

Métodos de cultivo convencionales para el aislamiento e identificación de Salmonella en los alimentos: revisión y justificación de procedimientos

Javier Mérida Ramos *

RESUMEN

Se pasa revista a las diferentes etapas en la recuperación de Salmonella en los alimentos, especialmente la toma de muestras y las fases iniciales de los análisis: pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo. Se acentúa la diferencia entre los protocolos de búsqueda de Salmonella en alimentos y muestras clínicas como resultado del daño celular producido durante el proceso de manufactura del alimento, necesiéndose de etapas de reactivación de los gérmenes.

ABSTRACT

This article discusses the different steps to detect Salmonella spp. in food products, mainly the sampling methods and the first steps of the analyses: pre-enrichment and selective enrichment. The difference between searching Salmonella in food products and clinical samples as a result of the cellular damage caused by food processing is pointed out. In this case, revitalization steps are necessary before culturing.

INTRODUCCION

Los microorganismos del género Salmonella son responsables de una de las toxiinfecciones alimentarias que ejercen una mayor presión epidemiológica sobre el hombre. Exceptuando la Salmonella typhi y unos pocos serotipos que están adaptados primariamente al hombre ocasionando fiebres entéricas (tifoides y paratifoideas), la mayor parte de las salmonelas están adaptadas primariamente a los animales. Un cierto número de serotipos de estas últimas ocasionan gastroenteritis en el ser humano, con lo que la salmonelosis se convierte en una zoonosis que se proyecta epidemiológicamente al hombre a través de los alimentos.

En los últimos años, la Salmonella ha sido uno de los gérmenes desencadenantes de toxiinfecciones alimentarias más investigadas. Ello ha supuesto que los métodos de búsqueda de salmonelas en alimentos hayan experi-

mentado numerosas modificaciones en aras a lograr metodologías normalizadas, reproducibles y de creciente poder de detección. Inicialmente, se ensayaron los mismos métodos de análisis que para las muestras clínicas. Sin embargo, esta práctica no resultaba indicada por cuanto: la cantidad de salmonelas en los alimentos es menor que en las muestras clínicas, por lo general fuertemente contaminadas y además, en los alimentos los gérmenes están casi siempre dañados o debilitados y se hacen necesarias etapas de "revivificación" durante las fases iniciales de los análisis. El laboratorio de microbiología alimentaria debe contar con metodologías analíticas propias adaptadas al sistema ecológico-bacteriano integrado por las muestras que analiza. Por lo general, la búsqueda de salmonelas se hace de forma cualitativa, señalando la presencia o no de estos gérmenes en los alimentos; sin embargo, los mismos métodos de análisis pueden adaptarse a propósitos cuantitativos, enumerándose los microorganismos mediante la técnica del número más probable (NMP). La sistemática del género Salmonella

ha experimentado numerosos cambios y revisiones. Kauffmann y White propusieron una clasificación antigénica que fue adoptada por el Bergey's Manual en su octava edición. Según ésta, las salmonelas se agrupan en cuatro subgéneros que comprenden distintos serotipos cada una. El subgénero I está formado por las salmonelas con nomenclatura binomial aceptada, utilizando las denominaciones en lugar de epítetos antigénicos. El subgénero III contiene al anteriormente designado "grupo Arizona", Arizona hisnhawii y más tarde, Salmonella Arizona, quedando en la actualidad como grupo bioquímica y serológicamente definido dentro del subgénero III de Salmonella. Los subgéneros II, III, IV, descritos después de 1966, quedan establecidos únicamente por la fórmula antigénica.

Desde un punto de vista sanitario todos los subgéneros de Salmonella son importantes dada su implicación en toxiinfecciones alimentarias.

MUESTREO

El interés por demostrar la presencia

* Capitán Farmacéutico Diplomado en Análisis Químico-Biológicos (E.A.). Licenciado en Ciencias Biológicas.

Métodos de cultivo convencionales para el aislamiento e identificación de Salmonella en los alimentos: Revisión y justificación de procedimientos

de salmonelas en los alimentos ha hecho que las agencias reguladoras y organismos internacionales hayan elaborado planes de muestreo específicos para estos microorganismos. Son procedimientos que señalan el número de unidades de muestra tomadas al azar que deben analizarse, así como los criterios de aceptación y rechazo para cada lote o partida sometida a comprobación. A su vez, el plan crea distintas categorías para los alimentos analizados en función de la sensibilidad del grupo de consumidores (p.e. ancianos, enfermos) y del tipo de alimento, así como de la existencia de procesos letales para las salmonelas durante la manufactura o elaboración culinarias.

