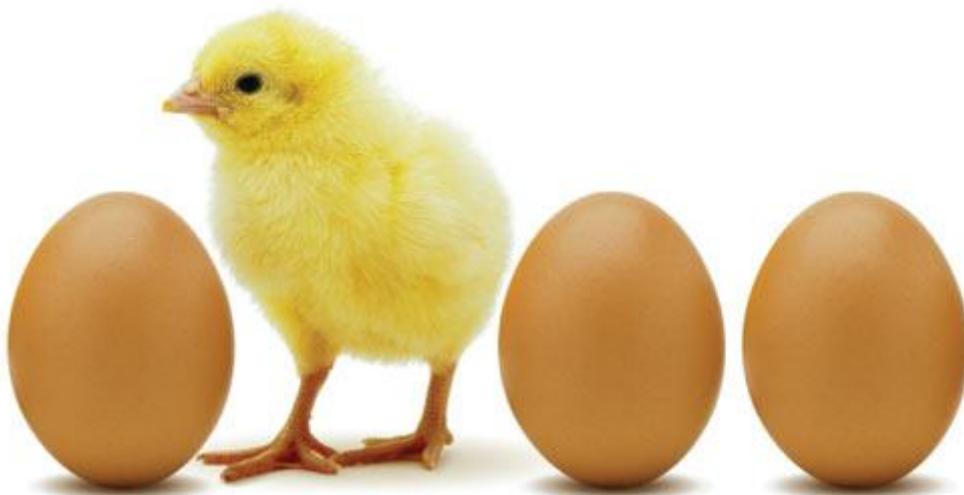


Validación de un método de detección de *Salmonella* en huevos y pollo



Sonia Sánchez Canedo

INDICE

1. INTRODUCCIÓN -----	2
1.1. <i>Salmonella</i> -----	4
1.2. <i>Salmonella</i> en aves y huevos -----	9
1.3. Legislación -----	10
2. OBJETIVO -----	12
3. MATERIAL Y MÉTODOS -----	13
3.1. Aparatos y material -----	13
3.2. Reactivos y productos -----	13
3.3. Inóculo -----	14
3.4. Muestras -----	14
3.5. Procedimiento de análisis -----	15
3.5.1. Preparación de la muestra y preenriquecimiento -----	16
3.5.2. Inmunoconcentración -----	18
3.5.3. Aislamiento e identificación -----	19
3.5.4. Pruebas de Confirmación -----	20
4. RESULTADOS -----	22
5. CONCLUSIONES -----	27
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	29
7. ANEXOS -----	30

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana de los alimentos sigue constituyendo actualmente uno de los principales problemas asociados a su consumo.

Los alimentos pueden transmitir diversos microorganismos y metabolitos microbianos, algunos de ellos patógenos para el hombre. En ocasiones, estos microorganismos se encuentran en los alimentos como consecuencia de su presencia en los tejidos de los animales vivos o de los vegetales antes de su recolección. Sin embargo, con mayor frecuencia, los microorganismos llegan a los alimentos durante su obtención o en las operaciones a que estos se someten posteriormente.

La contaminación de los alimentos con microorganismos patógenos tiene implicaciones graves desde un punto de vista de la salud pública debido al aumento del número de casos, al surgimiento de nuevas formas de transmisión, a la aparición de grupos poblacionales vulnerables, al incremento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y al impacto socioeconómico que ocasionan.

El impacto económico asociado a las enfermedades de transmisión alimentaria de etiología microbiana, más conocidas como toxiinfecciones alimentarias (TIA), es considerable, con pérdidas millonarias para el sector público y privado (destrucción de *stocks*, cierre de empresas, pérdidas de horas de trabajo, hospitalización, medicamentos, investigación epidemiológica, indemnizaciones, etc.).

Los síntomas más comunes de las toxiinfecciones alimentarias son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc.

Aunque cualquier individuo es susceptible de padecer una TIA, los principales grupos de riesgo son los niños, ancianos, mujeres gestantes, los positivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), personas sometidas a tratamientos de quimioterapia y, en general, individuos con problemas de inmunidad. Asimismo, preocupa el hecho cada vez más constatado de que del 1-5% de las personas que padecen cuadros de TIA sufren con posterioridad secuelas crónicas: enfermedades reumáticas, neuromusculares,

síndrome urémico hemorrágico, hipertiroidismo severo, enfermedad inflamatoria intestinal, etc.

Hace dos décadas, la lista de microorganismos causantes de TIA incluía un número reducido de especies, entre las que se encontraban, por ejemplo, *Salmonella* Typhi y Paratyphi, *Shigella* spp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* y el virus de la Hepatitis A. Desde entonces, a la lista se han incorporado nuevos patógenos como *Campylobacter* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium DT104, *Listeria monocytogenes*, las cepas verotoxigenicas de *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, astrovirus, rotavirus, norovirus, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* y priones, entre otros.

Con frecuencia, los patógenos emergentes sobreviven a los sistemas de conservación y tratamientos culinarios tradicionales. Por ello, es importante la implantación de sistemas barrera en los que la acción sinérgica de diversos factores subletales (tratamiento térmico, temperatura de almacenamiento, atmosferas modificadas, aditivos, bacteriocinas, etc.) permita la obtención de alimentos seguros.

Otro hecho a tener presente es la marcada tendencia de estos microorganismos a formar biopelículas. Los microorganismos se adhieren a las superficies mediante la síntesis de polisacáridos extracelulares y son numerosas las experiencias que ponen de manifiesto la gran protección que encuentran los microorganismos en las biopelículas frente al uso de desinfectantes como el cloro y otros antimicrobianos (6).

Las industrias que se ven mayoritariamente afectadas por problemas de alteración son las que producen y comercializan alimentos altamente perecederos como la carne y pescados frescos, la leche pasteurizada o los vegetales crudos. Debido a su composición y características fisicoquímicas, estos alimentos son muy susceptibles al ataque microbiano y requieren de unas condiciones especiales de mantenimiento.

1.1. *Salmonella*

El género *Salmonella* está compuesto por bacilos Gram negativos aerobios facultativos. Algunos de los cuales, son responsables de una enfermedad bacteriana denominada salmonelosis.

La salmonelosis humana es una de las principales zoonosis de transmisión alimentaria tanto a nivel mundial como a nivel europeo y nacional y provoca graves consecuencias económicas, sociales y sanitarias.

En la Figura 1 se muestra la tendencia de los casos de gastroenteritis causados por los cinco microorganismos notificados con más frecuencia al SIM. De *Salmonella* se declararon 4.419 casos. *Campylobacter*, con 6.177 casos declarados, sigue siendo la primera causa de gastroenteritis notificada.

