

Desarrollo de un ensayo de PCR dúplex para la detección de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en leche cruda



Evaluation of a duplex PCR assay for the detection of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in raw milk

<http://opn.to/a/HuAKn>

Yuneilys Aleli Martínez-García^{1*}, Odalys Uffo-Reinoso¹, Yamilka Riverón-Alemán¹, José Antonio Agüero-Fernández¹, Ailin Martínez-Vasallo¹

¹Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: En alimentos contaminados, los patógenos de mayor importancia asociados a enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), que producen brotes gastrointestinales agudos, se encuentran *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. La causa fundamental de esta contaminación es la deficiente higiene en la obtención y manipulación de los mismos. En alimentos como la leche y derivados lácteos, las ETA alcanzan hasta 6 %. El presente trabajo tuvo como objetivos optimizar y estandarizar un ensayo de PCR dúplex para la detección de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en leche cruda. El método se basa en la amplificación simultánea del gen *yfiR* para *Salmonella* spp. y ARNr 23S para *Staphylococcus aureus*. Se determinaron las propiedades termodinámicas de cada cebador y se optimizaron los principales parámetros críticos del ensayo. El PCR dúplex optimizado demostró ser específico para los microorganismos diana y el ensayo detectó valores de hasta 1 pg/μL de ADN y 10²ufc/mL en leche estéril. En el 46,7 % de las muestras de leche analizadas se detectó la presencia de *S. aureus* y no hubo muestra positiva a *Salmonella* spp. Los resultados sugieren que el PCR dúplex desarrollado es un ensayo sensible y específico para la detección simultánea de ambos patógenos en leche cruda.

Palabras clave: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, PCR dúplex, leche cruda.

ABSTRACT: Infectious and toxigenic pathogens transmitted through food have been recognized as the cause of Foodborne Diseases (FBD). The main pathogens of concern are *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus*. These bacteria are associated with acute gastrointestinal outbreaks caused by contaminated food. One of the causes of this contamination is the poor hygiene during the processing and handling of food. Foodborne outbreaks caused by milk and dairy products contaminated reach up to 6 %. The objective of the present work was to develop and standardize a duplex PCR assay for the detection of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* in raw milk. The principle of the method is the simultaneous amplification of the genes *yfiR* for *Salmonella* spp. and ARNr 23S for *Staphylococcus aureus*. The thermodynamic properties of each primer were determined and the main critical parameters of the dPCR assay were optimized. The duplex PCR demonstrated its specificity for the target microorganisms and the detection limit of the assay was up to 1 pg/μL of DNA and 10² cfu/mL in unpasteurized milk. In the milk samples analyzed, 46.7 % were contaminated with *S. aureus* and none of the samples were positive to *Salmonella* spp. The results suggest that the developed duplex PCR is sensible and specific for the simultaneous detection of both pathogens from raw milk.

Key words: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, duplex PCR, raw milk.

*Autor para correspondencia: Yuneilys Aleli Martínez-García. Email: yuneilys@censa.edu.cu

Recibido: 07/02/2018

Aceptado: 20/06/2018

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) constituyen una importante causa de morbilidad y mortalidad, así como un significativo impedimento al desarrollo socioeconómico en todo el mundo (1). Los brotes de ETA provocados por leche y productos lácteos contaminados se han descrito a nivel mundial; como los principales agentes causales se reportan *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp. y *Coxiella burnetti* (2,3,4).

Salmonella spp. es una de las principales bacterias patógenas que causa daños a los seres humanos y a los animales debido al consumo de alimentos. Se ha reportado como la principal causa de gastroenteritis aguda en varios países (5). En la leche cruda alcanza una prevalencia de hasta 6 % en muestras de tanque (6,7). Las vías de contaminación pueden ser a través del ganado que actúa como reservorio, contaminaciones fecales de los pezones, superficies de la ubre, máquinas de ordeño o contaminación postpauterización en las plantas de producción (3,8).

La intoxicación por *Staphylococcus* spp. es una de las causas comunes de brotes de origen alimentario a nivel mundial. Desde la perspectiva de la seguridad alimentaria, su importancia se deriva de la capacidad de producir enterotoxinas (9) y su presencia en la leche y derivados lácteos se debe, principalmente, a la contaminación con casos clínicos o subclínicos de mastitis, deficiente higiene durante el proceso de obtención de la leche o proveniente de los trabajadores (10). La prevalencia se reporta hasta 89 % (11); Hill *et al.* (9) refieren índices de prevalencias de 13-100 % de esta bacteria en leche de tanque.