El modelo propuesto por la Food and Drug Administration (USA) establece tres categorías de alimentos:

- Alimentos de categoría I.—Aquellos comprendidos en la categoría II que van destinados a poblaciones de alto riesgo (enfermos, niños y ancianos).
- Alimentos de categoría II.—Aquellos que no están sujetos normalmente a ningún proceso letal para Salmonella entre el momento del muestreo y el de su consumo (productos de bollería, galletas, cereales de desayuno, mantequilla y derivados, leche pasteurizada entera y concentrada, leche en polvo, quesos, helados y cremas pasteurizadas, huevos y ovoproductos de consumo directo, pescados curados y enlatados, vertebrales, moluscos, ensaladas, sopas, cremas, bebidas, etc.).
- Alimentos de categoría III.—Los que sí comprenden una etapa letal para Salmonella entre el momento del muestreo y el de su consumo (cereales y almidones para consumo humano, pastas, pescados frescos y congelados, moluscos —a menos que se coman crudos— precocinados, alimentos preparados, congelados, etc.).

Este plan establece un número de unidades de muestra de *sesenta* para cada lote de alimentos de la categoría I, *treinta* para los de categoría II y *quince* para los de categoría III. Cada unidad de muestra consistirá en un mínimo de 100 gr. del alimento, de los que

25 gr. constituirán la unidad analítica. Este plan de muestreo presupone que la distribución de Salmonella en un lote o partida de alimento es al azar, lo que implica que todas las unidades analíticas tienen igual contenido de salmonelas. En orden a los criterios de aceptación de cualquier lote muestreado según al anterior programa, cabe significar para las distintas categorías de alimentos que:

- Categoría I.—Sesenta unidades analíticas analizadas y encontradas negativas indican con un 95% de probabilidad que el contenido de Salmonella por cada 500 gr. del alimento en el lote, es inferior a uno.
- Categoría II.—Treinta unidades analíticas negativas, indican menos de una salmonela por cada 250 gr. del alimento.
- Categoría III.—Quince unidades analíticas negativas, suponen menos de una salmonela por cada 125 gr. de alimento en el lote.

Sin embargo, en un intento de reducir el trabajo analítico necesario para calificar la aceptabilidad de un lote, se ha ensayado y demostrado adecuada la mezcla de unidades analíticas de muestra sin comprometer la sensibilidad del ensayo para la detección de Salmonella. A tal fin, en el plan de muestreo de la FDA, quince unidades analíticas de 25 gr. cada una pueden combinarse dando una unidad de 375 gr., con lo que la presencia de salmonela en alimentos pertenecientes a las categorías I, II y III, puede llevarse a cabo mediante el análisis de cuatro, dos o una unidades combinadas respectivamente. El lote resulta aceptable únicamente, si todas las unidades combinadas sometidas a análisis resultan negativas.

Planes de muestreo de similares características al anterior, han sido propuestos por la National Academy of Sciences (USA), a través del Comité de Salmonella del National Research Council (NRC), y por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).

El plan de la NRC divide los alimentos, a efectos de muestreo, en cinco categorías según el nivel de riesgo que presenta su consumo. A estos efectos, se consideran factores de riesgo los siguientes: 1) el alimento o sus ingredientes son una fuente potencial para la existencia y desarrollo de Salmonella; 2) el proceso de manufactura no incluye etapas letales para estos microorganismos, y 3) existe un riesgo potencial de multiplicación de salmonelas durante el transporte o la distribución negligentes. Los alimentos se categorizan en razón al número de riesgos que acumulan y al riesgo añadido de la sensibilidad de la población destinataria:

- Categoría I.—Alimentos destinados a enfermos, niños o ancianos.
- Categoría II.—Alimentos con los tres factores de riesgo.
- Categoría III.—Alimentos con dos factores de riesgo.
- Categoría IV.—Alimentos con un factor de riesgo.
- Categoría V.—Alimentos sin ningún factor de riesgo.

