 932-935.
3. Valbuena E, Castro G, Lima K, Acosta W, Briñez W, Tovar A. Calidad Microbiologica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Rev Cient 2004; 14: 59-67.
4. Silva R, Cruz A, Faria J, Moura M, Carvalho M, Water E., et al. Pasteurized *milk*: efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. Foodborne Pathog Dis 2010; 7: 217-219.
5. Ivic K, Kocic B. Food contamination with *Salmonella* species in the Republic of Macedonia. Foodborne. Foodborne Pathog Dis 2009; 6: 627-630.

6. Ducanson P, Wareing D, Jones O. Application of an automated immunomagnetic separation enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella spp.* during an outbreak associated with a retail premises. *Lett Appl Microbiol.* 2003; 37: 144-149.
7. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) 1291-2004. Alimentos. Aislamiento e Identificación de *Salmonella*.
8. Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, Cudjoe K, Hornes E, Ugelstad J., et al. Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2004; 7: 43-54.
9. Luigi T. Aplicación de la técnica de separación inmunomagnética para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de leche. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; 24: 50-58.
10. Mansfield L, Forsythe M. The detection of *Salmonella* using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31: 279-283.
11. Liébana S, Lerm A, Campoy S, Cortés M, Alegret S, Pividori M. Rapid detection of *Salmonella* in milk by electrochemical magneto-immunosensing. *Biosens Bioelectron* 2009; 25: 510-513,
12. Fluit A, Torensma R, Visser M, Aarsman C, Poppelier M, Keller B., et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in Cheese with the magnetic Immuno-Polymerase Chain Reaction Assay. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1289-1293.
13. Wolfhagen M, Fluit A, Torensma R, Poppelier M, Verhoef J. Rapid Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* in Fecal Samples by Magnetic Immunomagnetic PCR Assay. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1629-1633.
14. 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.
15. Vermunt A, Franken A, Beumer R. Isolation of *Salmonella* by Immunomagnetic Separation. *J App Bacteriol* 1992; 72: 112-118.
16. Insunza M, Soto A. Salmonelosis una enfermedad que se transmite por alimentos. *Revista de Extensión Tecnovet.* Universidad de Chile 1998; 4-10.
17. Cudjoe K, Krona R. Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads anti-*Salmonella* and a conventional reference method. *International J Food Microbiol* 1997; 37: 55-62.
18. Ribeiro A, Nascimento P, Cardoso M, Dos Santos L, Rocha S. Utilization of immunomagnetic separation for detection of *Salmonella* in raw broiler parts. *Braz J Microbiol* 2002; 33: 20- 27.
19. 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.