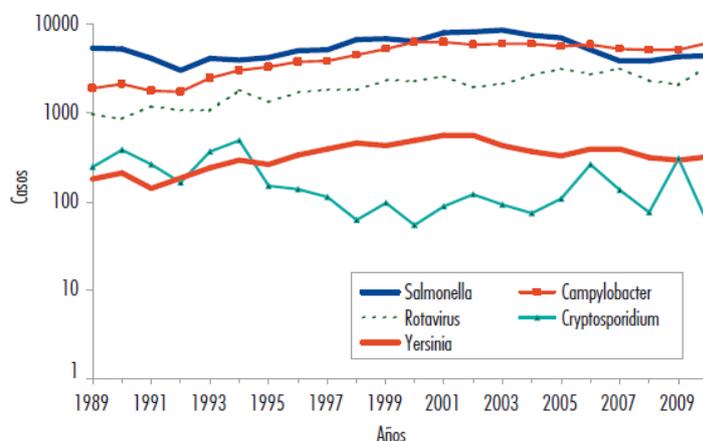


Figura 1. Tendencias de los microorganismos más relevantes causantes de infecciones gastrointestinales. Casos notificados al Sistema de Información Microbiológica. España 1989-2010

Salmonella presenta una clasificación compleja. En la actualidad se reconoce la existencia de dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, siendo *Salmonella enterica* la única con interés clínico.

La *S. enterica* se subdivide en seis subespecies: *indica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* y *enterica*.

La subespecie *S. enterica* es una de las más importantes por la alta difusión entre los animales y su patogenicidad para el humano (se aísla en la práctica totalidad de los casos). El resto de las subespecies se encuentran en animales de sangre fría y en el ambiente.

Las salmonellas, independientemente de su especie y subespecie, se clasifican basándose en sus antígenos que son de 2 tipos: somáticos (O) y flagelares (H). Las diferentes combinaciones de antígenos que muestran las cepas de *Salmonella* permiten clasificarlas en serotipos. Actualmente existen unos 2.523 serotipos diferentes.

Cuando no se dispone de sueros específicos para los diferentes antígenos de *Salmonella* pero sí de sueros para los antígenos somáticos las salmonellas se pueden clasificar en diversos serogrupos designados como *Salmonella* A, B, C, D y E.

El reservorio lo constituyen animales domésticos y salvajes de diverso tipo, incluidos porcinos, aves de corral, bovinos, roedores y otros como iguanas, tortugas, perros y gatos y también el hombre.

Numerosos serotipos de *Salmonella* son patógenos para los animales y las personas, pero en la mayoría de los países donde existe vigilancia de *Salmonella*, los serotipos notificados con mayor frecuencia son *Salmonella* ser. Enteritidis y *Salmonella* ser. Typhimurium. De hecho en muchas zonas, un número limitado de serotipos causa la mayor parte de los casos confirmados. *S. Enteritidis* fue el serotipo más frecuente con 1.329 casos, le sigue en frecuencia *S. Typhimurium* con 1.279 casos (Figura 2).

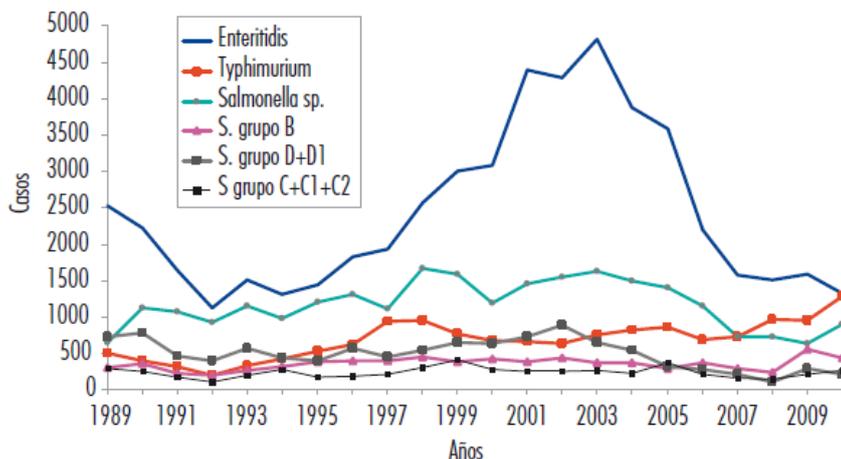


Figura 2. Evolución de los principales serogrupos de *Salmonella*. Casos notificados al Sistema de Información Microbiológica. España. 1989-2010

La salmonelosis en humanos, después de un periodo de incubación de 18-36 horas, cursa habitualmente en forma de gastroenteritis más o menos grave, con náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal y fiebre. En algunos enfermos, sin embargo, puede producir lesiones en múltiples órganos y ser mortal (tasa estimada en el 2% de los casos, que en la UE supone al año alrededor de 200 fallecimientos) o manifestarse en secuelas a largo plazo, de las que la más frecuente es una artritis reactiva, en forma de síndrome de Reiter, cuya incidencia ha sido estimada en el 5% de los casos.

La transmisión se produce principalmente a través del consumo de alimentos contaminados procedentes de animales infectados, o contaminados por las heces de un animal o persona infectada. Incluye huevos crudos y sus productos; leche cruda y productos lácteos; agua contaminada; carne y sus derivados; aves de corral y productos preparados con ellas. También polluelos, iguanas y tortugas usadas como mascotas son fuentes potenciales de salmonelosis.

También es importante la transmisión fecal-oral de una persona a otra, en especial cuando existe diarrea.

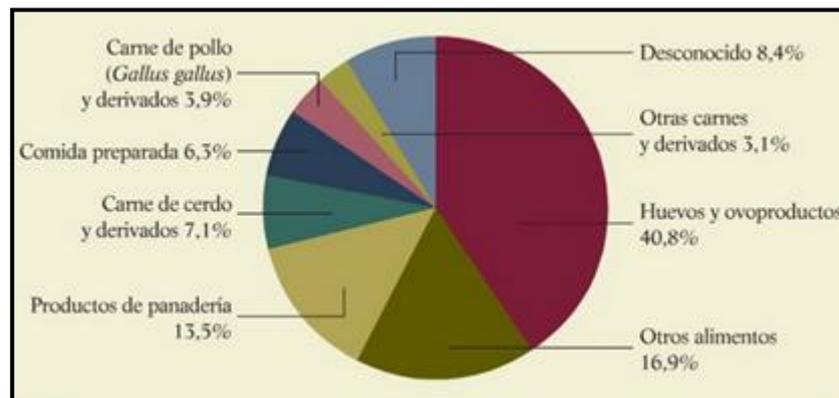


Figura 3. Distribución de los alimentos implicados en los brotes verificados de *Salmonella* en el hombre en la UE durante el año 2008.

Los huevos y los productos derivados del huevo constituyen el principal vehículo de las salmonelosis humanas tanto en Europa, en particular en España, como en muchos otros países, seguido a gran distancia de la repostería, la carne y los productos cárnicos. Hay que destacar la disminución relativa de la implicación del huevo y sus derivados como causa de brotes debidos a *Salmonella* Typhimurium a expensas de la repostería y la carne y productos cárnicos.