En Cuba, los reportes sobre calidad bacteriológica en leche cruda son escasos; sin embargo, Martínez *et al.* (12) indicaron que el 55,8 % de 360 muestras en el eslabón primario de la cadena de producción de leche fueron positivos a la presencia de *Salmonella* spp. En este mismo estudio, la media de los conteos de

Staphylococcus coagulasa positiva fue superior a 1×10^3 ufc/mL en todas las muestras analizadas.

La detección, el aislamiento y la identificación de diferentes tipos de microorganismos en los alimentos se realiza mediante microbiología convencional, por lo general, basado en las normas internacionales (13). Estos protocolos, aunque son baratos y simples, son laboriosos y la obtención de los resultados demora varios días (14,15,16). Recientemente se ha incrementado el uso de métodos moleculares basados en la identificación de ácidos nucleicos, como la PCR, que permite obtener los resultados en corto tiempo, por lo que resulta de vital importancia en la industria alimentaria (15).

Para la detección de *Salmonella* spp. y *S. aureus* se han descrito ensayos de PCR, tanto en formato simple como en múltiple (16,17,18), reconocidos como métodos alternativos para el diagnóstico de estas bacterias en los alimentos (19). El presente trabajo tuvo como objetivo optimizar y evaluar un ensayo de PCR dúplex para la detección de *Salmonella* spp y *S. aureus* en leche cruda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas: se utilizaron las cepas de referencia *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Las cepas se conservaron a -20°C en caldo triptona soya con glicerol, según lo descrito por Nakasone *et al.* (20).

Condiciones de preenriquecimiento: se partió de la suspensión de concentración $1,2 \times 10^9$ ufc/mL de cada microorganismo, se tomaron 0,25 µL y se inocularon en 10 mL de caldo nutriente (BioCen; Cuba) enriquecido con 3 % de NaCl (Merck, Alemania) y se incubaron a 35°C durante 12 horas (14).

Extracción de ADN: la extracción de ADN se realizó empleando el protocolo descrito por Ahmadi *et al.* (21). La calidad y la concentración del ADN se evaluaron en el equipo Colibri Microvolume Nanodrop Spectrophotometer (Titertek-Berthold, Alemania). Las muestras de ADN obtenidas se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Reacción de PCR: se emplearon los cebadores descritos por Kawasaki *et al.* (22) y Cremonesi *et al.* (23)(Tabla 1). Las reacciones de PCR se

TABLA 1. Secuencia de los cebadores utilizados en los ensayos de PCR para la detección de *Salmonella* spp. y *S. aureus*. / *Sequence of the primers used in the PCR assays for the detection of Salmonella spp. and S. aureus*

Patógeno	Cebador	Secuencia [5' - 3']	Tm (°C)	Gen Diana [Amplicon (pb)]	Referencia
<i>Salmonella</i> spp.	TS-11	GTC ACG GAA GAA GAG AAA TCC GTA CG	57,3	<i>yfiR</i> (375)	(22)
	TS-5	GGG AGT CCA GGT TGA CGG AAA ATT T	57,7		
<i>S. aureus</i>	23S-1200	AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG	51,5	ARNr 23S (499)	(23)
	23S-1698	TCG CTC GCT CAC CTT AGA AT	51,8		

realizaron en un volumen final de 25 µL, que contenía 5 µL GoTaqFlexi Buffer red 5x; 2 µLMgCl₂ (25 mM); 0,5 µLdNTP (10 mM); 0,2 µLTaq Polimerasa GoTaq® Flexi DNA Polymerase5U/µL, (Promega, EE.UU), 1µL (20 mM) de cada cebador; 8,3 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL de ADN con el siguiente programa de amplificación: 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 7 min, realizado en el equipo 3-Prime Personal Thermal Cycler (TECHNE; Reino Unido).

Los productos de la reacción de dúplex PCR se aplicaron en geles de agarosa (Sigma-Aldrich, EE.UU.) al 1,5 % en tampón TBE 0,5X y se corrieron a 100 Volts y 50 mA en una cámara de electroforesis horizontal Mupid®-One (Advance, Japón), durante 35 minutos. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en tampón de corrida (TBE 0,5X) durante 15 minutos y se visualizaron en un equipo Doc-Print VX5 (Vilber Lourmat, France). En todos los casos se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, EE.UU).

