

# *Investigación de Salmonella spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos*



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

ESCOLA SUPERIOR D'AGRICULTURA DE BARCELONA (ESAB)

TRABAJO FINAL DE GRADO

Tutora: Rosa Carbó Moliner

Autora: Agostina Robledo López

24/04/2015

# RESUMEN

---

*Salmonella* es, desde hace tiempo, objeto de diversos estudios debido a la complejidad que presenta el género. Desde un principio, la dificultad de clasificarlo de manera clara ha creado controversias y diferencias de opinión que han llevado a los investigadores a trabajar con varios sistemas y esquemas de clasificación. Con el fin de prevenir y tratar de manera eficaz esta bacteria, se han ido desarrollando, a lo largo de las últimas décadas, métodos de detección más específicos y rápidos. Además, la necesidad de las empresas de obtener resultados fiables y en menor tiempo ha ido en aumento hasta el día de hoy. En el trabajo se realiza la investigación de *Salmonella* spp en alimentos mediante método tradicional ISO 6579, método de inmunofluorescencia (ELFA) y método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos, con el objetivo de obtener datos cuantitativos y una ampliación de la validación de un método inmunoenzimático. Los resultados obtenidos muestran fiabilidad y seguridad en la utilización de las tres técnicas de detección. Los métodos inmunoenzimáticos responden positivamente a las necesidades de las empresas por obtener resultados en poco tiempo (24-48 horas). Ciertos grupos de alimentos, como las carnes frescas, muestran niveles de presencia y ausencia de *Salmonella* más altos que otros grupos, según el método utilizado. La ampliación de la validación ha permitido mejorar las condiciones de preparación de la muestra en huevos y carnes de ave de corral.

**Palabras clave:** *Salmonella*, método inmunoenzimático, método por inmunofluorescencia, método tradicional ISO 6579.

# RESUM

---

*Salmonel·la* és, des de fa temps, objecte de diversos estudis degut a la complexitat que presenta el gènere. Des d'un principi, la dificultat de classificar-lo de manera clara ha creat controvèrsies i diferències d'opinió que han portat als investigadors a treballar amb diversos sistemes i esquemes de classificació. Per tal de prevenir i tractar de manera eficaç aquest bacteri, s'han anat desenvolupat, al llarg de les últimes dècades, mètodes de detecció més específics i ràpids. A més, la necessitat de les empreses d'obtenir resultats fiables i en menys temps ha anat en augment fins al dia d'avui. En el treball es realitza la investigació de *Salmonel·la* spp en aliments mitjançant el mètode tradicional ISO 6579, mètode d'immunofluorescència (ELFA) i mètode inmunoenzimàtic (ELFA) amb proteïnes recombinats de fagos, amb l'objectiu d'obtenir dades quantitatives i una ampliació de la validació d'un mètode inmunoenzimàtic. Els resultats obtinguts mostren la fiabilitat i la seguretat en la utilització de les tres tècniques de detecció. Els mètodes inmunoenzimàtics responen positivament a les necessitats de les empreses per obtenir resultats en poc temps (24-48 hores). Certs grups d'aliments, com les carns fresques, mostren nivells de presència i absència

de *Salmonella* més alts que altres grups, segons el mètode utilitzat. L'ampliació de la validació ha permès millorar les condicions de preparació de la mostra en ous i carns d'au de corral.

**Paraules clau:** *Salmonella*, mètode immunoenzimàtic, mètode per immunofluorescència, mètode tradicional ISO 6579.

## ABSTRACT

---

*Salmonella* is, for a long time, the subject of several studies due to the complexity presented by the genus. From the beginning, the difficulty of classifying it in a clearly way, has created controversies and different opinions that have led researchers to work with multiple systems and classification schemes. In order to prevent and treat this bacteria in an effectively form, some specific and rapid detection methods have been developed over the last decades. In addition, the necessity of the companies of obtaining reliable results in less time has increased until today. In the project there is a *Salmonella* spp investigation in food using the traditional method ISO 6579, immunofluorescence (ELFA) method and immunoenzimatic (ELFA) with recombinant phage protein method, in order to obtain quantitative data and finally an extended validation of an immunoenzimatic method. The results obtained show trustworthiness and certainty in the three detection techniques used. The immunoenzimatic methods respond positively to the needs that companies have of obtaining results in a short period of time (24-48 hours). Certain food groups such as fresh meat, levels of presence and absence of *Salmonella* are higher than in other groups, depending on the method used. The extension of the ratification has allowed improving the conditions of the sample preparation in eggs and poultry meat.

**Key words:** *Salmonella*, immunoenzimatic method, immunofluorescence method, traditional method ISO 6579.

# AGRADECIMIENTOS

---

Quiero hacer partícipe de este trabajo a todas aquellas personas que de una manera u otra me han ayudado durante todo este tiempo.

En especial, a la tutora de este proyecto, Rosa Carbó por facilitarme tanto el trabajo, guiarme siempre y darme buenos consejos. Incluso por estar dispuesta en todo momento, hasta para recibir correos a altas horas de la noche y contestarme para aclarar las dudas o problemas que iban surgiendo.

Al laboratorio CALITEC, por querer desde un primer momento que formase parte de su equipo y por ayudarme a lo largo de este proceso, dejando a mi disposición todo el material, tanto práctico como teórico.

A mi familia, por estar siempre presente, por ayudarme y formarme como persona. Por enseñarme a valorar las cosas y no desistir nunca, aun cuando todo se hacía cuesta arriba. A Laura y Macarena, por toda la paciencia que tuvieron y la ayuda que me dieron.

Y en especial a mi abuela, por venir a darme ánimos desde 12.000 km tres semanas antes de la entrega.

Sin lugar a dudas, este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de todos ellos.

# ÍNDICE

---

1. Introducción.....	8
1.1 Antecedentes históricos.....	9
1.2 El género <i>Salmonella</i> .....	10
1.2.1 Caracterización morfológica y bioquímica del <i>Salmonella</i> .....	10
1.2.2 Crecimiento y supervivencia de <i>Salmonella</i> .....	12
1.2.3 Mecanismos de patogenicidad de <i>Salmonella</i> spp .....	13
1.3 <i>Salmonella</i> en humanos .....	16
1.3.1 La enfermedad .....	16
1.3.2 Brotes de <i>Salmonella</i> en Europa y España .....	18
1.3.3 Evaluación de riesgo y dosis infectivas .....	21
1.4 <i>Salmonella</i> en la industria alimentaria.....	22
1.4.1 Tratamientos de control de <i>Salmonella</i> en la industria alimentaria.....	23
1.4.2 Prevención y control de <i>Salmonella</i> .....	25
2. Objetivos.....	27
3. Material y métodos .....	29
3.1 Medios de cultivo y reactivos.....	30
3.2 Detección de <i>Salmonella</i> spp según método tradicional ISO 6579 .....	36
3.3 Detección de <i>Salmonella</i> spp mediante inmunofluorescencia (ELFA).....	40
3.4 Detección de <i>Salmonella</i> spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos.....	42
3.5 Informe de ampliación de validación de investigación de <i>Salmonella</i> spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos.....	44
3.5.1 Preparación de las muestras.....	44
4. Resultados y discusión.....	46
4.1 Detección de <i>Salmonella</i> spp según método tradicional ISO 6579 .....	47
4.2 Detección de <i>Salmonella</i> spp mediante inmunofluorescencia (ELFA).....	50
4.3 Comparación de resultados según los métodos tradicional ISO 6579 e inmunofluorescencia (ELFA).....	52
4.4 Ampliación de la validación de investigación de <i>Salmonella</i> spp mediante el kit VIDAS UP <i>Salmonella</i> (SPT).....	54
4.5 Detección de <i>Salmonella</i> spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos.....	59

4.6 Comparación de resultados según los métodos de inmunofluorescencia (ELFA) e inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos.....	61
5. Conclusiones .....	64
6. Bibliografía .....	66
7. Anejos .....	71

*“Calcular la probabilidad de lo posible ayuda a anticipar la incertidumbre”*

**Jorge Wagensberg**

## *1. Introducción*

Los microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y es por eso que su estudio es esencial para su conocimiento. De manera resumida, existen algunas bacterias capaces de beneficiar al ser humano como *Lactobacillus bulgaricus* o *Bifidobacterium bifidum* que mejoran nuestra situación nutricional, o ciertos hongos del género *Trichoderma* que actúan frente a los patógenos del suelo. Por otro lado, existen microbios perjudiciales, como es el caso de *Salmonella*, causante de infecciones intestinales, conocidas como salmonelosis, una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comunes que causa la bacteria.

*Salmonella* es el microorganismo patógeno que más toxiinfecciones alimentarias produce, tanto en países desarrollados como en desarrollo. Constituye la segunda causa de morbilidad en países en vía de desarrollo (Flores, 2003). Se calcula que decenas de millones de casos se producen anualmente en todo el mundo y que cerca de cien mil personas mueren a causa de la enfermedad (World Health Organization (WHO), 2013).

Actualmente, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema en el tratamiento de enfermedades infecciosas, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas. La evolución de cepas resistentes ha contribuido a la aceleración de este fenómeno natural y es por eso que el estudio y desarrollo de nuevas tecnologías rápidas es fundamental para una buena prevención y control de microorganismos patógenos.

## 1.1 Antecedentes históricos

El primer aislamiento de microorganismos del grupo *Salmonella* fue en 1884 por Gaffky (1850-1918) y en el año 1886 el género *Salmonella* fue descrito por el epidemiólogo y patólogo estadounidense Theobald Smith (1859-1934), logrando aislar la bacteria en cerdos con cólera, aunque el organismo recibe su nombre en honor a su jefe, el norteamericano y patólogo veterinario Daniel Elmer Salmon (1850-1914), administrador del programa de investigación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Fresquet, 2002).

A lo largo de la historia, el género *Salmonella* ha sido clasificado de diversas maneras debido a su compleja nomenclatura y taxonomía. Ante esta controversia, científicos de todo el mundo han ido utilizando diferentes sistemas para tratar acerca de la bacteria. En 1930, Kauffman y White establecieron una clasificación serológica para las cepas aisladas, basada en los antígenos flagelares H, que permiten el movimiento y antígenos somáticos O, sin movimiento. Desde entonces la taxonomía del género *Salmonella* ha ido variando a lo largo del tiempo. La primera identificación de cepas de éste género fueron clasificadas en tres especies: *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella enteritidis*, siendo la última especie la que contaba con la mayoría de los serotipos. Posteriormente, otra nomenclatura utilizada reconocía la existencia de dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella choleraesuis*, donde esta última se dividía en 6 subespecies pero al haber un serotipo *choleraesuis* se decidió cambiar el nombre de la especie por el de *Salmonella enterica* (Flores, 2003). En la actualidad se ha simplificado en dos especies: *Salmonella enterica* que consta de seis subespecies I *entérica*, II *salamae*, III a *arizonae*, III b *diarizonae*, IV *houtenae*, y VI *indica* y *Salmonella bongori* (V), incluida en otra

especie distinta (Koneman *et al.*, 2006). Se han descrito más de 2000 serotipos. *Salmonella* se puede dividir en diversos serogrupos: A, B, C, D y E (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de la Salud Carlos III, 2015 (A)).

Actualmente, el sistema de clasificación (tabla 1) es el utilizado por la Organización mundial de la Salud (OMS), el Centro para el control de Enfermedades (CDC) y otras organizaciones (González *et al.*, 2014).

Tabla 1: Especies, subespecies, serotipos y hábitat usual de *Salmonella* según la clasificación de Kauffman-White (González *et al.*, 2014)

Especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	No. de serotipos dentro de la especie	Habitat usual
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
<b>Total</b>	<b>2579</b>	

## 1.2 El género *Salmonella*

### 1.2.1 Caracterización morfológica y bioquímica del *Salmonella*

*Salmonella* (imagen 1) es un género de bacterias, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, integrado por células en forma de bacilo, no esporuladas y habitualmente móviles mediante flagelos peritricos. Son bacterias Gram-negativas, de metabolismo anaerobio facultativo, que reducen los nitratos a nitritos y que fermentan la glucosa produciendo ácido y gas (Odumeru & León-Velarde, 2012). Raramente fermentan la lactosa o la sacarosa, son citocromo-oxidasa negativas y normalmente catalasa positivas. Son ureasa negativas, lisina descarboxilasa negativas y la prueba del indol es negativa (Koneman *et al.*, 2006). Infeccionan muchas especies animales distintas, la humana entre ellas, y algunas pueden invadir otros tejidos aparte de los del tracto intestinal ya sean como patógenos o como comensales. Las colonias son grandes (de 2-4mm) y tienen una textura rugosa o lisa.

Tal y como se ha visto en la tabla 1, a la subespecie I pertenecen aquellas salmonelas que son patógenas y que se han aislado del contenido intestinal de animales de sangre caliente, en su mayoría. A la subespecie II y III pertenecen aquellas que provienen del aislamiento de animales de sangre fría, tales como *S. salamae*, *S. arizonae* y *S. diarizonae*. En las últimas subespecies, IV y V, forman parte *S. houtenae* y *S. indica*, que se encuentran, en su mayoría, en el medio ambiente y que en rara ocasión se han identificado como patógenas para el hombre (Trepatt i Quílez, 2002).



Imagen 1: *Salmonella* (Voss, 2012)

La identificación y/o confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella* se realiza mediante pruebas bioquímicas que utilizan medios diferenciales como el agar entérico Hektoen y el agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). Como se puede observar en la imagen 2, las colonias típicas de este microorganismo son rosadas, pudiendo presentar o no un centro negro debido a la producción de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) en agar XLD y verdosas o verde azuladas con o sin centro negro en el agar Hektoen. Simultáneamente, se puede llevar a cabo en medios como el agar triple hierro (TSI) y el agar lisina hierro (LIA). Pruebas como urea, de producción de indol, crecimiento en caldo KCN, fermentación de dulcitol o la utilización del malonato de sodio también sirven como pruebas bioquímicas complementarias (González *et al.*, 2014).

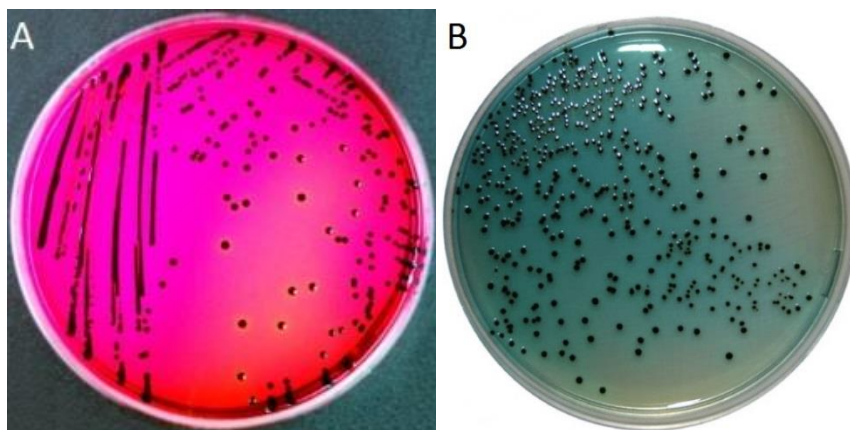


Imagen 2: Colonias típicas de *Salmonella*. A) Aislamiento en agar XLD (Department of Veterinary Disease Biology, University of Copenhagen, 2011). B) Aislamiento en agar Hektoen (EO Labs, 2015)

Como se ha comentado anteriormente, las pruebas bioquímicas y serológicas sirven para la identificación del género *Salmonella*, y la elección de cada una de ellas depende de las características del laboratorio donde se realizan. En la tabla 2, se pueden observar las características bioquímicas de las diferentes especies y subespecies de *Salmonella* y cómo reaccionan a las diversas pruebas bioquímicas (Caffer & Terragno, 2001).

Tabla 2: Características bioquímicas diferenciales de especies y subespecies de *Salmonella* (Caffer & Terragno, 2001)

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>salamae</i> (II)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>houtenae</i> (IV)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>indica</i> (VI)	<i>S. bongori</i> (V)
Dulcita	+	+	-	-	-	d	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	- (75%)	+	-	d	-
Habitat de la mayoría de las cepas	Animales de sangre caliente		Animales de sangre fría y medio ambiente				

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos; d: diferentes reacciones

## 1.2.2 Crecimiento y supervivencia de *Salmonella*

*Salmonella* se multiplica bien en medios ordinarios. Las colonias crecen al cabo de 16-24 horas y su temperatura óptima de crecimiento es de unos 32-37°C pero es capaz de desarrollarse dentro de un amplio rango de 6-46°C. A temperaturas inferiores a 10°C el crecimiento sufre un retraso considerable y a temperaturas inferiores a 7°C se podrían evitar el crecimiento de la mayoría de salmonelas. Es por eso que los alimentos perecederos deben mantenerse por debajo de la temperatura mínima de crecimiento del microorganismo. El microorganismo *Salmonella* está presente en el medio ambiente, procede del tracto intestinal animal, ya sea doméstico o salvaje, donde puede encontrarse sin causar ningún tipo de enfermedad aparente (Odumeru & León-Velarde, 2012). La muerte del microorganismo aumenta durante el proceso de congelación siendo el intervalo de 0°C y -10°C más efectivo que entre -17°C a -20°C. Aunque este proceso pueda dañar seriamente el estado de la bacteria, no garantiza su destrucción total en los alimentos. Para asegurar su muerte se tendría que sobrepasar una temperatura máxima de 49.5°C (Trepát i Quílez, 2002). En la tabla 3 se resumen los datos anteriormente comentados.

Uno de los factores que más afecta al crecimiento de *Salmonella* es la actividad de agua. Se desarrollan bien a valores de  $a_w$  de 0.93 a 0.999 y pueden sobrevivir años en alimentos con  $a_w$  baja (Elika, 2013).

Las salmonelas presentan una cierta sensibilidad al calor y su resistencia suele ser muy rara. Este factor se ve influenciado por la actividad de agua (se incrementa cuando la actividad de agua del substrato se reduce), por la naturaleza de los solutos y el pH del medio, ya que si se reduce este último factor se reduce la resistencia al calor (Trepal i Quílez, 2002).

Soportan un pH entre 3 y 9 con un óptimo de 7 a 7.5. La presencia de ciertos ácidos es importante para *Salmonella*, ya que algunos, como el ácido clorhídrico y el cítrico, permiten su crecimiento a pH cercanos a 4 y otros como el ácido acético, propiónico o butírico lo impiden a pH inferiores a 5. El potencial de óxido-reducción también afecta al crecimiento del microorganismo ya que puede verse inhibido por potenciales de óxido-reducción inferiores a -30mV (Trepal i Quílez, 2002).

Tabla 3: Condiciones de crecimiento de *Salmonella* (Elika, 2013).

	Mínimo	Óptimo	Máximo
<b>Temperatura (°C)</b>	5.2	35-43	46.2
<b>pH</b>	3.8	7-7.5	9.5
<b>Actividad de agua</b>	0.93	0.99	>0.99

### 1.2.3 Mecanismos de patogenicidad de *Salmonella* spp

Como se ha comentado anteriormente, *Salmonella* es ubicua, de manera que existen diversas fuentes de infección, como mamíferos, aves, roedores o insectos, el hombre, el agua bajo condiciones insalubres o el mismo entorno de los animales, como puede ser el alimento contaminado, sus heces y el polvo o suelos mal desinfectados, entre otros.

El principal modo de transmisión es por vía oral, por contacto con heces de animales infectados. Son resistentes al pH del estómago, sales biliares y peristaltismo, de tal manera que al lograr colonizar el intestino delgado provoca una infección localizada. Una vez dentro de las células intestinales, comienza a dividirse dentro de éstas. Existe la posibilidad de transmisión por vía aerógena, afectando a las amígdalas y los pulmones (Centre de recerca en sanitat animal, UAB, 2008).