Como factores determinantes de los casos de salmonelosis humanas asociados a huevos y ovoproductos hay que considerar:

1. Factores asociados al proceso de producción en granja
2. Factores asociados a la conservación y procesamiento de productos primarios
3. Factores asociados a procesamiento culinario
4. Factores asociados a contaminación exógena (manipulación)

1. Los múltiples factores que condicionan la probabilidad de que los huevos, sea a nivel interno o externamente, estén contaminados con *Salmonella* al final del proceso de producción en granja. En la infección por *S. Enteritidis* se produce menos IFN- γ que en la infección por *S. Typhimurium*, lo que facilita la diseminación sistémica y la infección de los ovarios, con la consiguiente contaminación de los huevos.

Entre ellos adquieren especial relevancia la prevalencia de granjas con aves portadoras de *Salmonella*, la de aves contaminadas en cada granja, el número de *Salmonellas* excretadas por las aves, la frecuencia de huevos contaminados internamente en el momento de la puesta, el sistema de producción, la calidad bacteriológica del agua y piensos (o materias primas para piensos), así como las condiciones higiénicas de la granja y de los procesos de recogida, clasificación y manipulación de los huevos.

2. Los que condicionan la persistencia y/o multiplicación de *Salmonella* en los sustratos alimenticios durante los procesos de conservación y procesado de los huevos (principalmente factores intrínsecos, propiedades del sustrato, factores extrínsecos, temperatura y tiempo de conservación, y tipo e intensidad de los tratamientos tecnológicos aplicados, esencialmente, intensidad del tratamiento térmico).

3. Los que condicionan la contaminación durante los procesos de preparación culinaria de productos derivados del huevo (principalmente, contaminación cruzada).

4. La contaminación exógena procedente de los manipuladores en cualquiera de las etapas de la cadena producción-consumo (especialmente en las etapas de preparación previa al consumo).

1.2. *Salmonella* en aves y huevos

En el sector avícola, tras la introducción en los años 1960 del método intensivo de explotación de las aves, la patología específica de la salmonelosis aviar estuvo causada por las serovariedades de *Salmonella* Pullorum (pullorosis) y *Salmonella* Gallinarum (tifosis aviar). Estas serovariedades causaban una alta tasa de mortalidad entre los animales afectados.

La erradicación de estos dos serotipos, mediante vacunación, supuso la aparición, a partir de los años 1980, de una nueva infección que se inició principalmente en manadas de reproductoras de la línea de producción de carne, causada por la serovariedad enteritidis. Posteriormente este serovar ha sido aislado también en reproductoras de la línea de producción de huevos, manadas de ponedoras y en pollos de carne.

En las aves los efectos de la infección del serovar Enteritidis dependen de la edad. En animales jóvenes produce una enfermedad sistémica que generalmente es causa de alta mortalidad. En aves de mayor edad y adultas, las salmonellas son causa de una infección persistente, habitualmente asintomática (portadores asintomáticos), con colonización intestinal y situaciones sistémicas transitorias de escasa gravedad.

Los factores que afectan a la colonización son:

- Serotipo de *Salmonella*.
- Edad del pollo (resistencia con la edad).
- Estrés (desequilibrio orgánico) y condiciones ambientales (humedad y temperatura).
- Enfermedades digestivas, coccidiosis, enteritis necrótica.

El lugar principal de colonización son los ciegos, lo que facilita la transmisión horizontal al producirse la contaminación de las heces (que facilita la contaminación de los huevos durante la puesta y de las canales durante el sacrificio y eviscerado) con probable retroinfección del tracto reproductor.

En el animal vivo los macrófagos, en los que las salmonellas sobreviven y se multiplican, son incapaces de eliminar la infección, contribuyendo a su difusión, incluido el tracto reproductor. La respuesta innata, que es diferente según el serotipo, y que se exalta en presencia de interferón gamma (IFN-g) que la modula, también puede contribuir

a la difusión sistémica, incluyendo la infección de los ovarios y la contaminación de los huevos. La condición de portador asintomático se conoce mal y se comprende peor, pudiendo estar influenciada por la capacidad de colonización y la respuesta humoral, siendo más efectiva en el aclaramiento la respuesta local.

Aparte de las oportunidades de contaminación endógena de los huevos, durante su formación, a partir de casos de infección ovárica (transmisión vertical), habitualmente se produce contaminación superficial de la cáscara a partir de las heces, en la cloaca, en los nidales, en la cinta transportadora, en los sistemas colectores hasta el centro de clasificación, etc., siendo particularmente vulnerables los huevos con fisuras, rotos o con cualquier otro tipo de deficiencia, lo que les convierte en fuentes de infección para huevos sanos.

En el hogar o la industria, los huevos con cáscara contaminada también son fuentes potenciales de contaminación para el producto, durante la manipulación previa al consumo.

1.3. Legislación

En España, la vigilancia y control de *Salmonella* se lleva a cabo desde 1993, de acuerdo con la Directiva 92/117/CEE, del Consejo, relativa a medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos. Esta vigilancia y control han estado centrados en *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

En 2004 los denominados entonces Ministerios de Sanidad y Consumo, y de Agricultura, Pesca y Alimentación, presentaron conjuntamente un Programa de Control de *Salmonella* en Huevos y Ovoproductos.

La iniciativa nacía con el firme propósito de disminuir la incidencia y prevalencia de infecciones mediante actuaciones de control en toda la cadena alimentaria. El control de este patógeno en todas las etapas de la cadena de procesamiento de alimentos, constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la salmonelosis. El mercado nacional e internacional, para proteger la salud de sus

compradores, exige que todos los productos de consumo estén libres de patógenos como *Salmonella spp.*

Con la puesta en marcha del programa, se iniciaron líneas de actuación en las que conjugaban aproximaciones «desde la microbiología, la epidemiología, la profilaxis higiénica y terapéutica, el control oficial y el autocontrol, la comunicación y la educación para la salud».

Una de las líneas de trabajo del Programa fue el desarrollo de actividades específicas en granjas ya que las granjas son uno de los puntos con más riesgo de que se produzca contaminación por *Salmonella*. En este apartado, destacó la Implantación de un Programa Nacional de Vigilancia y Control en avicultura.

El Programa Nacional de Vigilancia y Control en avicultura exige el control de *Salmonella* mediante análisis microbiológicos periódicos para evitar el consumo de aves y huevos contaminados. Como medida preventiva se deben analizar las vísceras, meconio, heces frescas o calzas absorbentes, gamuzas, revestimientos internos de las cajas, piensos, polvo y agua. En caso de detectarse *Salmonella* en alguna de las muestras se adoptarán las medidas oportunas para evitar cualquier situación de riesgo. Estas medidas incluyen la destrucción de los huevos y el sacrificio de las aves de la manada infectada, así como la eficiente y completa limpieza de las instalaciones y la posterior desinfección, desinsectación y desratización.