Optimización de los parámetros críticos del ensayo de PCR dúplex: se realizaron PCR simples con cada pareja de cebadores en un gradiente de temperatura ± 10°C (Tabla 2) y se determinó la temperatura óptima de unión de los

cebadores (Ta) del PCR dúplex. Para determinar la concentración óptima de los cebadores se evaluó el siguiente rango de concentraciones: 0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM, 0,5 µM, 0,6 µM, 0,8 µM y 1 µM para cada cebador y las concentraciones de MgCl₂, comprendidas entre 0,5 mM y 3,5 mM con incrementos de 0,5 mM.

Especificidad analítica: para evaluar la especificidad analítica se empleó ADN de *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, *Streptococcus agalactiae* ATCC 27591, *Salmonella typhimurium*. ATCC 14028 y *S. aureus* ATCC 29213, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Listeria monocytogenes* ATCC 14119.

Límite de detección (LD): para determinar el LD del ensayo de PCR dúplex se realizaron diluciones seriadas 1/10 (100 ng/µL, 10 ng/µL, 1 ng/µL, 100 pg/µL, 10 pg/µL, 1 pg/µL, 100 fg/µL, 10 fg/µL, 1fg/µL) de ADN extraído de las cepas de referencia *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Detección de *Salmonella* spp. y *S. aureus* en muestras de leche cruda: se colectaron 60 muestras de leche cruda según la Norma IDF 50/ISO 707:2012, previamente caracterizadas por la Prueba de California (CMT) y el Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM), de acuerdo a los requisitos microbiológicos de la NC-ISO 448:2006. Las muestras se analizaron por el método de PCR dúplex optimizado. La

TABLA 2. Temperaturas evaluadas con cada pareja de cebadores. / *Temperatures evaluated with each pair of primers*

	Rango Temperatura (± 10°C)
<i>S. aureus</i> (23S-1200/23S-1698)	42°C, 42.2°C, 43.3°C, 45.1°C, 47.4°C, 50°C, 52.8°C, 55.5°C, 58°C, 60.1°C, 61.7°C y 62.6°C
<i>Salmonella</i> spp. (TS-11/TS-5)	47°C, 47.3°C, 48.4°C, 50.2°C, 52.5°C, 55.1°C, 57.8°C, 60.5°C, 63°C, 65.1°C, 66.7°C y 67.5°C

prevalencia se calculó a través de una aproximación Bayesiana basada en la distribución Beta, $\beta(s + 1; n - s + 1)$, donde: $s =$ positivos; $n =$ muestras.

RESULTADOS

El método de extracción permitió obtener la concentración suficiente de ADN y con la calidad requerida para desarrollar el ensayo de PCR. Se amplificaron fragmentos con la talla esperada: 499pb y 375pb para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp., respectivamente.

En el proceso se obtuvieron productos de PCR de la talla esperada, sin la presencia de amplificaciones inespecíficas. Se seleccionó 0,6 μM como el valor óptimo de concentración de cebadores en 25 μL (Figura 1). La temperatura óptima de alineamiento se seleccionó 60°C y la concentración óptima de MgCl_2 fue de 2 mM.

El ensayo de PCR dúplex optimizado demostró ser específico para el diagnóstico de las bacterias en estudio, ya que solo se obtuvo amplificación frente al ADN de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. (Figura 2). La mínima concentración de ADN genómico requerida para la reacción de PCR dúplex fue 1 $\text{pg}/\mu\text{L}$ (Figura 3).

Se obtuvieron 28/60 muestras positivas (46,7 %; IC 95 %: 34 - 59,3 %) a la presencia de *Staphylococcus aureus* y no se detectó alguna muestra positiva a la presencia de *Salmonella* spp. (Figura 4).

DISCUSIÓN

La PCR facilita y agiliza la detección de los microorganismos patógenos, pero su eficiencia tiende a disminuir si se aplica en muestras de alimentos directamente (24). Para aumentar la eficiencia del ensayo es recomendable realizar un paso de preenriquecimiento, que garantice la revitalización de los microorganismos y permita que las células bacterianas comiencen el proceso de multiplicación normal y disminuyan o eliminen las sustancias inhibitoras de la PCR, provenientes del alimento (25). Este paso posibilita aplicar el método de PCR en diferentes matrices, indistintamente.