En la tabla 4 se expone una clasificación de los serotipos de *Salmonella* que afectan tanto al hombre como a los animales:

Tabla 4: Clasificación de serotipos de *Salmonella* según su hospedador (Centre de recerca en sanitat animal, UAB, 2008)

Serotipos adaptados al hombre	Serotipos adaptados a animales
<i>Salmonella typhi</i>	Aves: <i>Salmonella pullorum</i> y <i>Salmonella gallinarum</i>
<i>Salmonella paratyphi A, B</i> (aves)	Vacuno: <i>Salmonella dublin</i>
<i>Salmonella sendai</i>	Ovino: <i>Salmonella abortusovis</i>
	Equino: <i>Salmonella abortusequi</i>
	Cerdo: <i>Salmonella choleraesuis</i>
	Conejo: serovariedad perteneciente a la subespecie III a
Otros serotipos no adaptados a hospedadores específicos que afectan a conejos y personas: <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Salmonella enteritidis</i>	

Se puede clasificar la salmonelosis humana mediante dos grupos, las que son causadas por serotipos humanos, que suelen ocasionar síndromes tifoídicos y las que son debidos a serotipos más generales y que suelen causar diarreas, vómitos y fiebre. La duración de la enfermedad varía según el estado general del huésped (Parra *et al.*, 2002).

Una vez *Salmonella* ha superado las barreras y penetra en las células del hospedero, se necesitan aproximadamente  $10^6 - 10^8$  bacterias para desarrollar la enfermedad sintomática. Aunque intervienen otros factores como el tipo de cepa, el tipo de alimento o el estado fisiológico del huésped. (Sánchez & Cardona, 2003).

### **Mecanismos de adherencia**

La adherencia microbiana es necesaria para la supervivencia de un microorganismo y depende de la habilidad que posea la bacteria para adherirse. Este mecanismo necesita un receptor situado en la célula eucariota del huésped y la presencia de adhesinas, es decir, múltiples factores que lo adhieran al receptor. Éstas son capaces de desencadenar una serie de respuestas biológicas como la activación de los linfocitos B, los neutrófilos o la secreción de citocinas, entre otras. Las múltiples adhesinas que se encuentran en los microorganismos se pueden agrupar en adhesinas fimbriales y adhesinas no fimbriales. Por lo general, en las bacterias Gram negativas las fimbrias (apéndices proteínicos) son más cortas y numerosas que los flagelos y no son responsables de la movilidad bacteriana. Los pelos (pili), en cambio, tienen una estructura parecida a las fimbrias pero suelen ser más largos y menos numerosos. Tanto las fimbrias como los pelos son los encargados de fijar de manera específica ciertas bacterias patógenas a los tejidos (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008).

### **Mecanismos de invasión**

Una vez se ha ingerido el alimento contaminado, *Salmonella* tiene vía libre para comenzar su ciclo infeccioso a través del tejido linfoide, dirigiéndose a las células hospedadoras que normalmente no fagocitan, ya que en defensa del organismo intentarían eliminarla. La superficie de la capa mucosa de las células epiteliales podría significar un lugar seguro para la multiplicación y persistencia de la bacteria al ser una técnica de invasión segura (Figueroa & Verdugo, 2005).

Las células epiteliales reciben señales de la bacteria con el fin de provocar cambios en la estructura del citoesqueleto y causar ondulamientos en la superficie como respuesta al contacto. Además, *Salmonella*, puede invadir múltiples líneas celulares e impulsar su entrada en las células del huésped. Parece ser que la introducción de *Salmonella* en la mucosa intestinal es fundamental para causar infección, con la cual se intenta evitar su entrada se podrían obtener cepas atenuadas y utilizarlas como posibles inmunógenos (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008).

### **Enteritis y diarrea**

*Salmonella* produce, al menos, tres toxinas: enterotoxina, endotoxina (LPS) y citotoxina y parece ser que, además de otros factores, son la causa de diarreas y septicemias, síntomas que se expresan pocas horas después del contacto de la bacteria con la célula hospedadora. Durante el proceso de infección, *Salmonella* induce la liberación de citocinas proinflamatorias que intervienen en el proceso diarreico (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008).

### **Islas de patogenicidad**

Las islas de patogenicidad (PI) son largas agrupaciones de genes cuya función es codificar factores específicos de virulencia y que por lo general se expresan durante el proceso infeccioso. En el caso de ciertas bacterias de la familia de las enterobacterias, el hecho de adquirir una única PI puede provocar que pasen de comensal a patógeno, aunque no siempre se garantiza la conversión (Martínez, 2007).

Los genes de las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) cuentan con una proporción de G+C diferente al promedio del genoma bacteriano y generalmente están dentro del loci de ARNt (Martínez, 2007).

Se conoce que *Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5 (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008).

## 1.3 *Salmonella* en humanos

Las infecciones entéricas pueden estar causadas por diferentes bacterias pero por lo general manifiestan alguno de los síntomas principales, como diarreas sin fiebres o fiebres entéricas con dolor abdominal y gastroenteritis invasiva con diarrea inflamatoria, fiebre y presencia de numerosos leucocitos, principalmente neutrófilos. Los patógenos tienen un sistema de secreción que les permite secretar e inyectar proteínas de patogenicidad, lo que las convierte en altamente invasivas. *Salmonella* es uno de los géneros más complejos que existen hoy en día y a pesar de su gran conocimiento sobre su actuación y poder patógeno, continúa siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en adultos y niños en el mundo y uno de los productores de toxiinfecciones alimentarias de origen bacteriano más importantes en España y otros países (Echeita *et al.*, 2011).

### 1.3.1 La enfermedad

La patología ligada a *Salmonella* agrupa un conjunto de enfermedades denominadas **salmonelosis** y éstas pueden manifestarse bajo dos aspectos esenciales:

- Fiebres entéricas que engloban principalmente las fiebres tifoideas, causadas por *Salmonella typhi* y las fiebres paratifoideas, causadas por *Salmonella paratyphi* A, B o C y que suelen ser menos agresivas que las primeras.
- Gastroenteritis que puede estar causada por muchos serotipos, siendo los más comunes en las fiebres no tifoideas *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*.

#### ***Fiebre tifoidea producida por Salmonella typhi***

*Salmonella typhi* posee un antígeno de virulencia (Vi), formado por polisacáridos y se encuentra en la membrana externa de la pared. La mayoría de estas cepas son móviles debido a unos flagelos peritricos, que rodean la célula. Por otro lado, existen cepas no móviles en Indonesia, donde la incidencia de la fiebre tifoidea es más alta. *Salmonella typhi* produce ácido a partir de maltosa, glucosa y sorbitol, sin llegar a producir gas. Por otro lado, no fermenta la lactosa, sacarosa, la ramnosa, entre otros. Produce ácido sulfhídrico y nitrito a partir de nitrato (Calva, 2007).

La fiebre tifoidea es una toxiinfección que únicamente afecta a seres humanos. El método de contagio se puede dar a través de las heces de la persona infectada y puede contaminar los alimentos o el agua. Este tipo de fiebres es más común en países en vías de desarrollo. Se prevé que en Asia y África hay cerca de 17 millones de casos anuales y que unas 600.000 personas acaban muriendo. La mayor frecuencia de estos casos se da en países como Indonesia o Papua Guinea, donde la edad con mayor incidencia es entre 13 y 19 años (Calva, 2007).

Generalmente, los síntomas de la fiebre tifoidea comienzan una o dos semanas después de producirse el contagio, aunque el período de incubación puede llegar a durar hasta un mes. La multiplicación de la bacteria empieza en el epitelio de la submucosa y una vez ha invadido el torrente circulatorio se disemina por el cuerpo. Posteriormente se vuelve a multiplicar en el bazo y el hígado y finalmente es liberado en grandes cantidades por todo el torrente sanguíneo. Los síntomas suelen ser fiebres altas (por encima de los 40°C), acompañadas de dolor de cabeza y tos seca y persisten durante 2 o 3 semanas.

Existen diversos métodos, tanto bioquímicos como serológicos para detectar y confirmar una infección por *Salmonella typhi*, desde aislamientos de la bacteria, hasta un aspirado de bilis y médula ósea. Uno de los ejemplos de serodiagnóstico es el ensayo de aglutinación de Widal, basado en la detección de anticuerpos a los antígenos O, H y Vi. Las técnicas de inmunoensayos (ELISA) o de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también son eficaces en la detección, tanto de antígenos como de anticuerpos específicos (Calva, 2007).

La fiebre tifoidea es tratada con eficaces antibióticos pero, ciertamente, hay una preocupación global debido al desarrollo de la resistencia de algunas cepas a los medicamentos, un problema de salud pública actual que requiere la investigación y desarrollo de nuevas técnicas que permitan conocer mejor al microorganismo. Las principales vacunas contra la fiebre tifoidea son la oral Ty21a y la parental del polisacárido Vi (Calva, 2007).

### ***Fiebre paratifoidea producida por Salmonella paratyphi***

Similar a la fiebre tifoidea, aunque de carácter más leve. Es una infección causada por *Salmonella paratyphi A* y *B*, una serovariedad de *Salmonella enterica*. Los síntomas son similares pero tienden a ser más benignos y menos mortales. La proporción de casos por *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* es de 10:1 (Heymann, 2004).

Se transmite a los alimentos, sobre todo productos lácteos y marisco, a través de las heces u orina de un enfermo o un portador por una mala higiene, como no lavarse las manos o a través del agua potable que ha sido contaminada por aguas residuales que contienen la bacteria. Los síntomas aparecen alrededor de los 10 días de la infección y se caracterizan por tener fiebre elevada prolongada, dolor abdominal, malestar general, cefaleas, estreñimiento o diarrea.

Tanto la fiebre tifoidea como la paratifoidea siguen siendo un problema significativo en países del Sudeste Asiático, África o América del Sur, debido a la precariedad en el sistema de saneamiento ambiental básico.

### ***Gastroenteritis***

Es una infección alimentaria producida como consecuencia de la multiplicación de las bacterias en el intestino, causada por diversas cepas de *Salmonella*, entre las que se encuentran los serotipos *typhimurium*, *hydenberg* y *adelaj*, entre otros.

La infección es provocada debido a la ingestión de grandes cantidades de salmonelas que invaden el epitelio del intestino delgado, donde sólo se multiplican ya que, al contrario que los bacilos tifoideos, posteriormente no se diseminan. Los síntomas aparecen a las 24-48 horas después de haber ingerido el alimento contaminado y se manifiestan en forma de diarreas severas, cólicos, náuseas y en ocasiones vómitos; no suele haber fiebre, aunque puede haber febrícula. Normalmente la recuperación es rápida y no hace falta la administración de medicamentos (Ingraham & Ingraham, 1998).

*Salmonella typhimurium* es uno de los serotipos más comunes que causan este síndrome clínico. Su tratamiento debe estar encaminado a restituir líquidos y a equilibrar los electrolitos. Ni el diagnóstico ni el tratamiento etiológico son necesarios ya que las bacterias no invaden otros tejidos y el padecimiento se resuelve en menos de una semana de evolución (Romero, 2007).

### 1.3.2 Brotes de *Salmonella* en Europa y España

Son diversas las fuentes de contagio de *Salmonella*, la incidencia depende de muchos factores que influyen en su contagio, como la disposición de agua potable, la manipulación de alimentos a lo largo de todo el proceso o incluso, el clima. Principalmente, en países en desarrollo, *S. typhi* se aísla frecuentemente. En otras áreas geográficas como Estados Unidos, el oeste de Europa o Japón, *Salmonella* no tifoídica es más común. Según datos del libro Síndrome diarreico infeccioso: “En los países en vía de desarrollo, la incidencia de *S. typhi* se estima entre 10 y 500 casos por 100.000 habitantes, mientras que la incidencia de *Salmonella* no tifoídica puede ser mucho más alta” (Romero & Herrera, 2002).

La distribución por edad también es un factor a tener en cuenta ya que, en países en desarrollo, los individuos de entre 5 y 25 años son más propensos a padecer una infección por *S. typhi*. En cambio, en los países industrializados, la mayoría de casos se dan en individuos de 19 años, que normalmente suelen realizar viajes al extranjero. En relación a la infección por *Salmonella* no tifoídica, no existe diferencia en la incidencia en cuanto a la edad, aunque hay grupos que son más propensos, como menores de 5 años e individuos mayores de 70 años. (Romero & Herrera, 2002).

*Salmonella hadar* se da frecuentemente en pavos y pollos. Entre el 1973 y 1974 este serovar se extendió a lo largo de los criaderos de pavos del Reino Unido. Su exportación a otros países hizo que se dispersara su aislamiento entre los humanos provocando que, en el año 1990, fuese la segunda bacteria más aislada en los corrales de pollos (Trepát i Quílez, 2002).

En mayo del 2014, en Gran Canaria se detectó un brote de salmonelosis en un colegio, afectando a más de 200 personas, en su mayoría niños de 2 y 17 años. La toxiinfección alimentaria fue debida a *Salmonella enteritidis* y varias personas tuvieron que ser ingresadas con fiebre, vómitos, diarreas y dolor abdominal. La causa del brote fue consecuencia de condiciones higiénicas sanitarias no adecuadas por parte de un manipulador de alimentos y no por los productos con los que se elaboró la ensalada, como se creía en un principio.

En agosto del 2014 un brote de salmonelosis afecto a varios países de la Unión Europea debido a una partida de huevos producidos en el sur de Alemania. Según la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) el brote se identificó como el origen de la salmonelosis y llegó al mercado de países como la propia Alemania, Austria, Francia, Luxemburgo y Reino Unido. Se llegaron a reportar alrededor de 70 casos.

En España, el Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III) gestiona mediante la red nacional de vigilancia epidemiológica los brotes de salmonelosis en humanos que le son comunicados a través de distintas vías. Toda la información obtenida de estas vías se analiza y se difunde a través del Boletín Epidemiológico Semanal que incluye datos periódicos sobre los brotes de *Salmonella* transmitidos por los alimentos.

A continuación se exponen los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España durante el período comprendido entre 1994 y 2003. En la tabla 5 se pueden observar los principales agentes causales, productores de las enfermedades, siendo *Salmonella* la responsable del mayor número de brotes producidos durante esta década. La especie con más incidencias fue *Salmonella enteritidis* con 2568 brotes, seguida de *Salmonella spp* con 2459 brotes. Durante los últimos años del período se nota un crecimiento en el número de brotes notificados, siendo *Salmonella spp* y *Salmonella enteritidis* los más comunes. Actualmente la incidencia de salmonelosis tanto en España como en la Unión Europea en general ha ido disminuyendo gracias a los avances en las medidas de prevención y programas de control en la seguridad alimentaria.

Tabla 5: Número de brotes notificados según agente causal y año en España ente 1994-2003 (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, 2015 (B))

Agente causal	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	1994-2003
<b>Bacterias</b>											
<i>Bacillus cereus</i>	1	5	4	5	4	6	0	7	12	12	56
<i>Brucella</i>	6	16	9	4	10	4	16	5	7	7	84
<i>Campylobacter</i>	2	1	0	5	1	6	5	8	4	4	36
<i>Clostridium botulinum</i>	5	5	5	7	9	5	1	4	3	1	45
<i>Clostridium</i> (otros)	13	17	11	17	22	19	19	15	17	16	166
<i>E. coli</i> (enterohemorrágico)	0	0	0	0	1	2	1	0	0	2	6
<i>Salmonella</i>											0
- <i>Salmonella sp</i>	214	263	249	215	261	230	248	249	228	302	2459
- <i>Salmonella enteritidis</i>	141	153	188	214	272	281	280	310	318	411	2568
- <i>Salmonella typhimurium</i>	11	5	9	9	8	5	9	10	7	15	88
- <i>Salmonella typhi</i> y <i>paratyphi</i>	2	2	1	4	3	0	1	1	0	1	15
- Otro serotipo	11	10	9	3	10	9	8	7	5	4	76
<i>Shigella</i>	6	1	0	1	3	3	0	1	1	3	19
<i>Staphylococcus (aureus)</i>	39	24	40	39	36	21	22	27	31	22	301
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	5	6	6	2	3	4	2	2	4	35
Otras bacterias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
<b>Parásitos</b>											
<i>Trichinella</i>	4	6	3	2	2	2	3	6	1	3	32
<b>Virus</b>											
Virus hepatitis A	0	1	0	1	10	3	6	0	2	0	23
Norovirus	0	0	0	0	0	4	1	9	20	22	56
Otros virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4
<b>Sustancias tóxicas</b>											
Animales tóxicos	16	17	10	9	9	15	15	10	10	13	124
Plantas tóxicas	0	4	7	4	7	7	2	6	14	6	57
Sustancias químicas	15	12	5	2	2	7	4	2	2	0	51
Otras sustancias tóxicas	26	19	11	7	19	16	8	17	10	3	136
<b>Desconocido</b>	<b>456</b>	<b>338</b>	<b>320</b>	<b>317</b>	<b>251</b>	<b>279</b>	<b>307</b>	<b>293</b>	<b>277</b>	<b>364</b>	<b>3202</b>
<b>Total</b>	<b>969</b>	<b>904</b>	<b>887</b>	<b>871</b>	<b>942</b>	<b>927</b>	<b>960</b>	<b>989</b>	<b>971</b>	<b>1221</b>	<b>9641</b>

Durante el año 2003 en España se produjeron 733 casos de salmonelosis debido a la contaminación alimentaria. En la tabla 6 se pueden observar las bacterias causantes de los brotes producidos a lo largo del año y los alimentos implicados. En cuanto a los alimentos, el huevo y los ovoproductos son las principales vías de transmisión, seguidas de la repostería y la nata. Esto puede ser debido a que las bacterias del género *Salmonella* están asociadas a las aves y a los huevos, los cuales representan las principales vías de distribución e infección en el hombre.

Tabla 6: Agente causal y alimento implicado en España en 2003 (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, 2015 (B))

	Lácteos*	Queso	Huevo y ovoproductos	Carne	Pollo	Pescados y Mariscos	Repostería y Nata	Ensaladas Vegetales	Otros	Desconocido	Total
<b>Bacterias</b>											
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	1	2	2	0	1	1	3	2	12
<i>Brucella</i>	0	5	0	0	0	0	0	0	0	2	7
<i>Campylobacter</i>	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	4
<i>Clostridium botulinum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Clostridium</i> (otros)	0	0	1	9	0	0	1	2	2	1	16
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	2
<i>Salmonella</i>											
- <i>Salmonella</i> sp	1	1	178	5	7	3	15	4	27	61	302
- <i>S. enteritidis</i>	4	0	238	8	5	8	29	9	28	82	411
- <i>S. typhimurium</i>	0	0	4	0	0	1	0	1	4	5	15
- <i>S. typhi/paratyphi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
- Otras salmonelas	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	4
<i>Shigella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
<i>Staphylococcus</i>	0	7	2	1	0	1	2	1	4	4	22
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4
Otras bacterias	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
<b>Parásitos</b>											
<i>Trichinella</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3
<b>Virus</b>											
Norovirus	0	0	0	1	0	3	1	3	3	11	22
Otros virus	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	4
<b>Sustancias tóxicas</b>											
Animales tóxicos	0	0	0	0	0	12	0	0	0	1	13
Plantas tóxicas	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	6
<b>Sustancias químicas</b>											
Químicas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3
<b>Desconocido</b>	4	4	69	17	11	34	13	10	31	171	364
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>494</b>	<b>48</b>	<b>27</b>	<b>70</b>	<b>64</b>	<b>36</b>	<b>105</b>	<b>349</b>	<b>1221</b>

\* Excluye queso y nata

Según el boletín epidemiológico, en el año 2012 se notificaron 60 casos de infecciones alimentarias causadas por *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, siendo confirmados 41 casos (71.6%). Cataluña fue la comunidad autónoma con más casos, unas 19 notificaciones. También se registraron incidencias en País Vasco, Galicia, Aragón y Valencia. En el resto de comunidades autónomas no se comunicaron casos. Disponiendo de información sobre 59 casos, se obtuvieron los grupos con mayor número de casos: de 1-4 años, de 25-34 años y de 35-44 años (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, 2015 (C)).

En cuanto a la situación epidemiológica de la salmonelosis, se notificaron un total de 4.831 casos de infección por *Salmonella* no tifoidea en el año 2012. Esta tendencia fue desigual entre los diferentes serotipos estudiados, siendo más bajos *Salmonella* grupo C y *Salmonella* spp respecto al año anterior. En cambio *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella* grupo B aumentan de manera considerable, mostrando una tendencia ascendente

en los últimos años, sobre todo los dos últimos microorganismos. En la imagen 3 se pueden ver los casos dados por año y la tendencia ascendente y descendente del microorganismo aislado.

