

Doble enriquecimiento simultáneo para detección de Salmonella

Jorge Sanchis¹, Cristina Aijón¹, Eva Sánchez¹

¹ Laboratorios MICROKIT, S.L. Madrid, España, jorge@microkit.es

INTRODUCCIÓN

La Norma ISO 6579 para detección de Salmonella en alimentos promueve el uso de un pre-enriquecimiento revitalizador de 25 ml de muestra en 225 ml de Agua de Peptona Tamponada, seguido de un post-enriquecimiento selectivo en dos caldos (0,1 ml en 10 ml de Rappaport VS y 1 ml en 9 ml de MK Tetrionato), antes de pasar a las placas de agar selectivos, de los que uno es obligado (XLD Agar) y otro de elección del laboratorio usuario. Posteriormente se confirman las colonias sospechosas con diversas pruebas inmunológicas y bioquímicas.

En MICROKIT llevamos ya más de 15 años demostrando por intercomparación (servicio Seilalimentos) que ni el Agua de Peptona Tamponada ni el Rappaport VS son los medios ideales para el aislamiento en muchos alimentos de la gran gama de cepas que existen de *Salmonella spp.* Simplemente sustituyendo el Agua de Peptona Tamponada por Buffered Peptone Neutralizing Water (BPN), obtenemos muy superiores recuperaciones en todo tipo de microorganismos y en la mayoría de matrices alimentarias, dado que los inactivadores de conservantes que incorpora este diseño de MICROKIT permite neutralizar los conservantes típicos de la mayoría de alimentos, sean naturales (ajo, pimentón, pimienta, aromáticas, aceites esenciales, benzopirenos del humo...) o artificiales E200-E285 (sorbatos, benzoatos, propionatos, boratos, sulfitos, nitritos, nitratos, ácidos, nisina, natamicina, óxidos, hidróxidos, tocoferoles, lisozima...); también se inactivan los metabolitos del crecimiento de la flora acompañante, que impiden a la Salmonella manifestarse en muchas ocasiones en el Agua Peptonada Tamponada clásica. Y sustituyendo el Rappaport VS Broth por SS Broth (1 ml del pre-enriquecimiento en 9 ml de SS Broth y de MK Tetrionato), no se escapan cepas de Salmonella que, bien por estar subletales, bien por ser atípicas, dan falsos negativos en el primero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Nos propusimos dar un paso más, acortando el tiempo de incubación, de las 18 h del pre-enriquecimiento más 18 h del post-enriquecimiento, a

sólo 18 h en un enriquecimiento mixto. Los resultados preliminares en 2013, empleando Rappaport concentrado, añadido a los 225 ml de Buffered Peptone Water, para la incubación conjunta de 18 horas, como promueven algunos métodos franceses, dieron resultados inaceptables, con numerosos falsos negativos para las 3 cepas de Salmonella empleadas y en casi todas las matrices alimentarias (se emplearon 20 de las más variadas, abarcando todo el abanico de matrices alimentarias).

En Mayo de 2014 se estudia de nuevo la sensibilidad (escasez de falsos negativos) en un nuevo método acortado de enriquecimiento de Salmonella, consistente en enriquecer los 25 g de alimento dopado con Salmonella en 225 ml de BPN a los que se añaden antes de la incubación, 18 ml de SS Broth concentrado [x5]. Tras incubar el conjunto sólo 18 h a 35°C, se estría en la superficie de placas de Cromosalm Agar y de XLD Agar, que se incuban otras 18 h para estudiar la aparición de colonias características.

Concretamente, añadiendo 18 ml de caldo SS concentrado [x5] al Buffered Peptone Neutralizing con la muestra; la mitad del SS Broth indicado a un duplicado; y la cuarta parte del SS Broth indicado a un triplicado. El experimento se realizó con tres cepas de Salmonella (*S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. nottingham*) inoculadas a muy baja concentración (<10 ufc/25 g) junto con un mix de flora acompañante a muy alto nivel: 10⁷ ufc de una mezcla de *Klebsiella aerogenes* como enterobacteria interferente, *Pseudomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* como Gram negativos oxidasa positivos, y *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus warneri* como Gram positivos. En matrices bastante desfavorables para las Salmonella, a causa de su bajo pH y presencia de conservantes fuertes: salsa rosa, salsa César, Ketchup y salsa de yogur, que habían reportado falsos negativos en el experimento de 2013 con el método BPW + Rappaport concentrado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras las 18 h de este enriquecimiento mixto de BPN y SS Broth, ya había alerta de presencia de *Salmonella* en el 100% de los casos con 18 ml de SS Broth concentrado [x5], porque el caldo había virado a negro (los caldos menos concentrados tardaron en virar otras 18 h adicionales, por lo que no sirvieron de pre-alerta).