El plan de la NRC resulta equivalente al de la FDA, proponiendo el análisis del mismo número de unidades de muestra (60 y 30) para las correspondientes categorías de alimentos I y II y trece unidades para las restantes categorías (III, IV y V).

El plan recomendado por la ICMSF se corresponde igualmente a los anteriores, incrementando el número de unidades de muestra a medida que aumenta el peligro potencial de la partida de alimentos sometida a comprobación. No obstante, se introduce una modificación que consiste en distinguir los muestreos realizados en forma rutinaria de aquéllos orientados a investigaciones especiales, como la investigación de brotes declarados de toxoinfección alimentaria. Resulta obvio decir que en el último caso, las características del muestreo son más estrictas que cuando se procede de forma rutinaria y equivalentes a los planes propuestos por la FDA y NRC.

La metodología para el aislamiento e identificación de Salmonella en alimentos comprende cinco etapas básicas:

1. Pre-enriquecimiento.
2. Enriquecimiento selectivo.
3. Aislamiento en medios selectivos sólidos.
4. Identificación bioquímica.
5. Confirmación serológica.

PRE-ENRIQUECIMIENTO

Es una etapa esencial para la recuperación de Salmonella. Como ya ha sido apuntado, los factores intrínsecos y extrínsecos a los alimentos producen un debilitamiento, cuando no daño celular, en los microorganismos, necesitando "revivificarlos" en medios líquidos, antes de proceder a un enriquecimiento selectivo. En condiciones ideales esta etapa supone: 1) la multiplicación de las salmonelas frente a otros microorganismos competidores presentes en el alimento; 2) la lenta rehidratación de los gérmenes afectados por la baja actividad de agua de muchos alimentos; 3) la reparación del daño celular producido por los distintos procedimientos de manufactura hasta conseguir la restauración del fisiologismo del germen, y 4) la dilución de sustancias inhibitoras o tóxicas presentes en el alimento.



Figura 1.—Colonias de *Salmonella typhi* en un medio de aislamiento (agar-XLD).

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Supone la continuación de los efectos de la etapa de pre-enriquecimiento. Durante el enriquecimiento selectivo se consigue la proliferación de las salmonelas a la vez que se restringe el crecimiento de otras bacterias presentes en el alimento. Esto se logra mediante la utilización de medios líquidos que contienen principios fuertemente inhibidores para los microorganismos competidores.

Los caldos de enriquecimiento selectivo se inoculan con el cultivo de pre-enriquecimiento, subcultivando un mililitro generalmente del cultivo de pre-enriquecimiento en diez mililitros del caldo selectivo (ó 10ml. en 100ml.). Ciertos alimentos crudos o alimentos fuertemente contaminados con salmonelas, pueden inocularse directamente en el medio de enriquecimiento selectivo evitando la etapa del pre-enriquecimiento.

Los caldos de enriquecimiento más utilizados en la recuperación de salmonelas son el caldo Tetracionato, origi-



Figura 2.—Batería con un medio diferencial (medio de Kligler) y cinco sustratos de pruebas bioquímicas (Urea, ONPG, Citrato, Voges-Proskauer y Rojo de Metilo) para la identificación de salmonella.

nalmente formulado por Müller y el caldo Selenito, inicialmente formulado por Leifson. Ambos medios han sido modificados mediante la adición de diferentes sustancias para conseguir mayor selectividad.

El caldo Tetracionato fue modificado por Kauffmann merced a la adición de verde brillante para prevenir el crecimiento de especies de *Proteus* y de sales biliares para implementar el aislamiento de *Salmonella*. Otras modificaciones han supuesto la adición de tergitol, novobiocina y sulfatiazol sódico.

El caldo Selenito también ha experimentado numerosas modificaciones como la adición de cistina para preservar la acción selectiva del selenito en presencia de alta proporción de materia orgánica o de metionina para incrementar el efecto tóxico del selenito para *E.coli*.

Otros medios de enriquecimiento selectivo también citados en la bibliografía son: el medio Rappaport, el medio de Ruys o el medio Estroncio-Selenito.