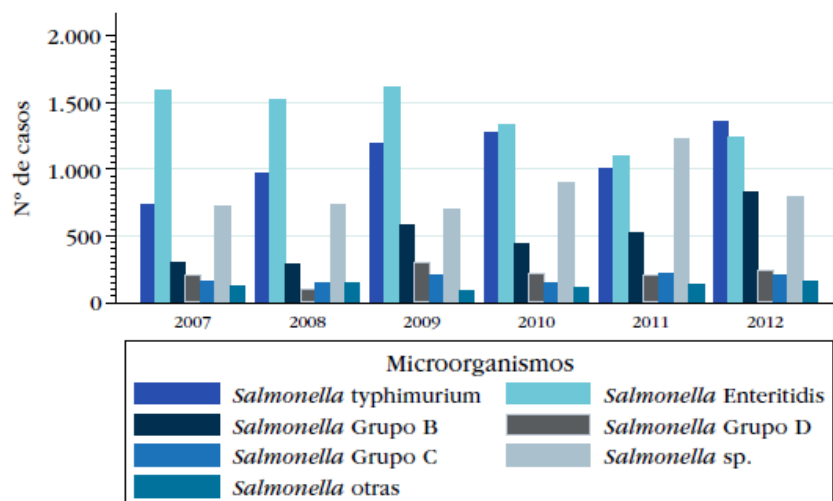


Imagen 3: Vigilancia de *Salmonella* entre los años 2007 - 2012 (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, 2015 (C))

Disponiendo de información sobre la edad, de 4.757 casos el 40.28% (1.899) eran menores de 5 años y el 15.05% (709) mayores de 65. En cuanto al sexo, de 4.772 casos, el 51.72% (2.468) fueron hombres, y el resto mujeres. *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella* grupo B, fueron los microorganismos aislados más frecuentes. De los 291 brotes notificados en el año 2012, se produjeron 2.406 enfermos, de los cuales 380 tuvieron que ser hospitalizados y 2 fallecieron. Prácticamente el 92% de los brotes fueron transmitidos por vía alimentaria. Sólo uno de los brotes fue transmitido por agua. Dentro de la lista de alimentos sospechosos se vieron implicados el huevo y derivados (68.2% de los brotes), la carne y los productos cárnicos (6.5%), los vegetales (5.6%), la repostería (4.2%), las aves (1.9%) y el pescado/marisco (1.4%) (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, 2015 (C)).

Aunque la salmonelosis es la segunda causa de gastroenteritis bacteriana en España representa la principal causa de brotes de transmisión alimentaria.

### 1.3.3 Evaluación de riesgo y dosis infectivas

Como se ha comentado anteriormente, el género *Salmonella* puede afectar de manera indistinta a cualquier grupo de edad, aunque son más vulnerables los menores de 5 años y los mayores de 60 años. De esta manera, las personas que presentan algún tipo de enfermedad, son portadores del VIH o se someten a determinados tratamientos, también suelen presentar mayor grado de vulnerabilidad.

Son varios los factores que afectan de manera directa la capacidad infecciosa de *Salmonella*. La resistencia del hospedador según su edad o estado inmunitario, el tipo de matriz en que se ingiere el microorganismo o el estado fisiológico de éste último influyen en la infectividad de la bacteria. De esta manera, se estiman unas dosis infectivas que oscilan entre  $10^6$  y  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC) (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008).

Aunque los valores de las dosis infectivas parecen ser fijos, diversas investigaciones han puesto en evidencia que pueden variar, incluso ser mucho menores, dependiendo del tipo de alimento (tabla 7), donde los que son ricos en grasas y/o azúcares presentan una dosis infectiva de  $10^4$  o  $10^5$  células, mientras que en personas susceptibles a enfermedades bastan sólo 10 bacterias de la cepa apropiada de *Salmonella* para provocar la infección (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008).

Tabla 7: Dosis infectivas estimadas de *Salmonella* spp (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008).

<b>Estimates of the infective dose of <i>Salmonella</i> spp.</b>		
<b>Foodstuff</b>	<b>Serovar</b>	<b>Infectious dose (CFU)</b>
Cheese	Typhimurium	1–10
Chocolate	Eastbourne	<100
	Napoli	10–100
	Typhimurium	10
Maize snack	Agona	2–45
Paprika-flavoured potato chips	Saint Paul, Javiana, Rubislaw	<45
Peanut butter	Mbandaka	10–100

Derived from epidemiological evidence of outbreaks. CFU, colony-forming units. Data taken from REF. 43.

## 1.4 *Salmonella* en la industria alimentaria

En las últimas décadas, la industria alimentaria ha puesto en marcha prácticas de prevención y medidas muy estrictas para poder ofrecer productos seguros, aptos para el consumo en cualquier época del año.

El control de la calidad y seguridad alimentaria de las materias primas que se utilizan o el control durante el procesado y acabado del producto son esenciales para prevenir microorganismos no deseados, sobre todo patógenos, ya que no solo pueden alterar las características organolépticas y nutricionales de los alimentos sino que pueden producir infecciones alimentarias, causando enfermedades en el ser humano. Para las industrias alimentarias también supone grandes pérdidas económicas ya que el producto contaminado tiene que ser eliminado o bien, exige un aumento de gastos adicionales con el fin de obtener un producto final libre de bacterias patógenas.

### 1.4.1 Tratamientos de control de *Salmonella* en la industria alimentaria

En los últimos años, una de las finalidades de la industria alimentaria ha sido crear prácticas de prevención y estrictas medidas con el fin de poder proporcionar productos aptos para el consumo humano:

- Asegurar que las materias primas utilizadas sean aptas, realizando controles de calidad y seguridad alimentaria.
- Realizar planes de control durante la producción de los alimentos.
- Mantener y controlar la higiene de las instalaciones y equipos a utilizar.
- Aplicar buenas prácticas durante la manipulación de los alimentos.
- Crear fórmulas para mejorar la conservación de los productos.

La principal guía de autocontrol aplicada en la industria alimentaria está basada en el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control: APPCC o HACCP (Hazard analysis and critical control points). *Salmonella* es un peligro que se considera en la mayoría de los PCC (punto crítico de control); este peligro es controlado o eliminado desde el origen de las materias primas mediante la vigilancia de temperaturas de proceso de elaboración, en medidas de control como la limpieza y sanitización de los equipos, en prácticas de higiene personal o en mantenimiento de instalaciones, entre otros.

Durante la elaboración, los alimentos crudos básicamente de origen animal se someten a diferentes tratamientos con el fin de inhibir la proliferación de microorganismos o bien de eliminarlos por completo. Existen diferentes procesos tecnológicos para eliminar o reducir el número de salmonelas en los alimentos crudos como son: tratamientos de esterilización, pasteurización, irradiación, refrigeración, congelación, ajuste de pH, y Aw, e incluso la adición de conservantes naturales como los aceites esenciales con poder bactericida o los polifenoles, ya que dificultan la actividad y el desarrollo del patógeno.

Los tratamientos térmicos se utilizan como método principal para la inactivación de *Salmonella* durante la preparación y transformación de los alimentos crudos. Las temperaturas oscilan a partir de los 70°C aunque los alimentos con poca actividad de agua o alto contenido de grasa exigen un tratamiento térmico más intenso (Sánchez *et al.*, 2009). Un ejemplo de tratamiento térmico es la pasteurización, un proceso que ayuda a destruir la *Salmonella* y que suele bastar con una temperatura de 72°C durante 15 segundos aunque ciertos alimentos, como los huevos, deben pasteurizarse a una temperatura más baja, aproximadamente de 64-65°C durante 2-4 minutos para asegurarse que se eliminan los microorganismos patógenos que puedan contener. Algunos fabricantes también aumentan la temperatura, disminuyendo el tiempo de tratamiento, lo que se conoce como ultrapasteurización (Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos, 2006). En ambos casos los tratamientos se aseguran en agredir lo mínimo posible las propiedades organolépticas del alimento. La pasteurización es adecuada para alimentos líquidos, ligeramente ácidos como leche o zumos de verduras y fruta (Sánchez *et al.*, 2009).

La irradiación en los alimentos se utiliza con el fin de aumentar el tiempo de conservación y como medidas de saneamiento. Es un tratamiento no térmico que se aplica sobre todo en productos sólidos y consiste un conjunto de emisiones (normalmente electrones de alta energía o ciertas ondas electromagnéticas) que interactúan con la materia produciendo ionizaciones, es decir, pérdida de electrones que se convierten en iones. Dichas ionizaciones producen cambios, particularmente en el material biológico, que acaba alterando el funcionamiento de las estructuras de los seres vivos (Raventós, 2003).

La desinfección por irradiación en diversos alimentos como carnes frescas, peces o huevos, permite eliminar un amplio grupo de bacterias patógenas como *Salmonella* sin llegar a dañar las propiedades del alimento. También permite eliminar insectos, descartando el uso de insecticidas y fumigantes. Ciertamente, no todos los tratamientos pueden aplicarse de la misma manera en los alimentos ya que su eficacia depende de la matriz con la que se trabaje. En productos frescos es recomendable utilizar la pasteurización o esterilización en frío ya que permite aumentar las posibilidades de que el alimento llegue a los establecimientos en mejores condiciones que los demás productos. En contrapartida, es un método que está en fase de evaluación ya que no todos sus efectos llegan a ser deseados. El hecho de la probabilidad de que produzcan moléculas tóxicas o puedan disminuir el contenido nutricional de los alimentos ha llevado al Comité de expertos sobre irradiación de alimentos (FAO/OIEA/OMS) a establecer unas normas para garantizar la seguridad de los alimentos que se utilizan con este tipo de tratamientos (Raventós, 2003).

Existen varios tipos de radiaciones ionizantes: rayos X, rayos Y o haces de electrones. Las dosis varían según el tipo de alimento, ajustándose a la necesidad de cada producto. En productos como las carnes la irradiación en dosis entre 10 y 50 kGy ayuda a eliminar *Salmonella* y otros patógenos no deseables. En el caso del pescado y marisco es importante que el producto este en buenas condiciones antes y después de la irradiación. Las dosis adecuadas son de 0.75 a 1.5 kGy para los productos frescos y cocidos y de 2 a 5 kGy para los productos congelados. En productos como el huevo y ovoproductos hace falta una dosis de 2.50 kGy para eliminar la *Salmonella* (Raventós, 2003).

El control de microorganismos también se realiza mediante refrigeración; ésta es esencial para el mantenimiento de alimentos como huevos u ovoproductos, que deben conservarse a una temperatura de 8°C. Cada alimento necesita una temperatura idónea de refrigeración, por eso es importante no romper la cadena de frío entre el transporte, distribución y conservación en el hogar. Con la refrigeración se consigue frenar la acción de los microorganismos y los procesos físico-químicos, de modo que se eviten los malos olores y posibles pardeamientos que puedan derivar en enfermedades alimentarias. La congelación también provoca una disminución del número de microorganismos patógenos y consigue inhibir el crecimiento de otros. *Salmonella* puede ser inhibida durante el proceso de congelación, a unos -18°C, como mínimo (Pascual & Calderón y Pascual, 2000).

El ajuste apropiado de la acidez (pH) es un método empleado para destruir las salmonelas o inhibir su proliferación al elaborar ciertos alimentos. Las salsas se suelen aliñar con un medio ácido como el vinagre o el limón ya que complica la proliferación de bacterias. Fuera del intervalo de pH de crecimiento de *Salmonella*, las células se inactivan aunque no es

instantáneo ya que se ha demostrado que pueden sobrevivir largos periodos en productos ácidos.

La actividad de agua ( $a_w$ ) también tiene un efecto significativo en el crecimiento de *Salmonella*. Su valor mínimo se sitúa en 0.93 pero puede llegar a sobrevivir durante un largo periodo en alimentos que contengan valores aún más bajos como es el caso del chocolate, la pimienta negra o la gelatina. Las sales que se añaden o presentan ciertos alimentos pueden tener un efecto negativo sobre *Salmonella* ya que son capaces de captar el agua que pueda estar retenida en los alimentos, provocando una disminución de la actividad del agua e inhibiendo el crecimiento del microorganismo (Trepát i Quílez, 2002).

### 1.4.2 Prevención y control de *Salmonella*

La prevención de *Salmonella* exige controlar todas las etapas de fabricación, elaboración y preparación de los alimentos destinados al consumo, tanto en las industrias como en los hogares (Protocolo de vigilancia y alerta de salmonelosis, 2012):

- Es importante cocinar a temperaturas que alcancen los 65°C en el centro del producto.
- Las comidas ya preparadas deben ser refrigeradas a una temperatura inferior a 5°C y en pequeños recipientes.
- Evitar la contaminación cruzada separando los alimentos crudos de los cocidos
- Limpiar las superficies y los utensilios una vez se haya cocinado y proteger la comida ya preparada contra insectos y roedores. Lavarse las manos con frecuencia al manipular alimentos.
- Establecer programas de control de *Salmonella* (control de limpieza y desinfección y otras medidas sanitarias e higiénicas).
- Educar a la población, de manera que se evite el consumo de huevos crudos, sucios, rotos o que hayan sido cocinados de forma incompleta.

Los alimentos que con más frecuencia causan salmonelosis son las carnes y productos cárnicos, carnes de aves y subproductos, huevos y ovoproductos, leche y productos derivados de la leche. Los animales cuyas carnes se destinan al consumo humano, sobre todo terneros, cerdos y aves considerados sanos, son portadores de *Salmonella* en una tasa que oscila entre el 20-30 %. Las aves causan la mayoría de brotes de salmonelosis. Los huevos se contaminan en el tracto intestinal del propio animal o por sus heces. Con tal de conservar correctamente los huevos hay que mantener una temperatura y humedad ambiental adecuadas. La humedad no debe superar el 80% ya que puede dar lugar a una proliferación de hongos y otros microorganismos que deteriorasen el huevo. La temperatura estaría entre 1 y 10°C, sin llegar nunca a la congelación. En lo posible, es importante evitar los cambios bruscos de temperatura ya que al producirse la condensación del agua en la superficie de la cáscara aumenta la posibilidad de entrada de bacterias en el interior del huevo a través de los poros (Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos, 2006).

Simple measures of personal hygiene, such as washing hands frequently with water and soap, are enough to avoid contaminating food during its preparation. Educating the population about the risks that produce a poor handling of food is essential to prevent this type of foodborne infections.

## *2. Objetivos*

---

CALITEC es una empresa destinada a la implantación de sistemas que garantizan la Seguridad Alimentaria en la producción primaria y en la industria agroalimentaria. Ofrece servicio de laboratorio, asesoría y control de calidad, trazabilidad de productos, formación continuada al personal del sector alimentario y agroambiental y planes de prevención de plagas y desinfección.

El laboratorio está acreditado por la ENAC (Entidad Nacional de Acreditación), según los criterios recogidos en la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005, destinados a ensayos microbiológicos y físico-químicos de productos agroalimentarios.

El análisis de *Salmonella* está basado en la normativa europea ISO 6579 donde se describe un método horizontal para la detección de *Salmonella*, incluyendo las cepas *typhi* y *paratyphi*. Pero ante la necesidad de crear y desarrollar nuevas tecnologías en el laboratorio que garanticen resultados más precisos y en menor tiempo para las empresas, existen algunas técnicas diseñadas para cumplir con estas especificaciones, como es el caso del sistema VIDAS o la PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Los objetivos de este Trabajo Final de Grado son:

1- determinar la incidencia de *Salmonella* spp en distintos alimentos y mediante 3 técnicas analíticas de investigación:

- método tradicional ISO 6579 (siguiendo la normativa europea).
- método de inmunofluorescencia (ELFA).
- método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos.

2- ampliar la validación de la técnica de investigación de *Salmonella* spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos en diferentes matrices, en especial de huevos y carnes de ave de corral.

3- comparar los diferentes métodos utilizados a partir de los resultados obtenidos.

### *3. Material y métodos*

### 3.1 Medios de cultivo y reactivos

#### Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo

- Agua de peptona tamponada. BioMérieux

#### Medios de cultivo

- Caldo SX<sub>2</sub>. BioMérieux
- Rappaport-Vassiliadis semisólido. Oxoid
- Caldo Müller-Kauffman tetracionato-novobiocina (MKTTn). Microplanet
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). Microplanet
- Agar Hektoen. BioMérieux
- Agar nutritivo (AN). Scharlab
- Agar Kligler. Scharlab

#### Reactivos

- Suplemento *Salmonella* (*Salmonella* SUPP). BioMérieux
- Cono y cartuchos VIDAS para VIDAS UP. BioMérieux
- Cono y cartuchos VIDAS para VIDAS SLM. BioMérieux
- Pruebas bioquímicas OXIDASA. Oxoid
- Pruebas bioquímicas RAPID ONE. Oxoid
- Pruebas bioquímicas API 20E. BioMérieux

#### Equipos y material

Tabla 8. Equipos y material utilizados para el análisis (Calitec .PNT 2)

<b>Equipo</b>	<b>Rango</b>	<b>Resolución</b>	<b>Tolerancia</b>
<b>Nevera</b>	5°C	1°C	3°C
<b>Balanza</b>	10-50g	0.1g	1%
<b>Autoclave</b>	121°C	1°C	3°C
<b>Baño termostático de agua</b>	45.5°C	0.1°C	1.5°C
<b>Stomacher</b>	1-3 minutos	90 segundos	---
<b>Bolsas stomacher</b>	---	---	---
<b>Mechero quemador bunsen</b>	---	---	---
<b>Pipetas punta desechable</b>	0.1 ml 1.0 ml	0.1 ml 1 ml	5% 2%
<b>Micropipeta</b>	500 µl	10 µl	2%
<b>Cabina flujo laminar</b>	---	---	---
<b>Agitador vórtex</b>	0-2500 l/min	200l/min	---
<b>Estufa de cultivo</b>	37°C	0.1°C	1°C
<b>Estufa de cultivo</b>	41.5°C	0.5°C	1°C

<b>Heat&amp;Go (BioMérieux)</b>	126°C - 136°C	0.1°C	5°C
<b>MiniVidas (BioMérieux)</b>	---	---	---
<b>Asas de siembra desechables</b>	1 µl	---	---
<b>Asas de Nicrom</b>	---	---	---
<b>Baño María</b>	95-100°C	---	---

El equipo **Vidas Heat&Go** (imagen 4) está basado en un sistema de calefacción en seco que proporciona una fuente de temperatura constante. Su función consiste en calentar las muestras contenidas en los cartuchos de miniVidas para mejorar la sensibilidad de los ensayos, proceso denominado “terminación”. Para ello, basta con encender el aparato y dejar que el calentador alcance la temperatura indicada de 131°C. Una vez fijada esta temperatura una luz empieza a parpadear, lo cual significa que el equipo está listo para su uso. Se pueden calentar hasta 12 muestras y el tiempo de utilización depende del análisis que vaya a realizarse. Sirve para todo tipo de muestras excepto en el caso de huevos y carnes de ave de corral ya que estos alimentos presentan una fuerte coagulación. En estos casos se utiliza un baño María.



Imagen 4. Vidas Heat&Go (BioMérieux.com)

**Mini VIDAS** es un equipo automatizado (imagen 5) que permite determinar diferentes parámetros de inmunoanálisis para la detección rápida de microorganismos patógenos en muestras de alimentos; se fundamenta en el principio ELISA fluorogénico, tecnología ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay). Este procedimiento se basa en “la detección de un antígeno inmovilizado sobre una base sólida, mediante anticuerpos combinados con fluorescencia”, lo que hace que sea un análisis muy sensible y específico. Existen diversos kits para la detección de *Salmonella*, y también para diferentes microorganismos (BioMérieux).

