

---

## **Nuevo método de captura de *Salmonella*: la filtración inmunomagnética** ***New method for the capture of Salmonella: Immunomagnetic filtering***

D.M. Álvarez<sup>1</sup>, C. Gamazo<sup>2</sup>, N. Echarri<sup>1</sup>

---

### **INTRODUCCIÓN**

Los métodos de análisis utilizados en la validación microbiológica integral de un producto alimentario o en la elaboración de las normas de higiene en muestras tipo, deben poseer al menos cinco atributos: facilidad, rapidez, reproducibilidad, garantía intrínseca de ausencia de errores y automatización o cierto grado de mecanización.

La mayoría de las técnicas microbiológicas, sobre todo aquellas que se utilizan en la investigación de patógenos, proporcionan los resultados cuando el alimento ya ha sido procesado incluso cuando éste ha sido consumido. La rapidez en la obtención de resultados debe considerarse en el contexto de los modernos sistemas de aseguramiento de la calidad. Actualmente, se utilizan en Microbiología técnicas extremadamente rápidas y sensibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La aplicación de esta técnica permite detectar una sola partícula

infecciosa en tan sólo unas horas. No obstante, posee ciertas limitaciones cuando se utiliza en el análisis de agua de bebida o en Microbiología Ambiental. La PCR se utiliza con éxito en muestras clínicas, las cuales, raramente necesitan un tratamiento previo para incrementar la concentración bacteriana, porque la presencia de patógenos en estas muestras es, normalmente, muy alta e incluso, a veces, se encuentran en cultivo puro. Por el contrario, los patógenos presentes en muestras ambientales, son una parte muy pequeña del total de microorganismos, siendo preciso utilizar, en este caso, técnicas de concentración bacteriana.

Existen varias técnicas de concentración disponibles y que están perfectamente estandarizadas. En el presente trabajo hemos utilizado conjuntamente la técnica de filtración por membrana y otra, de reciente aparición, denominada "separación inmunomagnética". Esta última se utiliza para separar una especie bacteriana

---

*ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 9-15.*

1. Laboratorio Municipal de Pamplona. Sección de Microbiología.
2. Universidad de Navarra. Departamento de Microbiología.

### **Correspondencia:**

Desiderio Miguel Álvarez Marqués  
Laboratorio Municipal de Pamplona (Sección de Microbiología)  
C/ San Saturnino, 2  
31001 Pamplona  
Tfno. 948 420452  
Fax 948 420404

de una mezcla de microorganismos en suspensión, utilizando para ello partículas inmunomagnéticas sensibilizadas con anticuerpos específicos<sup>1,2</sup>.

La filtración por membrana es una de las técnicas que más se utiliza en la concentración de bacterias de muestras de agua. Esta técnica es rápida, fácil y reproducible, aunque presenta algunas desventajas como la falta de selectividad y es inapropiada en la filtración de grandes volúmenes o de muestras con elevada materia orgánica en suspensión.

En la separación inmunomagnética se utilizan dos tipos de partículas de polímeros superparamagnéticos. En primer lugar, las partículas (microperlitas) comercializadas bajo el nombre de Dynabeads M-280 o M-450 (DynaL A/S, Oslo, Norway) de 2,8 y 4,5  $\mu$ m de diámetro que llevan anticuerpos específicos adsorbidos a su superficie<sup>1</sup>. En segundo lugar, las partículas denominadas ferrofluidos que son suspensiones de partículas coloidales de 50-60 nm y están también sensibilizadas con anticuerpos específicos<sup>2</sup>. Estas últimas presentan alguna ventaja sobre las partículas Dynabeads, como son la posibilidad de esterilización por filtración y que, al ser partículas de menor tamaño, la superficie cubierta de anticuerpos es mayor y por tanto son más reactivas.