El proceso de extracción debe ser eficiente para romper la pared celular sin dañar al ADN (26). Las concentraciones de ADN obtenidas en el presente estudio son similares a las descritas en estudios realizados por Cremonesi *et al.* (27), quienes utilizaron un protocolo de extracción de ADN basado en la utilización de tiocianato de guanidina, centrifugación y tratamiento térmico.

Es muy importante determinar la concentración óptima de los cebadores para obtener amplificaciones confiables de todos los productos de PCR esperados (28). Dicha concentración de cebadores no debe ser superior a 0,5 μM , ya que en los ensayos de PCR multiplex pueden ocurrir interacciones entre los mismos y afectar la sensibilidad del sistema, si existen diferencias en las concentraciones de los

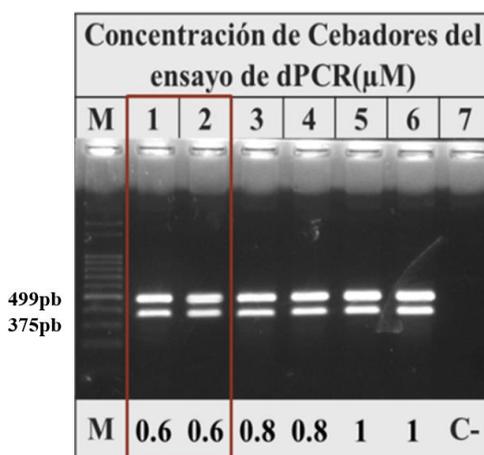


FIGURA 1. Resultados de la determinación de la concentración óptima de cebadores para el ensayo de PCR dúplex en gel de agarosa 1,5 %. **M:** Marcador de peso molecular 100 pb; **1 - 2:** 0,6 μM ; **3-4:** 0,8 μM ; **5-6:** 1 μM ; **7:** C- (agua libre de nucleasas). / *Results of the determination of the optimal concentration of primers for the 1.5 % agarose gel duplex PCR assay. M: 100 bp molecular weight marker; 1-2: 0.6 μM ; 3-4: 0,8 μM ; 5-6: 1 μM ; 7: C- (nuclease-free water)*

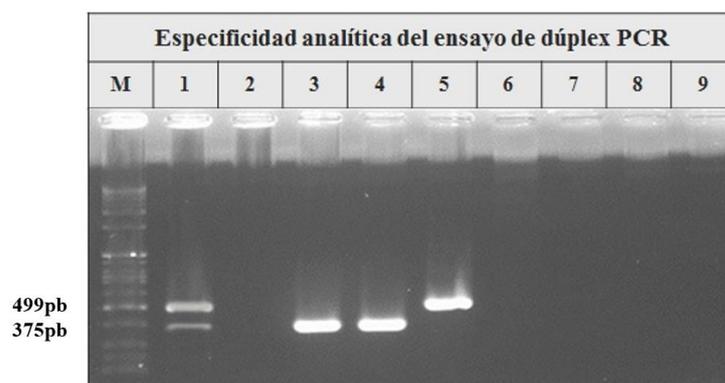


FIGURA 2. Especificidad analítica del ensayo de PCR dúplex. Electroforesis en gel de agarosa 1,5 %. **M:** Marcador de peso molecular 100 pb; **1:** C+ dúplex PCR *S. enteritidis* ATCC 13076 y *S. aureus* ATCC 29213; **2:** C- (agua libre de nucleasas); **3:** *S. enteritidis* ATCC 13076; **4:** *S. typhimurium* ATCC 14028; **5:** *S. aureus* ATCC 29213; **6:** *E. coli* O157:H7 ATCC 35150; **7:** *Streptococcus agalactiae* ATCC 2748; **8:** *L. monocytogenes* ATCC 14119; **9:** *Bacillus cereus* ATCC 11778. / Analytical specificity of the duplex PCR assay. Electrophoresis in 1,5 % agarose gel. **M:** 100 bp molecular weight marker; **C + duplex PCR** *S. enteritidis* ATCC 13076 and *S. aureus* ATCC 29213; **2:** C- (nuclease-free water); **3:** *S. enteritidis* ATCC 13076; **4:** *S. typhimurium* ATCC 14028; **5:** *S. aureus* ATCC 29213; **6:** *E. coli* O157: H7 ATCC 35150; **7:** *Streptococcus agalactiae* ATCC 2748; **8:** *L. monocytogenes* ATCC 14119; **9:** *Bacillus cereus* ATCC 11778.