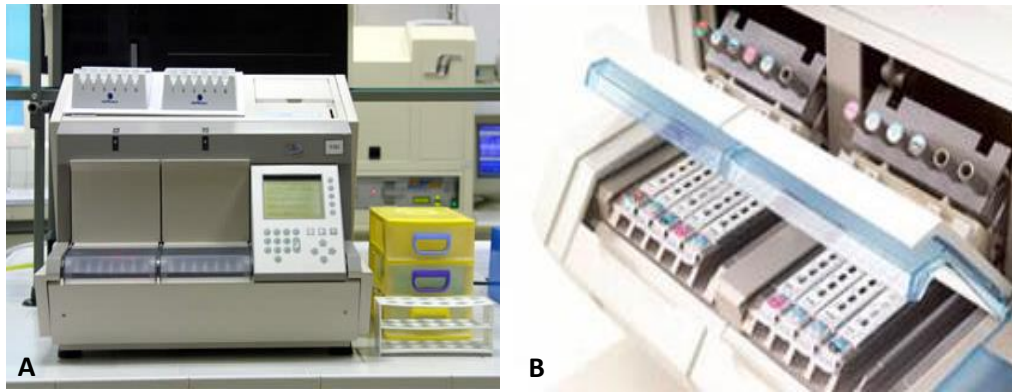


Imagen 5. A) Equipo automático para la detección de patógenos mini VIDAS. B) detalle de la parte frontal del equipo (BioMérieux.com)

La parte del equipo en la que se produce la reacción inmunológica y de fluorescencia está formado por el cartucho y el cono. El cartucho es una tira alargada de 10 pocillos en los que se introduce la muestra y los distintos reactivos necesarios para el análisis (imagen 6). El cono (SPR o Solid Phase Receptacle) en forma de punta de pipeta es específico para detectar cada microorganismo y actúa como fase sólida de la reacción.

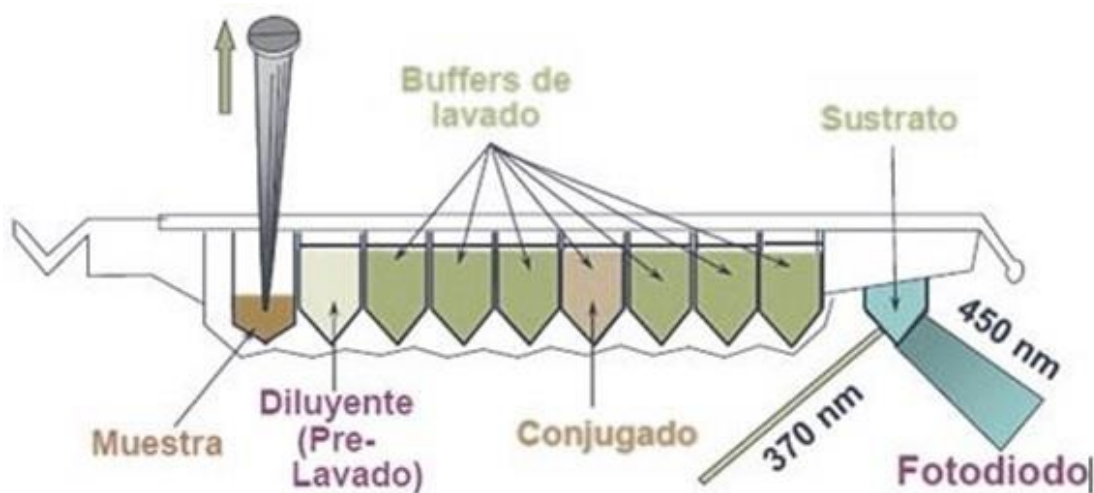


Imagen 6. Cartucho de 10 pocillos con los reactivos y los buffers de lavado (BioMérieux.com)

El método de inmunofluorescencia (ELFA) se realiza con el kit VIDAS *Salmonella* (SLM); el interior del cono está recubierto de anticuerpos anti-*Salmonella*. El medio de reacción es aspirado y expulsado del cono SPR varias veces. En el primer pocillo del cartucho de reactivos se dosifica parte del caldo de enriquecimiento que contiene la muestra. La reacción que se genera consiste en que los antígenos presentes en el microorganismo a estudiar se unen a los anticuerpos anti-*Salmonella* que recubren el interior del cono. Los componentes de la muestra

no ligados se eliminan mediante lavado. El conjugado que contiene un segundo anticuerpo anti-*Salmonella* unido con fosfatasa alcalina marcada con un fluorocromo (sustrato que va a permitir realizar la lectura de la fluorescencia emitida durante la reacción) es aspirado y expulsado del cono y se une a los antígenos de *Salmonella* que a su vez están unidos a los anticuerpos de la pared del cono SPR, formando así una especie de “sándwich”, tal y como se muestra en la imagen 7. Mediante nuevos pasos de lavado se elimina el conjugado no ligado para descartar posibles interferencias durante el análisis. Finalmente, se añade el sustrato (4-metil-umbeliferil-fosfato) sobre el que actúa la fosfatasa alcalina hidrolizando el enlace umbeliferil con el fosfato, produciendo 4-metil-umbeliferona, molécula fluorescente que va a permitir realizar la lectura de la fluorescencia emitida durante la reacción.

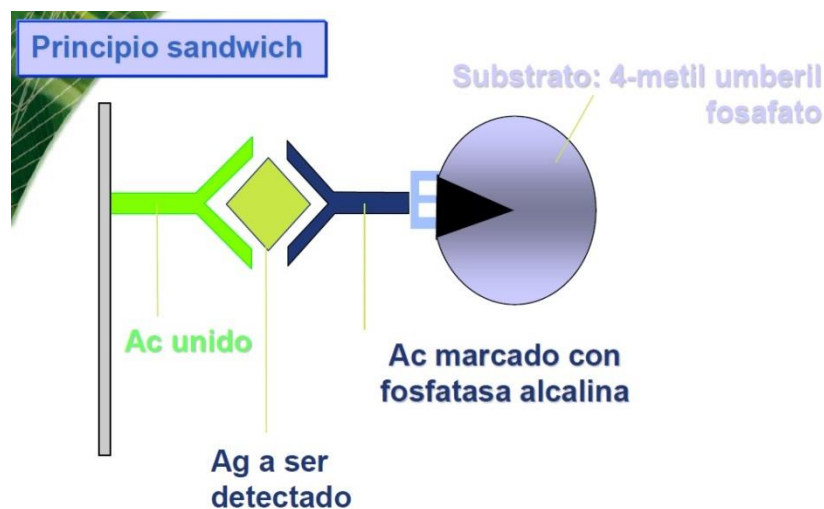


Imagen 7. Principio “sándwich” entre los anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina y los antígenos de *Salmonella* con los anticuerpos de la pared del cono SPR (BioMérieux.com)

El método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos se realiza usando el kit VIDAS UP *Salmonella* (SPT); se procede de manera similar a la descripción realizada anteriormente pero se diferencia básicamente en que se utilizan proteínas recombinantes obtenidas de fagos conjugados con la fosfatasa alcalina y que se unirán a los receptores de *Salmonella* unidos a la pared del cono SPR.

El equipo está programado para solicitar una recalibración cada 14 días o cuando se utilice un lote de reactivo, por primera vez, que incluye un control positivo y un control negativo (BioMérieux).

**DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS DEL CARTUCHO CORRESPONDIENTE AL kit VIDAS *Salmonella* (SLM)**

Tabla 9. Descripción de los reactivos del cartucho SLM (BioMérieux.com)

Pocillos	Reactivos
1	Pocillo para la muestra: se dosifican 500 µl de caldo de enriquecimiento o estándar.
2	Tampón de prelavado (400 µl): TBS (150 mmol/l) – Polisorbato 20 pH 7.6 + conservante.
3-4-5-7-8-9	Tampón de lavado (600 µl): TSB (150 mmol/l) – Polisorbato 20 pH 7.6 + conservante.
6	Conjugado (400 µl): anticuerpos anti- <i>Salmonella</i> marcados con fosfatasa alcalina + conservante.
10	Cubeta de lectura con sustrato (300 µl): 4-metil-umbeliferil-fosfato (0.6 mmol/l) + dietanolamina (DEA) (0.62 mol/l o 6.6 %, pH 9.2) + conservante.

**DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS DEL CARTUCHO CORRESPONDIENTE AL kit VIDAS UP *Salmonella* (SPT)**

Tabla 10. Descripción de los reactivos del cartucho SPT (BioMérieux.com)

Pocillos	Reactivos
1	Pocillo para la muestra: se dosifican 500 µl de caldo de enriquecimiento o estándar.
2	Solución de prelavado (400 µl): tampón pH 7.8 + conservante.
3-4-5-7-8-9	Solución de lavado (600 µl): TSB (150 mmol/l) – Polisorbato 20 pH 7.6 + conservante.
6	Conjugado (400 µl): proteínas específicas para los receptores de <i>Salmonella</i> marcadas con fosfatasa alcalina + conservante.
10	Cubeta de lectura con sustrato (300 µl): 4-metil-umbeliferil-fosfato (0.6 mmol/l) + dietanolamina (DEA) (0.62 mol/l o 6.6 %, pH 9.2) + conservante.

En la tabla 11 se presenta un resumen de los dos métodos de detección de *Salmonella* a través del equipo Mini VIDAS:

Tabla 11. Comparación de los métodos utilizados a través del equipo Mini VIDAS

	<b>Método inmunofluorescencia (ELFA)</b>	<b>Método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos</b>
<b>Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo</b>	si	si
<b>Enriquecimiento en medio líquido selectivo</b>	si	no
<b>Suplemento</b>	no	si
<b>Kit</b>	VIDAS SLM	VIDAS UP
<b>Tiempo de calentar la muestra</b>	15±1 minutos	5±1 minutos
<b>Cono SPR</b>	Recubierto de anticuerpos anti- <i>Salmonella</i>	Recubierto de proteínas específicas para los receptores de <i>Salmonella</i>
<b>Reacción</b>	Anticuerpo-Antígeno anti- <i>Salmonella</i>	Proteínas-receptores <i>Salmonella</i>
<b>Producto fluorescente</b>	4-metil-umbeliferona	4-metil-umbeliferona
<b>Luz de absorción</b>	370 nm	370 nm
<b>Luz de emisión</b>	450 nm	450 nm
<b>Tiempo total del análisis</b>	48 horas	24 horas
<b>Confirmación en caso de presencia</b>	4-5 días	4-5 días

### 3.2 Detección de *Salmonella* spp según método tradicional ISO 6579

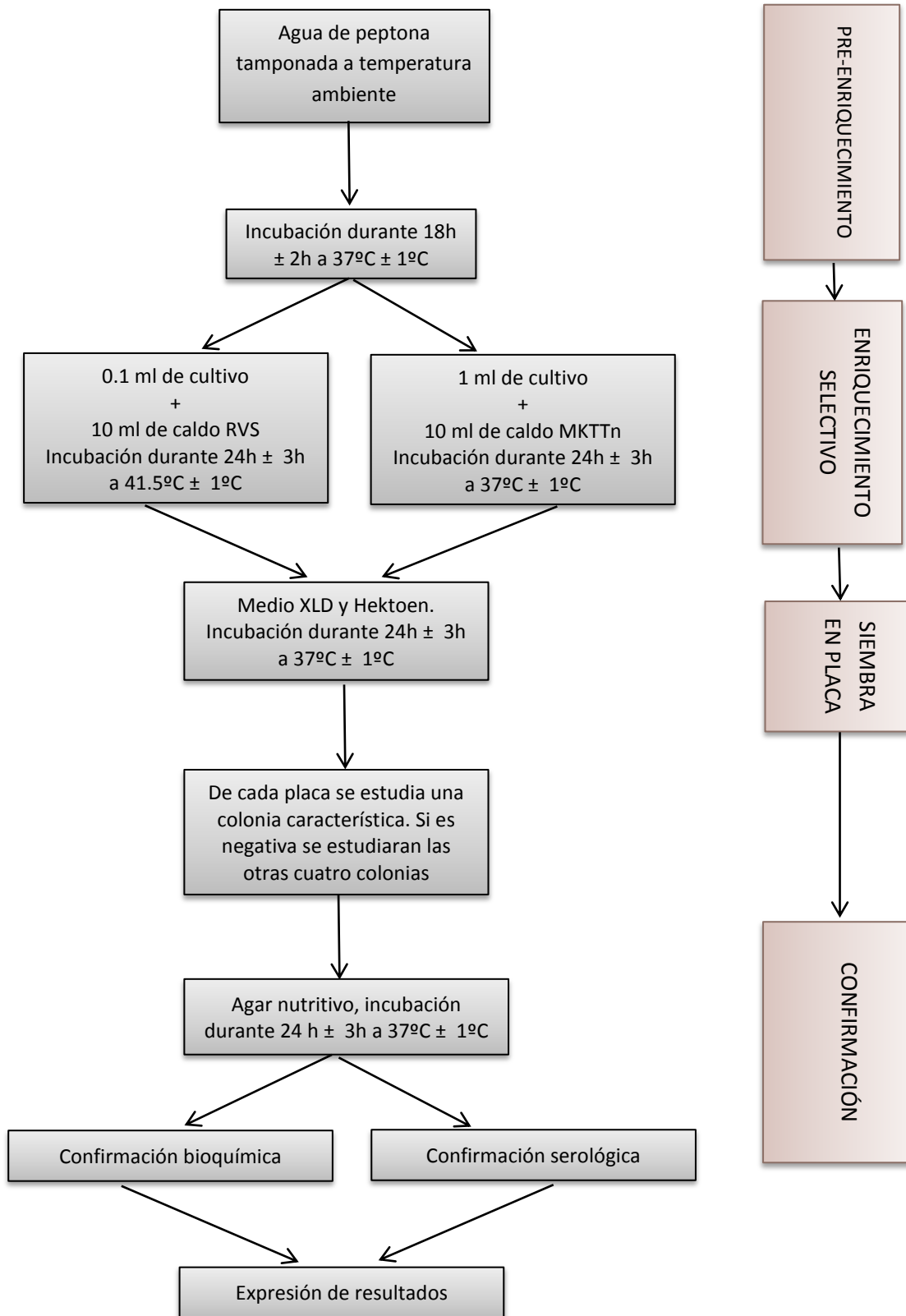


Imagen 8. Diagrama del procedimiento (AENOR, 2003)

- **Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo**

- Se toma, en condiciones asépticas, una cantidad de entre 10-50 gramos de muestra (salvo que se especifique lo contrario, se pesan 25 gramos) y se multiplica el resultado por 9, obteniendo así la cantidad en gramos de diluyente necesarios para lograr una dilución 1:10.
- Se tritura y homogeneiza el alimento con agua de peptona tamponada (APT) con la ayuda de un stomacher.
- Se deja incubar el recipiente estéril (bolsa de plástico con filtro) a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18-20 horas.

- **Enriquecimiento en medios selectivos**

- Transcurrido el tiempo de incubación, se siembra de la bolsa de la muestra un volumen total de 0.1 ml y se distribuyen 3 gotas de manera separada y a la misma distancia, mediante pipeta automática con punta desechable estéril, en una placa de caldo Rappaport-Vassiliadis peptona de soja (caldo RVS), medio de cultivo selectivo semisólido, previamente aditivado con una solución de novobiocina.
- Se incuban las placas en posición invertida a  $41.5\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$  horas.
- Paralelamente, se transfiere 1 ml de la misma bolsa incubada a un tubo de 10 ml de caldo Müller-Kauffmann Tetratoato Novobiocina (MKTTn), previamente aditivado con una solución de novobiocina y una solución de yodo-yoduro potásico.
- Se dejan incubar los tubos a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$  horas.

- **Siembra en placa en agar selectivo**

Se utilizan dos medios sólidos selectivos:

- Agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato)
- Agar Hektoen
- Se siembra  $1\ \mu\text{l}$  introduciendo un asa de siembra desechable estéril dentro del borde del halo opaco de crecimiento y se inocula la superficie de una placa de XLD y paralelamente una placa de Hektoen con una estría por agotamiento, de manera que se obtengan colonias aisladas.
- Se dejan incubar las placas a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$  horas en posición invertida.

- **Aislamiento en agar no selectivo**

- Se toma al menos una colonia típica o sospechosa y se vuelve a aislar en una superficie de agar nutritivo con la ayuda de un asa de siembra desechable estéril y se realiza una estría por agotamiento con el fin de obtener colonias totalmente aisladas.

- Se incuban las placas de manera invertida a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 3$  horas.
- **Confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella***
  - A partir de las colonias crecidas en agar nutritivo se realiza una siembra en un tubo de agar con hierro Kligler. Con la ayuda de asa de Nicrom estéril se realiza una primera siembra en una picadura en el interior del agar y luego una segunda siembra en forma de zig-zag en la superficie inclinada.
  - Se incuban los tubos Kligler a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se realiza una primera lectura para verificar el crecimiento y si es necesario se dejan incubar 24 horas más.

La mayoría de *Salmonella* spp son Glucosa +, Lactosa -, existiendo variantes según la cepa. Los cambios de color se pueden interpretar según la reacción producida (imagen 9):

CRECIMIENTO EN PROFUNDIDAD	
REACCIÓN	CAMBIO
Glucosa +	Amarillo
Glucosa -	Rojo o sin cambio
Formación de sulfuro de hidrógeno	Negro
Formación de gas a partir de la glucosa	Formación de burbujas o fisuras
CRECIMIENTO EN SUPERFICIE	
REACCIÓN	CAMBIO
Lactosa y/o sacarosa positivo	Amarillo
Lactosa y/o sacarosa negativo	Rojo o sin cambio

Imagen 9: Cambios de color típicos de *Salmonella* (Calitec. PNT 1)

- **Confirmación bioquímica: RapID ONE/API 20E**
  - En primer lugar se realiza el test de la oxidasa a partir del Kligler para saber si es necesario realizar una confirmación bioquímica posterior. Con la ayuda de un asa estéril desechable se pincha el agar Kligler y se moja la tira oxidasa. Si la zona impregnada vira a un color lila la prueba es oxidasa positiva, es decir *Salmonella* negativa pero si no vira es oxidasa negativa y se procede a una confirmación bioquímica final.
  - El test RapID ONE se basa en un micrométodo cualitativo para la identificación de Enterobacterias y bacilos Gram-negativos y negativos a la oxidasa. Está formado por un panel o galería con 18 pocillos de reacción, entre ellos el indol, que contienen

reactantes deshidratados. Mediante el líquido de inoculación RapID se realiza una suspensión bacteriana que permite rehidratar los pocillos. Se deja incubar el panel a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas. Pasado el tiempo se examina la galería según el cambio de color (imagen 10). Hay que tener en cuenta que en ciertos pocillos previamente se debe añadir un reactivo para un cambio de color (BioMérieux).

**remel** **RapID™ ONE** Report Form

Identificación N.º / N.º de referencia \_\_\_\_\_  
 Date / Fecha \_\_\_\_\_  
 Tech / Tec \_\_\_\_\_  
 Origine / Origen \_\_\_\_\_

Rapidez Reactivo	Nessure / Ninguno														RapID One Rapidez Reactivo RapID One	Nessure / ninguno	RapID Spot Indole			
Reacciones positivas	Rosado o violeta / Rapo o violeta	Porpora acceso o oscuro / Morado intenso o azul	Giallo Amarello												Rosato Rapo	Violeta, porpora, rosso o rosa scuro / Violeta, morado rapo o rosa oscuro	Giallo o arancio molto chiaro / Anarillo o naranja muy claro	Marrone, nero o porpora / Marrón, negro o morado		
Cantidad N.º / N.º de cantidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
Código esame / Código de prueba	URE	ADH	ODC	LDC	TET	UP	KSF	SEL	GLU	ONPG	BGL	BVL	NAG	MAL	PRO	GGT	PHS	ADON	IND	OX
Valore / Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
Risultato / Resultado																				
Valore totale / Valor total																				

Identificazione / Identificación \_\_\_\_\_

Microsite: REMEL Inc 800-255-6730 Printed in USA 0412



A B

Imagen 10. A) Hoja de trabajo RapID ONE. B) Galería de reactivos RapID ONE (Oxoid.com)

- La galería API 20E es otra prueba bioquímica que identifica Enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos. Consta de 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. La prueba número 21 es la oxidasa y se realiza de forma independiente a la galería. A partir de una suspensión bacteriana en solución salina se inoculan los microtubos tal y como indican las instrucciones. Se deja incubar la tira a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se apuntan los cambios de color de los reactivos (imagen 11).