Las medidas de vigilancia, prevención y control contempladas el programa han sido muy efectivas ya que se ha detectado una disminución constante del número de notificaciones de *S. Enteritidis*. Esta disminución también se ha detectado en el número de brotes notificados por este patógeno en España y en el número de notificaciones de salmonelosis en Europa.

La efectividad de las medidas de control no está tan clara en *S. Typhimurium*. El número de notificaciones de este serotipo no ha disminuido a lo largo del periodo de estudio sino que parece estar aumentando. Esto podría ser debido a que la transmisión para este serotipo no está tan asociada al consumo de huevos y ovoproductos contaminados y, por lo tanto las medidas de control podrían no ser tan efectivas. Además, esto puede indicar un reemplazo del serotipo *S. Enteritidis* por el serotipo *S. Typhimurium* (Figura2).

2. OBJETIVO

Como consecuencia de la elevada cantidad de casos de salmonelosis, que se producen como consecuencia del consumo de huevos y pollos contaminados con *Salmonella*, se exige el control de dicho microorganismo en estos productos, lo que supone un importante gasto económico. En los mataderos y granjas avícolas debido al elevado número de muestras a analizar (heces, cajas, piensos, agua, etc.) el gasto económico aún es mayor.

El objetivo principal del presente proyecto es validar una estrategia de análisis de *Salmonella* en huevo y pollo que permita garantizar la fiabilidad del ensayo, utilizar técnicas más avanzadas (inmuno-concentración) y al mismo tiempo aumentar el espacio muestral realizando un número menor de análisis y por lo tanto, a un coste más ajustado, con el fin de aplicarlo en granjas y mataderos de pollos.

La reducción del número de análisis se consigue mediante una estrategia preanalítica de composición de muestras simple. El propio método de detección, con una fase inicial de enriquecimiento, combinada con la elevada sensibilidad del método (inmunoconcentración), permite partir del supuesto de la detección fiable del microorganismo en una muestra compuesta por la mezcla de 5 muestras individuales a partir de un único componente individual positivo a nivel de límite de detección.

Se considera que combinar 5 muestras es lo más adecuado ya que supondría un ahorro del 80% en el caso de que el resultado del análisis fuera negativo y solo un incremento del 20% en el caso de que el resultado fuera positivo, ya que en este caso habría que repetir el análisis de las cinco muestras de forma individual para detectar cuál de ellas tiene *Salmonella*. Dada la elevada prevalencia de *Salmonella*, muestras compuestas por un número superior aumentarían excesivamente la probabilidad de que una muestra individual fuera positiva y con ello, tener que repetir las todas individualmente para determinar cual de ellas es la positiva.

Además de validar la estrategia preanalítica se van a comparar los resultados obtenidos al realizar una inmunoconcentración y un método tradicional con la finalidad de emplear el método más adecuado para cada situación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Aparatos y material

Asas de siembra estériles
Autoclave
Balanza de precisión 0.01g
Bolsa estéril de masticador
Cabina de flujo laminar
Diluctor
Estufa de incubación
Gradillas
Masticador
Mechero de alcohol
Mini-Vidas
Placas de petri
Pinzas y tijeras de acero inoxidable
Probeta de vidrio graduada
Pipetas y puntas estériles

3.2. Reactivos y productos

Agua desmineralizada
Agua de peptona tamponada APT
Alcohol de 70°
Galerías API 20E (Biomérieux) y reactivos
Kit Vidas Inmuno-Concentración Salmonella II (ICS2)
Medio de enriquecimiento selectivo Selenito
Medios sólidos selectivos en placa: Agar SM-ID, Agar Hecktoen (HE), Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD).
Parafina
Solución salina estéril

3.3. Inóculo

Para realizar la validación se inocularon las muestras comprobadas previamente como negativas con una concentración conocida de la cepa de *Salmonella entérica* CETC 4300 (CP0003).

Para determinar la concentración del inóculo adicionado, es necesario caracterizar el inóculo de partida. Para ello, se siembra una placa de agar Hecktoen con la *Samonella entérica* CETC 4300 (CP0003) y se incuba a 37°C durante 24 horas.

Tras la incubación se seleccionan de 3 a 5 colonias frescas de 1mm de diámetro aproximadamente y se resuspenden en 2ml de solución salina estéril. Se ajusta la carga bacteriana a una turbidez de 90 ± 3 UNF y se hacen diluciones seriadas.

Se calcula el inóculo para un recuento teórico aproximado a límite de detección 5ufc/25g (=5ufc/250ml). De acuerdo con la estandarización, para 0,3ml de la dilución 10^{-6} el resultado esperado es 138ufc, por lo tanto, en 0,012ml de la dilución 10^{-6} habrá 5,5ufc (teórico).

Para ajustar el inóculo teórico al realmente adicionado, se siembran 3 placas de medio Hecktoen con 0,1ml de la dilución 10^{-6} y tras la incubación se comprueba que el número de colonias coincide con el esperado.

3.4. Muestras

Se han utilizado 4 muestras de pollo fresco troceado y 2 muestras de huevos de tamaño medio. Las muestras se tomaron el 16 de enero de 2012 en una cadena de distribución de venta al público. (ver Anexos)

1. Pechuga de pollo
2. Contramuslo de pollo
3. Zanco de pollo
4. Ala de pollo
5. Huevo (yema + clara)
6. Huevo completo

3.5. Procedimiento de análisis

Para validar un método de análisis de *Salmonella* en huevo y pollo se siguen los siguientes pasos:

1. Se analizan las muestras de pollo y los huevos para garantizar que no presentan *Salmonella*.
2. Se preparan los inóculos a nivel de límite de detección y se verifican mediante controles por triplicado.
3. Se inoculan las muestras con una cantidad de *Salmonella* conocida y se analizan de nuevo tras su inoculación.
4. Se realiza la mezcla de las muestras inoculadas y no inoculadas y se analizan para comprobar si se detecta *Salmonella* al mezclar muestras positivas y negativas.

Debido a que el procedimiento es de detección, se autoclavan las muestras positivas para eliminar la *Salmonella* presente en ellas antes de inocularlas con una cantidad conocida.

A continuación, se describe de manera detallada el procedimiento a seguir para realizar la validación del método.

La investigación de *Salmonella spp.* está estructurada en cuatro fases sucesivas: (ver Anexos)

- Preparación de la muestra y preenriquecimiento en agua de peptona tamponada durante 18 ± 2 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Los microorganismos del género *Salmonella* pueden encontrarse en pequeña cantidad y mezclados con otros interferentes más numerosos. El preenriquecimiento es también necesario para recuperar microorganismos lesionados.
- Inmunoconcentración. Tras la incubación, se inocula en el material específico (ICS) para el proceso de inmunoconcentración automática con Mini-Vidas, que los aísla de interferentes.

Nota: la inmunoconcentración se compara con el procedimiento tradicional mediante un enriquecimiento selectivo en selenito.