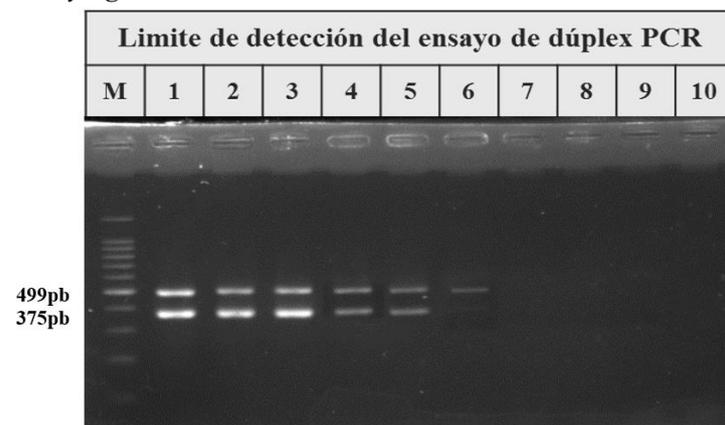


FIGURA 3. Resultados de la determinación del límite de detección del ensayo de dPCR en gel de agarosa 1,5 %. **M:** Marcador de peso molecular 100 pb; **1:** 100ng/μL; **2:** 10 ng/μL; **3:** 1 ng/μL; **4:** 100 pg/μL; **5:** 10 pg/μL; **6:** 1 pg/μL; **7:** 100 fg/μL; **8:** 10 fg/μL; **9:** 1 fg/μL; **10:** C- (agua libre de nucleasas). / Results of the determination of the detection limit of the dPCR assay in 1.5 % agarose gel. **M:** 100 bp molecular weight marker; **1:** 100ng / μL; **2:** 10 ng / μL; **3:** 1 ng / μL; **4:** 100 pg / μL; **5:** 10 pg / μL; **6:** 1 pg / μL; **7:** 100 fg / μL; **8:** 10 fg / μL; **9:** 1 fg / μL; **10:** C- (nuclease-free water).

cebadores (29). La mayoría de los oligonucleótidos presentan una mayor actividad a temperaturas entre 56-60°C (29,30). En los ensayos de PCR, con una finalidad diagnóstica, la temperatura de alineamiento se debe establecer en 60°C o mayor, con el objetivo de incrementar la especificidad del ensayo (31).

El ensayo evaluado presentó una alta especificidad, comparable con estudios realizados por Cremonesi *et al.* (27). Los cebadores basados en el gen ARNr 23S, para el diagnóstico de *S. aureus* en muestras de leche, mostró una

especificidad de 100 %, en cultivos y en leche cruda contaminada. Tsen *et al.* (32) reportaron la especificidad de los cebadores TS-11/ TS-5 frente a 327 cepas de *Salmonella* spp. de diferentes serotipos, los cuales no tuvieron reacción positiva frente al ADN de 56 cepas de otras enterobacterias. Por otra parte, Kawasaki (22) reportó una especificidad de 100 % con esta pareja de cebadores para la detección de *Salmonella* spp.

El ensayo de PCR dúplex tuvo un LD de hasta 1 pg/μL, resultado que coincide con estudios