La temperatura y período de incubación en esta etapa de enriquecimiento es de 35-37°C durante 18-24 horas. Sin embargo, ciertos trabajos recomiendan temperaturas de incubación superiores (43°C) para incrementar la recuperación de *Salmonella* en muestras fuertemente contaminadas con otros gérmenes competidores.

En un intento por reducir el tiempo necesario para el enriquecimiento, se han propuesto métodos en los que el pre-enriquecimiento y el enriquecimiento selectivo tienen lugar en una sola etapa. Por lo general, la modificación consiste en incubar las muestras del alimento en medios combinados de lactosa con los caldos Selenito o Tetracionato basales durante cuatro horas, para añadir después los principios selectivos (biselenito sódico o solución de yodo) y completar la incubación.

AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS SOLIDOS

Esta etapa consiste en inocular en medios sólidos (agares) los cultivos de enriquecimiento una vez incubados de forma que se restrinja el crecimiento de los microorganismos que no son *Salmonella* y se favorezca el desarrollo individualizado de colonias de *Salmonella*. A su vez, estos medios permiten un reconocimiento visual, merced a la morfología y coloración, de aquellas colonias sospechosas de ser *Salmonella*. Esto se logra, fundamentalmente, mediante la adición al medio de sustancias indicadoras. Cuando en estos medios crecen colonias de gérmenes distintos de los buscados, la diferenciación resulta posible debido a la fermentación

Generalmente, se recurre a añadir a cada unidad analítica de muestra (25 gr. en caso en que no se trate de una unidad combinada), 225 ml. del caldo de pre-enriquecimiento, con lo que el factor de dilución es 1:10. Uno de los medios líquidos más utilizados en esta etapa es el caldo lactosado que, al rebajar el pH con la acción fermentativa de los gérmenes lactosapositivo contribuye a la limitación de su crecimiento. Otros medios utilizados son el caldo tripticasa de soja, el agua de peptona tamponada y el caldo nutritivo. Ciertos autores han apuntado la inoportunidad de utilizar medios de pre-enriquecimiento clasificados como medios "ricos" o muy nutritivos, tal que los anteriores, frente a los llamados medios mínimos, como el medio M-9, al que consideran superior para la recuperación de *Salmonella* dañadas por el calor o los antibióticos.

Parece demostrado que una lenta rehidratación de los gérmenes es un factor importante para su posterior recuperación, aliviando el riesgo del daño osmótico que puede producir el paso desde un estado prácticamente desecado a un medio líquido. A tal fin, algunos autores recomiendan una gradual rehidratación para los alimentos con baja actividad de agua, como la leche en polvo, proponiendo la reconstitución inicial del alimento desecado a la dilución 1:2, durante un cierto tiempo (30 minutos), para después alcanzar la dilución final de 1:10.

El período de incubación que se recomienda para la etapa de pre-enriquecimiento es de 18 a 24 horas y la temperatura de 35-37°C. Sin embargo, también se ha sugerido que las primeras dos-cuatro horas de incubación se hagan a temperaturas inferiores (25°C, p.e.), para permitir una hidratación más lenta de las células.

Por último, resulta desaconsejable la adición de sustancias surfactantes que, aunque permiten una mayor interposición de los principios grasos del alimento en el caldo de pre-enriquecimiento o facilitando la liberación de bacterias a la fase acuosa, añaden una cierta toxicidad para los gérmenes debido al principio emulgente.

de ciertos azúcares o por la formación de negros precipitados de sulfuros metálicos en las colonias si los gérmenes producen sulfuro de hidrógeno.

Existen muchos medios en el mercado que sirven a los anteriores propósitos y suele quedar al juicio del microbiólogo la elección de los mismos. Sin embargo, ninguno de estos medios resulta plenamente satisfactorio por lo que es aconsejable la utilización conjunta de dos o más de ellos. No obstante, hay diferencias de selectividad entre los medios disponibles que deben tomarse en cuenta en el momento de la elección, combinando medios muy selectivos con otros de selectividad moderada. Entre los más conocidos y utilizados están: el agar Sulfito de Bismuto (Wilson-Blair), el agar entrérico de Hektoen, el agar Verde Brillante (Kauffmann), el agar Deoxicolato-Citrato (Leifson), el agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Taylor), el agar Salmonella-Shigella, el agar de Mac Conkey, etc.