- Aislamiento e identificación. A partir del inmunoconcentrado obtenido se realiza la siembra en dos medios selectivos sólidos: placa con medio Agar Hektoen (HE) y placa con medio Agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato) o medio Agar SM (cromógenos con sustrato glucuronato). Las placas se incuban a 37°C y se examinan a las 24h para comprobar si tienen colonias sospechosas de ser *Salmonella spp.*
- Confirmación: Si hay colonias sospechosas es necesaria confirmación con pruebas bioquímicas y serológicas.

3.5.1. Preparación de la muestra y preenriquecimiento

Se debe trabajar en condiciones de asepsia. Para ello, se realizará la manipulación de las muestras siempre en cabina de flujo laminar o con el mechero de alcohol encendido. Además, todos los elementos que entren en contacto con la muestra deben ser estériles.

Preparación previa de muestra

Productos cárnicos:

Tomar una muestra representativa (25 gramos) y cortarla en trozos de 0,5 – 1 cm.

La fracción de alimento destinada a su análisis debe ser representativa de la totalidad de la muestra. Si el alimento está integrado por distintos componentes se tomarán fracciones representativas de cada uno de ellos, tanto en superficie como en profundidad.

Lavar con alcohol y flamear el material de trabajo necesario para la manipulación entre operación y operación y trabajar con el mechero de alcohol encendido.

Huevos:

El análisis de los huevos puede realizarse con o sin esterilización de la cáscara.

Para la detección de la flora total (cáscara+yema+clara) no es necesario esterilizar los huevos antes de abrirlos. Los huevos se abren utilizando técnicas asépticas y se introduce la cáscara y su contenido en un recipiente estéril.

Para la detección de la flora interna (yema+clara) es necesaria la esterilización. Para ello, se quita cualquier suciedad de la cáscara con un paño y agua. Utilizando una toallita empapada en alcohol al 70% se limpia toda la superficie y se deja secar completamente sin contaminación. A continuación, se rompe el huevo y se abre asépticamente introduciendo el contenido en un recipiente estéril.

Pesada de la muestra

Se pesan 25 gramos de cada muestra en bolsas estériles del masticador (previa tara) para evitar contaminación en su manipulación.

La porción de muestra a analizar se introduce en la bolsa del masticador utilizando material de trabajo estéril y flameado entre operación y operación.

Evitar manipular la muestra en el interior de la bolsa si la cantidad pesada no se ajusta exactamente a la especificada (excepcionalmente hasta el 5%). Si la diferencia es mayor manipular la muestra con el mayor cuidado posible.

Adición del diluyente y preenriquecimiento

El peso de la muestra en gramos se multiplica por 9 y el resultado indica el volumen de diluyente en mililitros que es necesario añadir para obtener la dilución 1:10 (suspensión madre).

En nuestro caso, como hemos pesado 25g de muestra en cada bolsa, para preparar la suspensión madre, se añaden 225ml del medio de preenriquecimiento (agua de peptona tamponada).

Para evitar alteraciones de crecimiento de microorganismos por cambios bruscos de temperatura, el diluyente debe estar a temperatura ambiente.

El diluyente se transfiere de modo aséptico a la bolsa estéril de masticador que contiene la muestra.

Se homogenizar en el ‘masticador’ durante 1-2 minutos (nunca más de 2 minutos), pudiendo variar ese tiempo en función de la textura y composición de la muestra. Deben tomarse precauciones especiales cuando exista riesgo de rotura de la bolsa (presencia de partículas o componentes de la muestra con formas afiladas o duras) o de componentes de difícil homogeneización.

Incubar la suspensión madre en la bolsa de masticador en recipiente que garantice su estabilidad a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

En muestras ácidas o acidificantes comprobar tras la incubación que el pH es mayor a 4,5.

Para garantizar un correcto flujo de aire, las bolsas deberán colocarse en grupos de 8-10 unidades como máximo, separados entre sí y de las paredes del incubador por lo menos 25mm.

*Nota: El tiempo de preparación desde la preparación de la suspensión inicial hasta el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo nunca debe exceder los 45 minutos.

3.5.2. Inmunoconcentración

Inmunoconcentración en MiniVidas

Sacar los reactivos necesarios de la nevera (Vidas Inmuno-Concentración Salmonella ICS) y dejar atemperar 30 minutos. Utilizar un cartucho “código ICS” y un cono “ICS” para cada muestra.

Homogenizar mediante agitación las muestras y el estándar a analizar y transferir asepticamente mediante pipeta con punta estéril 0.8ml del caldo de preenquecimiento (sustituir por el estándar cuando se efectúe la calibración) al pocillo 4 para realizar la inmunoconcentración. Las puntas de pipeta estériles son de un único uso, cambiar entre cada muestra.

Colocar en el sistema los conos y los cartuchos y programar las muestras. Iniciar el análisis (ejecución automática). La etapa de inmunoconcentración se completa en 40 minutos aproximadamente.

*Nota: Las muestras inmunoconcentradas deben ser utilizadas en la media hora que sigue a la finalización del test.

Enriquecimiento selectivo en Selenito

Homogenizar mediante agitación las muestras y transferir mediante pipeta estéril 1ml del caldo de preenriquecimiento en un tubo con 9ml de Selenito.

Incubar los tubos a $43 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 ± 4 horas.

3.5.3. Aislamiento e identificación

Siembra e incubación de las placas

En cámara de flujo laminar, transferir una alícuota del inmunoconcentrado con un asa estéril calibrada de 0.1ml a dos placas de Petri, una con Agar Hektoen y otra con XLD o SM. Sembrar con aislamiento permitiendo el desarrollo de colonias bien aisladas. Repetir el proceso para cada una de las muestras.

Mantener las placas cerradas y sin invertir mientras el inóculo no se absorbe (5-10 minutos). Si pasado este tiempo el inóculo todavía no se absorbe, colocar la placa en el incubador e invertirla tras 10-20 minutos.

Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 ± 4 horas.

Si es posible, la estufa de incubación no se llenará completamente en una única operación, para evitar tiempos prolongados de estabilización. Para garantizar un correcto flujo de aire, las placas deberán colocarse en pilas de 6 unidades como máximo, y separadas entre sí y de las paredes del incubador por lo menos 25mm.

Con las muestras en selenito se sigue el mismo proceso una vez se hallan incubado.

Examen de las placas

Después de la incubación las placas deben ser examinadas inmediatamente. Si no es posible, se almacenarán un máximo de 24 horas en nevera.

Se examinan las placas y se identifica como presunta *Salmonella* spp. toda colonia sospechosa.

- Las colonias típicas de *Salmonella* cultivadas en Agar Hektoen (HE) son verdes con el centro negro; verdes sin centro negro (no productoras de sulfhídrico) ó amarillas con centro negro (lactosa positivas).
- Las colonias típicas de *Salmonella* en Agar XLD son de color de rosa a rojo con o sin centro negro.
- Las colonias típicas de *Salmonella* en SM son de color de rosa a veces con un contorno incoloro.