Tanto del test RapID ONE como del API 20E se obtiene una serie de resultados + o - que, agrupados de una manera específica, dan como resultado un código, el cual introducido en una base de datos permite identificar con un porcentaje de posibilidad la bacteria presente en el alimento (imagen 10 y 11).

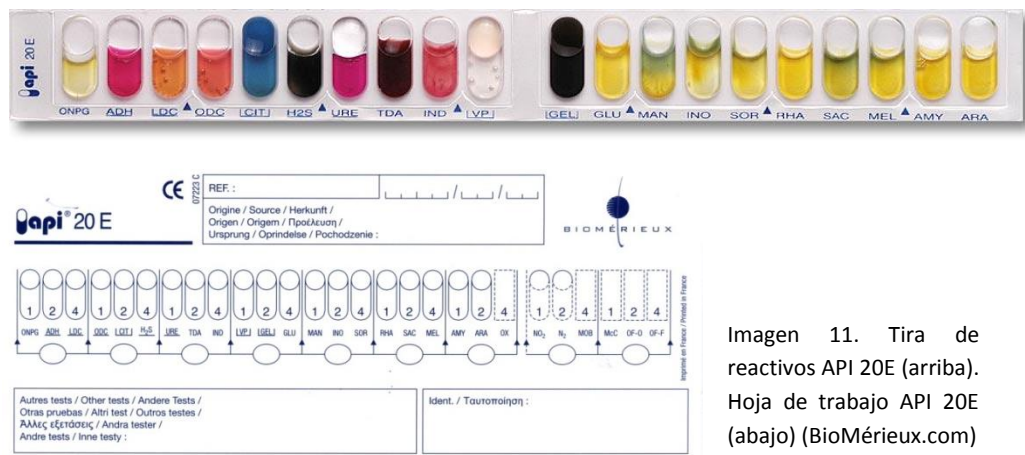


Imagen 11. Tira de reactivos API 20E (arriba). Hoja de trabajo API 20E (abajo) (BioMérieux.com)

### 3.3 Detección de *Salmonella* spp mediante inmunofluorescencia (ELFA)

- **Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo**

En el preenriquecimiento de la muestra se procede de la misma manera comentada anteriormente (ver apartado 3.2: Detección de *Salmonella* spp según método tradicional ISO 6579).

NOTA: Si la matriz a analizar es leche en polvo, para una mejor disolución, es preferible introducir primero el agua de peptona tamponada en la bolsa y después espolvorear el producto sobre la superficie del diluyente. Se deja 30 minutos a temperatura ambiente para una óptima rehidratación antes de la incubación.

- **Enriquecimiento en medios selectivos**

- Pasado el tiempo de incubación, se transfieren 0.1 ml del caldo de preenriquecimiento, mediante una pipeta automática con punta estéril desechable, a un tubo de 10 ml de caldo SX<sub>2</sub> ya preparado y previamente atemperado a 18-25°C.
- Se deja incubar en estufa a 41.5±1°C durante 22-26 horas.

- **Realización del Test mediante inmunofluorescencia (ELFA): kit Vidas Salmonella (SLM)**

- Transcurrido el tiempo de incubación, con la ayuda de un vórtex, se homogeneiza el tubo de caldo SX<sub>2</sub> y se transfieren 0.5 ml al pocillo de la muestra del cartucho de reactivos VIDAS, previamente atemperado.
- Con la ayuda del calentador HEAT&GO se calienta el cartucho VIDAS durante 15±1 minutos del tal manera que se alcancen temperaturas de ebullición. Luego, se deja enfriar unos 10 minutos.
- Una vez encendido el aparato, se colocan los cartuchos en la compuerta inferior y los conos, previamente atemperados en la compuerta superior. Se programa el quipo a través del teclado, identificando cada muestra con una letra y un número que corresponde al año, mes y a la cantidad de muestras hechas hasta la fecha en el laboratorio.
- Ante la posibilidad de necesitar una confirmación posterior se conserva el tubo de caldo SX<sub>2</sub> a una temperatura de unos 2-8°C. Es posible conservar el tubo hasta 72 horas a esta temperatura antes de realizar la confirmación de un resultado positivo.

- **Confirmación de resultados positivos obtenidos**

**Aislamiento en medios sólidos selectivos**

- A partir de las muestras positivas obtenidas durante el análisis del test VIDAS SLM, se siembra, del tubo de SX<sub>2</sub>, con un asa de siembra estéril desechable sobre una placa de XLD, formando una estría por agotamiento. Se realiza una segunda siembra en otro medio de cultivo elegido, en este caso en una placa de Hektoen.
- Se dejan incubar en posición invertida en la estufa a 37±1°C durante 24±3 horas las placas de XLD y 24 horas las placas de Hektoen para una primera lectura. En caso de que haya poco crecimiento se pueden dejar las placas durante 24 horas más.
- Se examinan las placas con tal de encontrar colonias típicas o sospechosas de *Salmonella* (imagen 12).

CRECIMIENTO EN XLD	
REACCIÓN	COLONIA
<i>Salmonella</i> Glucosa +/Lactosa -/H <sub>2</sub> S +	Centro negro y una zona ligeramente transparente de color rojizo
<i>Salmonella</i> H <sub>2</sub> S -	Rosas con un centro rosa más oscuro
<i>Salmonella</i> Lactosa +	Amarillas con o sin ennegrecimiento
CRECIMIENTO EN HEKTOEN	
REACCIÓN	COLONIA
<i>Salmonella</i> Lactosa, sacarosa, salicina +	Amarillo salmón o azules verdes
<i>Salmonella</i> H <sub>2</sub> S -	Verdes o azuladas
<i>Salmonella</i> H <sub>2</sub> S +	Centro negro

Imagen 12: Colonias típicas de *Salmonella* (Calitec. PNT 1)

Tras haber incubado las placas de XLD y Hektoen, se realiza un **aislamiento en agar no selectivo** de las colonias seleccionadas mediante una estría por agotamiento en una placa de agar nutritivo. Después de 24 horas, se realiza una **confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella*** con la prueba de la oxidasa y en caso de resultado negativo se realiza posteriormente una **confirmación bioquímica** mediante los test **RapID ONE** y/o **API 20E**.

Los pasos anteriormente comentados se encuentran más detallados en el apartado 3.2: Detección de *Salmonella* spp según método tradicional ISO 6579.

### 3.4 Detección de *Salmonella* spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos

- **Preenriquecimiento en medio líquido no selectivo**

Para el preenriquecimiento de la muestra se procede de la misma manera comentada en el apartado 3.2: Detección de *Salmonella* spp según método tradicional ISO 6579.

NOTA: Si la matriz a analizar es leche en polvo, para una mejor disolución, es preferible introducir primero el agua de peptona tamponada en la bolsa y después espolvorear el producto sobre la superficie del diluyente. Se deja 30 minutos a temperatura ambiente para una óptima rehidratación antes de la incubación.

Para ciertos productos alimentarios es necesario emplear otros procedimientos de preenriquecimiento:

- ◆ Cacao y productos que contienen cacao (más del 20%): se añaden 50 g/l de caseína (evitar la caseína ácida) o 100 g/l de leche desnatada en polvo estéril al agua de peptona tamponada.
- ◆ Productos alimenticios ácidos y acidificantes: hay que asegurarse que el pH no baja de 4.5 durante el preenriquecimiento. El pH de dichos productos se mantiene más estable si se utiliza agua de peptona tamponada a doble concentración.
- Se mezcla bien el inóculo en el stomacher.
- Se añade Y ml de Suplemento *Salmonella* (homogeneizar el suplemento *Salmonella* con ayuda de un agitador vórtex antes de usarlo) correspondiente a:

$$Y (ml) = \frac{\text{Volumen agua de peptona tamponada (ml)}}{225 ml}$$

- Se homogeneiza manualmente el contenido de la bolsa.
- Se deja incubar durante 18-24 horas a  $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- **Realización del Test Inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos: kit Vidas UP Salmonella (SPT)**

- Transcurrido el tiempo de incubación, se homogeneiza manualmente el contenido de la bolsa. Se transfiere 0.5 ml del contenido de la bolsa o del caldo de enriquecimiento al pocillo de la muestra del cartucho VIDAS SPT, previamente atemperado e identificado con el número de muestra.

- Se calienta el pocillo del cartucho VIDAS SPT durante 5±1 minutos llevando la muestra del pocillo a temperaturas de ebullición, con la ayuda del VIDAS HEAT&GO.

Para muestras de huevos y carnes de ave de corral no se debe utilizar VIDAS HEAT&GO. En este caso, se utiliza un baño María:

- ◆ Se transfiere 2-3 ml del caldo de enriquecimiento a un tubo estéril (para muestras que presentan una fuerte coagulación después del calentamiento es recomendable calentar un volumen mayor, por ejemplo 10 ml).
  - ◆ Se sella el tubo y se calienta durante 5±1 minutos a 95-100°C.
  - ◆ Se deja enfriar el tubo y con la ayuda de un agitador vórtex se mezcla el caldo hervido.
  - ◆ Se transfiere 0.5 ml del caldo al pocillo para la muestra del cartucho VIDAS SPT.
- Calentada la muestra, se retira el cartucho del VIDAS HEAT& GO y se deja enfriar 10 minutos.
  - Una vez encendido el aparato, se colocan los cartuchos en la compuerta inferior y los conos, previamente atemperados, en la compuerta superior. Se programa el equipo a través del teclado y los botones anexos a la pantalla, identificando cada muestra con una letra y un número que corresponde al año, mes y a la cantidad de muestras hechas hasta la fecha en el laboratorio.
  - Ante la posibilidad de necesitar una confirmación posterior se conserva el caldo de enriquecimiento no calentado durante 72 horas entre 2-8°C.
  - El test VIDAS UP con un resultado positivo requiere una confirmación posterior.

Para la **confirmación de resultados positivos obtenidos** mediante el test VIDAS UP, se realiza un **aislamiento en medios sólidos selectivos** en dos medios de cultivo, XLD y Hektoen. Tras su incubación, se realiza un **aislamiento en agar no selectivo** a través de una estría por agotamiento en una placa de agar nutritivo. Por último, se procede a una **confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella*** mediante la prueba de la oxidasa y en caso de resultado negativo se realiza una **confirmación bioquímica** mediante los test **RapID ONE** y/o **API 20E**.

Los pasos anteriormente comentados se encuentran más detallados en el apartado 3.2: Detección de *Salmonella* spp según método tradicional ISO 6579.

### 3.5 Informe de ampliación de validación de investigación de *Salmonella* spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos

El objetivo es ampliar la validación del método analítico de investigación de *Salmonella* spp mediante la utilización del kit VIDAS UP *Salmonella* (SPT) y obtener el límite de detección.

Según los criterios establecidos por el laboratorio:

El **límite de detección** de la técnica debe ser **equivalente o inferior a 10 UFC** por porción analítica.

La **sensibilidad** y la **especificidad** deben ser **superiores o iguales al 90%**.

El **límite de detección** debe tener un cumplimiento superior o igual al **90%**.

La **desviación positiva** y **desviación negativa** no deben **superar el 10%**.

#### 3.5.1. Preparación de las muestras

La validación del método se realiza en dos etapas. La primera etapa se inicia en diciembre de 2013 y se seleccionan las siguientes matrices para el análisis:

- Nata (Producto lácteo)
- Queso (Producto lácteo)
- Pienso (Alimento para animales)
- Harina avícola (Materia prima de alimentación animal)
- Pizza (Comida preparada)
- Agua (Agua destilada)
- Carne de pavo (Carne fresca)
- Salchichón (Producto cárnico)
- Hamburguesa de vacuno (Preparado de carne)

En total se realizan 18 ensayos, 9 muestras sin inocular y 9 muestras inoculadas con la cepa de *Salmonella enterica* subs. *enterica*, CECT 4594 (analizadas en condiciones de reproducibilidad).

En la segunda etapa, a partir de junio de 2014 se amplía la validación del método debido a que la casa comercial introduce una especificación en la preparación de muestras de carne de ave de corral y huevos. Paralelamente, esta corrección se utiliza para conseguir el objetivo de este trabajo.

Las matrices seleccionadas para el análisis son las siguientes:

- Pollo (Carne de ave)
- Huevo (Huevo fresco)
- Fiambre de pavo (Producto cárnico de carne de ave)
- Pienso (Alimento para animales)
- Nata (Producto lácteo)

En total se realizan 10 ensayos, 5 muestras sin inocular y 5 muestras inoculadas con la misma cepa de *Salmonella* utilizada en la primera etapa y bajo las mismas condiciones de reproducibilidad.

Se pesan por duplicado (dos porciones analíticas) 25 g de alimento, se añaden 225 ml de APT y se homogeneizan con la ayuda de un stomacher. Una porción analítica será la muestra sin inocular y la otra porción analítica la muestra inoculada. En la primera etapa se inoculan 0.5 ml de una concentración aproximada de 10 ufc/ml de la cepa de *Salmonella* spp. En la segunda etapa se inoculan 0.25 ml de una concentración aproximada de 10 ufc/ml de la misma cepa de *Salmonella* spp. Luego se añade el volumen de Suplemento *Salmonella* (previamente homogeneizado con ayuda de un agitador vórtex) calculado según la descripción realizada en el apartado 3.4. Posteriormente se procede a la investigación de *Salmonella* spp.

Las matrices de huevos y carnes de ave de corral exigen un método de calentamiento de las muestras en baño María y no en el equipo VIDAS HEAT&GO. Este procedimiento se realiza de la misma manera que la comentada anteriormente en el punto de realización del test inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos: kit Vidas UP *Salmonella* (SPT), del apartado 3.4: Detección de *Salmonella* spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos.

## 4. Resultados y discusión

## 4.1 Detección de *Salmonella* spp según método tradicional ISO 6579

Para la detección de *Salmonella* spp mediante el método tradicional se analizaron 5660 muestras de manera continuada durante los meses de octubre de 2013 a febrero de 2014. En la tabla 12 se incluyen los resultados de los alimentos analizados que se presentan agrupados en: harina de carne, comida preparada, carnes, lácteos, huevos, pastelería, pienso animal, pescado y otros alimentos. En el grupo de otros alimentos se incluyen harinas de diferentes ingredientes, bloques de carne de ternera congelados y pre refrigerados, proteína animal transformada, zumos con tratamiento y restos de alimentos recogidos de la maquinaria y de los silos, entre otros. Durante el transporte, las muestras se conservaron en neveras preparadas para mantener la temperatura y una vez llegadas al laboratorio se conservaron según la necesidad de cada alimento, a temperatura ambiente (20-22°C), de refrigeración (0-4°C) o de congelación (-10-0°C).

Durante el periodo de análisis el mayor porcentaje de alimentos analizados provino sobre todo de la industria de alimentación animal y de la industria cárnica, dos sectores muy diferentes debido al tipo de producto. Los alimentos destinados a alimentación animal analizados eran alimentos deshidratados sin problemas de presencia de *Salmonella*. En cambio, los alimentos del grupo de carnes frescas tenían una  $A_w \geq 0.92$  y la incidencia de *Salmonella* fue mayor debido a posibles factores como una mala higiene y/o manipulación durante el proceso, condiciones inadecuadas de transporte y/o refrigeración del alimento o la propia contaminación del animal. De las 5660 muestras analizadas, en el 98.5% se obtuvo ausencia de *Salmonella*, mientras que en el 1.5% se detectó presencia de *Salmonella*. Valorando el porcentaje de muestras con presencia de *Salmonella* para cada grupo de alimentos, observamos que la harina de carne representa un 4.1%, las carnes frescas un 1.4%, la pastelería un 1.2%, el pienso un 1.6%, el pescado un 0.36% y otros alimentos un 2.16%. En los grupos de comidas preparadas, lácteos y huevos no se registró ningún resultado con presencia de *Salmonella*, probablemente debido a los tratamientos térmicos a los que fueron sometidos, a excepción del grupo del huevo. Valorando los porcentajes sobre el total de muestras analizadas, los más representativos fueron los grupos de las carnes frescas, con un 0.8% y el de otros alimentos, con un 0.49%

Tabla 12. Grupos de alimentos analizados mediante el método tradicional

		GRUPO DE ALIMENTO									
		Harina de carne	Comida preparada	Carnes frescas	Lácteos	Huevo	Pastele- ría	Pienso	Pescado	Otros alimentos	Total
RESULTADO	Presencia	2	0	45	0	0	2	6	1	28	84
	Ausencia	47	297	3137	3	7	170	369	276	1270	5576
	Total	49	297	3182	3	7	172	375	277	1298	5660

A continuación (imágenes 13, 14 y 15) se presenta un resultado de *Salmonella* positivo detallando los resultados obtenidos en las distintas etapas del análisis, desde la fase de preenriquecimiento hasta la identificación bioquímica. En todos los análisis se utilizó agua de peptona tamponada (APT) como medio de enriquecimiento para las muestras ya que al mantener el pH constante permite detectar un bajo número de *Salmonella* e incluso de *Salmonella* lesionadas. Tras el enriquecimiento selectivo en placas de Rappaport y caldo MKTTn, en las primeras se observaron halos opacos alrededor de la siembra (imagen 13). Aquellas placas sin crecimiento se volvieron a incubar durante 24 horas más. En la siembra en medios selectivos se observaron colonias aisladas con centro negro y zonas ligeramente transparente de color rojizo en XLD, propias de *Salmonella* Glucosa positivas, Lactosa negativas y productoras de sulfuro de hidrógeno. En las placas de Hektoen se observaron colonias con centro negro, también propias de *Salmonella* productoras de sulfuro de hidrógeno (imagen 14). Posteriormente las colonias presuntivas se reaislaron en un agar no selectivo para su posterior confirmación. En la prueba del Kligler se observó uno de los crecimientos característicos de *Salmonella*, donde el crecimiento en profundidad suele ser negro debido a la formación de sulfuro de hidrogeno y el crecimiento en superficie de color rojo debido a una reacción lactosa y/o glucosa negativo. En los casos donde la prueba de la oxidasa dio positiva no hizo falta confirmación posterior. La confirmación bioquímica mayoritariamente se obtuvo mediante el test RapID ONE y en algunos casos también del API 20E (imagen 15).