La ICMSF recomienda que cada laboratorio utilice cualquiera de estos medios a su elección, pero que adicionalmente emplee agar Sulfito de Bismuto y agar Verde Brillante.

En estos medios, las salmonelas desarrollan colonias de morfología y coloración generalmente bien establecidas aunque es la experiencia del microbiólogo la que debe resolver en último término la presencia o ausencia de colonias sospechosas. Esto es tanto más importante cuanto que no siempre resultan fiables las indicaciones del fabricante, pues no se debe perder de vista que se está trabajando con microorganismos, reactivos vivos y por tanto inconsistentes.

Los medios selectivos sólidos han experimentado numerosas modificaciones desde su formulación original merced a la adición de antibióticos, sulfamidas, surfactantes y otras sustancias químicas, en orden a procurar una mayor selectividad y/o una mayor tasa de recuperación de salmonelas. Esto los ha convertido en medios ciertamente complejos, lo que obliga a tomar precauciones durante su preparación. Algunos no deben ser autoclavados pues perderían parte de su poder selectivo, mientras que otros exigen ser almacenados una vez preparados para disminuir su poder inhibitorio. En

todo caso, los medios han de prepararse según las indicaciones del método seguido y de no especificarse, observando las directrices de los fabricantes.

Estos medios son inoculados mediante asa de platino a partir del cultivo de enriquecimiento, siguiendo la técnica de los cuadrantes o cualquier otra, de forma que tras la incubación a 35-37°C durante 24-48 horas, den lugar a colonias aisladas fácilmente reconocibles.

MEDIOS DIFERENCIALES

Una vez realizado el aislamiento de las colonias sospechosas se da comienzo a la identificación tentativa de las bacterias, al menos a nivel de género, mediante pruebas bioquímicas convenientemente elegidas. Previamente, es necesario contar con suficiente cantidad del germen de modo que puedan efectuarse las citadas pruebas. Ello aconseja la realización de cultivos en los llamados medios diferenciales.

Los medios diferenciales son medios sólidos no selectivos, dispensados generalmente en tubos de agar inclinado, que aportan una información de gran utilidad al poner de manifiesto, simultáneamente, varias características bioquímicas del germen. Son medios que tras su inóculo e incubación experimentan cambios de coloración en distintos puntos como resultado de la utilización de uno o más azúcares fermentables y producción o no de sulfuro de hidrógeno.

El crecimiento masivo de los gérmenes en estos medios sirve: como fuente de bacterias para ulteriores pruebas bioquímicas y/o serológicas, como índice del grado de pureza del cultivo y para permitir el almacenamiento temporal hasta que se hagan los siguientes desarrollos.

El medio diferencial más utilizado es el agar Hierro Tres Azúcares (TSI) o su versión simplificada, el agar Hierro de Kligler (KIA). Se inocula con material procedente de una sola colonia obtenida en medios de aislamiento selectivo, siguiendo el procedimiento de extensión en la superficie del "slant" e infección por picadura del taco o fondo del agar inclinado. La lectura de resultados es fundamental que se haga dentro de un periodo de incubación de 18-24 horas ya que lecturas realizadas antes o después pueden conducir a falsos resultados. De esta forma, resulta posible detectar la facultad del germen para utilizar azúcares como la glucosa y la lactosa, caso del KIA, y además la sacarosa, con el TSI. También permite medir la producción o no de gas y de sulfuro de hidrógeno.

Otro medio diferencial muy utilizado en combinación con los anteriores es el

agar de Lisina y Hierro (LIA). Se inocula mediante picadura profunda en tubos con una cantidad conveniente del medio en cuestión. Tras incubar durante 48 horas se hace la lectura del color en que un resultado positivo indica que el germen es capaz de descarboxilar la lisina confiriendo al medio la alcalinidad debida a la amina creada.