Nota. Deben de confirmarse las colonias típicas y las dudosas, porque independientemente de la experiencia, su aspecto puede variar no sólo de una especie a otra sino también de un lote de medio de cultivo a otro.

3.5.4. Pruebas de confirmación

Es necesaria siempre la confirmación de las colonias sospechosas.

Para realizar la confirmación bioquímica vamos a utilizar un test bioquímico para Enterobacteriaceae de la galería API 20E. (ver Anexos)

Este tipo de tests incluyen una batería de pruebas bioquímicas que nos permiten reducir el tiempo y el trabajo necesario para la realización de cada uno de los análisis.

Seleccionar una colonia considerada típica o sospechosa (preferentemente con aspecto morfológico diferente) en cada placa.

Resuspender cada colonia en agua salina y realizar un test bioquímico para Enterobacteriaceae de la galería API 20E para cada muestra.

Incubar a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas.

Muestras inoculadas con *Salmonella*

Los análisis realizados en las muestras adquiridas en una cadena de distribución indican presencia de *Salmonella* en las 4 muestras de pollo.

Para poder garantizar la validez del estudio se autoclavan las muestras para eliminar la *Salmonella* y mantener el efecto matriz en la medida de lo posible. La muestra de huevo completo se descarta (evitamos problemas de procesamiento de muestra dado que en ocasiones la cáscara perfora la bolsa del masticador) y la muestra de contenido de huevo no necesita autoclavarse porque no presenta salmonella.

Una vez autoclavadas se pesa 25 gr de cada muestra y se añade el agua de peptona tamponada tal y como se indica en el apartado anterior. Cada muestra se hace por duplicado.

Se añade el inóculo en cada bolsa: en las muestras se añaden 0,08ml de la dilución 10^{-5} y en los duplicados 0,02ml de la dilución 10^{-6} .

Homogeneizar el contenido de las bolsas de masticador e incubar a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

Tras la incubación se realiza la inmunocentración en MiniVidas, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, de las muestras y los duplicados.

Además, dos de las muestras y sus duplicados se inoculan también en tubos con selenito y se incuban a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20 ± 4 horas.

El inmunocentrado se siembra con asa de siembra de 0,1ml en placas con medio de cultivo Agar Hektoen y XLD o SM y se incuba a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20 ± 4 horas.

Tras la incubación de los tubos con selenito se siembran placas de Agar Hektoen y se incuban a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20 ± 4 horas.

Realizar la comprobación bioquímica de las colonias sospechosas mediante un test bioquímico para Enterobacteriaceae de la galería API siguiendo las instrucciones indicadas anteriormente e incubar a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas.

Muestras compuestas

Cada muestra compuesta está formada por cinco muestras individuales. (ver Anexos)

Para realizar el análisis de las muestras compuestas se parte de la solución madre de cada muestra.

Descartamos realizar la combinación de la muestra antes del preenriquecimiento pesando 5gr de cada muestra en una sola bolsa de masticador porque si la mezcla se hace tras el enriquecimiento de 25 gramos de cada muestra por separado se consigue que la toma de muestra sea más representativa.

En 2 tubos se añaden 1ml de la solución madre de 4 muestras antes de añadirle el inóculo y 1 ml de la solución madre de una muestra tras añadirle el inóculo.

En los otros 2 tubos se añaden 1ml de la solución madre de 4 muestras antes de añadirle el inóculo y 1 ml de la solución madre de un duplicado tras añadirle el inóculo.

Se realiza la inmunoconcentración en MiniVidas de los 4 tubos, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Se inoculan también 4 tubos con Selenito y se incuban a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20 ± 4 horas.

El inmunoconcentrado se siembra con asa de siembra de 0,1ml en placas con medio de cultivo Agar Hektoen y SM.

Tras la incubación de los tubos con selenito se siembran placas de Agar Hektoen y se incuban.

Realizar la comprobación bioquímica de las colonias sospechosas mediante un test bioquímico para Enterobacteriaceae de la galería API siguiendo las instrucciones indicadas anteriormente e incubar a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas.

4. RESULTADOS

El análisis microbiológico de las muestras tomadas en una cadena de distribución ha determinado que las 4 muestras de pollo están contaminadas con *Salmonella*.

Id	Placa HE	API 20E
M1	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M2	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M3	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M4	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M5	Ausencia de colonias	Ausencia/25gr
M6	Ausencia de colonias	Ausencia/25gr

Tabla1. Resultados de las muestras individuales.

Los resultados de las muestras de huevos indican que no están contaminados con *Salmonella* ni con otros microorganismos ya que en las placas tampoco han crecido otras colonias.

Verificación del inóculo

Para verificar el inóculo se siembran 3 placas de medio Hecktoen con 0,1ml de la dilución 10^{-6} . Tras la incubación se hace el recuento de las colonias de cada placa y se obtienen los siguientes resultados.

Placa HE	Recuento de colonias
1	22ufc/0,1ml
2	23ufc/0,1ml
3	15ufc/0,1ml

Tabla2. Recuento de las colonias de *Salmonella*

$$\frac{22 + 23 + 15}{3} = 20\text{ufc}/0.1\text{ml}$$

El inóculo que hemos utilizado para realizar la validación del método de análisis de *Salmonella* tiene una concentración de 20 ufc/0,1ml de la dilución 10^{-6} .

Muestras y duplicados inoculados con *Salmonella*

Las muestras y sus duplicados fueron sometidos a un proceso de esterilización y posteriormente inoculados con una cantidad conocida de *Salmonella*.

De acuerdo con la estandarización, para 0,3ml de la dilución 10^{-6} el resultado esperado es 138ufc (teórico) por lo tanto, en 0,1ml es de 46ufc. Sin embargo, este dato no es real, ya que se ha comprobado que el inóculo en realidad tiene 20ufc/0,1ml de la dilución 10^{-6}

$$20\text{ufc} \longrightarrow 0,1\text{ml}$$

$$x \longrightarrow 0,02\text{ml}$$

$$x = (20 \times 0,02) / 0,1 = \mathbf{4\text{ufc}}$$

$$20\text{ufc} \longrightarrow 0,1\text{ml}$$

$$x \longrightarrow 0,008\text{ml}$$

$$x = (20 \times 0,008) / 0,1 = \mathbf{1,6\text{ufc}}$$

Según los resultados obtenidos al ajustar la concentración del inóculo las muestras fueron inoculadas con 4ufc y los duplicados con 1,6ufc.

Las muestras y sus duplicados se analizaron mediante una inmunocentración y un método tradicional de enriquecimiento selectivo en Selenito.