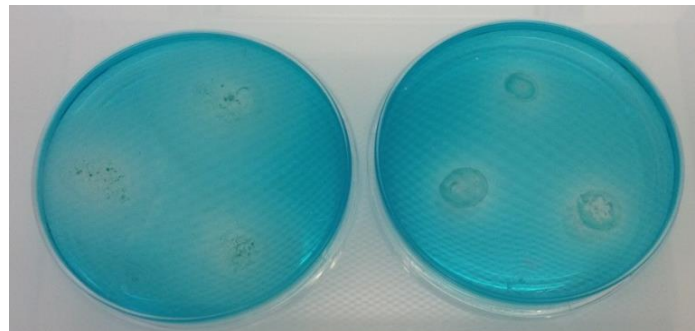


Imagen 13: Placas de Rappaport con halos característicos de *Salmonella*

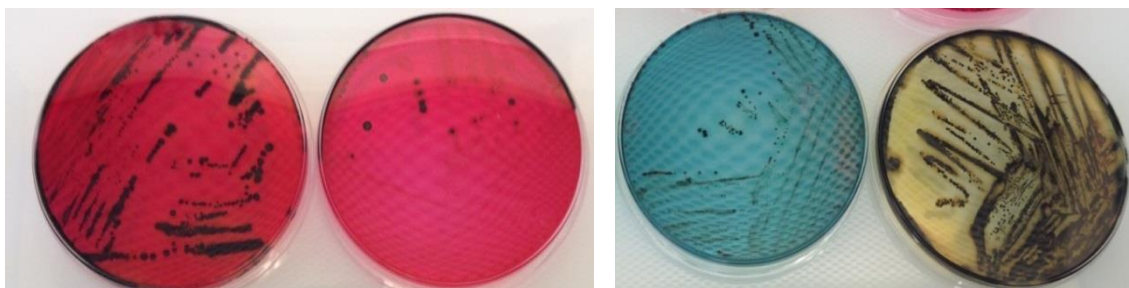
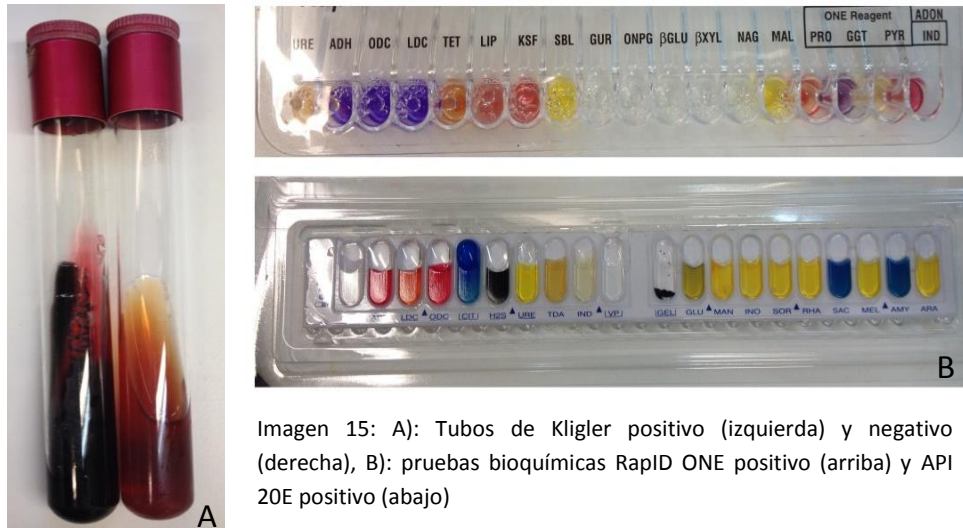


Imagen 14: Placas de XLD (izquierda) y Hektoen (derecha) con colonias negras características de *Salmonella*



Tal y como se comentó en la introducción, apartado de Prevención y control de *Salmonella*, uno de los alimentos que con mayor frecuencia causa salmonelosis son las carnes y productos cárnicos. Los principales factores que la propician pueden estar desencadenados en varios puntos de la producción, como una elaboración inadecuada o un mal proceso térmico, una contaminación por parte del manipulador, o una limpieza inadecuada de las superficies y utensilios que estuvieron en contacto con el alimento (Trepát i Quílez, 2002). En el gráfico 1 se puede observar como el mayor grupo de alimentos con presencia de *Salmonella* es el de las carnes, mayoritariamente de cerdo, con un 53,6% respecto a la distribución de muestras positivas. El grupo de otros alimentos tuvo un porcentaje algo más bajo respecto al grupo de las carnes, con un 33,3% sobre la distribución de muestras de *Salmonella* positivas. Haciendo referencia a este último grupo de alimentos, los resultados positivos provinieron en gran parte de los bloques de carne y de proteína animal transformada. El resto de los grupos de alimentos presentaron porcentajes  $\leq 7,1\%$ , la cual cosa tuvo poca notoriedad sobre el total de muestras analizadas. Los grupos de alimentos de comida preparada, lácteos y huevo no presentaron problemas de *Salmonella*.

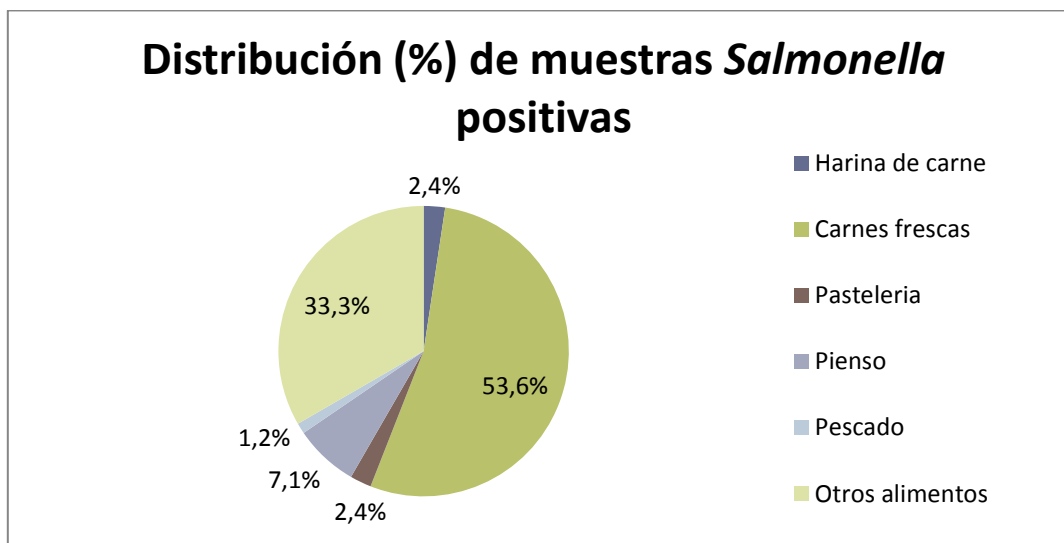


Gráfico 1. Porcentajes de distribución de muestras *Salmonella* positivas obtenidos mediante método tradicional

## 4.2 Detección de *Salmonella* spp mediante inmunofluorescencia (ELFA)

Mediante la técnica de inmunofluorescencia (ELFA) se analizaron diferentes grupos de alimentos con el fin de obtener resultados en menor tiempo. Una vez llegadas las muestras al laboratorio, en las mismas condiciones de transporte que las comentadas en el apartado anterior, se inició el análisis que consistió en el pre enriquecimiento y enriquecimiento de la muestra y detección mediante el método de inmunofluorescencia.

La técnica fue muy eficaz para las muestras con resultados negativos ya que una vez obtenido el resultado de ausencia de *Salmonella* se dio por finalizado el análisis. En cambio, aquellas muestras donde el mini VIDAS detectó presencia de *Salmonella* se trataron como presuntivas y necesitaron una confirmación posterior. Para la confirmación se siguieron algunos pasos del método tradicional: aislamiento en medios sólidos selectivos, aislamiento en agar no selectivo, confirmación de las colonias presuntivas y confirmación bioquímica.

Los resultados obtenidos a través de la técnica de inmunofluorescencia se muestran en la tabla 13. Se analizaron un total de 2351 alimentos de manera continua durante 5 meses, los cuales estaban repartidos en diferentes grupos: harina de carne, comida preparada, carnes frescas, huevo, pienso y otros alimentos, este último grupo detallado en el apartado 4.1. Más de la mitad de las muestras procedían del sector cárnico y en menor medida de las comidas preparadas

Se obtuvieron unos porcentajes de resultados positivos y negativos muy similares a los obtenidos mediante el método tradicional. Del total de muestras analizadas, el 98% dio ausencia de *Salmonella* y el sólo el 2% presencia de *Salmonella*.

Tabla 13. Grupos de alimentos analizados mediante el método de inmunofluorescencia

		GRUPO DE ALIMENTO						Total
		Harina de carne	Comida preparada	Carnes frescas	Huevo	Pienso	Otros alimentos	
RESULTADO	Presencia	0	0	37	0	4	3	44
	Ausencia	2	322	1707	9	150	117	2307
	Total	2	322	1744	9	154	120	2351

A partir de los resultados expresados en la tabla 13, se obtuvieron los porcentajes de presencia de *Salmonella* para cada grupo de alimentos, a través de los cuales se puede observar de donde procedía el mayor número de resultados positivos. De los 6 grupos de alimentos, sólo en 3 de ellos se obtuvieron muestras *Salmonella* positivas. El grupo de alimentos con más muestras con presencia de *Salmonella* fue el de las carnes frescas, y representó solamente el 2.12% del total de las muestras para este grupo. Con un volumen menor de muestras estudiadas, el grupo de alimento de los piensos representó el 2.6% del total de muestras

positivas para este grupo. Por último, en el grupo de otros alimentos aunque el volumen de muestras fue aún menor que en los dos grupos de alimentos anteriores, obtuvo el porcentaje de muestras positivas de su grupo más alto, con un 2.5%. Estos tres grupos de alimentos, carnes frescas, pienso y otros alimentos, representaron el 1,6%, 0,17% y 0,13%, del total de muestras analizadas y que fueron *Salmonella* positivas.

En el gráfico 2 se observan los porcentajes de muestras con presencia de *Salmonella*. Cabe destacar que de las 44 muestras con resultado positivo, es decir presuntivo, se realizó la confirmación bioquímica, concluyendo que todas las muestras eran portadoras de *Salmonella*. Mediante estos resultados se puede afirmar que el método fue eficaz en el 100% de las muestras analizadas.

A través de los porcentajes obtenidos en la distribución de *Salmonella* positivas en los diferentes grupos de alimentos, se observa que el mayor número de presencias proviene del grupo de las carnes frescas, con un 84,1% del total de las muestras positivas. En los grupos de alimentos que corresponden al pienso y a otros alimentos, también se detectó presencia de *Salmonella*, aunque con un 9,1% y un 6,8%, respectivamente, del total de muestras positivas. Los grupos de alimentos de harina de carne, comida preparada y huevo no presentaron problemas de *Salmonella*.

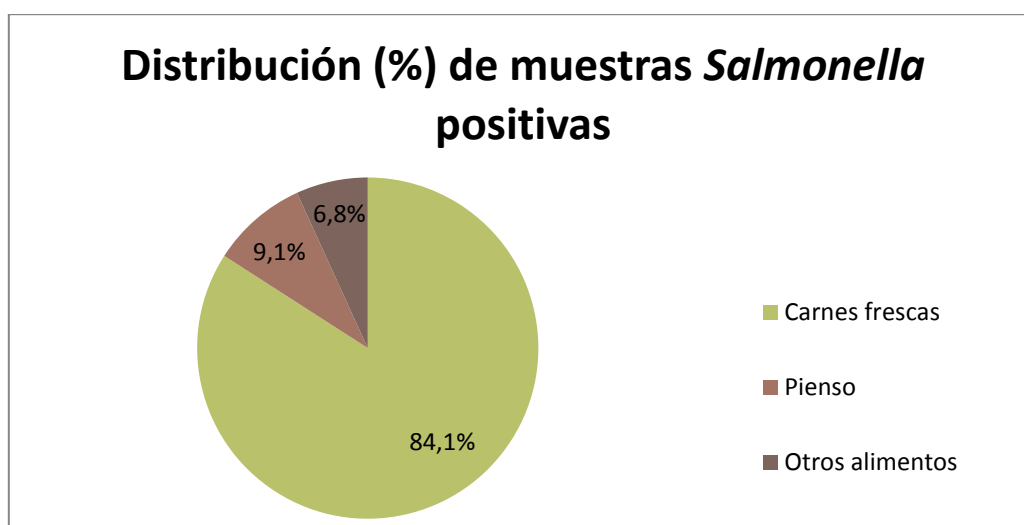


Gráfico 2. Porcentajes de distribución de muestras *Salmonella* positivas obtenidos mediante inmunofluorescencia

Es interesante tener en cuenta lo que representan los porcentajes determinados en función de los grupos de alimentos estudiados. Es decir, si bien las carnes frescas representan la gran mayoría de resultados, tanto positivos como negativos, es por el hecho de que hay más muestras analizadas y porque difieren mucho de los otros alimentos ya que las carnes frescas no han recibido ningún tipo de tratamiento mientras que los otros grupos han sido tratados para reducir o eliminar los microorganismos patógenos.

### 4.3 Comparación de resultados según los métodos tradicional ISO 6579 e inmunofluorescencia (ELFA)

Una vez presentadas las dos técnicas principales del laboratorio para la detección de *Salmonella*, se realiza una comparativa entre ambas con la idea de obtener datos cuantitativos a partir de los resultados analizados.

Se realizaron tablas de contingencia y la prueba de la chi-cuadrada a partir de los resultados positivos y resultados negativos obtenidos de aquellos grupos de alimentos que fueron evaluados mediante los dos métodos. En la tabla 14 se observan los resultados *Salmonella* positivos para cada grupo de alimentos según el método analizado:

Tabla 14. Tabla de contingencia de resultados *Salmonella* positivas (nº muestras y porcentajes)

	Métodos			Total
		Tradicional	Inmunofluorescencia	
Resultados <i>Salmonella</i> positivas	Carnes frescas	45 (54.9%)	37 (45.1%)	82
	Pienso	6 (60%)	4 (40%)	10
	Otros alimentos	28 (90.3%)	3 (9.7%)	31

Se plantea un contraste de hipótesis estadístico donde, la hipótesis nula consiste en afirmar que hay independencia entre los dos métodos analíticos y los tres grupos de alimentos y una hipótesis alternativa, donde se rechaza la afirmación anterior.

Mediante los resultados de la tabla se obtuvo un valor  $p$  de 0.002, inferior al nivel de significación del 0.05, con lo cual se rechaza la hipótesis nula de que los métodos utilizados trabajan por igual con los tres grupos de alimentos estudiados. Es decir, con los datos analizados se puede concluir que no hay independencia entre el método analítico utilizado y el tipo de alimento sobre el que se aplica.

Se observa que el mayor número de resultados de *Salmonella* positivos se obtuvo mediante el método tradicional, sobre todo en el grupo de las carnes frescas. Diferenciando cada grupo de alimentos, se observa que el grupo de otros alimentos es el que presenta una mayor diferencia entre ambos métodos estudiados; contrariamente, el grupo de piensos es el que representa resultados más cercanos entre métodos, aunque cabe destacar que hay pocas muestras analizadas.

Debido al bajo número de muestras *Salmonella* positivas, y que estas muestras proceden sólo de 3 de los 6 grupos de alimentos analizados, también se realizó una tabla de contingencia con los resultados *Salmonella* negativos. En la tabla 15 se pueden observar los grupos de alimentos, el nº de muestras y sus porcentajes de los dos métodos analizados. Dicha tabla contiene algunos grupos que no se encuentran en la tabla anterior ya que en algunos alimentos no se detectó presencia de *Salmonella*.

Tabla 15. Tabla de contingencia de resultados *Salmonella* negativas (nº muestras y porcentajes)

	Métodos			
		Tradicional	Inmunofluorescencia	Total
<b>Resultados <i>Salmonella</i> negativas</b>	<b>Harina de carne</b>	47 (96%)	2 (4%)	49
	<b>Comida preparada</b>	297 (48%)	322 (52%)	619
	<b>Carnes frescas</b>	3137 (64.8%)	1707 (35.2%)	4844
	<b>Huevo</b>	7 (44%)	9 (56%)	16
	<b>Pienso</b>	369 (71.1%)	150 (28.9%)	519
	<b>Otros alimentos</b>	1270 (91.6%)	117 (8.4%)	1387

La hipótesis planteada anteriormente también se contrastó utilizando los resultados negativos. De la misma manera, se obtuvo un  $p$  valor de 0.000 que al ser más bajo que el nivel de significación del 0.05 obligó a rechazar la hipótesis nula, de manera que al aceptar la hipótesis alternativa se puede concluir que no hay independencia entre los dos métodos analíticos utilizados y el grupo de alimentos analizados. Sería necesario profundizar más en el estudio y poder determinar qué método analítico sería más apropiado utilizar para cada grupo de los alimentos estudiados.

Observando la tabla 15, los porcentajes obtenidos muestran que el mayor número de muestras *Salmonella* negativas se detectaron mediante el método tradicional. Como se ha comentado anteriormente, el método tradicional es la técnica con la que se han analizado un mayor número de muestras.

Según los datos obtenidos a través del análisis utilizando las dos técnicas, se puede afirmar que el método tradicional es altamente fiable en la detección de *Salmonella*. Los pasos utilizados para el aislamiento y caracterización de *Salmonella* son técnicamente sencillos y sensibles, lo que confiere seguridad en los resultados. Por el contrario, son técnicas de trabajo intensivo y que consumen mucho tiempo ya que constan de demasiadas fases que necesitan temperaturas adecuadas y tiempos de incubación prolongados. El método tradicional se basa en la norma ISO 6579, validada por varios organismos en Europa como AFNOR, NordVal o Microval. Por otro lado, el método de inmunofluorescencia (ELFA) es un análisis totalmente automatizado que utiliza los equipos VIDAS, capaces de completar el análisis dentro de los 45-120 minutos, dependiendo del microorganismo patógeno a estudiar (Jasson *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos demuestran que es un método eficaz, específico y sencillo ya que solo consta de dos fases (pre enriquecimiento y enriquecimiento) previos a la detección en el mini VIDAS. Además es una vía de detección rápida para los resultados negativos ya que como se ha podido ver, en caso de presencia de *Salmonella* se requiere una confirmación posterior que alarga el proceso hasta 4-5 días más.

#### 4.4 Ampliación de la validación de investigación de *Salmonella* spp mediante el kit VIDAS UP *Salmonella* (SPT)

La validación de la técnica VIDAS UP *Salmonella* (SPT) implantada en el laboratorio se realizó en dos fases; los resultados del primer análisis experimental se recogen en la tabla 16:

Tabla 16: Resultados obtenidos en distintas matrices alimentarias

FECHA	Nº MUESTRA	MATRIZ	CARACTERÍSTICAS	INÓCULO	RESULTADO
19/12/2013	A12121829	Nata	No inoculado	-	Ausencia
19/12/2013	A12121830	Queso	No inoculado	-	Ausencia
19/12/2013	A12121831	Pienso	No inoculado	-	Ausencia
19/12/2013	A12121832	Harina avícola	No inoculado	-	Ausencia
19/12/2013	A12121833	Nata	Inoculado	<i>Salmonella</i> 5 células	Presencia
19/12/2013	A12121834	Queso	Inoculado	<i>Salmonella</i> 5 células	Presencia
19/12/2013	A12121835	Pienso	Inoculado	<i>Salmonella</i> 5 células	Presencia
19/12/2013	A12121836	Harina avícola	Inoculado	<i>Salmonella</i> 5 células	Presencia
14/01/2014	A14011093	Pizza	No inoculado	-	Ausencia
14/01/2014	A14011094	Agua	No inoculado	-	Ausencia
14/01/2014	A14011095	Pizza	Inoculado	<i>Salmonella</i> 6 células	Presencia
14/01/2014	A14011096	Agua	Inoculado	<i>Salmonella</i> 6 células	Ausencia
22/01/2014	A14011881	Carne de pavo	No inoculado	-	Ausencia
22/01/2014	A14011882	Salchichón	No inoculado	-	Ausencia
22/01/2014	A14011883	Hamburguesa de vacuno	No inoculado	-	Ausencia
22/01/2014	A14011884	Carne de pavo	Inoculado	<i>Salmonella</i> 6 células	Presencia
22/01/2014	A14011885	Salchichón	Inoculado	<i>Salmonella</i> 6 células	Presencia
22/01/2014	A14011886	Hamburguesa de vacuno	Inoculado	<i>Salmonella</i> 6 células	Presencia

En las 9 muestras que no fueron inoculadas con la bacteria, el resultado obtenido fue AUSENCIA de *Salmonella* spp. En cambio, en 8 de las 9 muestras inoculadas se detectó PRESENCIA de *Salmonella* spp. La muestra de agua inoculada dio un resultado negativo que se

atribuye a un posible defecto en el momento de la inoculación ya que de todos los alimentos estudiados, el agua es el que resulta más fácil de homogeneizar y no existen interferencias de nutrientes; es por tanto, que se considera como un falso negativo.

Se realizó un segundo ensayo debido a que la casa comercial implantó una especificación en la preparación de muestras de ave de corral y huevos ya que en el momento de utilizar el equipo HEAT&GO no se llegaban a romper las membranas de *Salmonella* y en consecuencia no se liberaban los flagelos. Es por este motivo que se decide hacer una segunda etapa con estas muestras, entre otras, y probar de calentarlas al baño María.