En los anteriores medios diferenciales los miembros del género Salmonella dan reacciones típicas produciendo: en el KIA, un "slant" alcalino (rojo) y un fondo ácido (amarillo) con o sin producción de sulfuro de hidrógeno (ennegrecimiento), y en el LIA, una alcalinización generalizada (púrpura). Estos cultivos se llevarán a continuación a distintos medios para conseguir su caracterización bioquímica.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA

Son muchas las pruebas bioquímicas disponibles para establecer la identificación de las salmonelas y de otras enterobacterias. Sin embargo, resulta conveniente para no perderse en ensayos inútiles, gastando tiempo y dinero, hacer una selección de las mismas según el perfil bioquímico del género, anteponiendo la realización de unas a otras y llegando en el menor tiempo y con la mayor fiabilidad posible a las pruebas de confirmación serológicas. Para la mayoría de las situaciones resultan suficientes las siguientes seis pruebas: ureasa, lisina descarboxilasa, fermentación del dulcitol, crecimiento en caldo CNK, utilización del malonato de sodio y producción de indol.

En ciertos casos, cuando son muchas las colonias que se sospecha son de Salmonella, puede resultar conveniente realizar la prueba de la ureasa junto con un test de aglutinación flagelar, a fin de evitar la realización de más ensayos si los resultados no se corresponden con la Salmonella, continuando con aquellos cultivos que den el resultado esperado. Otros criterios útiles para descartar definitivamente como no-Salmonella los cultivos no clasificados, están relacionados en la tabla 2.

Una vez efectuadas las seis pruebas bioquímicas anteriores se continuará con los ensayos serológicos para antígenos flagelares y somáticos de los que se hablará más adelante.

Si un cultivo no puede ser clasificado como Salmonella o no-Salmonella con los anteriores resultados bioquímicos y serológicos, todavía pueden realizarse alguno o varios de los siguientes ensayos bioquímicos: Voges-Proskauer, rojo de metilo, fermentación de lactosa y sacarosa y/o utilización del citrato. Si la ambigüedad continuase, se harían precisas otras pruebas contenidas en el Bergey's Manual. Estos y los anterio-

res ensayos pueden ser fácilmente establecidos por cualquier microbiólogo experto, procurando una interpretación cuidadosa de los resultados y tomando en cuenta todas las precauciones señaladas por el método o recomendadas por los fabricantes.

SISTEMAS MULTIPRUEBAS

Desde hace unos años se ha extendido considerablemente el uso de sistemas multipruebas para la identificación bioquímica de ciertos gérmenes. La mayor parte de los equipos disponibles en el comercio utilizan microtécnicas y en una sola unidad incorporan varias pruebas, lo que constituye la principal limitación para la fiabilidad del resul-

tado. Los sistemas tienen la indudable ventaja de su rapidez y facilidad de manejo, pero también suponen que utilizados por personal de laboratorio no experimentado en bacteriología no se alcance el resultado deseado al ignorar sus indiscutibles limitaciones. Los principales problemas que plantean frente a las técnicas corrientes se deben a la transferencia de sustrato durante la inoculación y a la edad y amplitud del inóculo. Entre los más utilizados para enterobacterias están: el sistema microtubo API-20 entérico (Analytab) que suministra 23 pruebas bioquímicas, el sistema multiprueba Enterotube (Roche) que aporta 11 resultados, los sistemas Micro-ID (General Diagnostic), Minitek (BBL) y Pathotec (General Diagnostic) que mediante tiras reactivas permiten realizar 15, 34 y 11 pruebas bioquímicas respectivamente, y el sistema de diferenciación entérica R/B (Flow Laboratories) que utilizando tubos especialmente diseñados permite 15 determinaciones.

Recientemente se han comercializado dispositivos diagnósticos automatizados para la lectura de los resultados de pruebas bioquímicas de identificación. Tres de ellos son: el Micro-Media System (Micro-Media Systems), el Auto-Microbic System (Vitek Systems) y el MS-2 System (Abbot). Tras añadir la suspensión bacteriana a cada módulo de análisis se incuba y lee para procurar la identificación.

Cuando se utilizan sistemas multiprueba, manuales o de lectura automática, han de correlacionarse los resultados obtenidos con otras características de identificación, como la morfología colonial en medios selectivos o diferenciales, antes de emitir el resultado definitivo.

CONFIRMACION SEROLOGICA

La dotación antigénica de los miembros del género *Salmonella* comprende antígenos de tipo somático y flagelar. Los antígenos somáticos son de naturaleza lipopolisacáridica, termoestables y resistentes al alcohol y los ácidos diluidos. Pueden ser: antígenos O o somáticos propiamente dichos, antígenos Vi o responsables de la virulencia y antígenos K o de cubierta capsular. Los antígenos flagelares o antígenos H, están asociados a la motilidad y desarrollo flagelar. Pueden presentarse en dos fases antigénicas, α o específica y β o de grupo, y tienen naturaleza proteica.