- Inmunocentración

Id	Placa HE	Placa XLD	Placa SM	API E20
M1.1	Colonias sospechosas		Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M2.1	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas		Presencia/25gr
M3.1	Colonias sospechosas		Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M4.1	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas		Presencia/25gr
M5.1	Colonias sospechosas		Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M1.2	Colonias sospechosas		Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M2.2	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas		Presencia/25gr
M3.2	Colonias sospechosas		Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M4.2	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas		Presencia/25gr
M5.2	Colonias sospechosas		Colonias sospechosas	Presencia/25gr

Tabla3. Resultados obtenidos por inmunocentración

- Enriquecimiento selectivo en Selenito

Id	Placa HE	API E20
M1.1	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M5.1	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M1.2	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
M5.2	Colonias sospechosas	Presencia/25gr

Tabla4. Resultados obtenidos por enriquecimiento selectivo.

Como era de esperar tras la inoculación el resultado de todas las muestras ha sido positivo para *Salmonella*.

Además, no se aprecian diferencias en los resultados obtenidos. Independientemente del método utilizado para el análisis (inmunoconcentración o método tradicional con enriquecimiento selectivo en selenito) o del medio de cultivo empleado (HE, XLD, SM).

Muestras compuestas

Las muestras compuestas están formadas por la combinación de las muestras sin inocular con las muestras y duplicados inoculados con *Salmonella*.

Se analizaron por inmunoconcentración y por el método tradicional con enriquecimiento selectivo en selenito obteniendo los siguientes resultados:

- Inmunoconcentración

Id	Placa HE	Placa SM	API E20
T1	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
T2	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
T3	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
T4	Colonias sospechosas	Colonias sospechosas	Presencia/25gr

Tabla5. Resultados obtenidos por inmunoconcentración

- Enriquecimiento selectivo en Selenito

Id	Placa HE	API E20
T1	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
T2	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
T3	Colonias sospechosas	Presencia/25gr
T4	Colonias sospechosas	Presencia/25gr

Tabla6. Resultados obtenidos por enriquecimiento selectivo.

Todas las muestras compuestas fueron positivas para *Salmonella* y además, se obtuvieron los mismos resultados por inmunoconcentración y por el método tradicional.

5. CONCLUSIONES

La salmonelosis humana es una de las principales zoonosis de transmisión alimentaria tanto a nivel mundial como a nivel europeo y nacional y provoca graves consecuencias económicas, sociales y sanitarias.

Los huevos y los productos derivados del huevo constituyen el principal vehículo de las salmonelosis humanas tanto en Europa, en particular en España, como en muchos otros países, seguido de la carne y los productos cárnicos.

Aunque la venta de alimentos con presencia de *Salmonella* está prohibida es muy importante extremar las precauciones a la hora de manipular los alimentos en casa porque, como se ha comprobado en este estudio, puede haber productos de venta al público con *Salmonella*.

Los controles microbiológicos son imprescindibles para reducir el riesgo de contaminación de los consumidores por eso, es muy importante investigar métodos más eficaces.

Los resultados obtenidos en el estudio confirman que nuestro método es suficientemente sensible y específico para evitar que el efecto de la dilución tras la combinación de las muestras afecte a la detección del microorganismo.

Se logra aislar la *Salmonella* incluso cuando se combinan 4 muestras negativas con una muestra positiva inoculada con $<2\text{ufc/ml}$ (5 veces por debajo del límite de detección utilizado en la validación habitual de las técnicas de detección).

La combinación de muestras supondrá un considerable ahorro económico de manera que se podrán ampliar los puntos de muestreo, reducir la frecuencia de muestreo, etc. para lograr un control más eficaz.

La reducción aún será mayor si el método se aplica en las granjas o mataderos de pollos donde el número de muestras que requieren análisis de detección de *Salmonella* es muy elevado. Además, este método también se podría emplear en otras matrices como heces, calzas, aguas, piensos, etc

En relación a la comparación efectuada entre la inmunoconcentración y el método tradicional de enriquecimiento selectivo en selenito podemos afirmar que cualquiera de los métodos es válido para detectar *Salmonella* en las muestras compuestas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araceli Castro [et al.]. *El género "enterococcus" en microbiología de los alimentos*. Universidad de Jaén, 2004
- Bibek Ray, Arun Bhunia; traducción Rubén Israel Sánchez Monsiváis, Diana Guadalupe Pineda Sánchez. *Fundamentos de microbiología de los alimentos*. McGraw-Hill Interamericana, cop. 2008
- Cansian RL; Floriani STR; Valduga E *Microbiological analysis of critical points in the chicken industry*. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Volume: 48 Issue: 3 Pages: 403-406 Published: MAY 2005
- Frances Pouch Downes, Keith Ito. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, 2001
- Hardy A. *Salmonella: a continuing problem*. POSTGRADUATE MEDICAL JOURNAL Volume: 80 Issue: 947 Pages: 541-545 Published: SEP 2004
- Oscar TP. *A quantitative risk assessment model for Salmonella and whole chickens*. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY Volume: 93 Issue: 2 Pages: 231-247 Published: JUN 2004
- Pascual Anderson, María del Rosario. *Microbiología alimentaria metodología analítica para alimentos y bebidas*. Díaz de Santos, 2000.
- *Microbiología de los alimentos: normas UNE*. AENOR, 2010. (CD-ROM)
- <http://www.aesan.msc.es/>
- <http://www.codexalimentarius.net>
- <http://www.efsa.europa.eu/>
- <http://www.isciii.es>
- <http://www.fao.org/>