Se estrió el enriquecimiento en placas de XLD y de Cromosalm (el medio cromogénico para *Salmonella* de Microkit, base DCA) y se incubaron 18 h, de modo que el aislamiento costó exactamente 36 h desde la muestra (y sólo 18 h como presuntivo por viraje del caldo mixto a negro).

Todas las placas (el 100% de 60) dieron estría positiva para *Salmonella* (verde azulada en cromosalm y negra en XLD) en todas las matrices y para las 3 cepas. Sólo una placa en la salsa yogur obtuvo en Cromosalm crecimiento enmascarado de *Klebsiella* pero fue detectada gracias al XLD. Además no es esperable en muestras naturales semejante concentración de enterobacterias acompañantes junto a tan bajísima concentración de *Salmonella*, ya que los niveles de ambas suelen estar en correlación.

Se concluye que el método de acortamiento del análisis de *Salmonella* a 18 h de pre + post enriquecimiento simultáneos en BPN + SS Broth, y 18 h de aislamiento en placa (Cromosalm y XLD Agar) puede aplicarse con la certeza de la detección de *Salmonella spp.* incluso en los peores casos (elevada flora interferente y acompañante, bajísimo nivel de *Salmonella*, matrices inhibitorias...).

Además es un método muy económico.

Por todo ello animamos a las industrias a emplearlo para minimizar el gran coste que les supone la retención de 1-3 días adicionales de stock de producto terminado precisamente a la espera del informe de liberación del laboratorio a causa de la lentitud del método clásico de detección de *Salmonella*.

BIBLIOGRAFÍA

-1992. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos.

-1982. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del CENAN Instituto Nacional de Sanidad.

-1989. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO: Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Instituto de Salud Carlos III.

-Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos. Corrie Allaert, Marta Escolá, Díaz de Santos, 2002

-DIRECTIVA EUROPEA 2073/2005 de 15 de Noviembre sobre Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Union Europea, 22.12.2005

-2008 Recopilación de Normas microbiológicas de alimentos. Manuel Moragas (Ayuntamiento de Bilbao) y M^a Begoña de Pablo (Sanidad del Gobierno Vasco).

-ISO 7218. Microbiología de los alimentos. Reglas Generales para los análisis microbiológicos.

-ISO 6579. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella*.

-Norma ISO/TS 11133-2:2003 Microb.alim: Preparación y producción de medios de cultivo-Pruebas de rendimiento

-UNE-EN ISO 16140: Microbiología de los alimentos: Protocolo para la validación de métodos alternativos

-ISO 5725: Precisión de los métodos de ensayo. Determinación de repetibilidad y reproducibilidad mediante intercomparativos

-Informes SEILALIMENTOS 1 a 58 (total 2.200 páginas), Laboratorios MICROKIT, Marzo-1999 a Junio-2013

-PRT-SEILA-001: Protocolo GLOBAL VALIDADO para la ejecución correcta de análisis de alimentos (e intercomparativos SEILALIMENTOS) (42 páginas)

-PRT-VAL-001 Protocolo para VALIDACIÓN en microbiología (69 páginas)

-PRT-VAL-1+2, Idem, incluido CD con hojas de cálculo en Excel.

-09/2008: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para control microbiológico de alimentos, VALIDADOS mediante 10 años de ensayos intercomparativos SEILALIMENTOS. XVI Congreso microbiología de alimentos. Córdoba, 9/2008

-05/2009: CONCLUSIONES DE LOS PROTOCOLOS MICROKIT PARA ALIMENTOS. Conclusiones sobre la validación de los protocolos MICROKIT optimizados para análisis microbiológico de alimentos frente a la normativa relacionada, mediante los ensayos intercomparativos Seilalimentos. Tecnicas de Laboratorio 341. Lifescienceslab 5.

-07/2009: PROTOCOLOS MICROKIT VALIDADOS PARA ANALISIS DE ALIMENTOS. Protocolos MICROKIT para análisis microbiológicos de alimentos. Alimentación, equipos y tecnología 245.

-03-2009: VALIDACION MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS. Validación de análisis de alimentos y esquema de trabajo. 12 pp. MICROKIT © 16-Julio-2009