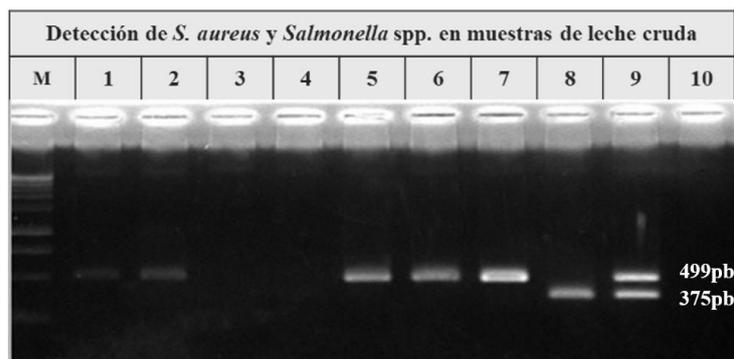


FIGURA 4. Marcador de peso molecular 100 pb (Promega); **1 - 6:** Muestras de leche cruda; **7:** C+ *S. aureus*; **8:** C+ *S. Enteritidis*; **9:** C+ dúplex PCR; **10:** C- (agua libre de nucleasas)./ *Hundred bp molecular weight marker (Promega); 1 - 6: Samples of raw milk, 7: C + S. aureus; 8: C + S. Enteritidis; 9: C + duplex PCR; 10: C- (nuclease-free water)*

previos descritos por Kim *et al.* (26), quienes reportan un LD similar de un PCR múltiplex para el diagnóstico de cinco patógenos en leche (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*).

Estudios realizados por diferentes autores refieren que la presencia de *Salmonella* spp. en muestras de leche se puede encontrar en un rango desde “no detectada” hasta 8,9% (2,33,34). Las muestras de leche cruda analizadas por el método de PCR dúplex no fueron positivas a la presencia de esta bacteria patógena. Está descrito que la presencia de este microorganismo en muestras de leche cruda depende de diferentes factores, como son la circulación de la bacteria en el ambiente, el tamaño y la salud de los animales y las condiciones de manejo del rebaño (9). Es importante tener en cuenta que la probabilidad de detectar este microorganismo pudo haber estado influenciado, además, por el número de muestras analizadas; por lo que se recomienda profundizar en estos aspectos para estudios posteriores.

La proporción de muestras positivas a *S. aureus* fue similar a la encontrada por Jørgensen *et al.* (35) y Hill *et al.* (9), quienes reportan valores de hasta 60 % de *S. aureus* en muestras de leche. La presencia de esta bacteria en leche puede significar la afectación de los animales con mastitis bovina o deficiente higiene en la obtención de la leche (36).

La detección de microorganismos patógenos en muestras de alimentos, o en materias primas utilizadas para la fabricación de los mismos, es uno de los principales retos en la industria alimenticia actual (37). La principal contribución

de este estudio fue el desarrollo de una metodología para el diagnóstico de *Salmonella* spp. y *S. aureus* a partir de precultivos de las muestras analizadas, con lo que se incrementó la sensibilidad de la técnica y se disminuyó el tiempo de diagnóstico de dos microorganismos de vital importancia para la salud pública y veterinaria, con respecto a los métodos convencionales de cultivo. Por otra parte, el empleo de un precultivo permite la posibilidad de analizar diferentes matrices con un mismo ensayo.

El ensayo de PCR dúplex evaluado constituye una herramienta que agiliza y fortalece el diagnóstico de *S. aureus* y *Salmonella* spp. en leche, lo cual permite liberar los productos alimenticios en un menor tiempo.

REFERENCIAS

1. WHO/FOS. WHO/FOS 15.02 Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. WHO/FOS. 2015.
2. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis.* 2005;2(2):115-29.
3. Labbé RG, García S. Guide to foodborne pathogens. 2013.
4. ECDC ECfDPaC. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2016. *EFSA Journal* 2017;15(12):5077.

5. Addis Z, Kebede N, Sisay Z, Alemayehu H, Wubetie A, Kassa T. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from lactating cows and in contact humans in dairy farms of Addis Ababa: a cross sectional study. *BMC Infect Dis.* 2011;11(1):222.
6. Jayarao BM, Donaldson SC, Straley BA, Sawant AA, Hegde NV, Brown J. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J Dairy Sci.* 2006;89(7):2451-2458.
7. van Asselt ED, van der Fels-Klerx HJ, Marvin HJP, van Bokhorst-van de Veen H, Groot MN. Overview of Food Safety Hazards in the European Dairy Supply Chain. *Compr Rev in Food Sci F.* 2017;16(1):59-75.
8. D'Amico DJ, Groves E, Donnelly CW. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J Food Protect.* 2008;71(8):1580-1589.
9. Hill B, Smythe B, Lindsay D, Shepherd J. Microbiology of raw milk in New Zealand. *Int J Food Microbiol.* 2012;157(2):305-308.
10. de Oliveira LP, Barros LSS, Carneiro V, Cirqueira MG. Study of Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. *J Food Process Technol.* 2011;02(06).
11. Gillespie BE, Lewis MJ, Boonyayatra S, Maxwell ML, Saxton A, Oliver SP, et al. Evaluation of bulk tank milk microbiological quality of nine dairy farms in Tennessee. *J Dairy Sci.* 2012;95(8):4275-4279.
12. Martínez A, Villoch A, Ribot A, Montes de Oca N, Riverón Y, Ponce P. Calidad e inocuidad en la leche cruda de una cadena de producción de una provincia occidental de Cuba. *Rev Salud Anim.* 2015;37(2):79-85.
13. Mata G, Vanetti MC. Comparison of Conventional and Rapid Methods for Salmonella Detection in Artisanal Minas Cheese. *J Food Res.* 2012;1(3):178.
14. Cheng CY, Huang MJ, Chiu HC, Liou SM, Chou CC, Huang CC. Simultaneous detection of food pathogens, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica, Bacillus cereus and Vibrio parahaemolyticus by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Food Drug Anal.* 2012;20(1):66-73.
15. Law JW, Ab Mutalib NS, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol.* 2015;5(770).
16. Lee N, Kwon KY, Oh SK, Chang HJ, Chun HS, Choi SW. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Bacillus cereus, Vibrio parahaemolyticus, Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus in Korean ready-to-eat food. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(7):574-580.
17. Gwida MM, Al-Ashmawy MA. Culture versus PCR for Salmonella Species Identification in Some Dairy Products and Dairy Handlers with Special Concern to Its Zoonotic Importance. *Vet Med International.* 2014;2014:502370.
18. Botero R, Esteban J. Diagnóstico molecular del Staphylococcus aureus en leche de vacas afectada por mastitis. 2013.
19. ISO. ISO-16140. Microbiology of the food chain. Method validation. Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. ISO. 2016.
20. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. 2004.
21. Ahmadi M, Rohani SMR, Ayremlou N. Detection of Staphylococcus aureus in milk by PCR. *Comp Clin Pathol.* 2010;19(1):91-94.
22. Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. Multiplex PCR for simultaneous detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Escherichia coli O157:H7 in meat samples. *J Food Prot.* 2005;68(3):551-556.
23. Cremonesi P, Luzzana M, Brascab M, Morandib S, Lodib R, Vimercatic C, et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of Staphylococcus aureus enterotoxigenic strains isolated from milk and

- dairy products. *Mol Cell Probes*. 2005;19:299-305.
24. Meiri-Bendek I, Lipkin E, Friedmann A, Leitner G, Saran A, Friedman S, et al. A PCR-Based Method for the Detection of *Streptococcus agalactiae* in Milk. *J Dairy Sci*. 2002;85(7):1717-1723.
25. Pachon CDA. Aislamiento, identificación y serotipificación de Enterobacterias del género *Salmonella*. 2009.
26. Kim JH, Rhim SR, Kim KT, Paik HD, Lee JY. Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in Low-fatted Milk by Multiplex PCR. *Korean J Food Sci An*. 2014;34(5):717-723.
27. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G, Biunno I, Vimercati C, Moroni P, et al. Technical Note: Improved Method for Rapid DNA Extraction of Mastitis Pathogens Directly from Milk. *J Dairy Sci*. 2006;89(1):163-169.
28. Zhao X, Lin C-W, Wang J, Oh DH. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24(3):297-312.
29. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):47-51.
30. Henegariu O, Heerema N, Dlouhy S, Vance G, Vogt P. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997;23(3):504-511.
31. Biolabs. Multiplex PCR Guidelines for Multiplex PCR 5X Master Mix. 2017.
32. Tsen HY, Liou JW, Lin CK. Possible use of a polymerase chain reaction method for specific detection of *Salmonella* in beef. *J Fermentation Bioengineering*. 1994;77(2):137-143.
33. D'Amico DJ, Donnelly CW. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *J Dairy Sci*. 2010;93(1):134-147.
34. Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, et al. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in foods and in food subjected to freezing. *Foodborne Pathog Dis*. 2009;6(1):81-89.
35. Jørgensen H, Mørk T, Høgåsen H, Rørvik L. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J Appl Microbiol*. 2005;99(1):158-166.
36. Gillespie BE, Oliver SP. Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Dairy Sci*. 2005;88(10):3510-3518.
37. OECD-FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025. 2016:1-13.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.