7. ANEXOS

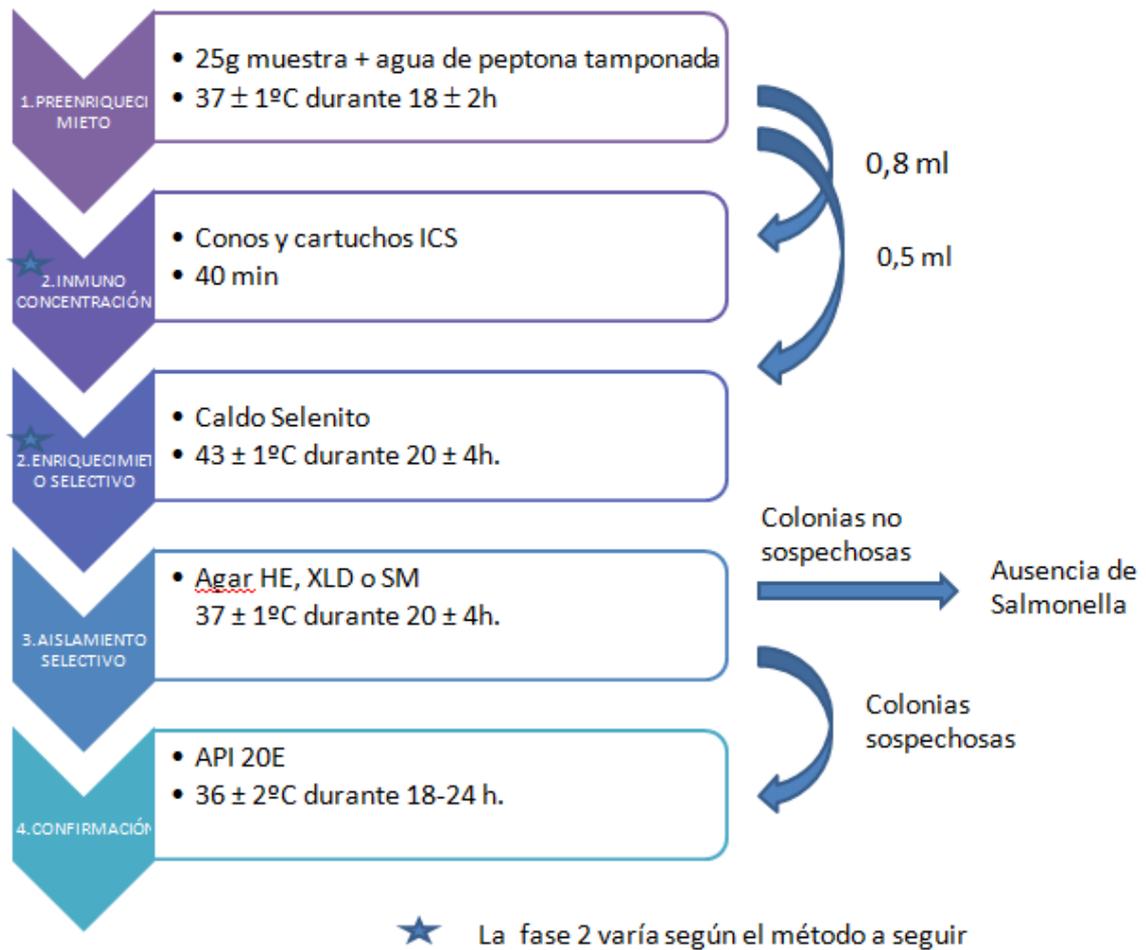
Tablas de identificación de muestras

Código de identificación	Descripción
M1	Pechuga de pollo
M2	Contramuslo de pollo
M3	Zanco de pollo
M4	Ala de pollo
M5	Huevo (yema + clara)
M6	Huevo completo

Código de identificación	Muestra	Inóculo
M1.1	M1	<5ufc
M2.1	M2	<5ufc
M3.1	M3	<5ufc
M4.1	M4	<5ufc
M5.1	M5	<5ufc
M1.2	M1	<2ufc
M2.2	M2	<2ufc
M3.2	M3	<2ufc
M4.2	M4	<2ufc
M5.2	M5	<2ufc

Código de identificación	Muestras combinadas
T1	M1 + M2 + M5 + M3 + M1.1
T2	M5 + M2 + M4 + M3 + M5.1
T3	M2 + M1 + M4 + M5 + M1.2
T4	M1 + M3 + M5 + M4 + M5.2

Esquema de detección de *Salmonella*



Medios de cultivo

1) Agar Hektoen

Se emplea como medio selectivo para el aislamiento y diferenciación de Enterobacterias patógenas en gran diversidad de muestras. Está indicado para la diferenciación de *Salmonella* y *Shigella*.

Fundamento

Por la presencia de los dos indicadores se diferencian las colonias de bacterias lactosa positivas de las lactosa negativas, las primeras toman un color amarillo anaranjado y las segundas un azul verdoso. Los microorganismos que fermentan la sacarosa y la salicina también toman un color amarillo anaranjado. La presencia de sacarosa y salicina evita la selección de patógenos falsamente positivos. Con el Sodio Tiosulfato y el Amonio Hierro(III) Citrato se detectan los productores de Hidrógeno Sulfuro por el precipitado negro de Hierro Sulfuro que presentan en el centro de las colonias. La presencia de sales biliares inhibe el crecimiento de una gran parte de la flora acompañante.

Composición (g/l):

Amonio Hierro(III) Citrato	1,5
Azul de Bromotimol	0,064
Extracto de Levadura	3,0
Fucsina Acida	0,1
Lactosa	12,0
Peptona de Carne	12,0
Sacarosa	12,0
Sales Biliares	9,0
D(-)-Salicina	2,0
Sodio Cloruro	5,0
Sodio Tiosulfato	5,0
Agar	14,0

2) XLD, Agar

Medio de cultivo para el aislamiento de Enterobacterias patógenas, especialmente *Salmonella* y *Shigella*

Fundamento:

El Sodio Desoxicolato inhibe el crecimiento de la flora contaminante Gram-positiva. La mayoría de las Enterobacterias patógenas, a excepción de la *Shigella*, fermentan la D(+)-Xilosa. El ácido producto de la fermentación de la D(+)-Xilosa, de la lactosa o de sacarosa produce un viraje a amarillo del Rojo de Fenol contenido en el medio. Los microorganismos que descarboxilan la lisina, como *Salmonella*, se reconocen por presentar colonias rojo-anaranjadas debido al aumento del pH que han provocado en el medio y el consecuente viraje del Rojo de Fenol. Además por la presencia de Sodio Tiosulfato y Amonio Hierro(III) Citrato las bacterias productoras de hidrógeno sulfuro dan colonias ennegrecidas siempre y cuando el pH del medio se mantenga alto.

Composición (g/l)

Amonio Hierro(III) Citrato	0,8
Sacarosa	7,5
Extracto de Levadura	3,0
Sodio Cloruro	5,0
Lactosa	7,5
Sodio Desoxicolato	1,0
L-Lisina	5,0
Sodio Tiosulfato	6,8
Rojo de Fenol	0,08
D(+)-Xilosa	3,75
Agar	13,5

3) Agar SM ID

Medio cromogénico y selectivo para la detección de *Salmonella spp.* responsable de patología humana.

Fundamento:

El medio SM contiene 2 sustratos originales: el Glucuronato y la β -galactosidasa. El Glucuronato es metabolizado por la *Salmonella* originando colonias de color rosa y la β -galactosidasa se manifiesta por un precipitado azul del sustrato cromogénico. La combinación de estos dos sustratos optimiza la detección de *Salmonella*.

Composición (g/l)

Peptona de caseína y carne	6
Extracto de levadura	2
Sales biliares	4
Rojo neutro	0'025
Tampón tris	0'65
Verde brillante	0'3
Sustrato cromogénico galactopiranosida	0'17
Glucuronato sódico	12
Glucopiranosida	0'025
Sorbitol	8
Agar	13'5



Colonias típicas de *Salmonella* en los medios de cultivo Agar Hecktoen, XLD y SM.

Galería API 20E

La batería de pruebas API20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram -. Básicamente consta de 21 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta.

Pruebas bioquímicas de la galería:

Prueba	Reacción / Enzimas
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Utilización del citrato
H ₂ S	Producción de H ₂ S
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Producción de indol
VP	Producción de acetoína (Voges-Proskauer)
GEL	Gelatinasa
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa
MAN	Fermentación/oxidación de manitol
INO	Fermentación/oxidación de inositol
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa
OX	Citocromo oxidasa