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos en este segundo ensayo:

Tabla 17: Resultados obtenidos en distintas matrices alimentarias

Fecha	Nº muestra	Matriz	Características	Inóculo	Resultado
02/07/2014	A14062632	Huevo	No inoculado	-	Ausencia
02/07/2014	A14062633	Huevo	Inoculado	<i>Salmonella</i> 2.5 células	Presencia
02/07/2014	A14062634	Pollo	No inoculado	-	Ausencia
02/07/2014	A14062635	Pollo	Inoculado	<i>Salmonella</i> 2.5 células	Presencia
02/07/2014	A14062636	Fiambre de pavo	No inoculado	-	Ausencia
02/07/2014	A14062637	Fiambre de pavo	Inoculado	<i>Salmonella</i> 2.5 células	Presencia
26/11/2014	A14062644	Pienso	No inoculado	-	Ausencia
26/11/2014	A14062645	Pienso	Inoculado	<i>Salmonella</i> 2.5 células	Presencia
16/12/2014	A14120603	Nata	No inoculado	-	Ausencia
16/12/2014	A14120604	Nata	Inoculado	<i>Salmonella</i> 2.5 células	Presencia

De los resultados obtenidos durante el ensayo, en las 5 matrices sin inocular se observa AUSENCIA de *Salmonella spp* y en las 5 muestras inoculadas se detecta PRESENCIA de *Salmonella spp*.

De las muestras con presencia de *Salmonella spp* obtenidas en ambos ensayos se procede a la confirmación de los resultados tal y como se ha explicado anteriormente en caso de obtención de resultados positivos mediante el test inmunoenzimático:

- **Aislamiento en medios sólidos selectivos: XLD y Hektoen**
- **Aislamiento en agar no selectivos: AN**
- **Confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella* con agar con hierro de Kligler**
- **Confirmación bioquímica: TEST OXIDASA/ RapID ONE/ API 20E**

A continuación se muestran los pasos seguidos para la confirmación con un ejemplo de una muestra presuntiva y de la cepa de *Salmonella enterica* subs. *enterica*, CECT 4594:

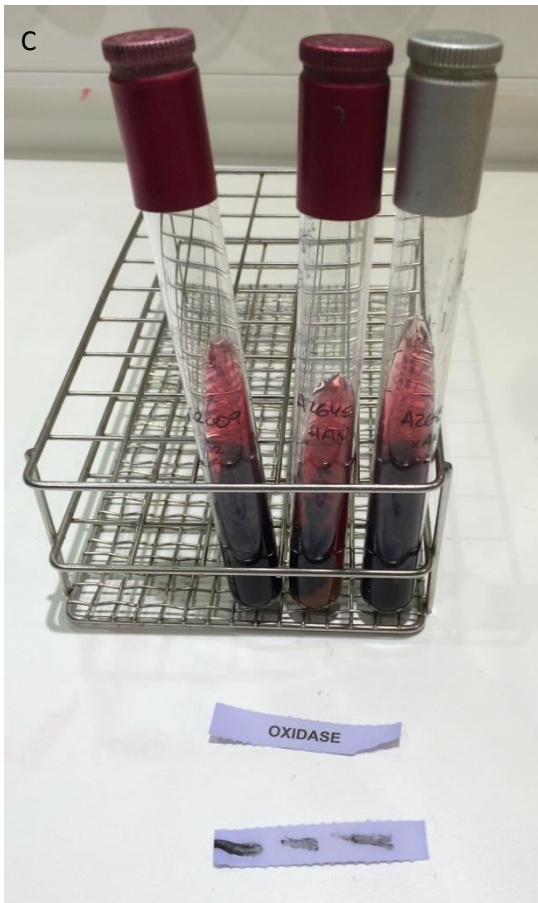
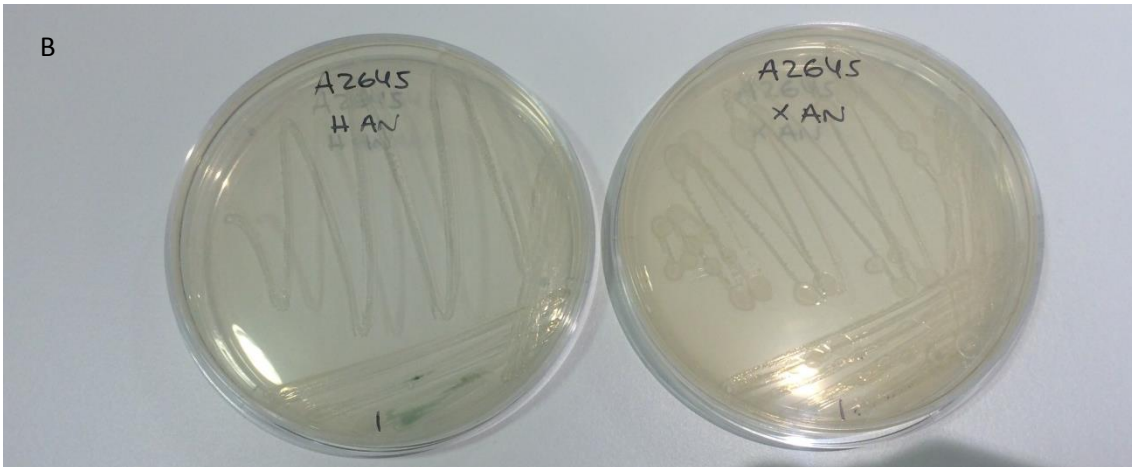
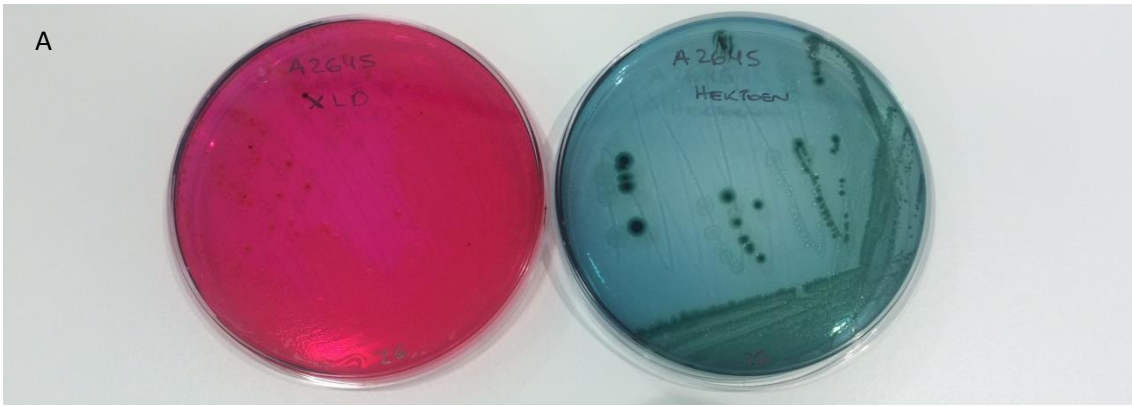


Imagen 16: A) Placas de XLD y Hektoen con colonias presuntivas de *Salmonella*, B) Placas de agar nutritivo (AN) con crecimiento, provenientes de la placa de XLD (siglas XAN) y de la placa de Hektoen (siglas HAN), C) Prueba de la oxidasa, resultado negativo para la cepa de *Salmonella*, XAN y HAN, D) Rapid ONE de cepa CRO09, XAN y HAN

En el apartado de Anejos se encuentran los reportes correspondientes a los resultados positivos y negativos obtenidos en la segunda etapa de la validación, así como un ejemplo de la confirmación bioquímica (RapID ONE y API 20E) de una muestra (imágenes 17, 18, 19, 20, 21 y 22).

A continuación se muestran los cálculos efectuados a partir de los resultados obtenidos durante el análisis para determinar el porcentaje de cada uno de los criterios establecidos por el laboratorio, especificados en material y métodos:

Tabla 18: Valoración de los resultados obtenidos

	Muestras +	Muestras -	
<b>Referencia</b> +	a 13	b 1	a+b 14
<b>Referencia</b> -	c 0	d 14	c+d 14
	a+c 13	b+d 15	N 28

donde,

a: muestras inoculadas con resultado positivo

b: muestras inoculadas con resultado negativo

c: muestras no inoculadas con positivo

d: muestras no inoculadas con resultado negativo

**Sensibilidad:**  $a \cdot 100 / (a+b)$ : 92.86%

**Especificidad:**  $d \cdot 100 / (c+d)$ : 100%

**Falsos positivos:**  $c \cdot 100 / (a+c)$ : 0%

**Falsos negativos:**  $b \cdot 100 / (b+d)$ : 7.14%

**Eficiencia E:**  $(a+d) \cdot 100 / N$ : 96.43%

Del total de los 28 ensayos realizados se han obtenido resultados que indican que la Sensibilidad de la técnica evaluada es del 92.86%, la Especificidad del 100%, la Eficiencia del 96.43% y los falsos positivos y falsos negativos no superan el 10%.

El límite de detección se encuentra entre 2.5 UFC y 6 UFC por unidad de muestra analizada.

Mediante esta validación se ha podido comprobar que el método es apto para su utilización en el laboratorio. Los parámetros estudiados muestran una alta sensibilidad, ligada a la detección de resultados positivos, aunque haya sido capaz de detectar ausencia en una muestra inoculada. La especificidad, en cambio, ligada a detectar ausencias en las muestras no inoculadas, fue absoluta, lo que determina que la técnica responde exclusivamente a la detección de *Salmonella*. El equipo también tuvo una alta eficiencia, con la cual se pudo evaluar su uso óptimo para la detección del microorganismo.

## 4.5 Detección de *Salmonella* spp mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos

Para la detección de *Salmonella* mediante el método inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos se analizaron 100 muestras durante 5 meses. Este volumen de alimentos es, por el momento, muy bajo en comparación a los otros 2 métodos ya que al ser una técnica prácticamente nueva, lleva poco tiempo implantada en el laboratorio. Aun así, los clientes que desean un análisis urgente de las muestras utilizan este método que, en tan solo 24 horas proporciona resultados.

Las muestras llegaron al laboratorio en las mismas condiciones de transporte comentadas en los dos métodos anteriores. Al iniciar el análisis se enriquecía la muestra añadiendo la cantidad de suplemento necesario. El suplemento actúa inhibiendo la mayoría de bacterias Gram + y de algunas Gram – y juntamente con el agua de peptona tamponada sirve para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*. De manera que, al enriquecer por partida doble la muestra, no es necesario un paso intermedio entre el enriquecimiento y el análisis en el equipo mini VIDAS.

En la tabla 19 se pueden observar los resultados obtenidos mediante el análisis para cada grupo de alimentos. Las muestras se clasificaron dependiendo del tipo de alimento: harina de carne, comida preparada, carnes frescas y pienso. Del total de muestras analizadas, se detectó presencia de *Salmonella* en el 16% de los alimentos, mientras que el 84% dio ausencia de *Salmonella*. Los dos únicos grupos de alimentos en que se detectó *Salmonella* fueron las carnes frescas, con un 31.6% y el pienso, con un 40%, ambas sobre del total de muestras positivas para cada grupo. Aunque el volumen de muestras en el caso del pienso fue 4 veces menor, en comparación, el porcentaje de presencias fue mayor que en el de las carnes frescas.

El análisis de aquellos alimentos con resultado negativo se dio por finalizado, mientras que las 16 muestras con presencia de *Salmonella* tuvieron que ser confirmadas mediante pruebas bioquímicas. La realización de las pruebas bioquímicas supone un retraso en la obtención del resultado final, pero a su vez permite gestionar mejor las decisiones que deben tomarse respecto al alimento.

Tabla 19. Grupos de alimentos analizados mediante el método de inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos

		GRUPO DE ALIMENTO				
		Harina de carne	Comida preparada	Carnes frescas	Pienso	Total
RESULTADO	Presencia	0	0	12	4	16
	Ausencia	2	50	26	6	84
	Total	2	50	38	10	100

En el gráfico 3 se pueden observar los porcentajes de distribución de presencia *Salmonella* para cada grupo de alimentos sobre el total de muestras positivas. El grupo de las carnes frescas representó un 75% frente al 25% obtenido en el grupo del pienso.

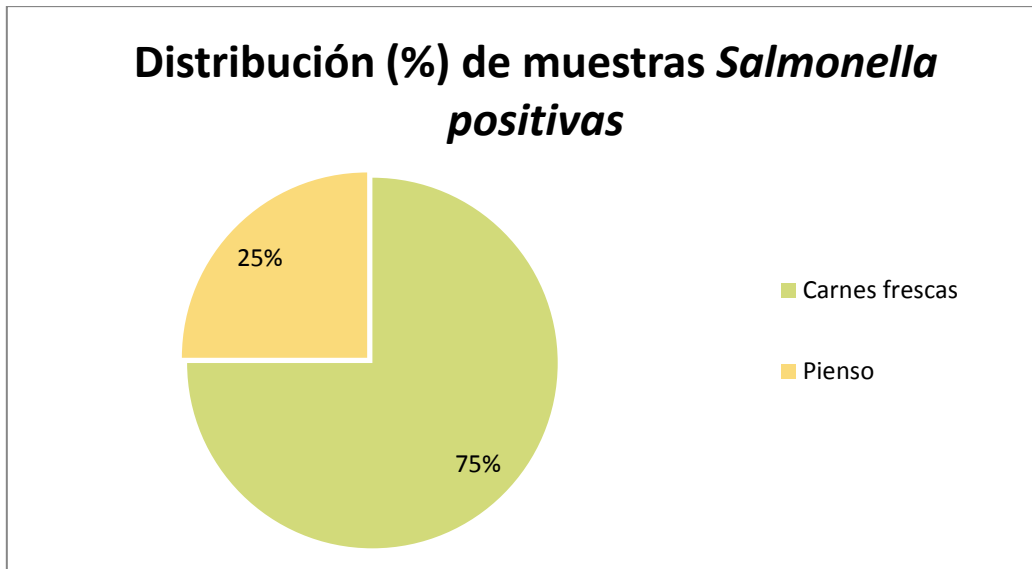


Gráfico 3. Porcentajes de distribución de muestras *Salmonella* positivas obtenidos mediante el método inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos

Aunque hace falta un volumen mayor de muestras para poder sacar conclusiones validas sobre este método, lo cierto es que atiende perfectamente a las necesidades que surgen hoy en día de las empresas por buscar métodos de detección que sean aún más rápidos y eficaces. Además esta técnica proporciona un rendimiento óptimo que ayuda a simplificar el volumen de trabajo en los laboratorios, obteniendo resultados en poco tiempo y maximizando la eficacia en la producción.

## 4.6 Comparación de resultados según los métodos de inmunofluorescencia (ELFA) e inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos

Dado que los dos métodos son de inmunofluorescencia, es decir, utilizan anticuerpos unidos a una sustancia cromogénica, e inmunoenzimáticos, es decir, se basan en una reacción inmunológica antígeno-anticuerpo, es interesante comparar los resultados de los dos métodos para determinar si existen diferencias entre ellos.

Como se ha comentado anteriormente, el método de inmunofluorescencia se basa en una unión antígeno-anticuerpo, en cambio el método de inmunofluorescencia con proteínas recombinantes de fagos utiliza bacteriófagos para obtener las proteínas recombinantes específicas para los receptores de *Salmonella*.

En la tabla 20 se observan los resultados *Salmonella* positivos obtenidos mediante los dos métodos, agrupados según los alimentos. El mayor número de datos se obtuvo del método por inmunofluorescencia ya que, de momento, es el más utilizado en el laboratorio. Dentro de este método, el grupo de las carnes frescas representó un 75.5% respecto al total de muestras positivas para este grupo. En cuanto al método inmunoenzimático, el porcentaje fue más bajo, con el 24.5% sobre el total de muestras positivas. El grupo del pienso representó el 50% en ambos métodos sobre el total de resultados positivos.

Tabla 20. Tabla de contingencia de resultados *Salmonella* positivas

Resultados <i>Salmonella</i> positivas	Métodos		Total
	Inmunofluorescencia	Inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos	
Carnes frescas	37 (75.5%)	12 (24.5%)	49
Pienso	4 (50%)	4 (50%)	8

En el contraste del test a partir de esta tabla de contingencia, se asume como verdadera la hipótesis nula de que hay independencia entre los dos métodos estudiados y los grupos de alimentos analizados. Con el resultado del  $p$  valor obtenido de 0.137, se puede concluir que con los datos analizados no hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula y por tanto se mantiene la hipótesis nula de independencia. Esto nos indica que los métodos analíticos utilizados detectan *Salmonella* por igual en los dos grupos de alimentos estudiados y, por ello, no hay criterio para discernir a la hora de elegir entre uno u otro.

Para poder realizar el estudio con un número más elevado de muestras introduciendo un tercer grupo de alimentos (comida preparada), también se ha realizado una tabla de contingencia con los resultados *Salmonella* negativos para cada método y separado por grupos de alimentos (tabla 21); en este caso sucede lo contrario, el  $p$  valor obtenido es inferior a 0.001, y por tanto significativo, lo cual indica que podemos rechazar la hipótesis nula y aceptar

la hipótesis alternativa de que los métodos utilizados y los grupos de alimentos estudiados no son independientes. Es necesario profundizar más en este estudio para poder determinar cuál de los dos métodos enzimáticos resulta más apropiado utilizar en función del grupo de alimento. Considerando los tres grupos estudiados, el grupo de comida preparada a diferencia de los grupos de las carnes frescas y de los piensos, es el que incluye alimentos e ingredientes más diversos tanto por su origen (vegetal y animal) como por su tratamiento (térmico, acidez, sal, especias,...). En cambio, los grupos de las carnes frescas y de los piensos permiten obtener muestras más homogéneas a la hora de analizar permitiendo una mejor exposición de *Salmonella* con los distintos reactivos indistintamente del método enzimático utilizado.

Tabla 21. Tabla de contingencia de resultados *Salmonella* negativas

	Métodos			Total
		Inmunofluorescencia	Inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos	
Resultados <i>Salmonella</i> negativas	Comida preparada	322 (86.6%)	50 (13.4%)	372
	Carnes frescas	1707 (98.5%)	26 (1.5%)	1733
	Pienso	150 (96.2%)	6 (3.8%)	156

Los porcentajes más representativos de muestras *Salmonella* negativos se encuentran en el método de inmunofluorescencia, mediante el cual se detectó prácticamente el 90% de las ausencias sobre el total de muestras negativas.

Es importante hacer hincapié en el volumen de las muestras, ya que al haber tanta diferencia entre los métodos se dificulta la comparación entre ambos. Es por eso que se necesitan hacer más análisis cuantitativos con el método inmunoenzimático y determinar de manera más acertada su eficacia.

En cualquier caso se ha podido comprobar que son métodos equiparables en la detección de *Salmonella* para los grupos de alimentos estudiados y que ofrecen resultados fiables y en poco tiempo. Por un lado el método inmunoenzimático ofrece resultados en 48 horas, una técnica rápida y sensible que ofrece una buena alternativa para aquellos análisis que se realizan de manera tradicional. Además está demostrado que esta técnica es interesante para la detección de *Salmonella* spp en muestras de carne de pollo (Rohonczy *et al.*, 2014). Por otro lado, el método inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos es una técnica muy novedosa, de gran especificidad y sensibilidad en la detección de *Salmonella*. El análisis VIDAS se completa en tan solo 24 horas, lo cual responde de manera positiva a la demanda de los fabricantes de alimentos que necesitan tener técnicas más avanzadas y en un menor tiempo.

Estos dos métodos podrían ser comparados con la PCR a tiempo real, aunque el tiempo de detección es mucho menor en este último y también son interesantes para la detección de otros patógenos. Por lo tanto estas dos técnicas responden de manera positiva a las necesidades de la industria alimentaria que requieren técnicas sensibles para el análisis

microbiológico de los alimentos con el fin de garantizar la seguridad de sus productos (Elizaquível *et al.*, 2011).