La confirmación serológica de los cultivos sospechosos de *Salmonella* puede hacerse a partir de los crecimientos en medios diferenciales (TSI y KIA).

La tipificación de los antígenos somáticos (O) se hace mediante aglutinación en "porta" con sueros polivalentes (O "melanges" de Pasteur) destinados a la orientación del diagnóstico. El 98%

Prueba o sustrato	Positiva	Negativa	Reacción salmonella (a)
1. Glucosa (TSI).....	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
2. H ₂ S (TSI).....	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
3. Ureasa.....	Color rojo púrpura	Sin cambio de color	-
4. Lisina Descarboxilasa (caldo).....	Color púrpura	Color amarillo	+
5. Rojo de Fenol-Dulcitol (caldo).....	Color amarillo; gas	Sin gas; sin cambio de color	+(b)
6. KCN (caldo).....	Turbidez	No turbidez	-
7. Malonato (caldo).....	Color azul	Sin cambio de color	-(c)
8. Indol.....	Color rojo en superficie	Color amarillo en superficie	-
9. Ensayo polivalente flagelar..	Aglutinación	No aglutinación	+
10. Ensayo polivalente somático	Aglutinación	No aglutinación	+
11. Rojo de Fenol-Lactosa (caldo).....	Color amarillo; gas	Sin gas; sin cambio	-(c, d)
12. Rojo de Fenol-Sacarosa (caldo).....	Color amarillo; gas	Sin gas; sin cambio	-
13. Voges-Proskauer.....	Rosa a rojo	Sin cambio de color	-
14. Rojo de Metilo.....	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
15. Citrato de Simmons.....	Crecimiento; color azul	Sin crecimiento; sin cambio de color	v

(a) +, 90% de resultados positivos en uno o dos días; -, 90% de negativos en uno o dos días; v, variable.

(b) La mayoría de los cultivos de *S. arizonae* son negativos.

(c) La mayoría de los cultivos de *S. arizonae* son positivos.

(d) De forma infrecuente, pueden encontrarse cepas atípicas o aberrantes de *Salmonella* fermentadoras de la lactosa.

(Tomada de "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". APHA.)

Tabla 1.—Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*

Métodos de cultivo convencionales para el aislamiento e identificación de Salmonella en los alimentos: Revisión y justificación de procedimientos

de las Salmonellas que se aíslan más frecuentemente en patología humana aglutinan en los sueros O "melanges" OMA y OMB de Pasteur. Los cultivos de aglutinación positiva se enferentarán a los sueros O "monovalente" destinados al estudio de la fórmula antigénica. La presencia de abundante antígeno capsular puede interferir las anteriores aglutinaciones dando falsos negativos. Para evitarlo, se calienta la dilución bacteriana a 100°C durante 20 minutos o a 60°C durante una hora antes de llevar a cabo las aglutinaciones.

Los antígenos flagelares se establecen de la misma forma con sueros polivalentes y monovalentes. Es aconsejable una estimulación previa del componente flagelar, para lo cual se inoculan los gérmenes en una placa de agar blando y se incuban 24 horas a 35°C. Las aglutinaciones pueden hacerse en

Prueba o sustrato	Resultados
Ureasa.....	Positivo (rojo púrpura)
Indol..... Ensayo flagelar (polivalente o Spicer-Edwards).....	Positivo (rojo) Negativo (sin aglutinación)
Lisina Descarboxilasa..... KCN (caldo).....	Negativo (amarillo) Positivo (crecimiento)
Rojo de Fenol-Lactosa (caldo) (a)..... Lisina Descarboxilasa.....	Positivo (ácido y/o gas) (b) Negativo (amarillo)
Rojo de Fenol-Sacarosa (caldo)..... Lisina Descarboxilasa.....	Positivo (ácido y/o gas) (b) Negativo (amarillo)
KCN (caldo)..... Voges-Proskauer..... Rojo de Metilo.....	Positivo (crecimiento) Positivo (rojo) Negativo (amarillo)

(a) Los cultivos positivos en caldo Malonato se deben ensayar posteriormente, por si fuesen de *Salmonella arizonae*.
(b) No desechar los cultivos positivos si en el medio diferencial Lisina-Hierro dan reacción típica de *Salmonella*. Continuar con otras pruebas.
(Tomado del "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". 2nd. Ed. APHA. Washington, D.C., 1984.)

Tabla 2.—Criterios para descartar como no-Salmonella los cultivos no clasificados

"porta", con los sueros H "melanges" y sueros H "monovalentes" de Pasteur o en tubos, con cultivos formolizados

ensayados frente a antisuero flagelar polivalente y antisueros de Spicer-Edwards.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, eds.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, Md., 1974.
- 2.—COX, N. A.; McHAN, F., and FUNG, D. Y. C.: *Commercially available minikits for identification of Enterobacteriaceae: a review*. J. Food Prot. Vol. 40: 866-872, 1977.
- 3.—EDWARDS, P. R., and EWING, W. H.: *Identification of Enterobacteriaceae*. 3rd. Ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Mn., 1972.
- 4.—DIFCO LABORATORIES: *Serological Identification of Salmonella*. Technical Information Publication No. 0168. Detroit, Mich., 1977.
- 5.—GABIS, D. A., and SILLIKEN, J. H.: *ICMSF methods studies. II. Comparison of analytical schemes for detection of Salmonella in highmoisture foods*. Can. J. Microbiol. Vol. 20: 663-669, 1973.
- 6.—GALTON, M. M.; MORRIS, G. K., and MARTIN, W. T.: *Salmonellae in Foods and Feeds. Review of Isolation Methods and Recommended Procedures*. Communicable Disease Center, Atlanta, Ga., 1968.
- 7.—INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF): *Microorganismos de los alimentos. 1. Técnicas de análisis microbiológico. 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológico: principios y aplicaciones específicas*. Ed. Acribia. Zaragoza. 1983 y 1981.
- 8.—NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL: *An Evaluation the Salmonella Problem*. Publication 1683, National Academy of Sciences, Washington, D.C., 1969.
- 9.—KAUFFMANN, F.: *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*. The William and Wilkins, Co. Baltimore, Md., 1966.
- 10.—*Official Methods of Analysis*. AOAC. 12th ed., Washington, D.C., secs. 46.013-46.026, 1975.
- 11.—POELMA, P. L.; ROMERO, A., and ANDREWS, W. H.: *Rapid identification of Salmonella and related foodborne Bacteria by five biochemical multitest systems*. J. Food Sci. Vol. 42: 677-680.
- 12.—POELMA, P. L.; ROMERO, A., and ANDREWS, W. H.: *Comparative accuracy of five biochemical systems for identifying salmonella and related foodborne bacteria: collaborative study*. J. Assoc. Off. Analyt. Chem. 61: 1.043-1.049, 1978.
- 13.—SACO GALVANY, M.; DIAZ YUBERO, M. A.; SAN GABRIEL CLOSASA: *Microbiología de materias primas para piensos compuestos y otros alimentos animales*. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1985.
- 14.—SILLIKER, J. H., and GABIS, D. A.: *ICMSF methods studies. I. Comparison of Analytical schemes for detection of Salmonella in dried foods*. Can. J. Microbiol. Vol. 19: 475-479, 1973.
- 15.—SPECK, MARVIN L., Ed.: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 2nd ed. American Public Health Association, Washington, D.C., 1984.
- 16.—SPICER, C. C.: *A quick method of identifying Salmonella "H" antigen*. J. Clin. Pathol. Vol. 9: 378-379, 1956.
- 17.—FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: *Bacteriological Analytical Manual*, 5th ed. (2supplements). FDA, Washington, D.C., Chapter VI, pp.1-29, 1978.
- 18.—U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION: *Inspection Operations Manual*. FDA, Washington, D.C., 1976.
- 19.—VAN SCHOTHORST, M.; VAN LENSSEN, M. F.; DE GIERE, E.; RIJNIESE, V.F.M., and VEEN, A.J.D.: *Influence of reconstitution on isolation of Salmonella from dried milk*. J. Food. Prot. Vol. 42: 936-937, 1979.