La reacción de las partículas con los microorganismos se produce cuando éstas son mezcladas con una suspensión bacteriana. Las bacterias se adhieren a los anticuerpos específicos de la superficie de las partículas por una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, las partículas son extraídas del medio líquido mediante la aplicación de un campo magnético. Las bacterias adheridas a las mismas son arrastradas en este proceso.

La aplicación bacteriológica de esta técnica se ha centrado en microbiología de los alimentos. Betts y col<sup>3</sup> recogen una amplia relación de patógenos aislados de alimentos mediante la captura inmunomagnética. Varios estudios han demostrado su potencial para recuperar *Salmonella* spp. y *E. coli* O157 directamente a partir de caldos de preenriquecimiento, eliminando la necesidad de utilizar enriquecimientos

selectivos, con la consiguiente reducción de 24 h del tiempo utilizado en el análisis<sup>1,4,7</sup>. En el campo de la Microbiología Ambiental, Morgan y col<sup>8</sup> han utilizado esta técnica para recuperar *Pseudomonas putida* a partir de muestras de agua dulce. Actualmente las partículas de Dynabeads para la captura *Salmonella* spp. y de *E. coli* O157 se encuentran en fase de comercialización.

En este trabajo se ha combinado la técnica de la filtración por membrana y la técnica inmunomagnética con objeto de obtener un procedimiento diagnóstico que permita la captura de *Salmonella* de forma específica y directa a partir de cualquier volumen de muestra. Con esta objeto se han seleccionado diferentes tipos de filtros para ser utilizados como soporte de partículas Dynabeads. La elección del filtro se efectuará en función de su mayor capacidad de retención de partículas Dynabeads y de su menor capacidad de retención de bacterias. En este procedimiento se filtrará un volumen de suspensión de *Salmonella* a través de un filtro previamente recubierto de partículas Dynabeads (Fig. 1). El paso lento de la suspensión a través de esta capa de partículas Dynabeads permitirá la captura selectiva de *Salmonella* en el proceso de filtración. A este procedimiento hemos denominado Inmunofiltración.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Partículas Dynabeads

Se han utilizado microperlitas M-280 de 2,8  $\mu$ m de diámetro con anticuerpos anti-*Salmonella* adheridos a su superficie (DynaL AS, Oslo, Norway).

### Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa avirulenta de referencia *Salmonella panama* 5 (ALM41; RIVM/SVM) suministrada en cápsulas de baja densidad [ $n^{\circ}$  de partícula formadoras de colonias (Nufc) / cápsula =  $5,7 \pm 0,67$ ].

### Captura de *Salmonella* de una muestra mediante el procedimiento convencional con partículas Dynabeads anti-*Salmonella* (DynaL AS, Oslo, Norway)

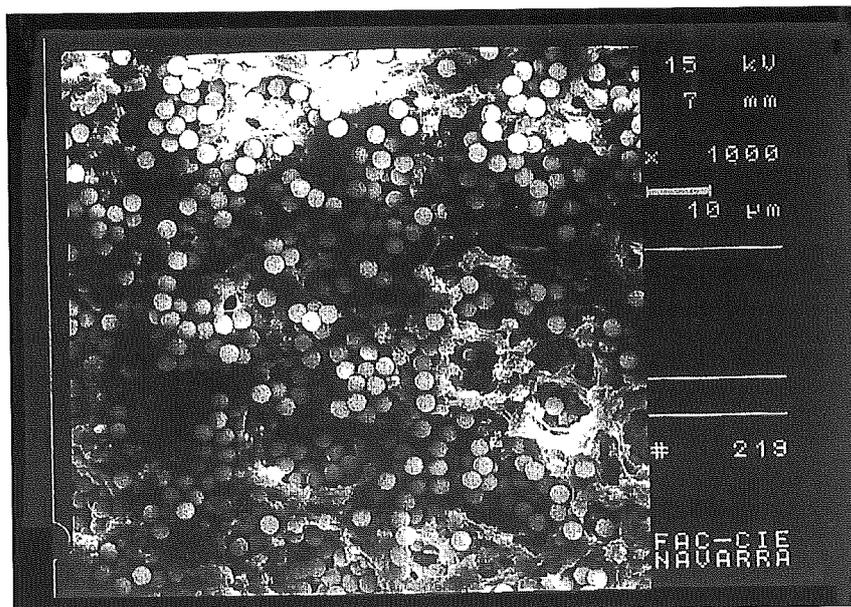


Figura 1. Partículas Dynabeads sobre filtro SVLP.

El protocolo recomendado para la separación o captura de *Salmonella* a partir de una suspensión fue el siguiente:

- Preenriquecimiento: La muestra a examinar se diluyó (1:10) en agua de peptona tamponada (ADSA Micro) y se incubó a 37 °C durante 18-24 h.

- Incubación con Dynabeads: Se añadió 1 ml de la muestra preenriquecida sobre 20  $\mu$ l de Dynabeads anti-*Salmonella* depositados en un tubo Eppendorf. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación continua (agitador orbital "Heidolf" tipo DSG 304).

- Extracción de las Dynabeads: Se colocó el tubo en el soporte MPC-M (Dynal AS, Oslo, Norway). A continuación se colocó la placa magnética del soporte MPC-M durante 3 minutos y posteriormente se aspiró cuidadosamente todo el líquido del tubo con una pipeta Pasteur estéril. A continuación se quitó la placa magnética del soporte MPC-M y se resuspendieron las partículas recogidas con 1 ml de tampón salino que contenía 0,05 % de TWEEN 20 (pH 7,4) y posteriormente se invirtió tres veces con objeto de capturar las microperlitas adhe-

ridas bajo la tapa del tubo. Tras repetir el proceso (punto 3) se resuspendieron las microperlitas en 50 ml de PBS.

- Inoculación en medios selectivos: La suspensión final de microperlitas se inoculó en medios selectivos (XLD, medio semi-sólido de Rappaport Vassiliadis), incubándose a 37 °C durante 24 h.

#### Elección del filtro soporte para partículas Dynabeads

La elección del filtro se efectuó en función de su mayor capacidad de retención de partículas Dynabeads y de su menor capacidad de retención de bacterias.

- La medida de la capacidad de retención de células de *Salmonella* por los diferentes filtros Millipore ensayados se efectuó de la siguiente manera: Partiendo de una suspensión de *Salmonella* (100 ml) con una absorbancia equivalente a la estándar nº 2 de MacFarland, se efectuó un recuento en placas de PCA, según las técnicas tradicionales, se filtró la suspensión a través de diferentes tipos de filtros, a una presión de 100 mb. A continuación, se efectuó el recuento de los distintos filtrados

(en placas de PCA). A partir de estos recuentos se calculó el porcentaje de retención de cada filtro aplicando la siguiente fórmula:

– La medida de la capacidad de retención de Dynabeads por los filtros Millipore se efectuó indirectamente mediante la medida de la reflexión de la luz en su superficie. Se utilizó un reflectómetro marca TVM 200 de la casa comercial MCV S. A. Los datos de los índices de reflexión se transformaron en índices de coloración, que hemos definido como la diferencia entre el índice de reflexión del filtro blanco y la de los filtros problema.

Así, la capacidad de retención de microperlititas por los filtros se determinó indirectamente mediante la medida del índice de coloración de la superficie de los mismos. Los datos de las lecturas y de los volúmenes de Dynabeads anti-*Salmonella* se introdujeron en una hoja de cálculo (Excel 4.0, Microsoft) y se obtuvo la gráfica correspondiente.

#### **Captura de *Salmonella* mediante el procedimiento de Inmunofiltración**

El procedimiento de Inmunofiltración se ha ensayado en aquellos filtros que ofrecieron una mínima retención de bacterias y por el contrario presentaron una máxima capacidad de retención de partículas Dynabeads.

La elección del volumen de partículas a depositar en la superficie del filtro se efectuó tras el examen de las electronografías de la superficie de distintos tipos de filtros tras filtrar a través de ellos volúmenes conocidos de una suspensión de Dynabeads.

Tras recubrir la superficie de un prefiltro (Millipore) con una película de microperlititas sensibilizadas con anticuerpos anti-*Salmonella* (Dynabeads), se colocó dicho prefiltro en un equipo de filtración (soporte y embudo) (Afora). Se filtraron 100 ml de una suspensión bacteriana conocida y a una presión de vacío de 100 mb. Se efectuaron controles negativos utilizando filtros con perlititas anti-*E. coli* O157 H7.

Mientras la muestra pasa por los filtros, las células de *Salmonella* son capturadas por los anticuerpos anti-*Salmonella* de las microperlititas. Posteriormente, se procedió a inocular esta suspensión en medios selectivos (XLD, medio semisólido de Rappaport Vassiliadis) incubándose a 37 °C durante 24 h.

#### **Electronografías**

La disposición de las microperlititas en la superficie filtrante y la determinación del número de microperlititas capaz de saturar completamente la superficie los filtros utilizados en la Inmunofiltración, se realizó mediante electronografías. Se empleó un microscopio electrónico de barrido (Zeiss DSM-940 A). Previamente a la observación de la muestra fue necesaria su fijación físico-química. Para ello, los filtros se trataron con etanol (96 %) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez desecados, se deshidrataron completamente mediante liofilización (Liofilizador Virtis). Finalmente, las muestras fueron sombreadas con tetróxido de osmio (Sombreador LEYBOLD-Heraeus PDW-170).

### **RESULTADOS**

#### **Retención de *Salmonella* y Dynabeads por diferentes tipos de filtros**

En la tabla 1 se expresan los porcentajes de retención obtenidos tras filtrar entre  $1 \times 10^3$  y  $4 \times 10^3$  ufc de *S. panama*/100 ml de PBS a través de los tipos de filtro indicados. Se efectuaron recuentos antes y después de la filtración y se calculó posteriormente el porcentaje de retención bacteriana. En dicha tabla se observa que los filtros AN 50, AN 1H y SVLP, mostraron una menor capacidad de retención.

La retención de Dynabeads por diferentes tipos de filtros (Tabla 1) se determinó tras filtrar 100 ml de PBS que contenían 70 l de suspensión de micropartículas a una presión de 100 mb. Se incluyó como control el resultado de la filtración de 100 ml de PBS estéril. Tras el cálculo de los índices de coloración se determinó el porcentaje de partículas retenidas en cada tipo de filtro. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 1. Se obtuvieron porcenta-

**Tabla 1.** Retención de *Salmonella* y Dynabeads por diferentes tipos de filtros.

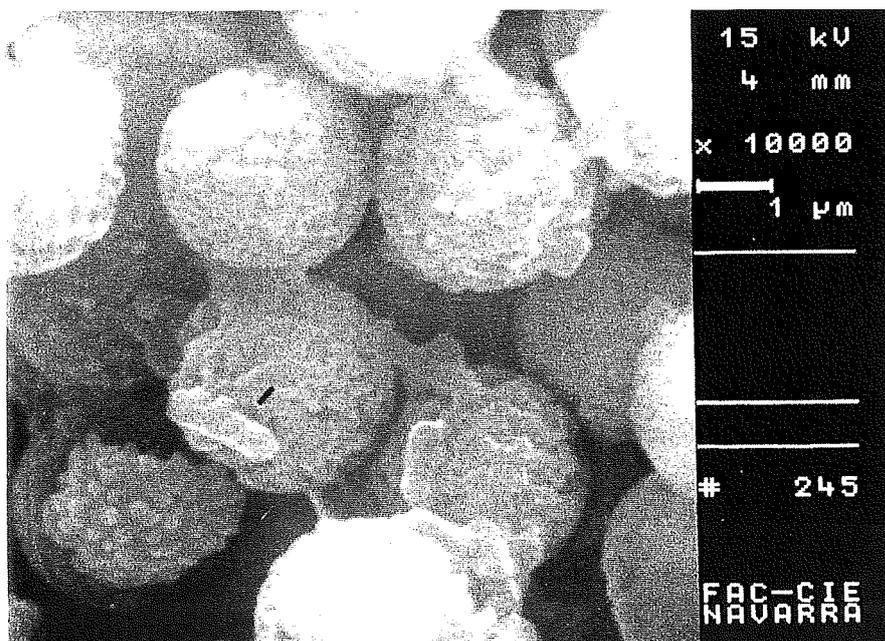
Tipo de filtro (*)	Retención de Dynabeads (%)	Retención de <i>Salmonella</i> (%)
AP 10	6,5	84,4
AP15	77,8	89
AP20	100	83,2
AP 25	100	87,2
AN 50 (5)	22,6	6,6
AN 1H (10)	25,4	0,3
SSWP (3)	100	99,6
SMWP (5)	100	72,5
SCWP (8)	100	82,3
SVLP (5)	97,6	27,2
HVLP (0,45)	100	100
LCWP (10)	ND	NC
LSWP (5)	ND	NC
FSLW (3)	ND	NC

(\*) Se incluye entre paréntesis el tamaño de poro en mm  
 NC= No se detecta ningún tipo de crecimiento bacteriano  
 ND= No determinado

jes de retención mayores del 97% en los filtros SSWP, SMWP, SCWP, SVLP, AP 20, AP 25 y HVLP.

**Retención de *Salmonella* por filtros recubiertos de Dynabeads anti-*Salmonella***

Tras seleccionar el filtro SVLP (Fig. 2), se recubrieron cinco filtros con 280 l de suspensión de Dynabeads anti-*Salmonella* y cinco filtros con 280 l de Dynabeads anti-*E. coli*. Tras el proceso de filtración (10 ml de una suspensión conteniendo 2.430 ufc/ml de *Salmonella*) se han efectuado recuentos de los filtrados y se han calculado las medias a partir de los recuentos obtenidos. Los controles utilizados han sido filtros SVLP sin partículas Dynabeads en superficie. Así, mientras que los filtros sin partículas retuvieron un 27,2% de las células de *Salmonella*, los filtros recubiertos de partículas anti-*Salmonella* retuvieron un 86,3%, mientras que los filtros recubiertos de partículas anti-*E. coli* retuvieron un 41,4%. En resumen, la



**Figura 2.** Captura de *Salmonella* mediante el sistema de Inmunofiltración.

retención específica de *Salmonella* debida a reacción antígeno-anticuerpo fue del 44,9 %. La retención no específica de *Salmonella* debida a la presencia de partículas fue del 14,2 % y la debida exclusivamente al propio filtro fue del 27,2 %.

En la figura 2 se observan las células de *Salmonella* capturadas por la superficie de partículas de Dynabeads sobre un filtro SVLP.

## DISCUSIÓN

La técnica inmunomagnética convencional aplicada según el protocolo de Dynal S.A. permite la recuperación de *Salmonella* tras un preenriquecimiento, incluso de las células que se encuentren en una fase no viable, que con métodos habituales de resiembra no sería posible recuperar<sup>9</sup>. Esta técnica se aplica en la actualidad a bacterias como *Salmonella*, *Listeria*, *Vibrio*, *E. coli* O157 H7 e incluso a virus como enterovirus, citomegalovirus, HIV-1 y virus de la necrosis pancreática infecciosa<sup>7,10,11</sup>. Pero en todos los casos, el diagnóstico lo efectuaron a partir de volúmenes de muestra de 1 ml. Por el contrario, la técnica propuesta por nosotros, que hemos denominado de Inmunofiltración, no requiere preenriquecimiento y se pueden utilizar volúmenes mayores de 1 ml. Esta técnica requiere preparar una superficie filtrante que soporte las micropelotas sensibilizadas con anticuerpos anti-*Salmonella*. Un filtro soporte ideal es aquél que retiene las partículas Dynabeads y a la vez permite el paso libre de bacterias. En nuestro caso, teniendo en cuenta la diferencia de tamaño entre las micropelotas (2,8 mm) y las células de *Salmonella* (0,7 x 2 mm), la capacidad de elección de filtros soporte es limitada. El filtro seleccionado fue del tipo SVLP que posee un tamaño de poro de 5 mm. Este filtro retuvo el 97,6% de partículas Dynabeads y el 27,2% de bacterias. Cuando el filtro se recubrió con una capa de partículas Dynabeads anti-*Salmonella*, se produjo una retención de *Salmonella* del 41,4%, debida a la adsorción física de bacterias a la superficie filtrante y una retención del 44,9%, debida a interacciones específicas (antígeno-anticuerpo).

Los métodos inmunomagnéticos, en general, pueden tener una gran importancia en el diagnóstico microbiológico en alimentos y medio ambiente. El procedimiento de Inmunofiltración, en particular, puede tener mayor interés cuando se desea capturar microorganismos de volúmenes mayores de 1 ml y sobre todo en la captura de partículas de menor tamaño que las bacterias como son los virus o otro tipo de partículas, en cuyo caso desaparecerían las limitaciones que encontramos en el procedimiento al aplicarlo a la captura de bacterias. En todo caso, los dos procedimientos podrán aplicarse siempre que se disponga del correspondiente anticuerpo específico frente al microorganismo a investigar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CUDJOE KS, KRONA R, OLSEN E. IMS: A new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. *Int J Food Microbiol* 1994; 23: 159-165.
2. ABTS H, EMMERICH M, MILTENYI S, RADBRUCH A, TESCH H. CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *J Immunol Methods* 1989; 125: 19-28.
3. BETTS R. In rapid methods and automation in Microbiology and Immunology, R. C. Spencer, E. P. Wright, and S. W. B. Newson, Eds. (Intercept, Andover), 1994; 107-119.
4. SKJERVE E, OLSVIK O. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. *Int J Food Microbiol* 1991; 14: 11-18.
5. BOBBITT JA, STEER JP, JONES JL, BETTS RP. In New Techniques in Food and Beverage Microbiology, Society for Applied bacteriology Tech. Ser. nº 31 r. g. Kroll, A. Gilmuour, and M. Sussman, Eds. (Blackwell Scientific Publications), Oxford, 1993; 139-142.
6. LUCIELLE P, FORSYTHE SJ. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broth for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol* 1993; 16: 122-125.
7. WRIGHT DJ, CHAPMAN PA, SIDONS CA. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidemiol Infect* 1994; 133: 31-39.
8. MORGAN JAW, WINSTANLEY C, PIVKUP RW, SAUNDERS J. Rapid immunocapture of

NUEVO MÉTODO DE CAPTURA DE *SALMONELLA*:: LA FILTRACIÓN...

- Pseudomonas putida* cells from lake water by using bacteria flagella. Appl Environ Microbiol 1991; 57: 503-509.
9. OLSVIK O, POPOVIC T, SKJERVE E, CUDJOE KS, HORNES E, UGELSTAD J et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. Clin Microbiol Rev 1994; 7: 43-54.
10. BARBARA AM, MILBURY JA, BROOKINS AM, JACKSON BJ. Use of immunomagnetic capture on beads to recover *Listeria* from environmental samples. J Food Protection 1994; 57: 743-745.
11. MUIR P, NICHOLSON F, JHETAM M, NEOGI S, BANATVALA JE. Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical specimens. J Clin Microbiol 1993; 31: 31-38.