## *5. Conclusiones*

---

- El método tradicional permite hacer un seguimiento detallado desde el pesado de la muestra hasta la confirmación bioquímica, lo que ofrece seguridad en los resultados. Por el contrario, es una técnica lenta (6-7 días) y laboriosa para las necesidades de las empresas alimentarias.
- El método de inmunofluorescencia e inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos son muy útiles para muestras *Salmonella* negativas ya que la duración del análisis respecto al método tradicional es mucho menor; y en caso de la detección de posible presencia de *Salmonella*, los métodos son eficaces ya que, en el presente estudio, se ha confirmado que todas las muestras que dieron *Salmonella* positivas con ambos métodos, posteriormente se confirmaron bioquímicamente.
- Los métodos tradicional y de inmunofluorescencia coinciden en la baja proporción del número de muestras con presencia de *Salmonella* (1.5% y 2%, respectivamente) y también en el grupo de alimentos con más incidencia de *Salmonella*, las carnes frescas.
- Existe una relación de dependencia entre los métodos tradicional y de inmunofluorescencia y los grupos de alimentos: carnes frescas, piensos y el grupo de otros alimentos. Aunque hacen falta más análisis y un mayor número de muestras, se puede concluir que es necesario estudiar cual de los dos métodos es mejor para determinar *Salmonella* en función del grupo de alimentos.
- Se ha realizado satisfactoriamente la ampliación de la validación del método VIDAS UP, así como la modificación de la especificación para muestras de huevo y aves de corral. En la validación se ha obtenido una sensibilidad del 92.86%, una especificidad del 100%, una eficiencia del 96.43% y los falsos positivos y falsos negativos no han superado el límite establecido del 10%. Los resultados obtenidos permiten considerar validada la técnica.
- Existe una relación de independencia entre los dos métodos enzimáticos y las muestras con presencia de *Salmonella* en los grupos de alimentos de las carnes frescas y el pienso, ya que con lo que los dos métodos se pueden utilizar indistintamente para estos alimentos.
- El tiempo de análisis del método inmunoenzimático con proteínas recombinantes de fagos es menor al tiempo de análisis del método de inmunofluorescencia (24 horas frente a 48 horas) ya que se elimina el paso de enriquecimiento de la muestra. Por el contrario, ambos métodos necesitan ser confirmados en caso de presencia de *Salmonella* lo que acaba retrasando por igual la obtención de los resultados.

## *6. Bibliografía*

---

- Aenor, 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp (ISO 6579:2002). Madrid, España.
- BioMérieux. Manual del usuario mini VIDAS [en línea]. Disponible en: <<https://www.mybiomerieux.com/>>
- Caffer M. & Terragno R., 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Instituto Nacional de enfermedades infecciosas, Departamento Bacteriología. Buenos Aires, Argentina.
- CALITEC. PNT 1 Técnica de investigación de *Salmonella* spp en alimentos y piensos y materias primas mediante inmunofluorescencia (ELFA).
- CALITEC. PNT 2 Técnica de investigación de *Salmonella* spp en alimentos y piensos y materias primas mediante método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos.
- Calva E., 2007. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública [en línea]. Instituto de Biotecnología, UNAM. Disponible en: <<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>>.
- Centre de Recerca en Sanitat Animal, UAB, 2008. Salmonelosis [en línea]. [Consulta: 29 enero 2015]. Disponible en: <<http://www.cresa.es/granja/salmonelosis.pdf>>.
- Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de la Salud Carlos III, 2015 (A). Boletín epidemiológico, 2009 [en línea]: Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000-2008., semana: 38-39, 2009, Vol. 17, No. 17/193-204. Madrid. [Consulta: 21 enero 2015]. Disponible en: <<http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-sistema-informacion-microbiologica/BES20002008.pdf>>. ISSN 1135-6286.
- Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, 2015 (B). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (excluye hídricos). España 1994-2003. Madrid. [Consulta: 24 febrero 2015]. Disponible en: <<http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-brotes/Informedebrotesalimentarios.pdf>>
- Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, 2015 (C). Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Año 2012. Madrid [Consulta: 18 febrero 2015]. Disponible en: <<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=29/01/2015-f0855cb161>>.
- Department of Veterinary Disease Biology, 2011. Faculty of health and medical sciences. University of Copenhagen [en línea]. [Consulta: 21 enero 2015]. Disponible en: <[http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/plating\\_media/XLD/](http://atlas.sund.ku.dk/microatlas/veterinary/plating_media/XLD/)>.
- Echeita M., Herrera S., Simón C., 2011. Gastroenteritis invasivas, ¿algo nuevo? [en línea]. Editorial Elsevier, Vol. 29, Supl. 3, p. 55-60. [Consulta: 29 febrero 2015]. Disponible en: <<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2009-bacteriologia4.pdf>>

- Elizaquível P., Gabaldón J., Aznar R., 2011. Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food Control*, 22(2), 158–164. [Consulta: 20 abril 2015]. Disponible en: <<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.05.018>>.
- EO Labs, 2015. Microbiological culture media [en línea]. [Consulta: 21 enero 2015]. Disponible en: <<http://www.eolabs.com/hektoen-enteric-agar.html>>.
- Figueroa I. & Verdugo A., 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp [en línea]. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol. 47, No. 1-2, pp. 25-42. [Consulta: 20 febrero 2015]. Disponible en: <[http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1\\_2e.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2005/mi05-1_2e.pdf)>.
- Flores L., 2003. Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas de ambientes marinos. Tesis doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. [Biblioteca de la Facultad de Ciencias Biológicas].
- Fresquet, J., 2002. Historia de la medicina [en línea]: Daniel Elmer Salmon (1850-1914). Instituto de Historia de la Ciencia y Documentación, Universidad de Valencia-CSIC. [Consulta: 13 febrero 2015]. Disponible en: <<http://www.historiadelamedicina.org/salmon.html>>.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2008. Elika. Comité científico de seguridad agroalimentaria de la CAE. Evaluación del riesgo [en línea]. [Consulta: 4 febrero 2015]. Disponible en: <<http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo20/2008-05-Salmonella%20WEB.pdf>>.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2013. Elika. *Salmonella* [en línea]. [Consulta: 28 enero 2015]. Disponible en: <[http://www.elika.net/datos/pdfs\\_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf](http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf)>.
- González J., Pereira N., Soto Z., Hernández E., Villarreal J., 2014 Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección [en línea]. *Revista científica Salud Uninorte*. Vol. 30, no. 1. [Consulta: 20 enero 2015]. Disponible en: <<http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewFile/5458/4766>>. ISSN 2011-7531.
- Heymann D., 2004. Control of communicable diseases manual, 18th edition. American Public Health Association. ISBN: 0-87553-034-6.
- Ingraham J. & Ingraham C., 1998. Introducción a la microbiología. Editorial Reverté. ISBN: 84-291-1871-3.
- Jasson V., Jacxsens L., Luning P., Rajkovic A., Uyttendaele M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*. Editorial Elsevier. [Consulta: 19 abril 2015]. Disponible en: <<http://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.008>>.
- Koneman E., Winn W., Allen S., Janda W., Procop G., Schreckenberger P., Woods G., 2006. Koneman. Diagnóstico microbiológico: *texto y atlas en color*. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. ISBN: 978-950-06-0895-4.

- Martínez N., 2007. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis doctoral, Departamento de Biología Funcional. [Universidad de Oviedo].
- Odumeru J. & León-Velarde C., 2012. *Salmonella* Detection Methods for Food and Food Ingredients, *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. Editorial InTech. Capítulo 17, p. 373-392. ISBN: 978-953-307-782-6.
- Parra M., Durango J., Máttar S., 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. Revista científica de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, p-187-200.
- Pascual M<sup>a</sup> del R. & Calderón y Pascual V., 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas, 2<sup>a</sup> edición. Editorial Díaz de Santos. ISBN: 84-7978-424-5.
- Protocolo de vigilancia y alerta de salmonelosis, 2012. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Junta de Andalucía. [Consulta: 20 febrero 2015]. Disponible en: [http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p4\\_p1\\_vigilancia\\_de\\_la\\_salud/protocolos\\_actuacion\\_2012/pr\\_salmonelosis12.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p4_p1_vigilancia_de_la_salud/protocolos_actuacion_2012/pr_salmonelosis12.pdf).
- Raventós M., 2003. Industria alimentaria. Tecnologías emergentes. Edicions de la Universitat Politècnica de Catalunya. ISBN: 84-8301-790-3.
- Rohonczy K., Zoller L., Hermann Z., Fodor A., Mráz B., Tabajdi-Pintér V., 2014. Comparison of an automated ELFA and two different real-time PCR techniques for *Salmonella* detection in poultry samples. Acta microbiologica et immunologica hungarica. Vol. 61, No 3, pp 261-272. [Consulta: 20 abril 2015]. Disponible en: <http://www.pubfacts.com/detail/25261941/Comparison-of-an-automated-ELFA-and-two-different-real-time-PCR-techniques-for-Salmonella-detection>->
- Romero R., 2007. Microbiología y parasitología humana: *Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*, 3<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana, México. ISBN: 978-968-7988-48-1.
- Romero R. & Herrera I., 2002. Síndrome diarreico infeccioso. Editorial Médica Panamericana, México. ISBN: 968-7157-99-2.
- Sánchez J., Serrano S., Marfil R., Jodral M., 2009. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino: *Fundamentos de seguridad alimentaria*. Editorial Díaz de Santos. ISBN: 978-84-7978-922-0.
- Sánchez M. & Cardona N., 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal [en línea]. Infectio: Revista de la asociación colombiana de infectología. Vol.7, No.1 [Consulta: 2 febrero 2015]. Disponible en: <http://revistainfectio.org/site/portals/0/ojs/index.php/infectio/article/view/275/293>>
- Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos, 2006. Instituto de Estudios del Huevo, Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. [Consulta: 22 febrero 2015]. Disponible en: [http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones\\_estudios/seguridad/seguridad\\_alimentaria\\_huevos\\_ovoproductos1.pdf](http://aesan.mssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/seguridad/seguridad_alimentaria_huevos_ovoproductos1.pdf)>

- Trepat i Quílez M., 2002. Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas. Tesis doctoral, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, UAB. [Biblioteca de la Facultat de Veterinaria].
- Voss T., 2012. 360 Magazine: features. San Diego State University [en línea]. [Consulta: 21 enero 2015]. Disponible en:  
<<http://newscenter.sdsu.edu/360/news.aspx?s=73397>>
- World Health Organization (WHO), 2013 [en línea]: *Salmonella* (non-typhoidal). Factsheet N°139, Updated August 2013. [Consulta: 16 enero 2015]. Disponible en:  
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>

## *7. Anejos*

---

```

mini VIDAS Informe
Sección: A
Terminado: 17:13:37 02 Jul14
UP Salmonella (SPT)
Ver: R5.6.0
Lote #: 150124-0
Standard usado
Terminado: 16:44:23 30Jun14
RFV = 4061
VT Negativo < 0.25
VT Positivo >= 0.25
-----
Posición: A1
ID muestra: A14062632
Ruido de fondo: 140 RFV: 166
VT: 0.04 Resultado: Negativo

Posición: A2
ID muestra: A14062633
Ruido de fondo: 143 RFV: 11076
VT: 2.82 Resultado: Positivo

Posición: A3
ID muestra: A14062634
Ruido de fondo: 145 RFV: 39
VT: 0.01 Resultado: Negativo

Posición: A4
ID muestra: A14062635
Ruido de fondo: 144 RFV: 11077
VT: 2.82 Resultado: Positivo

Posición: A5
ID muestra: A14062636
Ruido de fondo: 137 RFV: 170
VT: 0.04 Resultado: Negativo

Posición: A6
ID muestra: A14062637
Ruido de fondo: 140 RFV: 10039
VT: 2.56 Resultado: Positivo
-----

```

Imagen 17. Reporte de las muestras inculadas y no inculadas mediante inmunofluorescencia (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos para la validación del método

---

**mini VIDAS Informe**  
**Sección: A**

Terminado: 15:00:07 26Nov14  
**UP Salmonella (SPT)**  
Ver: R5.6.0  
Lote #: 150703-0  
Standard usado  
Terminado: 16:17:40 04Nov14  
RFV = 3484

VT Negativo < 0.25  
VT Positivo >= 0.25

---

**Posición: A1**  
ID muestra: A14112644  
Ruido de fondo: 157 RFV: 108  
VT: 0.03 Resultado: **Negativo**

**Posición: A2**  
ID muestra: A14112645  
Ruido de fondo: 151 RFV: 11201  
VT: 3.21 Resultado: **Positivo**

---



---

**mini VIDAS Informe**  
**Sección: B**

Terminado: 13:28:43 16Dic14  
**UP Salmonella (SPT)**  
Ver: R5.6.0  
Lote #: 150703-0  
Standard usado  
Terminado: 16:06:35 03Dic14  
RFV = 3920

VT Negativo < 0.25  
VT Positivo >= 0.25

---

**Posición: B1**  
ID muestra: A14120603  
Ruido de fondo: 139 RFV: 65  
VT: 0.01 Resultado: **Negativo**

**Posición: B2**  
ID muestra: A14120604  
Ruido de fondo: 141 RFV: 10723  
VT: 2.73 Resultado: **Positivo**

---

Imagen 18. Reporte de las muestras inoculadas y no inoculadas mediante inmunofluorescencia (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos para la validación del método

Laboratory: My Laboratory  
User: calitec

Ref No: CR009  
Report Date: 03/12/2014

Rapid ONE

Identification Report

Microcode: 6120010

- URE      + LDC      - KSF      - ONPG      - NAG      + GGT      - IND  
+ ADH      - TET      + SBL      - BGLU      - MAL      - PYR      - OXI  
+ ODC      - LIP      - GUR      - BXYL      - PRO      - ADON

IDENTIFICATION = Salmonella Group 1

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Tests
Salmonella choleraesuis	98,16%	1/6	None
Salmonella 1 (Most)	01,84%	1/39	TET [91]

Probability Level: Implicit

BioFrequency: Typical

Salmonell group 1. Pathogenic for man and animals. O group C1. Arabinose and trehalose negative.

Riferimento N. / N° de referencia: CR009  
Data / Fecha: \_\_\_\_\_  
Tech / Tec: \_\_\_\_\_  
Origine / Origen: \_\_\_\_\_

Reagente Reactivo	Nessuno / Ninguno														Rapid One Reagent / Reactivo Rapid ONE				Nessuno / ninguno		Rapid Spol Indole	
	Rosso o violetto / Rojo o violeta				Porpora acceso o azzurro / Morado intenso o azul				Giallo / Amarillo						Rosso / Rojo		Violetto, porpora, rosso o rosa scuro / Violeta, morado rojo o rosa oscuro		Giallo o arancio molto chiaro / Amarillo o naranja muy claro		Marrone, nero o porpora / Marrón, negro o morado	
Cavità N. / N° de cavidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18			
Codice esame / Código de prueba	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	BGLU	BXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON	IND	OXI		
Valore / Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2		
Risultato / Resultado	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-		
Valore totale / Valor total	6			7			2			0			0			7			0			

Identificazione / Identificación: \_\_\_\_\_

Microcode: REMEL Inc 800-255-6730 Printed in USA 04/12

Imagen 19. Resultado de la confirmación bioquímica (Rapid ONE), Salmonella positiva de la cepa utilizada para inocular las muestras de la validación del método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos

Laboratory: My Laboratory  
User: calitec

Ref No: A14112645 XAN  
Report Date: 03/12/2014

RapID ONE

Identification Report

Microcode: 6120010

- URE	+ LDC	- KSF	- ONPG	- NAG	+ GGT	- IND
+ ADH	- TET	+ SBL	- BGLU	- MAL	- PYR	- OXI
+ ODC	- LIP	- GUR	- BXYL	- PRO	- ADON	

IDENTIFICATION = Salmonella Group 1

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Tests
Salmonella choleraesuis	98,16%	1/6	None
Salmonella 1 (Most)	01,84%	1/39	TET [91]

Probability Level: Implicit

BioFrequency: Typical

Salmonell group 1. Pathogenic for man and animals. O group C1. Arabinose and trehalose negative.

Riferimento N. / N° de referencia: A2645 XAN  
 Data / Fecha: \_\_\_\_\_  
 Tech / Tec: \_\_\_\_\_  
 Origine / Origen: \_\_\_\_\_

Reagente Reactivo	Nessuno / Ninguno													RapID ONE Reagent / Reactivo RapID ONE			Nessuno / ninguno		RapID Spot Indole	
	Rosso o violetto / Rojo o violeta	Porpora acceso o azzurro / Morado intenso o azul			Giallo Amarillo									Rosso Rojo	Violetto, porpora, rosso o rosa scuro / Violeta, morado rojo o rosa oscuro		Giallo o arancio molto chiaro / Amarillo o naranja muy claro		Marrone, nero o porpora / Marrón, negro o morado	
Cavità N. / N° de cavidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18	
Codice esame Código de prueba	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	BGLU	BXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON	IND	OXI
Valore Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
Risultato Resultado	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Valore totale Valor total	6		1		2		0			0			1		0		0			

Identificazione / Identificación: \_\_\_\_\_

Imagen 20. Resultado de la confirmación bioquímica (RapID ONE), Salmonella positiva de una de las muestras analizadas para la validación del método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos

Laboratory: My Laboratory  
User: calitec

Ref No: A14112645 HAN  
Report Date: 03/12/2014

RapID ONE

Identification Report

Microcode: 6120010

- URE	+ LDC	- KSF	- ONPG	- NAG	+ GGT	- IND
+ ADH	- TET	+ SBL	- BGLU	- MAL	- PYR	- OXI
+ ODC	- LIP	- GUR	- BXYL	- PRO	- ADON	

IDENTIFICATION = Salmonella Group 1

Choice(s)	Probability	Bioscore	Contraindicated Tests
Salmonella choleraesuis	98,16%	1/6	None
Salmonella 1 (Most)	01,84%	1/39	TET [91]

Probability Level: Implicit

BioFrequency: Typical

Salmonell group 1. Pathogenic for man and animals. O group C1. Arabinose and trehalose negative.

Riferimento N. / N° de referencia: A2645 HAN  
 Data / Fecha: \_\_\_\_\_  
 Tech / Tec: \_\_\_\_\_  
 Origine / Origen: \_\_\_\_\_

Reagente Reactivo	Nessuno / Ninguno														RapID ONE Reagent / Reactivo RapID ONE	Nessuno / ninguno	RapID Spot Indole			
Reazioni positive Reacciones positivas	Rosso o violetto / Rojo o violeta	Porpora acceso o azzurro / Morado intenso o azul			Giallo Amarillo										Rosso Rojo	Violetto, porpora, rosso o rosa scuro / Violeta, morado rojo o rosa oscuro	Giallo o arancio molto chiaro / Amarillo o naranja muy claro	Marrone, nero o porpora / Marrón, negro o morado		
Cavità N. / N° de cavidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18	
Codice osame Código de prueba	URE	ADH	ODC	LDC	TET	LIP	KSF	SBL	GUR	ONPG	BGLU	BXYL	NAG	MAL	PRO	GGT	PYR	ADON	IND	OXI
Valore Valor	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2
Risultato Resultado	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Valore totale Valor total	6		1			2		0			0		1			0		0		

Identificazione / Identificación: \_\_\_\_\_

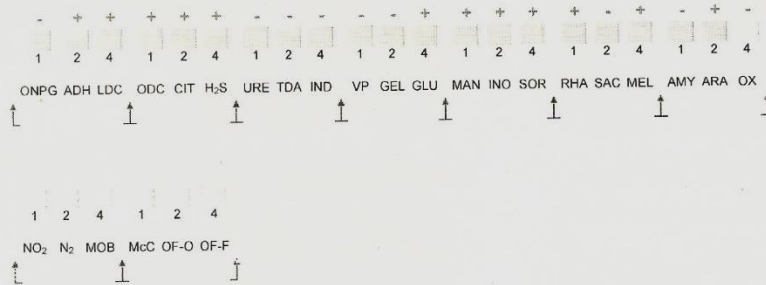
Microcode: REMEL Inc 800-255-6730 Printed in USA 04/12

Imagen 21. Resultado de la confirmación bioquímica (RapID ONE), Salmonella positiva de una de las muestras analizadas para la validación del método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos

Catitec - Barcelona



API 20 E V4.1



REFERENCIA A14112645  
FECHA 04/12/14  
COMENTARIO

EXCELENTE IDENTIFICACION

Galería API 20 E V4.1  
Perfil 6704752  
Nota CONFIRMAR POR PRUEBAS SEROLOGICAS

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Salmonella spp	99.9	0.97	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Salmonella choleraesuis ssp arizonae	0.1	0.25	ONPG 98% INO 0%

Cerrar

Imprimir

CE 07223 C REF: A2645 2014/12/14

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

file:///C:/Users/dspatx/AppData/Local/Temp/FDCYJ5XW.htm

Imagen 22. Resultado de la confirmación bioquímica (API 20E), *Salmonella* positiva de una de las muestras analizadas para la validación del método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos