

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

TESIS DOCTORAL

Aislamiento de *Salmonella* spp. en alimentos y muestras ambientales:
Estudio y desarrollo de medios semisólidos

ILDEFONSO PERALES PALACIOS

1990

MINISTERIO DE EDUCACION Y CIENCIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Curso de 19 90 a 19 91

Folio -

Núm. -

Expediente académico para la expedición del TITULO DE DOCTOR a favor de D. ILDEFONSO
PERALES PALACIOS

hijo de D. ALFONSO

y de D.ª MARIA, que nació el día 19 de julio de 1954

en JAEN provincia de IDEM

BACHILLER por el Instituto de I.N.E.M. de LINARES

con la calificación de APROBADO, expedido el Título por la Universidad de GRANADA

en 23 de mayo de 19 72

Hizo los estudios de la Licenciatura en la Universidad de GRANADA, efectuó el
examen de Licenciatura, con la calificación de NOTABLE el 11
de julio de 1978.

Expedido el TITULO DE LICENCIADO con fecha 28 de mayo de 1979

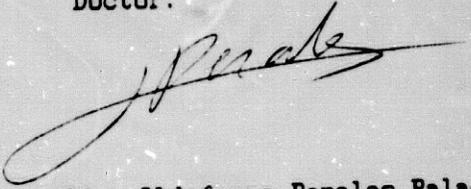
Tiene además aprobados en la Universidad de GRANADA los estudios del
doctorado de la Facultad de Farmacia que se expresan:

Asignaturas o cursos monográficos del Doctorado	Matriculado en		Calificaciones en los exámenes		Observaciones
	Centro	Curso	Ordinarios	Extraordinarios	
"BACTERIOLOGIA CLINICA"	F.Farmacia	80-81	Notable		
"VIRUS BACTERIANOS"	F.Farmacia	80-81	Sobresaliente		
"ACAROS, PARASITOS Y VECTORES"	F.Farm.	80-81	Sobresaliente		
"BIOSINTESIS DE MACROMOLECULAS Y SU REGULACION"	F.Ciencias U.BILBAO	79-80	Sobresaliente		

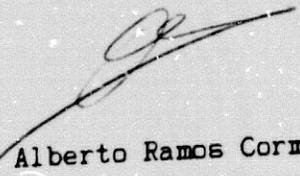
Sigue a la vuelta

Aislamiento de *Salmonella* spp. en alimentos y muestras ambientales:
Estudio y desarrollo de medios semisólidos

Memoria presentada por el
Licenciado en Farmacia
Ildefonso Perales Palacios,
para aspirar al grado de
Doctor.


Fdo. Ildefonso Perales Palacios

El Director del Trabajo


Fdo. Alberto Ramos Cormenzana
Catedrático de Microbiología
de la Facultad de Farmacia de
la Universidad de Granada.

Parte de los trabajos experimentales de esta memoria se han realizado gracias a dos becas del Departamento de Sanidad y Consumo del Gobierno Vasco

Las investigaciones aquí incluidas se han realizado en el Laboratorio de Salud Pública de la Dirección de Salud de Vizcaya (Dr. Luis González de Galdeano y Dr. Iñaki Eguileor Gurtubai).

Algunos de los resultados aquí incluidos se han publicado en los artículos:

"Evaluation of semisolid Rappaport medium for detection of salmonellae in meat products". J. Food Prot. 52: 316-319, 1989.

"Semisolid media for isolation of *Salmonella* spp. from coastal waters". Appl. Environ. Microbiol. 55: 3032-3033, 1989.

A Alicia, mi esposa y a mis hijos Pablo y Jorge.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Alberto Ramos Cormenzana, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por su confianza, apoyo constante e inestimables consejos, y por haber despertado en mí el interés por la Microbiología.

Al Dr. Luis González de Galdeano, por estimularme constantemente en el trabajo y por la amistad que siempre ha dirigido a los que hemos trabajado con él.

A Ana Audicana, por su gran compañerismo y amistad en el trabajo diario.

Al Profesor Dr. D. A. A. Mossel, (Universidad de Utrech, Países Bajos) por transmitirme parte de su gran experiencia en microbiología de los alimentos y por prestarme su apoyo en todo momento.

A Eloisa Erkiaga por su ayuda y colaboración en los trabajos de laboratorio.

A Alicia Loenzo, Enma Merino e Inmaculada García por su ayuda técnica y amistad.

A Miguel Angel Usera, del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda por la confirmación y serotipado de las cepas de *Salmonella* aisladas en este estudio.

A todos muchas gracias.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
Importancia de las gastroenteritis	2
La bacteria	4
Aislamiento	4
Aislamiento a partir de muestras biológicas	5
Alimentos y muestras ambientales	6
Preenriquecimiento	6
Enriquecimiento	8
Medios selectivo-diferenciales	12
Métodos rápidos basados en el cultivo	13
Medios semisólidos	14
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	20
Evaluación del Rappaport-semisólido en productos cárnicos	20
Evaluación de medios semisólidos con aguas de playa	21
Comparación entre el RS y el Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado	22
Modificación del medio Rappaport semisólido	24
Comparación de las nuevas modificaciones con otros medios semisólidos	25
Utilización de medio semisólidos como un método rápido de cultivo	28
ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO	33
RESULTADOS	48
Evaluación del Rappaport-semisólido en productos cárnicos	48
Evaluación de medios semisólidos con aguas de playa	53
Comparación entre el RS y el Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado	56
Modificación del medio Rappaport semisólido	61
Comparación de las nuevas modificaciones con otros medios semisólidos	71
Utilización de medio semisólidos como un método rápido de cultivo	78

DISCUSION	90
Evaluación del Rappaport-semisólido en productos cárnicos	90
Evaluación de medios semisólidos con aguas de playa	92
Comparación entre el ES y el Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado	94
Modificación del medio Rappaport semisólido	98
Comparación de las nuevas modificaciones con otros medios semisólidos	102
Utilización de medio semisólidos como un método rápido de cultivo	105
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFIA	113

INTRODUCCION-

IMPORTANCIA DE LAS GASTROENTERITIS

La diarreas son una importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. Según datos de 1980, la Organización Mundial de la Salud estima en mil millones los episodios diarreicos que se producen en el mundo y se transmiten por agua y alimentos, esto supone unos cinco millones de muertes en niños menores de cinco años (212, 252). En países occidentales como Estados Unidos y Canadá, se estiman 8,4 y 2,2 millones de casos anuales de enfermedades transmitidas por alimentos, con un impacto económico de 12,6 y 1,3 miles de millones de dólares respectivamente (224-226). En Europa son la segunda causa de morbilidad (251) y se calcula entre millón y medio y 15 millones los casos anuales de enfermedades transmitidas por alimentos (209). En España, sólo en el caso de la salmonelosis, se estima que se producen unos 190,000 casos anuales con un coste económico de 18 mil millones de pesetas (148). Por otra parte y además de la gastroenteritis aguda, muchos de los microorganismos transmitidos por alimentos pueden producir complicaciones y secuelas que dan lugar a enfermedades crónicas (16, 17, 156). Una característica de estas enfermedades es que, a diferencia de la mayoría de las enfermedades declaratorias, las transmitidas por alimentos no presentan una disminución (17, 156, 224).

Las intoxicaciones alimentarias son aquellas enfermedades que se adquieren como resultado del consumo de alimentos que contienen cantidades suficientes de sustancias venenosas (34). Las intoxicaciones pueden deberse a: (i) la ingestión de sustancias tóxicas que se hayan en los tejidos de ciertas plantas o animales; (ii) sustancias venenosas añadidas intencionadamente o accidentalmente a los alimentos; o (iii) a productos metabólicos (toxinas) formadas y excretadas por ciertos microorganismos cuando se multiplican en los alimentos. En éste último caso se incluyen, entre otras, las toxinas producidas por *Clostridium botulinum* (200), *Staphylococcus aureus* (31), *Bacillus cereus* (87) y mohos (130).

En el caso de las infecciones transmitidas por alimentos la variedad de agentes es aún mayor (68, 156, 157). Sin embargo son probablemente las bacterias del género *Salmonella* las que reciben mayor atención, debido a que suponen una de las principales causas de enfermedades gastroentéricas

en la mayoría de los países industrializados, teniendo también importancia en los países en vías de desarrollo (225). En estos últimos las salmonelas tíficas y paratíficas siguen representando una causa importante de morbilidad y mortalidad (33), mientras que en los países desarrollados son las salmonelas productoras de gastroenteritis las que presentan una mayor importancia. En los países occidentales los alimentos de origen animal son los principales vehículos de salmonelas (35, 36, 156) y la producción masiva de alimentos crea un mayor riesgo. Un ejemplo podría ser el gran incremento que en los últimos años ha tenido el número de pollos criados por explotación y los altos ritmos de producción de los mataderos de aves, lo que sin duda ha influido en que actualmente los canales de pollo presenten *Salmonella* con más frecuencia que hace algunas décadas (224). En los últimos años los alimentos derivados del huevo han aumentado su relación con la transmisión de salmonelosis y el incremento de la incidencia de *S. enteritidis*. Este fenómeno es cada vez más frecuente en países como España (171, 172, 175), algunos estados USA (214), Reino Unido (72) y Francia (104) y podría estar relacionado con la transmisión intraovárica de salmonela antes de la puesta (72, 172, 204, 214).

En la cadena epidemiología de salmonela los animales son el principal reservorio, procediendo la mayoría de ellas de sus tractos intestinales o de sus heces (34). El hombre es frecuentemente víctima y tiene una importancia menor como reservorio y origen de la infección (34), excepto en el caso de los serotipos adaptados como *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi C* y *S. sendai* (36). El ambiente también juega un importante papel en la perpetuación de la presencia de *Salmonella* (156), ya que tanto el hombre como los animales las excretan durante la infección o mientras son portadores sanos (36). La evacuación de las excretas puede contaminar las estaciones de tratamiento de las aguas residuales (131) y los lodos formados durante dicho proceso (108), los suelos (53, 166), cursos fluviales o aguas marinas (92, 116, 201, 202) etc, provocando una contaminación del ambiente. Además los animales salvajes, como es el caso de las gaviotas, pueden contaminarse con dichos vertidos (80) y transmitir las salmonelas a los animales domésticos (53, 190, 253). Los piensos que consumen los animales pueden adquirir salmonelas del ambiente o de los

animales salvajes (53), lo que cierra el ciclo de la infección (92, 156, 254).

Esta situación hace necesario el disponer de técnicas adecuadas para el aislamiento de salmonela de muestras que pueden proceder de orígenes muy diversos.

LA BACTERIA

La diferente terminología utilizada en la denominación del género *Salmonella* por los distintos autores ha dado lugar a confusión, sobre todo por la práctica común de utilizar los nombres de los serotipos como si representaran nombres de especies (135). Ewing (76) y Le Minor y Popoff (135) consideran a *Salmonella enterica* como única especie, lo que ha sido aceptado por el Subcomité de *Enterobacteriaceae* del Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriana y ha sido propuesto para su homologación por la Comisión Judicial del Comité (135). La especie *S. enterica* incluye siete subespecies, entre las cuales la subespecie I (subsp. *enterica*) es la más frecuente en humanos (137), y más de 2.200 serotipos descritos hasta finales de 1977 (138). Le Minor y Popoff (135) proponen la denominación de los serotipos con mayúscula y sin utilizar letra itálica, pero debido a que en el momento de la redacción de este manuscrito la Comisión Judicial no se había pronunciado sobre la nueva denominación, nosotros utilizaremos la denominación clásica con los serotipos escritos en itálica siguiendo lo descrito en el manual Bergey (136).

El comportamiento de los distintos serotipos puede ser diferente y la patogenicidad varía mucho de un serotipo a otro, existiendo unos que están adaptados a huéspedes específicos, como *S. typhi*, *S. gallinarum-pullorum*, *S. abortus-ovis* etc., mientras que otros son ubicuos y se pueden aislar como patógenos en una amplia variedad de especies animales (136).

AISLAMIENTO

La gran cantidad de serotipos incluidos dentro del género *Salmonella* provoca un comportamiento no uniforme frente a los diferentes medios de cultivo y a los agentes selectivos que se utilizan para su aislamiento.

Otro factor muy importante en el aislamiento de *Salmonella*, es el tipo de muestra a analizar, ya que ésta influye en las condiciones en que se encuentren las células de *Salmonella*, y condiciona a la vez la flora acompañante.

A pesar de estos inconveniente y debido a la importancia de las enfermedades producidas por *Salmonella* es necesario el disponer de técnicas sensibles y rápidas para el aislamiento de los diferentes serotipos a partir de una amplia variedad de muestras.

Aislamiento a partir de muestras biológicas

En el caso de muestras biológicas, como las heces en la fase aguda de la enfermedad, las células de salmonela se encuentran activas y en gran número, llegando incluso a ser el organismo predominante (50, 76), siendo posible por ello, la siembra directa en agar selectivo (81, 110). Cuando se trate de enfermos convalecientes o portadores, el número de células puede ser inferior, requiriéndose en dicho caso un enriquecimiento en caldo selectivo (76).

Esta relativa facilidad para el aislamiento de salmonela permite que las muestras biológicas se siembren rutinariamente en una placa de baja selectividad, como puede ser el agar MacConkey o Eosina Azul de Metileno (EMB) y en otra de mediana selectividad como los agares Desoxicolato-Citrato, Hektoen, Xilosa-Lisina-Desoxicolato, *Salmonella-Shigella* etc, junto con un medio de enriquecimiento, siendo el más utilizado y recomendado el caldo Selenito F de Leifson (76, 90, 150, 191, 203). Se recomienda que cuando se intente aislar *S. typhi* se incluya además el agar sulfito de bismuto (76).

Cuando el aislamiento se intenta a partir de líquidos biológicos que en condiciones normales son estériles, suele ser suficiente la siembra en un medio no selectivo como agar sangre, junto con un medio poco selectivo frente a enterobacterias como es el agar MacConkey; si es necesario, se utilizará también un enriquecimiento en un medio líquido no selectivo (76).

ALIMENTOS Y MUESTRAS AMBIENTALES

En las ocasiones en que se investiga un alimento como sospechoso de haber transmitido una salmonelosis con multiplicación de la bacteria en el mismo, se ha de intentar el aislamiento directo, tal como se indicó para muestras biológicas. Además, el recuento mediante siembra directa de las diluciones del alimento en medios selectivos en placa permite obtener datos útiles sobre la dosis infecciosa y de la responsabilidad de cada alimento en el caso de contaminaciones cruzadas (15).

Cuando se trata de analizar rutinariamente alimentos destinados a consumo humano o animal, o muestras ambientales como aguas de diferentes orígenes, las dificultades aumentan por las siguientes causas: (i) las células de *Salmonella* no son en general predominantes y pueden estar presentes en números tan bajos como unas pocas células en 25 o 100 gramos (7, 110); (ii) frecuentemente están acompañadas de una flora muy variada, pero que puede incluir a bacterias de comportamiento similar al de *Salmonella*; (iii) pueden encontrarse lesionadas debido a la influencia de la muestra "per se" o a la elaboración que ésta ha recibido (7) y (iv) la distribución de *Salmonella* en la muestra puede no ser uniforme (236).

Debido a estos factores no existe un método ideal para la recuperación de todas las salmonelas de cada uno de los diferentes tipos de muestras (110). El procedimiento mayoritariamente utilizado consiste en una serie de pasos secuenciales que generalmente comprenden el preenriquecimiento, enriquecimiento y siembra en placas de medios selectivos y diferenciales, procediéndose a continuación a la identificación. Para realizar todos estos pasos son necesarios 4-5 días hasta obtener una identificación presuntiva de *Salmonella* (7, 50, 51, 54, 110).

Preenriquecimiento

Este paso tiene como función: (i) reparar las células de salmonela lesionadas o debilitadas y (ii) aumentar su número de forma que puedan ser transferidas cuando se proceda al subcultivo de los caldos de enriquecimiento selectivos (81, 177, 232). Por ello el término

preenriquecimiento no se corresponde con la función real de este paso, que es en realidad una revivificación y al mismo tiempo un enriquecimiento no selectivo.

La utilización del preenriquecimiento aumenta la sensibilidad del método de aislamiento de salmonela (50, 51, 70).

En general los alimentos se siembran mediante homogenización de una parte representativa del alimento en 9 volúmenes del caldo de preenriquecimiento. Sin embargo en las ocasiones en que interesa un estudio de la contaminación superficial, como es el caso de los pollos, cáscara de huevos y ancas de rana, se prefiere un "enjuagado" de la superficie, que posteriormente servirá como caldo de preenriquecimiento (44, 81).

En algunos alimentos de bajo contenido en humedad se recomienda realizar un rehidratación lenta: o espolvoreando el alimento sobre la superficie del caldo de preenriquecimiento y dejándolo empapar durante unos 60 minutos a temperatura ambiente (5, 9, 181, 182) o reconstituyéndolo en proporción 1:2 y después de 30 minutos a temperatura ambiente, llevándolo a 1:9 (237). Este procedimiento se ha mostrado útil para leches en polvo y derivados de la caseína, con la excepción del caseinato sódico, (9, 181, 182, 237) y para la harina de soja (255), pero no presenta ventajas o es de menor sensibilidad con otros productos de bajo contenido en humedad (59, 255).

En el caso de muestras de agua, es conveniente realizar una concentración previa de la muestra. La técnica más utilizada es la filtración a través de membrana (6, 47, 91, 201), introduciéndose ésta en el caldo de preenriquecimiento y procediéndose posteriormente como en el caso de los alimentos.

La elección del medio de preenriquecimiento no es crítica para la sensibilidad del método (51) y el nivel de nutrientes parece no ser determinante para el aislamiento de salmonela (50). Por ello en la mayoría de los estudios los caldos de preenriquecimiento utilizados han dado resultados similares (29, 43, 230, 235). Sin embargo la utilización del caldo lactosado ha sido cuestionada debido a que la lactosa no es necesaria para la recuperación de salmonela (233) y en el caso de los piensos los resultados son peores que con el M-9 o con el agua de peptona tamponada (118).

En alimentos muy contaminados o en aquellos que se sospeche la posible acidificación por estreptococos, se ha recomendado la adición al caldo de preenriquecimiento de 0.02 g/l de verde brillante (9, 50, 161, 163) o 0.1 g/l de verde de malaquita (232). De esta forma se podrían paliar los efectos adversos de la acidificación por bacterias grampositivas, aunque algunos investigadores no han encontrado ventajas en la utilización de dicho colorantes (257).

Algunos autores han propuesto la adición de sustancias tensioactivas al caldo de preenriquecimiento en el caso de alimentos que contengan grasas (50). Sin embargo la mayoría de los estudios no han mostrado ventajas e incluso podrían ser contraproducentes por la toxicidad de estas sustancias frente a salmonela (57, 118).

La incubación del caldo de preenriquecimiento se realiza normalmente a 35-37°C durante 18-24 horas (81, 180).

El mantenimiento del caldo de preenriquecimiento en refrigeración hasta 72 horas, con el fin de poder iniciar la analítica cualquier día de la semana, no presenta disminución importante en la sensibilidad de la técnica (54, 56, 143).

Enriquecimiento

La finalidad de este paso es: (i) permitir que las células de salmonela aumenten en número para poder ser detectadas posteriormente en placa e (ii) inhibir la flora acompañante (7, 81, 180).

Debido a la influencia de los diferentes factores apuntados anteriormente, se ha recomendado la utilización de al menos dos caldos de enriquecimiento para de esta forma poder detectar el mayor número posible de muestras positivas y de serotipos diferentes (39, 52).

El volumen a transferir del caldo de preenriquecimiento al caldo de enriquecimiento, no tiene influencia en la sensibilidad excepto cuando se utiliza la incubación del caldo de pre-enriquecimiento durante 6 horas (50). En los demás casos no se obtiene ninguna ventaja en transferir volúmenes superiores a 1 ml, mientras que se encarecen los costes analíticos (50, 55). En muestras de carne picada, inoculada artificialmente

y congelada se han obtenido mejores resultados mediante la transferencia de pequeñas cantidades (un asa o una dilución 10^{-2}) de caldo de preenriquecimiento (120, 121)

El caldo selenito (134) es uno de los medios de enriquecimiento más utilizados. Su mecanismo de acción selectiva no está claro pero podría deberse a la acción del selenio sobre los compuestos sulfhídricos de algunos componentes celulares, o a la formación de seleno-aminoácidos (81). La reducción del selenito a selenio aumenta el pH, bajando su toxicidad, por lo que se añaden al medio azúcares fermentables para mantener el pH del medio (81). Se han señalado varias modificaciones del caldo selenito (180), pero la más utilizada y que ha dado mejores resultados (153) es la del caldo selenito cistina (162), ya que ésta aumenta la recuperación de salmonela en presencia de gran cantidad de materia orgánica.

El caldo selenito presenta el inconveniente de no inhibir suficientemente a los organismos competidores (118), por lo que no es muy útil en muestras que contengan mucha flora acompañante. Es tóxico para *S. choleraesuis* y *S. abortusovis* (76, 134), sin embargo es un medio apropiado para el aislamiento de *S. typhi* (76, 97)

El caldo tetrionato fue utilizado como agente selectivo para salmonela por Müller en 1923 (160) y más tarde fue modificado por Kauffmann añadiendo verde brillante y sales biliares (125, 126). Su acción se debe al anión tetrionato ($S_4O_6^-$) que es el principal agente selectivo (50) y su mecanismo de acción parece basarse en la presencia en salmonela de tetrionato-reductasa, enzima que está ausente en muchas otras bacterias (81). Existen varias formulaciones del caldo tetrionato, correspondiéndose la utilizada en Europa a la modificación de Kauffmann, con una mayor concentración de sales biliares y a un exceso de $S_2O_3^-$, que podría ser en ocasiones más tóxico para algunos serotipos (22, 50) y para el aislamiento de salmonela de carnes crudas (50, 111), sin embargo esta formulación aumenta la selectividad frente a *Proteus* (198) y no hay diferencias con muestras congeladas (230).

La incubación a temperaturas elevadas del orden de 43°C puede suprimir el crecimiento de microorganismos competidores pero no de salmonela (36), algunos estudios han demostrado una neta ventaja en la incubación a esta temperatura (38, 198, 208).

El caldo tetracionato es más sensible que el caldo selenito cistina con alimentos de alta humedad, pero obteniéndose resultados similares con alimentos de baja humedad (30, 52, 59, 60, 86, 235), salvo en un estudio con piensos en el que se señaló ventaja del Müller-Kauffmann (178).

El éxito del aislamiento de salmonela tras enriquecimiento en Müller-Kauffmann está influido por el crecimiento o no de enterobacterias, siendo difícil el aislamiento sobre todo cuando se produce el crecimiento de un elevado número de organismos lactosa positivos (24).

El caldo tetracionato inhibe el crecimiento de *S. choleraesuis*, *S. paratyphi-A* y *S. abortusovis* (76), además las formulaciones que contienen verde brillante no son útiles para aislar *S. typhi* (73, 76).

El caldo Rappaport fue descrito en 1956 como medio de enriquecimiento para salmonela (185). Su empleo fue menor que el de los caldos selenito y tetracionato hasta la modificación de Vassiliadis en 1976 (243), que fue denominada en un principio R10 (243) y posteriormente RV (Rappaport-Vassiliadis) (167). Su eficiencia se ha relacionado con la capacidad de salmonela para multiplicarse a presión osmótica elevada, valores de pH relativamente bajos, a 43°C y en presencia de pocos nutrientes y a que los efectos tóxicos del verde de malaquita frente a salmonela se suprimen gracias a la presencia de cloruro magnésico (11).

El caldo RV se ha mostrado superior al caldo Rappaport original y a otras modificaciones (83, 239, 243). Se ha señalado que la sustitución de triptona por peptona de soja en el caldo RV, puede aumentar ligeramente la productividad del medio (83, 84, 183). La adición de novobiocina puede ser útil cuando se emplean muestras que contengan gran cantidad de flora acompañante (3, 4, 79, 154).

Un requisito importante a tener en cuenta es que el caldo RV se ha de inocular con el caldo de preenriquecimiento en proporción 1:100 (83, 84, 183, 238), siendo suficiente con inocular 0.1 ml en tubos de 10 ml de caldo RV (238, 242). Cantidades superiores, como 1 ml en matraces con 100 ml de RV no suponen ventaja y sí un mayor gasto de material (238).

El caldo RV se ha mostrado en la mayoría de los estudios como más selectivo y específico que el caldo selenito y sus modificaciones (152, 238). Comparado con las diferentes formulaciones del caldo tetracionato y

utilizando alimentos, piensos, muestras biológicas de animales y aguas, el RV presenta en la mayoría de los casos una mayor eficacia, sobre todo cuando se compara con preparaciones comerciales del caldo tetracionato, siendo además más fácil de normalizar, de preparar y más barato (25, 27, 28, 122, 123, 144, 163, 238, 240, 248). El mejor comportamiento del RV frente al tetracionato se debe a que los competidores sobreviven mejor en el caldo Müller-Kauffmann, mientras que decrecen en el RV y a que en el RV las células de *Salmonella* presentan un tiempo de generación más corto (32, 169, 197). Además el RV inhibe más eficazmente a las bacterias lactosa y sacarosa positivas, haciendo más fácil la selección de las colonias de salmonela en los medios en placa (122).

Aunque inicialmente se recomendó que la incubación del RV fuese a 43°C (154, 238, 243), algunos estudios posteriores han considerado más efectiva y menos inhibidora para algunos serotipos la de 42°C (175, 197), siendo además menos crítica cuando puedan suceder oscilaciones de temperatura en estufas no muy bien reguladas. La temperatura de esterilización del RV (115°C) debe respetarse escrupulosamente, ya que si se esterilizase a 120°C, el número de aislamientos de salmonela disminuiría drásticamente (163).

La estabilidad del caldo RV en refrigeración es grande y no se han observado pérdidas de efectividad después de mantenerlo 6-7 meses en refrigeración (241). Las preparaciones comerciales suelen presentar resultados comparables al medio preparado en el laboratorio, siempre que la incubación se prolongue hasta 48 horas (84, 183), aunque ciertos fabricantes pueden ofrecer medios de calidad inferior (183).

No es útil para aislar *S. typhi* y *S. dublin*, debido a que estas son sensibles al verde de malaquita (79, 81, 185). Sin embargo y según otros autores, *S. dublin* no es inhibida cuando el Rappaport-Vassiliadis se incuba a 42 en lugar de 43°C (175).

Al igual que en el caso de los caldos de preenriquecimiento, los caldos de enriquecimiento se pueden mantener en frigorífico durante 72 horas sin pérdidas importantes de sensibilidad (54, 143).

Medios selectivo-diferenciales

Con el empleo de estos medios en placa se pretende que: (i) las diferentes cepas de salmonela puedan crecer formando colonias; (ii) que se inhiba el crecimiento de las restantes bacterias acompañantes y (iii) que las colonias de salmonela puedan ser distinguidas del resto a través de la visualización de características diferenciales (79, 180).

Al igual que con los medios de enriquecimiento, se recomienda utilizar varios medios en placa para aumentar las posibilidades de aislamiento de salmonela (110, 180).

Los medios que se utilizan tienen una selectividad variada. Entre los más empleados hay algunos poco selectivos, tales como el agar MacConkey (140), otros moderadamente selectivos como el agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (222) (XLD), Hektoen (127), Salmonella-Shigella (SS) (67) y Desoxicolato-Citrato (DC) (109, 133), siendo los más selectivos el agar Verde Brillante (129) y agar Sulfito de Bismuto (256).

Se han propuesto modificaciones de algunos de estos medios para incrementar su selectividad. Entre ellas están la adición al agar Verde Brillante de sulfamidas como sulfadiazina (87, 168), sulfapiridina (164) y sulfacetamida más mandelato sódico (147, 247, 249) con el objeto de inhibir a *Proteus* y *Pseudomonas aeruginosa*. También se ha propuesto la utilización del desoxicolato sódico añadido a dicho agar (122, 123, 168, 245) y del antibiótico novobiocina adicionado en cantidades variables a los agares XLD, Hektoen y Verde Brillante (44, 151, 155, 195) con el fin de aumentar la selectividad de dichos medios.

Algunos serotipos como *S. typhi* y *S. dublin* son sensibles al verde brillante que contienen algunos medios (82), por lo que se recomienda utilizar aquellos medios que no lo contienen o que lo contienen en bajas cantidades que no son inhibidoras, como es el caso del agar Sulfito de Bismuto

Los medios citados anteriormente, a excepción del Sulfito de Bismuto, basan sus características diferenciales en la fermentación de carbohidratos, por lo que no son apropiados cuando se intentan buscar aquellos tipos de salmonela que son lactosa positivo. En dichos casos se

ha recomendado utilizar el agar Sulfito de Bismuto u otros que basan sus características diferenciales en la producción de SH_2 por salmonela, como es el caso de las modificaciones del agar Lisina-Hierro (18, 186, 189) o de nuevas formulaciones (66)

En general se recomienda que la incubación de los medios en placa sea a 35-37°C durante 18-24 horas (180).

El agar Sulfito de Bismuto, a pesar de las ventajas de permitir la detección de los tipos lactosa positivos, proporcionar un buen crecimiento de *S. typhi* y de haberse obtenido buenos resultados en un estudio con alimentos artificialmente contaminados en el que participaron varios laboratorios (8) es delicado de preparar, su selectividad y características diferenciales pueden variar con el almacenamiento (43, 49, 73, 76, 141, 180) y puede haber grandes diferencias entre lotes de distintos fabricantes (1, 9). Generalmente es necesario incubar el agar Sulfito de Bismuto durante 48 horas (73). Su acción diferencial se basa en la reducción del sulfito a sulfuro en presencia de azúcares fermentables, produciendo un ennegrecimiento de las colonias en presencia de hierro (81).

La mayor o menor efectividad de los diferentes medios en placa han sido objeto de varios estudios sin resultados concluyentes (4, 8, 52, 79, 82, 89, 114, 197). Está recomendada la utilización de al menos un medio de alta selectividad y otro de baja (110).

Generalmente los medios selectivo-diferenciales disponibles son poco inhibidores para otras enterobacterias (158) y las salmonelas pueden no ser detectadas debido al crecimiento de otros competidores (231). Por ello la única manera efectiva de suprimir su crecimiento radica en la utilización previa de medios de enriquecimiento líquidos (158).

Métodos rápidos basados en el cultivo

Los pasos secuenciales, citados anteriormente para el aislamiento de salmonela, son necesarios y recomendados en la mayoría de las normas que se han descrito. Esto hace que la realización del análisis se prolongue durante varios días, requiriendo al menos tres para un resultado negativo y cuatro para un resultado presuntamente positivo (54). Por ello algunos

autores han intentado reducir el tiempo requerido basandose en la eliminación de pasos o en la reducción de los tiempos de incubación de éstos.

La eliminación del preenriquecimiento se ha sugerido por algunos autores para así acortar la duración del análisis (62) que recomiendan la siembra directa en el caldo de enriquecimiento cuando se trata de muestras muy contaminadas (62, 147). Sin embargo, en la mayoría de los estudios la utilización del preenriquecimiento produce un mayor rendimiento de la técnica (39, 70, 71, 79, 223, 244) y su eliminación produce en general un número inaceptable de falsos negativos, lo que lo hace inviable como medida para disminuir la duración del análisis (50).

También se ha sugerido la reducción del tiempo de incubación del caldo de preenriquecimiento, pero mientras algunos autores han obtenido resultados similares incubando 5-8 horas en lugar de 18 (42, 119, 188,), otros han encontrado efectos adversos en los resultados (177, 179, 234), desaconsejando su utilización.

Otra posibilidad que se ha planteado es la reducción del tiempo de incubación del caldo de enriquecimiento hasta llevarlo a sólo 6-8 horas (62, 187). En algunos estudios realizados con alimentos de bajo contenido en humedad se ha encontrado una equivalencia con la incubación durante 18 horas (62, 187). En el caso de muestras de carne y pollo se han obtenido buenos resultados cuando 5 ml del caldo de preenriquecimiento se filtraban a través de membrana y ésta se depositaba en el caldo de enriquecimiento que se incubaba sólo durante 6 horas (227).

Otro intento ha sido el combinar el preenriquecimiento y el enriquecimiento en un sólo paso (7). Este método está basado en la incubación del caldo de preenriquecimiento durante 4 horas la adición del caldo de enriquecimiento directamente o en forma de cápsulas y continuando la incubación hasta 24 horas (218, 219). Los resultados obtenidos no son concluyentes y están limitados a sólo una pequeña variedad de alimentos.

Medios semisólidos

El empleo de medios semisólidos para el aislamiento de Salmonella se viene utilizando desde principios de siglo (95). Están basados en la mayor

movilidad de *Salmonella* frente a las bacterias competidoras, en presencia o no de agentes selectivos (95). Desde mediados de la década de los sesenta se incrementó el empleo de medios semisólidos. Harvey et al. (95, 96, 98, 217) utilizaron un agar semisólido no selectivo para el enriquecimiento de salmonelas por movilidad. Otros autores modificaron medios diferenciales no selectivos (21, 23, 93) para visualizar la fermentación de azúcares o producción de SH_2 . Algunos medios semisólidos se han descrito como modificaciones de medios líquidos selectivos descritos previamente para el enriquecimiento de *Salmonella*, es el caso de las modificaciones del selenito F (215), selenito-cistina (85), fórmulas similares a la del caldo Rappaport (45, 46, 215). Otros son modificaciones de medios descritos para el aislamiento de *Salmonella* como el agar SS (94, 211, 220) o Hektoen (220). Por último otros autores proponen sus propios medios, como el dulcitol-verde brillante-novobiocina (220).

En la mayoría de los estudios los medios semisólidos permitían el aislamiento de mayor número de muestras positivas a *Salmonella* que los métodos tradicionales, pero al utilizar la mayoría de ellos material de vidrio (1, 21, 45, 46, 85, 93, 94, 96, 98, 170, 215, 217) presentaban los inconvenientes de precisar amplios espacios para su incubación, necesitar de una manipulación delicada o de material de vidrio especial.

En 1984 gran parte de estos inconvenientes fueron subsanados mediante la utilización por parte de Goossens et al. (90) de un medio semisólido vertido en placas petri de 50 mm para el aislamiento de *Salmonella* de heces humanas. El medio se basaba en la utilización del caldo Rappaport diluido al 60%, hecho semisólido mediante la adición de agar a una concentración final del 0.32% , incubado a 37°C y denominado Rappaport semisólido (RS). Otro medio semisólido en placa para el aislamiento de *Salmonella* de heces de roedores ha sido el descrito por Hine et al. (99) y denominado selenito semisólido fecal (SSF)

De Smedt et al. (63-65) en una serie de trabajos utilizaron un medio semisólido vertido en placas de 90 mm, basado en el caldo Rappaport-Vassiliadis adicionado de novobiocina, incubado a 42°C y denominado Rappaport-Vassiliadis Modificado Semisólido (RVMS). Este medio fue utilizado con alimentos y podía ser sembrado directamente del caldo de

preenriquecimiento, lo que proporcionaba resultados un día antes que los métodos habituales e incrementaba el número de positivos obtenidos con caldo Muller-Kauffmann.

Debido a que los métodos semisólidos presentan las ventajas de una mayor sensibilidad y una posible mayor rapidez en el aislamiento de *Salmonella* que los llamados métodos tradicionales, decidimos iniciar este estudio para valorar su utilidad.

OBJETIVOS

El aislamiento de *Salmonella* de alimentos y muestras ambientales presenta actualmente dos grandes problemas: 1) necesita 3 días en el caso de muestras negativas y al menos 4 en el caso de las muestras positivas, y 2) los medios de cultivo finales en el diagnóstico de *Salmonella* (medios en placa) no son en general lo suficientemente selectivos. Debido a ello se pretendieron alcanzar los siguientes objetivos:

- Evaluar la aplicación y utilidad de los diferentes medios semisólidos descritos en la literatura para su utilización en placa en el aislamiento de *Salmonella* de muestras de alimentos y muestras ambientales.

- Estudiar los componentes de los medios semisólidos más eficaces, con el fin de determinar su influencia en la productividad y selectividad, e intentar mejorar los medios existentes.

- Utilizar los medios semisólidos como componentes fundamentales de un método rápido para el aislamiento de *Salmonella* de alimentos basado en el cultivo.

MATERIAL Y METODOS

Evaluación del Rappaport-semisólido en productos cárnicos

Muestras

Las muestras de carne fueron adquiridas en establecimientos detallistas de Bilbao entre los meses de Noviembre de 1985 y Febrero de 1986. Se obtuvieron un total de 104 muestras, de las cuales 52 correspondían a carne de vacuno o cerdo que fue picada en el momento de la compra. Las otras 52 muestras eran salchichas de pollo. Las muestras se transportaron al laboratorio donde se inició el análisis dentro de las 3 horas siguientes a su recogida.

Medios de cultivo

La formulación de todos los medios de cultivo utilizados tanto en este apartado como en los siguientes se presentan en el anexo 1.

Como caldo de pre-enriquecimiento se utilizó el agua de peptona tamponada (APT, Buffered peptone water, Oxoid CM509). Los caldos de enriquecimiento fueron el caldo selenito F (SF, selenite broth, Difco O275), caldo tetraciónato de Müller-Kauffmann (MK, Müller-Kauffmann tetrathionate broth, Oxoid CM343) y caldo Rappaport-Vassiliadis preparado en el laboratorio siguiendo la descripción de sus autores (238, 243). Los medios en placa fueron el agar verde brillante (VB, brilliant green agar, Difco O285), agar sulfito de bismuto (SB, bismuth sulfite agar, Difco O073) y Rappaport semisólido (RS) preparado y vertido en placas de 50 mm de diámetro, según la descripción de Goossens et al. (90).

Procedimiento

Se pesaron 25 g de la muestra y se homogeneizaron con 225 ml de APT durante aproximadamente 1 minuto en un Stomacher 400 (Colworth, Seward Medical). El homogeneizado se incubó a 35°C durante 24 horas. Tras la incubación se transfirió 0,1 ml a 10 ml de caldo RV, 1 ml a 10 ml de caldo MK y 1 ml a 10 ml de caldo SF. Los caldos RV y MK se incubaron a 43°C y el SF a 35°C, todos ellos durante 24 horas. Después de la

incubación cada caldo se sembró en agar VB y agar SB que se incubaron durante 24 horas, procediéndose también a una incubación durante otras 24 horas más en el caso del SB. De cada caldo se sembró también un asa que se depositó cerca del extremo exterior de la superficie de sendas placas de RS, según se describió (90). Una placa de RS se incubó a 35°C y la otra a 43°C.

Las colonias típicas presentes en las placas de VB y SB y los organismos que migraban en el RS se identificaron bioquímica y serológicamente. En el caso del RS se procedió también a un reislamiento en agar MacConkey CS (Difco 1818) con el fin de comprobar la pureza del cultivo. Para la identificación bioquímica se utilizaron los medios de kligler (kligler iron agar, Difco 0086), caldo con lisina para descarboxilasa (lysine decarboxylase broth, Difco 0215 y l-lysine HCl Difco 0705) y (ONPG, Oxoid, DDO013A). La identificación serológica se realizó con antisueros de las casas Institut Pasteur Production y Difco, procediéndose posteriormente a su confirmación en el laboratorio de *Salmonella* del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda (Madrid).

Evaluación de medios semisólidos con aguas de playa

Muestras

Durante los meses de junio, julio, agosto y octubre de 1986 fueron recogidas un total de 256 muestras de agua de mar en 34 estaciones de muestreo situadas en 21 playas de la costa vizcaina. Las muestras se recogieron en las estaciones de muestreo a una profundidad aproximada de medio metro, utilizando botellas de polietileno de un litro de capacidad. Los análisis se iniciaron en el laboratorio antes de las cuatro horas posteriores a su recogida.

Medios de cultivo

La formulación de los medios de cultivo se presenta en el anexo 1. Como caldo de pre-enriquecimiento se utilizó el APT. Los caldos de

enriquecimiento empleados fueron el SF y el RV. Como medios de aislamiento en placa se utilizaron el VB y SB. Los medios semisólidos que se compararon fueron el RS y el RVS, vertidos en placas de 50 mm de diámetro. El RVS se preparó de forma similar al RS pero utilizando el caldo RV en lugar del caldo Rappaport.

Procedimiento

Quinientos ml de las muestras se filtraron a través de filtros de membrana de 0,45 μ m de tamaño de poro (HAWG 047; Millipore Corp.) Los filtros se enrollaron y se sumergieron en tubos que contenían 10 ml de agua de APT, se agitaron mecánicamente y se incubaron a 35°C durante 20 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirió 0,1 ml de APT a un tubo con 10 ml de RV, 1 ml a otro tubo con 10 ml de SF y el contenido de un asa se depositó sobre la superficie y cerca del borde de una placa de 50 mm de diámetro de RS, realizándose la misma operación con una placa de RVS. Los caldos de enriquecimiento y medios semisólidos se incubaron 24 horas a 35°C excepto el RV que lo fue a 43°C. Transcurrido el tiempo de incubación, de los medios semisólidos se procedió a la identificación y comprobación de la pureza según se describió en el apartado anterior, y cada caldo de enriquecimiento se sembró en VB, SB, RS y RVS que se incubaron a 35°C durante 24 horas, prolongándose la incubación hasta 48 horas en el caso del SB. La identificación se realizó según se describió anteriormente.

Comparación entre el RS y el Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado

Muestras

Se emplearon un total de 154 muestras. Cien de ellas eran productos cárnicos crudos que se adquirieron en comercios minoristas de Bilbao durante los meses de febrero y abril de 1928, e incluían 70 salchichas frescas (40 de pollo y 30 de cerdo) y 30 hamburguesas (15 de pollo y 15 de vacuno y/o cerdo). Las muestras se transportaron al laboratorio en donde se inició el análisis antes de transcurrir 3 horas desde su

adquisición. Treinta y cuatro eran piensos para gallinas recogidos en la provincia de Vizcaya durante mayo y junio de 1989. Los 20 restantes eran alimentos de bajo contenido en humedad (10 muestras de chocolate, 5 de leche en polvo, 4 de coco rallado y 1 de cacao en polvo) en los que previamente se demostró que no contenían *Salmonella*, inoculándose posteriormente con cápsulas de referencia (25, 26) suministradas por el Dr. P. H. in't Veld, (National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Países Bajos) y que contenían una media de 5 unidades formadoras de colonias (ufc) de *S. typhimurium*

Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados se presenta en el anexo 1.

Como caldo de pre-enriquecimiento se utilizó el APT. Los caldos de enriquecimiento utilizados fueron el selenito-cistina (SC, selenite cystine broth base, Oxoid CMO699 y sodium biselenite, Oxoid LPO121) y el MK. Como medios en placa se utilizaron el VB y SB. Los medios semisólidos fueron el RS y el RVSM, este último preparado según la descripción de De Smedt et al. (65).

Procedimiento

Se homogeneizaron en Stomacher 25 g de la muestra en 225 ml de APT, incubándose durante 24 horas a 35°C. Transcurrido el tiempo se enriqueció mediante la inoculación de 1 ml en caldo SC y 1 ml en caldo MK, además se inocularon placas de 9 cm de RS y RVSM con 3 gotas de pipeta pasteur depositadas separadamente en la superficie de las placas (cantidad total, 0.1 ml aproximadamente). Los caldos SC y MK se incubaron a 35 y 43°C respectivamente y las placas con medios semisólidos a 35°C el RS y a 42°C el RVSM, todos ellos durante 24 horas. Cuando finalizó la incubación, las placas que presentaron migración se estudiaron como se describió anteriormente y los caldos de enriquecimiento se reislaron sobre VB y SB y se inocularon sobre RS y RVSM, incubándose de la forma habitual. La identificación de las colonias y bacterias que migraban fue como en los apartados anteriores.

Modificación del medio Rappaport semisólido

Bacterias

Se utilizaron los siguientes serotipos de *Salmonella*: *S. enteritidis*, (2 cepas), *S. typhimurium*, (3 cepas), *S. agona*, (1 cepa), *S. blockley*, (1), *S. virchow*, (1), *S. infantis*, (1), *S. paratyphi B*, (1), *S. heidelberg*, (1), *S. ohio* (1) y *S. london* (1). Todas ellas, excepto una *S. typhimurium* que procedía de la ATCC (ATCC 14028, Bactrol Disk set A, Difco 1628), fueron aisladas en nuestro laboratorio a partir de aguas o alimentos, confirmandose los serotipos en el Laboratorio de Referencia de *Salmonella*, Majadahonda (Madrid).

Las cepas de bacterias no pertenecientes al género *Salmonella* fueron: *Citrobacter* sp. (2 cepas), *Enterobacter cloacae* (4 cepas) y *Pseudomonas aeruginosa* (1 cepa). Estas bacterias se aislaron de alimentos o agua, seleccionandose por ser capaces de migrar en el RS.

Procedimiento

Las cultivos de las bacterias a probar se sembraron en caldo triptona soja (TSB, tryptone soya broth, Oxoid, CMO129) y se incubaron durante 18 horas a 35°C. Después de transcurrida la incubación, se realizaron diluciones decimales con el fin de obtener una concentración aproximada de 10^4 ufc/ml, comprobado mediante la siembra de 0,1 ml de las diluciones en la superficie de agar sangre y posterior recuento (Columbia agar base, Oxoid, CMO331 con 7% de sangre de carnero). Las diferentes modificaciones de los medios semisólidos se vertieron en placas de 15 cm y se inocularon con 3 gotas de pipeta pasteur dispuestas separadamente. Las tres gotas proporcionaban conjuntamente una concentración aproximada de 10^3 ufc. Las placas con los medios semisólidos se incubaron habitualmente durante 18 horas a 35°C.

Como medio base se utilizó el RS y sobre él se realizaron las modificaciones sucesivas con el fin de valorar la influencia de sus diferentes componentes, y otros añadidos, en la productividad y selectividad del medio. La sistemática utilizada fue la modificación de

los componentes o de las condiciones de incubación, y la selección de la fórmula más selectiva y la fórmula más productiva que serían las que sufrirían las siguientes modificaciones.

Componentes básicos del medio

Se utilizaron cantidades variables de diferentes tipos de peptonas. Estas fueron las siguientes: triptona (tryptone, Difco O123); triptosa (tryptose, Oxoid L47); proteosa peptona (proteose peptone, Difco O120) e hidrolizado ácido de caseína (casein hydrolysate acid, Oxoid L41). También se determinó la influencia de la adición de extracto de levadura (yeast extract powder, Oxoid L21) y de extracto de carne ("Lab Lenco" powder, Oxoid L29).

Componentes protectores o inhibidores

Se estudió la influencia de diferentes concentraciones de cloruro de magnesio hexahidratado (Merck, 5833), verde de malaquita (Merk, 1398), novobiocina (Sigma, N-1628), biselenito sódico (Oxoid, L-121) y nitrofurantoina (Sigma, N-7878)

pH y temperatura

Una vez comprobada la acción de los componentes anteriores, se determinó la influencia de la reducción del pH a 4,5 y 4 mediante la utilización de los ácidos clorhídico y cítrico. También se valoró la utilidad de la incubación a 42°C, realizando ésta mediante la introducción de las placas en bolsas de plástico selladas y sumergiéndolas en baño maría con circulación del agua.

Comparación de las nuevas formulaciones con otros medios semisólidos

Cultivos puros

Se estudiaron un total de 35 cepas de *Salmonella* no tíficas, 34 aisladas en nuestro laboratorio y una cepa de referencia (*S. typhimurium* ATCC 14028, Bactrol Disk, Difco). Dichas cepas pertenecían a 15

serotipos: *S. agona* (1 cepa), *S. arizona* (1), *S. blockley* (1), *S. brandenburg* (3), *S. derby* (1), *S. enteritidis* (2), *S. heidelberg* (1), *S. infantis* (4), *S. london* (1), *S. mikawasima* (4), *S. ohio* (1), *S. panama* (3), *S. paratyphi B* (4), *S. typhimurium* (3), *S. virchow* (5). Se estudiaron también 10 cepas de bacterias no *Salmonella* y que previamente se habían mostrado como capaces de migrar en medios semisólidos selectivos: 7 de ellas pertenecían al género *Enterobacter*, 2 al *Citrobacter* y 1 era *Pseudomonas aeruginosa*.

Alimentos:

Se analizaron un total de 61 muestras de alimentos. Cuarenta fueron muestras de leche (10 de leche cruda, 10 de leche pasteurizada y 20 de leche en polvo) en las cuales se había comprobado la ausencia de salmonea, inoculándose posteriormente con cápsulas de referencia (25, 26) que fueron suministradas por el Dr. P. H. in 't Veld, (Países Bajos) y que contenían una media de 5 ufc por cápsula de *S. typhimurium*. Diez muestras eran salchichas de pollo adquiridas en febrero de 1989 en establecimientos de Bilbao y 11 piensos para gallinas recogidos en la provincia de Vizcaya en marzo de 1989.

Medios de cultivo:

Los cultivos puros se enriquecieron en caldo TSB y los recuentos se hicieron en superficie de placas de agar sangre (Columbia blood agar base, Oxoid CM331 + sangre desfibrinada de carnero al 5%). En el caso de los alimentos, el caldo de pre-enriquecimiento utilizado fue el APT, empleándose como caldos de enriquecimiento el SC y MK. Para el aislamiento en medio sólido se emplearon el VB y SB. Los 6 medios semisólidos comparados fueron: selenito semisólido fecal (SSF) (99), RS, RVS, RVSM y las dos modificaciones del RS: denominados provisionalmente RSM41 y RSM44. La fórmula de estos dos últimos medios de cultivo, como la del resto, se presenta en el anexo 1. Dichos medios se preparaban de forma similar al RS excepto que en el caso del RSM41, se sustituyeron los 3.25 g de triptona de la fórmula original por la combinación de 2.67 g de triptona (Difco O123), 2.67 g de proteosa peptona (Difco O120) y 1.06 g de extracto de levadura (Oxoid L 21), además la concentración de

cloruro de magnesio y verde de malaquita se incrementaron hasta 21.26 y 0.096 g/l respectivamente y el pH final del medio fue ajustado a 4.5 mediante la adición de la cantidad necesaria de ácido cítrico 1 M. El RSM44 se diferenciaba del RSM41 en que la concentración de verde de malaquita se redujo a 0.021 g/l y la obtención de un pH final de 4.5 se consiguió mediante la utilización de ácido clorhídrico 1N.

Procedimiento:

Cultivos puros:

Las cepas se sembraron durante 18 horas a 35°C en TSB, procediéndose a continuación a realizar diluciones decimales e inoculando los medios semisólidos con tres gotas (aprox. 0.1 ml) depositadas separadamente en la superficie de los medios semisólidos. Las diluciones fueron las apropiadas para alcanzar una concentración entre 30 y 100 ufc por gota, comprobado mediante la siembra de éstas en superficie de agar sangre.

Muestras:

Veinticinco g o ml de los alimentos se mezclaron con 225 ml de APT y se homogeneizaron en Stomacher. En el caso de las muestras artificialmente inoculadas la homogeneización se realizó junto con las capsulas de referencia. Los homogeneizados se incubaron a 35°C durante 24 horas. En el método estandar, los caldos de enriquecimiento SC y MK se sembraron con 1 ml del APT y se incubaron a 35°C el SC y a 43 el MK durante 24 horas. Transcurrida la incubación se resembraron ambos en VB y SB incubandose a 35°C durante 24 y 48 horas respectivamente. Los medios semisólidos se inocularon a partir del preenriquecimiento en APT y posteriormente de los enriquecimientos en SC y MK, incubandose todos ellos a 35°C durante 24 horas, excepto en el caso del SSF que lo fue durante 48 horas (99). La identificación de *Salmonella* se realizó sobre las colonias típicas que crecían en VB y SB y sobre aquellas bacterias que migraban en los medios semisólidos.

Utilización de los medios semisólidos como un método rápido de cultivo

Elección del tipo de filtro de membrana y su disposición en el medio semisólido:

Las formulaciones y forma de preparación de los medios de cultivo se presentan en el anexo 1.

Para valorar los tipos de filtro y su colocación en el medio de cultivo, se procedió a los siguientes pasos: (i) en primer lugar se trabajó con cultivos puros empleando una cepa de *S. enteritidis*, una de *S. typhimurium* y una de *E. cloacae*. Dichas cepas se sembraron durante 18 horas a 35°C en TSB, procediéndose a continuación a realizar diluciones decimales e inoculándose el APT (250 ml) con 0.1 ml de las diluciones 10^{-6} y 10^{-9} . Esto tenía como finalidad el obtener alguna muestra que contuviese entre 1 y 10 ufc/ml. La comprobación del número de ufc añadidas se realizó mediante recuentos en superficie de placas de agar sangre. (ii) En un experimento posterior se inocularon 250 ml de APT con una muestra de referencia que contenía *S. typhimurium* (Dr. in't Veld, Bilthoven, Países Bajos) según se describió en apartados anteriores. (iii) Finalmente se realizó la misma metodología que en el apartado (i) pero añadiendo las diluciones de la bacteria a un homogeneizado en Stomacher de 25 g de pienso, que previamente se había mostrado como exento de *Salmonella*, en 225 ml de APT y repitiendo la experiencia en tres ocasiones. En este último apartado se utilizó la cepa de *E. cloacae* denominada Ch13, que era la que más había migrado en experimentos anteriores.

Diez ml de cada una de las muestras preparadas de la forma descrita se filtraron, tras 6 horas de incubación a 35°C, a través de filtros, de 0.45 μ m de tamaño de poro, Millipore (HAWG 047; Millipore Corp.) y S&S (Ref. 406870, Schlercher & Schuell, Inc.). Ambos filtros se dispusieron de tres formas diferentes: una invertidos sobre la superficie del agar semisólido, otra en posición normal sobre el medio semisólido, añadiéndose posteriormente una capa delgada del mismo medio fundido a 47°C y dejándose solidificar, y por último una tercera forma fue la de

depositarlos en posición normal sobre agar TSBY (228) añadiendole a continuación una capa gruesa de medio semisólido fundido. Los medios semisólidos utilizados fueron el RS, RSM41 y el RSM44.

Elección de los medios semisólidos a emplear

Mediante la técnica de dilución hasta extinción (12) se compararon la productividad y selectividad de los medios RS, RSM41, RSM44 y RSM44n. Este último era similar al RSM44 pero a pH 5.2, es decir sin reducirlo a 4.5 con ácido clorhídrico, y adicionado de novobiocina (10 mg/l). Las cepas utilizadas fueron una cepa de cada uno de los siguientes serotipos de *Salmonella*: *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. virchow* y dos cepas de *Enterobacter cloacae* denominadas 77 y Ch13, todas ellas aisladas de alimentos y seleccionadas, en el caso de *Enterobacter*, por haber migrado en el medio RS.

Valoración del método para la recuperación de células lesionadas por calor o por congelación

Con el fin de obtener células lesionadas y determinar la posibilidad de recuperación por el procedimiento estudiado, se sometieron sendos cultivos de *S. enteritidis* y *S. typhimurium* incubados en TSB durante 18 horas a 35°C, a: (i) calentamiento a 52°C durante 10 minutos en baño maría, la temperatura se controlaba mediante la introducción de un termómetro en un tubo con agua destilada y sumergido en paralelo al cultivo en el baño maría, transcurrido el calentamiento, el tubo que contenía el cultivo se enfriaba rápidamente con agua del grifo y (ii) congelación a -18°C durante 21 días. La letalidad del proceso se comprobó mediante recuentos en placa antes y después de someterlos al calentamiento y la congelación. En ambos casos, el porcentaje de células lesionadas se expresó como la relación entre la media de tres recuentos del número de ufc en agar MacConkey con respecto a las obtenidas en agar sangre. El calentamiento presentaba una letalidad del 78% y entre las células supervivientes aproximadamente el 40% estaban lesionadas. En el caso de la congelación las cifras fueron del 64% y del 30% respectivamente. Después de someter los cultivos a los tratamientos lesionantes, se añadieron diluciones de éstos a un homogeneizado de un

pienso, previamente esterilizado, en 225 ml de M-broth (Difco, 0940) con el objeto de conseguir diluciones de las muestras que sólo contuviesen células lesionadas. Tras 6 y 8 horas de incubación a 35°C, se aplicó el procedimiento especificado en el apartado siguiente. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Aplicación de los métodos semisólidos al análisis de alimentos para consumo humano o animal

Se utilizaron 129 muestras: 14 muestras de piensos para animales adquiridos en comercios detallistas; 52 muestras de piensos para aves de los cuales 49 se habían mostrado anteriormente como positivos y 3 como negativos y que habían sido mantenidos en congelación a -80°C hasta su utilización; 22 muestras de leche en polvo; 2 de cacao en polvo; 2 de coco rallado y 37 de carnes.

Venticinco gramos de la muestra se diluyeron en 225 ml de M-broth y se homogeneizaron en Stomacher, incubándose a continuación a 35°C. A las 6 y 8 horas, 10 ml de la muestra se filtraron a través de sendos filtros Millipore. Algunas muestras pudieron filtrarse fácilmente tras una decantación natural de las suspensiones, como era el caso de los piensos y el coco rallado, sin embargo en otras, como leche y cacao en polvo, fue necesaria la adición de tween 80 (Difco, 3118) al 1% de concentración final y tripsina (Trypsine 1:250, Difco 0152) también al 1%, siguiendo las recomendaciones de Sharpe y Peterkin (206). Los filtros se depositaron invertidos sobre los medios semisólidos RS, RSM44 y RSM44n y se incubaron durante 15-17 horas a 35°C. Transcurrida la incubación en las placas en las que se observaba migración, se tomaba del extremo de ésta con un asa, sembrándose en botón en la superficie de una placa de agar TSBY, se añadía en parte del botón una gota de fago de *Salmonella* O:1 de Felix y Callow (Institut Pasteur Production 53652), se incubaba a 42°C durante 6 horas, procediéndose a la lectura de la reacción lítica; del resto del crecimiento se realizaba la prueba del MUCAP (Bioline, 191500) y aglutinación con partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos polivalentes frente a salmonela (Oxoid FT203). Del extremo de la migración en el cultivo semisólido, también se realizaba un reaislamiento en agar MacConkey CS para

confirmar la presencia o no de salmonela. De esta forma se calculó el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo (142) de las pruebas rápidas de identificación presuntiva (fago, MUCAP y látex).

El método abreviado de cultivo, efectuando una pre-incubación de 8 horas y empleando como prueba de identificación presuntiva el látex, se denominó filtración por membrana-semisólido (F-SS) y se comparó con la utilización habitual de medios semisólidos y con una técnica convencional. En ambos casos se partía del resto del homogeneizado en M-broth y se prolongaba la incubación hasta 24 horas, a continuación se enriquecía en caldo RV y caldo SC incubados como se citó anteriormente. En el caso del método semisólido, placas de RS se inocularon con 3 gotas de pipeta Pasteur del M-broth y de los caldos de enriquecimiento RV y SC. En el caso del método convencional, los caldos RV y SC se reasilaron, el primero sobre VB y agar XLD (Oxoid CM469) y el segundo sobre SB y XLD. La identificación bioquímica y serológica se realizó como se indicó en apartados anteriores.

ANEXO 1 :

MEDIOS DE CULTIVO

AGUA DE PEPTONA TAMPONADA (APT)
(BUFFERED PEPTONE WATER, OXOID, CM509)

Fórmula (g/l):

Peptona	10,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato disódico	3,5
Fosfato monopotásico	1,5

pH final: 7,2 (aprox.)

Preparación:

Se añaden 20 g a 1 litro de agua destilada. Se mezcla bien y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

AGAR SANGRE
(COLUMBIA BLOOD AGAR BASE, OXOID, CM331)

Fórmula (g/l):

Peptona especial	23,0
Almidón	1,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar Nº 1	10,0

pH final: 7,3 (aprox.)

Preparación:

Se disuelve por ebullición 39 g en 1 litro de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se enfría a 50°C y se añade 5% de sangre de carnero estéril desfibrinada. Se vierte en placas a razón de unos 25 ml.

M-BROTH
(DIFCO 0940)

Fórmula (g/l)

Extracto de levadura	5,0
Triptona	12,5
D-Manosa	2,0
Citrato sódico	5,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato dipotásico	5,0
Cloruro de manganeso	0,14
Sulfato de magnesio	0,8
Sulfato ferroso	0,04
Tween 80	0,75

pH final: 7,0 (aprox.)

Preparación:

Se suspenden 36,2 g en agua destilada y se calienta hasta ebullición 1-2 minutos. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

AGAR MACCONKEY CS
(DIFCO 1818)

Fórmula (g/l):

Peptona	17,0
Peptona proteosa	3,0
Lactosa	10,0
Cloruro sódico	5,0
Sales biliares	1,5
Agar	13,5
Rojo neutro	0,03
Violeta cristal	0,001

pH final: 7,1 (aprox.)

Preparación:

Se disuelve por ebullición, con agitación suave, 50 g en 1 litro de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se vierte en placas en cantidades aproximadas de 25 ml.

CALDO TETRACIONATO DE MULLER-KAUFFMANN (MK)
(OXOID CM343)

Fórmula (g/l):

Triptona	7,0
Peptona de soja	2,3
Cloruro de sodio	2,3
Carbonato de calcio	25,0
Tiosulfato de sodio	40,7
Bilis de buey	4,75

Preparación:

Se disuelve por ebullición 82 g en 1 litro de agua destilada. Se enfría a menos de 45°C. Inmediatamente antes de su utilización se añade 19 ml de una solución de yodo y 9,5 ml de una solución de verde brillante al 0,1%. Se mezcla bien y se vierte en tubos o matraces estériles.

Solución de yodo:

Yodo	20 g
Yoduro potásico	25 g
Agua destilada hasta	100 ml

Se disuelve el yoduro potásico en 5 ml de agua destilada, se añade el yodo y se calienta suavemente hasta disolverla completamente.

Se completa con agua destilada hasta un volumen de 100 ml

Solución de verde brillante:

Verde brillante	0,1 g
Agua destilada	100 ml

Se añade el verde brillante al agua destilada, agitando hasta disolverlo. Se calienta la solución a 100°C durante 30 minutos y se agita de vez en cuando mientras se enfría para asegurar que el colorante se disuelve completamente. Se almacena en un frasco de vidrio oscuro o al abrigo de la luz.

RAPPAPORT SEMISOLIDO (RS)

(13, 90)

Fórmula (g/l):

Triptona	3,25
Cloruro sódico	4,34
Fosfato monopotásico	0,87
Cloruro magnésico hexahidratado	17,25
Oxalato verde de malaquita	0,065
Agar	3,2
Agua destilada	1000,0

pH final: 5,2 (aprox.)

Preparación:

Solución A: A 1000 ml de agua destilada se añaden: 6 g de triptona (Difco, 0123); 8 g de cloruro sódico (Merck, 6404); 1,6 g de fosfato monopotásico (Merck, 4873). La solución se realiza el día de preparación del medio RS. Se calienta a unos 80°C hasta que los ingredientes se disuelvan completamente.

Solución B: Contiene 400 g de cloruro magnésico hexahidratado (Merck, 5833) en 1000 ml de agua destilada o 31,8% p/v. Como esta sal es muy higroscópica, se recomienda disolver el contenido entero de un frasco recién abierto, en agua destilada. La solución B se puede almacenar sin esterilizar en frascos oscuros a temperatura ambiente durante al menos 2 años.

Solución C: Contiene 2 g de oxalato verde de malaquita analíticamente puro (Merck 1398) en 100 ml de agua destilada. La solución C se puede mantener durante al menos 8 meses a temperatura ambiente en frascos oscuros.

Solución D: Contiene 3,2 g de agar (Difco, 0140) en 400 ml de agua destilada que se hierve hasta que esté completamente disuelta. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

El caldo Rappaport se prepara añadiendo a 1000 ml de solución A, 100 ml de solución B y 6 ml de solución C. Se esteriliza a 115°C durante 15 minutos. Después de enfriar a 50°C, 600 ml de caldo Rappaport se mezclan asépticamente con 400 ml de la solución D a la misma temperatura y se vierten en placas petri.

RAPPAPORT SEMISOLIDO MODIFICADO 41 (ESM41)

Fórmula (g/l):

Triptona	2,67
Proteosa peptona	2,67
Extracto de levadura	1,06
Cloruro sódico	4,27
Fosfato monopotásico	0,85
Oxalato verde de malaquita	0,096
Cloruro de magnesio hexahidratado	21,26
Agar	3,14
Agua destilada	1000,0

pH final: 4,5

Preparación:

Solución A: A 1000 ml de agua destilada se añaden 5 g de triptona (Difco, 0123), 5 g de proteosa peptona (Difco, 0120), 2 g de extracto de levadura (Oxoid, L21), 8 g de cloruro sódico (Merck, 6404) y 1,6 g de fosfato monopotásico.

Solución B: Contiene 400 g de cloruro de magnesio hexahidratado (Merck, 5833) en 1000 ml de agua destilada o 31,8% p/v. Como esta sal es muy higroscópica, se recomienda disolver el contenido entero de un frasco recién abierto en agua destilada. La solución B puede almacenarse sin esterilizarse a temperatura ambiente en frascos de color oscuro durante al menos 2 años.

Solución C: Contiene 2 g de oxalato verde de malaquita (Merck, 1398) en 100 ml de agua destilada. La solución C se puede mantener al menos durante 8 meses a temperatura ambiente en un frasco de color oscuro.

Solución D: Contiene 6,4 g de agar (Difco, 0140) en 800 ml de agua destilada, hirviéndose hasta que se disuelva completamente. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

El medio final se prepara con 1000 ml de la solución A, 125,2 ml de solución B, 9,2 ml de solución C. Se esteriliza a 115°C durante 15 minutos. Después de enfriar a 50°C, se añaden 737 ml de la solución D a la misma temperatura, se ajusta el pH a 4,5 con ácido cítrico 1N y se vierte en placas petri.

RAPPAPORT SEMISOLIDO MODIFICADO 41n (RSM41n)

Fórmula (g/l):

Triptona	2,67
Proteosa peptona	2,67
Extracto de levadura	1,06
Cloruro sódico	4,27
Fosfato monopotásico	0,85
Oxalato verde de malaquita	0,096
Cloruro de magnesio hexahidratado	21,26
Novobiocina	0,01
Agar	3,14
Agua destilada	1000,0

pH final: 5,2 (aprox.)

Preparación:

Igual al medio RSM41 pero añadiendo 1,9 ml de una solución de novobiocina (Sigma, N-1628) (100 mg en 10 ml de agua destilada) y sin ajustar el pH a 4,5 con ácido cítrico.

RAPPAPORT SEMISOLIDO MODIFICADO 44 (RSM44)

Fórmula (g/l)

Triptona	2,67
Proteosa peptona	2,67
Extracto de levadura	1,06
Cloruro sódico	4,27
Fosfato monopotásico	0,85
Oxalato verde de malaquita	0,021
Cloruro de magnesio hexahidratado	21,26
Agar	3,14
Agua destilada	1000,0

pH final: 4,5

Preparación:

Solución A: A 1000 ml de agua destilada se añaden 5 g de triptona (Difco, 0123), 5 g de proteosa peptona (Difco, 0120), 2 g de extracto de levadura (Oxoid, L21), 8 g de cloruro sódico (Merck, 6404) y 1,6 g de fosfato monopotásico.

Solución B: Contiene 400 g de cloruro de magnesio hexahidratado (Merck, 5833) en 1000 ml de agua destilada o 31,8% p/v. Como esta sal es muy higroscópica, se recomienda disolver el contenido entero de un frasco recién abierto en agua destilada. La solución B puede almacenarse sin esterilizarse a temperatura ambiente en frascos de color oscuro durante al menos 2 años.

Solución C: Contiene 0,4 g de oxalato verde de malaquita (Merck, 1398) en 100 ml de agua destilada. La solución C se puede mantener durante al menos 8 meses a temperatura ambiente en frascos oscuros.

Solución D: Contiene 6,4 g de agar (Difco, 0140) en 800 ml de agua destilada, hirviéndose hasta que se disuelva completamente. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

El medio final se prepara con 1000 ml de solución A, 125,2 ml de solución B y 10 ml de solución C. Se esteriliza a 115°C durante 15 minutos. Después de enfriar a 50°C, se añade 737 ml de la solución de agar a la misma temperatura. Se ajusta el pH hasta 4,5 con ácido clorhídrico 1N y se vierte en placas petri.

CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS (RV)

(11,243)

Fórmula (g/l):

Triptona	5,4
Cloruro sódico	7,2
Fosfato monopotásico	1,44
Cloruro magnésico hexahidratado	28,5
Oxalato verde de malaquita	0,036
Agua destilada	1000,0

pH final: 5,2 (aprox.)

Preparación:

Solución A: A 1000 ml de agua destilada se añaden 6 g de triptona (Difco, 0123), 8 g de cloruro sódico (Merck, 6404), 1,6 g de fosfato monopotásico (Merck, 4873). Esta solución se hace el día de la preparación del caldo RV. Se calienta hasta unos 80°C hasta que los ingredientes se disuelven completamente.

Solución B: Contiene 400 g de cloruro de magnesio hexahidratado (Merck, 5833) en 1000 ml de agua destilada o 31,8% p/v. Como esta sal es muy higroscópica, se recomienda disolver el contenido entero de un frasco recién abierto en agua destilada. La solución B puede almacenarse sin esterilizarse a temperatura ambiente en frascos de color oscuro durante al menos dos años.

Solución C: Contiene 0,4 g de oxalato verde de malaquita (Merck, 1398) en 100 ml de agua destilada. La solución C puede mantenerse durante al menos 8 meses en frascos oscuros a temperatura ambiente.

El medio final se prepara añadiendo a 1000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C (volumen final 1110 ml). Se distribuye en tubos de 10 ml y se esteriliza a 115°C durante 15 minutos.

RAPPAPORT VASSILIADIS SEMISOLIDO (RVS)

Fórmula (g/l):

Triptona	3,25
Cloruro sódico	4,34
Fosfato hidrógeno potásico	0,87
Cloruro magnésico hexahidratado	17,1
Oxalato verde de malaquita	0,022
Agar	3,14
Agua destilada	1000,0

pH final 5,5 (aprox.)

Preparación:

Se prepara el caldo Rappaport-Vassilidis (RV) según se especifica en la monografía correspondiente. Después de enfriar a 50°C, 600 ml del caldo RV se mezclan asépticamente con 400 ml de una solución estéril, a la misma temperatura, de agar al 0,8% y se vierte en placas petri.

RAPPAPORT VASSILIADIS SEMISOLIDO MODIFICADO (RVSM)
(14, 65)

Fórmula (g/l):

Triptosa	4,59
Hidrolizado ácido de caseína	4,59
Cloruro sódico	7,34
Fosfato monopotásico	1,47
Cloruro magnésico hexahidratado	23,34
Oxalato verde de malaquita	0,037
Novobiocina	0,02
Agar	2,7
Agua destilada	1000,0

pH final: 5,2 (aprox.)

Preparación:

Solución A: A 600 ml de agua destilada se añaden: 5 g de triptosa (Oxoid, L47), 5 g de hidrolizado ácido de caseína (Oxoid, L41), 8 g de cloruro sódico (Merck, 6404) y 1,6 g de fosfato monopotásico (Merck, 4873). Esta solución se hace en el día de preparación del RVSM. Se calienta hasta unos 80°C hasta que los ingredientes se disuelvan completamente.

Solución B: Contiene 400 g de cloruro magnésico hexahidratado (Merck, 5833) en 1000 ml de agua destilada o 31,8% p/v. Como esta sal es muy higroscópica, se recomienda disolver el contenido íntegro de un frasco recién abierto en agua destilada. La solución B se puede almacenar sin esterilizar en frascos oscuros a temperatura ambiente durante al menos 2 años.

Solución C: Contiene 0,4 g de oxalato verde de malaquita analíticamente puro (Merck, 1398) en 100 ml de agua destilada. La solución C se puede mantener durante al menos 8 meses a temperatura ambiente en un frasco oscuro.

Solución D: Contiene 3 g de agar (Oxoid, L13) en 400 ml de agua destilada. Se hierve hasta que se disuelva completamente y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

Solución E: Disolver 200 mg de novobiocina (Sigma, N-1628) en 10 ml de agua destilada. Esterilizar por filtración.

El medio se prepara añadiendo a 600 ml de la solución A, 80 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. Entonces se esteriliza a 115°C durante 15 minutos. Después de enfriar a 50°C, 400 ml de la solución D a la misma temperatura y 1,1 ml de la solución E se añaden asépticamente. Después de mezclar, el medio se vierte en placas petri.

CALDO SELENITO F

(DIFCO, Q275)

Fórmula (g/l):

Triptona	5,0
Lactosa	4,0
Fosfato disódico	10,0
Selenito sódico	4,0

pH: 7,0 (aprox.)

Preparación:

Se disuelven 23 g en 1 litro de agua destilada y se calienta hasta ebullición. Evitar el calentamiento excesivo. Una vez disuelto se distribuye en tubos estériles.

CALDO SELENITO CISTINA (SC)

(OXOID, CMD699)

Fórmula (g/l)

Triptona	5,0
Lactosa	4,0
Fosfato disódico	10,0
Selenito sódico	4,0
L-cistina	0,01

pH final 7,0 (aprox.)

Preparación:

Disolver 4 g de selenito sódico (Oxoid, L121) en 1 litro de agua destilada y entonces se añaden 19 g del caldo selenito-cistina base. Se dispensa en tubos estériles.

SELENITO SEMISOLIDO FECAL (SSF)

(99)

Fórmula (g/l):

Triptona	5,0
Lactosa	4,0
Fosfato disódico	10,0
Selenito sódico	4,0
Agar	3,7
Agua destilada	1000,0

pH final 6,2 (aprox.)

Preparación:

Se disuelven 23 g de caldo selenito deshidratado (Difco, 0275) y 3,7 g de agar purificado (Oxoid, L28) en agua destilada calentando suavemente y con agitación constante. Se ajusta el pH a 6,2 con ácido clorhídrico 4M. Se vierte en placas petri cuando alcanza una temperatura de unos 50°C.

AGAR SULFITO DE BISMUTO (SB)

(DIFCO, 0073)

Fórmula (g/l)

Extracto de carne	5,0
Peptona	10,0
Glucosa	5,0
Fosfato disódico	4,0
Sulfato ferroso	0,3
Sulfito de bismuto	8,0
Verde brillante	0,025
Agar	20,0

pH final: 7,7 (aprox.)

Preparación:

Se suspenden 52 g en 1 litro de agua destilada y se calienta hasta ebullición, no dejando que hierva más de 1-2 minutos. Se enfría a unos 50°C, se agita suavemente para dispersar el precipitado y se vierte en placas petri.

CALDO TRIPTONA SOJA (TSB)
(OXOID, CMD129)

Fórmula (g/l)

Digerido pancreático de caseína	17,0
Digerido papaico de haba de soja	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dibásico de potasio	2,5
Glucosa	2,5

pH final: 7,3 (aprox.)

Preparación:

Se disuelven 30 g en 1 litro de agua destilada. Se mezcla bien y se distribuye en tubos. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

AGAR TSBY
(228)

Fórmula (g/l):

Digerido pancreático de caseína	17,0
Digerido papaico de haba de soja	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dibásico de potasio	2,5
Glucosa	2,5
Extracto de levadura	3,0
Agar	15,0

pH final: 7,3 (aprox.)

Preparación:

A 1000 ml de agua destilada se añaden 30 g de TSB (Oxoid, CM129), 3 g de extracto de levadura (Difco, O127) y 15 g de agar N°1 (Oxoid, L11). Se calienta hasta disolución, se enfría hasta unos 50°C y se vierte en placas petri

AGAR VERDE BRILLANTE (VB)
(DIFCO, Q285)

Fórmula (g/l):

Proteosa peptona N°3	10,0
Extracto de levadura	3,0
Lactosa	10,0
Sacarosa	10,0
Cloruro sódico	5,0
Verde brollante	0,0125
Rojo fenol	0,08
Agar	20,0

pH final: 6,9 (aprox.)

Preparación: Se disuelven por ebullición 58 g en 1 litro de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se enfría a 50°C y se dispensa en placas petri.

AGAR XLD
(OXOID, CM469)

Fórmula (g/l):

Extracto de levadura	3,0
Clorhidrato de L-lisina	5,0
Xilosa	3,75
Lactosa	7,5
Sacarosa	7,5
Desoxicolato sódico	1,0
Cloruro de sodio	5,0
Tiosulfato de sodio	6,8
Citrato férrico amónico	0,8
Rojo fenol	0,08
Agar	12,5
Agua destilada	1000,0

pH final: 7,4 (aprox.)

Preparación: Se suspenden 53 gramos en 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición, con agitación frecuente y evitando el sobrecalentamiento. Se transfiere a un baño a 50°C y se vierte en placas petri.

RESULTADOS

Evaluación del Rappaport-semisólido con productos cárnicos

De las 104 muestras estudiadas para la presencia de *Salmonella*, 41 fueron positivas (Tabla 1). Estas muestras correspondían a 31 de las 52 salchichas de pollo (59,6%) y a 10 de las 52 muestras de carne picada de vacuno o cerdo (19,2%). En algunas ocasiones se encontraron varios serotipos en una misma muestra, por lo que se aislaron un total de 51 cepas diferentes que pertenecían a 13 serotipos. Los más frecuentemente encontrados fueron *Salmonella enteritidis* (22 cepas), *S. virchow* (9), *S. brandenburg* (5), *S. blockley* (3), *S. bredeney*, *S. infantis* y *S. oranienburg* con dos cepas cada uno. Los restantes serotipos sólo estaban representados por una cepa cada uno.

La tabla 2 muestra los resultados del aislamiento de *Salmonella* con cada uno de los diferentes medios utilizados. En lo referente a los medios de enriquecimiento, ninguno de ellos pudo detectar todas las muestras positivas. El caldo MK fue el que dió un mayor número de muestras positivas (29), el RV detectó un número ligeramente inferior (27), mientras que el SF sólo detectó 19. Respecto al número de cepas y serotipos encontrados, el RV aisló 31 cepas pertenecientes a 13 serotipos, el MK 31 cepas de 10 serotipos y el SF se mostró claramente inferior, detectando sólo 18 cepas y 6 serotipos.

En lo referente a los medios en placa, el RS incubado a 35°C fue el más productivo con todos los medios de enriquecimiento utilizados (Tabla 2), siendo las diferencias más acusadas cuando se sembraba después de enriquecer en los caldos SF y MK.

En la tabla 3 se presenta la recuperación total de *Salmonella* por los diferentes medios en placa tras el enriquecimiento en RV, SF y MK. El RS incubado a 35°C detectó el mayor número de muestras (90,2%) y de cepas. El VB puso de manifiesto el 63,4% de las muestras positivas y el RS incubado a 43°C el 58,5%, siendo el SB positivo sólo en el 46,3%. La diferencia en el número de muestras positivas entre el RS a 35°C y los demás medios en placa era estadísticamente significativa ($p < 0,01$) por el test de MacNemar (239).

En la tabla 4 se presenta la especificidad de cada uno de los medios utilizados. Los caldos RV y MK presentaron una especificidad similar,

mientras que la del SF fue claramente inferior. Entre los medios en placa el más específico fue el RS cuando se incubó a 43°C, teniendo una especificidad del 100%, ya que todas las colonias que migraban resultaron ser *Salmonella*. El siguiente medio más específico fue el mismo incubado a 35°C (72,6%), siendo su especificidad superior al VB y SB, tanto en los resultados totales como con todos los caldos utilizados.

Debido a la mejor relación sensibilidad-especificidad de la incubación del RS a 35 que a 43°C, se comparó la eficacia de este medio para la detección de muestras con *Salmonella* con la del VB y SB. De esta forma, la no utilización del RS hubiera conducido a 11 falsos negativos, mientras que el prescindir de BGA o BSA sólo hubiera producido 1 falso negativo en cada caso.

TABLA 1. Aislamiento de *Salmonella* de productos cárnicos.

Producto cárnico	Muestras Analizadas	Muestras Positivas	Nº de serotipos	Nº de cepas
Carne picada (bovino y cerdo)	52	10 (19,2%)	6	11
Salchichas de pollo	52	31 (59,6%)	10	40
Total	104	41 (39,4%)	13	51

TABLA 2. Productividad de los diferentes medios utilizados en el aislamiento de *Salmonella* de 41 productos cárnicos naturalmente contaminados.

Resultado	Enriquecimiento ^a y medio en placa ^b											
	RV(27) ^c				SF(19)				MK(29)			
	VB	SB	RS/35	RS/43	VB	SB	RS/35	RS/43	VB	SB	RS/35	RS/43
Positivo	21	19	24	19	5	1	18	0	11	6	27	21
Negativo	20	22	17	22	36	40	23	41	30	35	14	20
Positivo %	51,2	46,3	58,5	46,3	12,2	2,4	43,9	0,0	26,8	14,6	65,9	51,2
Total	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41

^aRV: caldo Rappaport-Vassiliadis, SF: caldo selenito-F, MK: caldo tetracionato de Müller-Kauffmann

^bVB: agar verde brillante, SB: agar sulfito de bismuto, RS/35: Rappaport semisolido incubado a 35°C, RS/43: Rappaport semisolido incubado a 43°C.

^cEn paréntesis número total de *Salmonella* aisladas por el medio de enriquecimiento.

TABLA 3. Productividad de cada uno de los diferentes medios en placa, sembrados después del enriquecimiento en tres caldos diferentes (RV^a, SF^a and MK^a), en el aislamiento de *Salmonella* de 41 muestras de productos cárnicos naturalmente contaminados.

Resultado

	Medio en placa ^b			
	VB	SB	RS/35	RS/43
Positivo	26	19	37	24
Positivo %	63,4	46,3	90,2	58,5
Serotipos	11	10	10	10
Cepas	29	24	41	25

^a Ver tabla 2.

TABLA 4. Especificidad de los medios de enriquecimiento y medios en placa utilizados para el aislamiento de *Salmonella*.

Medio de enriquecimiento ^a	Medio en placa ^b				Total
	VB	SB	RS/35	RS/43	
RV	44,6%	43,1%	64,8%	100%	63,1%
SF	11,1%	5,5%	78,2%	- ^c	31,9%
MK	20%	66,6%	77,1%	100%	63,4%
Total	25,1%	36,6%	72,6%	100%	

^a Ver tabla 1.

^c No migró ninguna bacteria en RS/43 después de enriquecimiento en Selenito F.

La especificidad se expresó en porcentaje de colonias típicas o bacterias que migraban y que se confirmaron como *Salmonella*.

Evaluación de medios semisólidos con aguas de playa

De las 256 muestras de aguas costeras analizadas, 83 fueron positivas para la presencia de *Salmonella* spp. con al menos uno de los medios utilizados. Se aislaron un total de 86 cepas pertenecientes a 18 serotipos. El serotipo aislado con más frecuencia fue *S. enteritidis* (42 cepas), seguido por *S. derby* (7 cepas), *S. mikawasima* (6) y *S. paratyphi B* (5); otros serotipos aislados en más de una ocasión fueron *S. panama*, *S. infantis*, *S. typhimurium*, *S. virchow* y *S. brandenburg*.

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos con los diferentes medios de cultivo sembrados a partir del caldo de pre-enriquecimiento. En ella se observa que, en el caso de las aguas costeras, la siembra de los medios semisólidos tras el enriquecimiento en caldos, no presentaba grandes ventajas respecto a otros medios en placa, especialmente tras el enriquecimiento en RV. Sin embargo, cuando los medios semisólidos se sembraban directamente del caldo de pre-enriquecimiento presentaban la ventaja de detectar el mayor número de muestras que eran negativas por otros medios de cultivo. La siembra directa del caldo de pre-enriquecimiento en los medios semisólidos proporcionó un total de 45 muestras positivas (54.2% del total) en un día menos que el método convencional. Cuando se sembraban tras el enriquecimiento, el RVS fue más productivo que el RS, pero presentaba una menor especificidad (tabla 5).

En la tabla 6 se compara la productividad y selectividad del método convencional con las obtenidas con los medios semisólidos, considerados conjunta o separadamente. En el caso del método convencional, se obtuvieron 53 muestras positivas (63.9%) de las 83 detectadas con cualquiera de los medios empleados, la combinación de los medios semisólidos proporcionó 73 (87.5%), siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) según el test de MacNemar (239). El RVS presentó una mayor productividad que el RS, pero una menor especificidad (tabla 6). En su conjunto, la incorporación de los medios semisólidos a la detección de *Salmonella* en aguas costeras incrementó el número de muestras positivas de 53 a 83, es decir un aumento en la detección del 56.6%.

Tabla 5. Productividad y especificidad de los medios de cultivo utilizados en la detección de 83 muestras positivas para *Salmonella* de las 256 muestras de aguas costeras analizadas.

Medios* utilizados tras el pre-enriquecimiento	Muestras positivas.	Especificidad % ^b
SF/SB	8 (1) ^c	11.1
SF/VB	5 (1)	8.3
RV/SB	34 (2)	60.7
RV/VB	42 (3)	58.3
RS	32 (7)	23.5
RVS	31 (4)	14.8
SF/RS	9 (2)	15.3
SF/RVS	21 (0)	10.2
RV/RS	40 (1)	60.6
RV/RVS	45 (3)	40.2

*RS: Rappaport semisólido; RVS: Rappaport-Vassiliadis semisólido; SF: caldo selenito; RV: caldo Rappaport-Vassiliadis; SB: agar sulfito de bismuto; VB: agar verde brillante.

^bLa especificidad fue expresada como porcentaje de colonias típicas o bacterias que migraban que se confirmaron como *Salmonella*

^cLos números en paréntesis indican el número de *Salmonella* spp. exclusivamente aisladas por el método especificado.

Tabla 6. Comparación entre el método convencional y el uso de los medios semisólidos en la detección de 83 muestras positivas para *Salmonella* spp. de las 256 aguas costeras analizadas.

Metodo	Muestras positivas	Especificidad % ^a
Convencional ^b	53 (10) ^c	34.2
RS y RVS ^b	73 (30)	22.2
RS	57 (7)	31,0
RVS	66 (11)	18,4

^aLa especificidad se expresó como porcentaje de las colonias típicas o las bacterias que migraban y que fueron confirmadas como *Salmonella* spp.

^bConvencional: pre-enriquecimiento, enriquecimiento con caldo selenito (SF) y caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y aislamiento sobre agar sulfito de bismuto y agar verde brillante.

RS y RVS: inoculación en los medios Rappaport semisólido y Rappaport-Vassiliadis semisólido directamente después del pre-enriquecimiento y después del enriquecimiento en RV y SF.

^c Los números en paréntesis indican el número de *Salmonella* spp. aisladas exclusivamente por el método especificado.

Comparación entre el RS y el Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado

De las 154 muestras analizadas, fueron positivas 62 para el aislamiento de *Salmonella*: 14 de las 20 artificialmente inoculadas, 7 de los 34 piensos y 41 de los 100 productos cárnicos (tabla 7). Entre los productos cárnicos, los derivados del pollo fueron los que con más frecuencia presentaban *Salmonella* (67,5% de las salchichas y 46,6% de las hamburguesas), seguidos de las salchichas de cerdo (16,6%) y las hamburguesas de carne de vacuno y/o cerdo (13,3%). Debido a que en algunas muestras había más de un serotipo, se encontraron un total de 50 cepas de *Salmonella* que incluían 9 serotipos, perteneciendo 31 a *S. enteritidis*, 6 a *S. agona*, 5 a *S. virchow*, 2 a *S. blockey*, 2 a *S. mbandaka* y 1 a cada uno de los siguientes serotipos: *S. paratyphi B*, *S. london*, *S. infantis* y *S. tilburg*.

En la tabla 8 se presenta la productividad de los diferentes medios de cultivo utilizados. La siembra directa de los medios semisólidos a partir del agua de peptona proporcionó 60 muestras positivas de las 62 detectadas, mientras que la siembra de los medios en placa tras el enriquecimiento en SC y MK sólo proporcionó 45 y 46 muestras positivas respectivamente. Respecto al rendimiento de los medios en placa, el RS fue el más productivo tanto cuando se sembraba después del enriquecimiento en SC (37 positivos) o en MK (42) como cuando se hacía directamente del APT (60). El RVSM fue claramente inferior, aunque su comportamiento fue algo mejor cuando se sembró directamente del agua de peptona que cuando lo fue tras enriquecimiento en SC y MK.

Cuando se comparó la productividad global de los medios en placa (tabla 9) el RS detectó el 100% de las muestras positivas, mientras que el RVSM sólo puso de manifiesto el 32,3%. El SB fue positivo en el 40,3% de las ocasiones y el VB sólo lo fue en 19 de las 62 muestras. La diferencia entre el RS y los demás medios fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$) según el test de MacNemar (239).

La especificidad de los medios empleados se presenta en la tabla 10. Tanto la siembra directa del APT como la siembra después de los enriquecimientos en MK y SC proporcionaron resultados similares con una ligera mayor especificidad del SC. En lo referente a los medios en placa,

el más específico fue el el RVSM con un 84,7%. El siguiente medio más específico fue el RS con 60,4%, mientras que los medios VB y SB mostraron una especificidad muy inferior.

Debido a que la productividad del RVSM fue muy inferior a la del RS, se estudio la posible influencia de la temperatura de incubación (42°C). Para ello se utilizaron 30 cepas que migraron en RS y no en RVSM, sembrandose cada cepa (3 gotas de pipeta pasteur de un cultivo de 18 horas en TSB) en un par de placas de RVSM, incubandose una a 35°C y otra a 42°C. Esto se realizó incubando en estufa y se repitió incubando en baño maría. Las 30 cepas crecieron en RS y en RVSM incubados a 35°C pero sólo 4 de ellas lo hicieron cuando la incubación del RVSM fue a 42°C.

Tabla 7. Aislamiento de *Salmonella* de alimentos y piensos

Alimento o pienso	Muestras Analizadas	Muestras positivas (%)	Nº de serotipos	Nº de cepas
Deshidratados, contaminados artificialmente	20	14 (70,0)	1	14
Piensos	34	7 (20,6%)	3	7
Salchichas de pollo	40	27 (67,5)	7	34
Hamburguesas de pollo	15	7 (46,6)	2	9
Salchichas de cerdo	30	5 (16,6)	2	5
Hamburguesas de vacuno y/o cerdo	15	2 (13,3)	1	2
Total	154	62 (40,2)	9	71

Tabla 3. Productividad de los diferentes medios utilizados en el aislamiento de *Salmonella*

Resultado	Medios de cultivo ^a									
	APT									
	(60) ^b		SC(45) ^c				MK(46) ^c			
	RS*	RVSM*	VB	SB	RS	RVSM	VB	SB	RS	RVSM
Positivo	60	15	19	15	37	9	16	18	42	4
Negativo	2	47	43	47	25	53	46	44	20	58
Positivo %	96,7	24,2	30,6	24,2	59,6	14,5	25,8	29,0	67,7	6,7
Total	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62

^aAPT: agua de peptona tamponada; SC: caldo selenito cistina; MK: caldo tetracionato de Müller-Kauffmann; RS: Rappaport semisólido; RVSM: Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado; VB: agar verde brillante; SB: agar sulfito de bismuto.

^bEn paréntesis número total de *Salmonella* aisladas por la siembra directa del APT a los medios semisólidos.

^cEn paréntesis número total de *Salmonella* aislada con el medio de enriquecimiento

*Medios semisólidos que fueron sembrados directamente del APT.

Tabla 9. Productividad de los medios en placa sembrados directamente del APT^a y tras enriquecimiento en SC y MK

Resultado	Medio en placa ^a			
	VB	SB	RS	RVSM
Positivo	19	25	62	20
Positivo %	30,6	40,3	100	32,3
Serotipos	5	7	10	6
Cepas	20	28	64	20

^a Ver Tabla 8.

Tabla 10. Especificidad de los medios de cultivo utilizados en el aislamiento de *Salmonella*

Medio de enriquecimiento ^a	Medio en placa ^a				Total
	VB	SB	RS	RVSM	
APT ^b	-	-	50,8%	73,8%	52,7%
SC	42,1%	46,0%	77,1%	83,3%	54,6%
MK	26,5%	37,0%	68,5%	100%	48,0%
Total	34,2%	41,8%	60,4%	84,7%	

^aVer Tabla 8.

^bEl APT se sembró directamente sobre RS y RVSM.

La especificidad se expresó como porcentaje de colonias típicas o bacterias que migraban y que se confirmaron como *Salmonella*.

Modificación del medio Rappaport semisólido

En primer lugar se comparó el efecto de diferentes peptonas cuando se utilizaban como componentes básicos en el medio Rappaport semisólido. Los resultados se presentan en la tabla 11. El incremento en la cantidad de triptona en el Rappaport semisólido, de 3,25 g/l de concentración final a 5,40 produjo disminución en la distancia de migración de las cepas no *Salmonella*, pero también, y de una manera más acusada, en las cepas de *Salmonella*. La sustitución de la triptona por la triptosa aumentó la distancia de migración de las no *Salmonella* y disminuyó las de *Salmonella*. Cuando en lugar de triptona se utilizó proteosa peptona, los resultados con *Salmonella* fueron similares, pero con no *Salmonella* migró una cepa menos. En el caso del empleo de combinaciones de peptonas, la más apropiada fue la de triptona con proteosa peptona, ya que las cepas de *Salmonella* migraron su máxima distancia y en el caso de las cepas no *Salmonella* sólo lo hicieron 3 y alcanzando la mínima distancia.

Para la siguiente prueba se seleccionaron la peptona o combinación de peptonas que mejores resultados habían presentado respecto a productividad y especificidad. A estas se les adicionaron extracto de carne o extracto de levadura, presentándose los resultados en la tabla 12. La adición de extracto de levadura produjo una mayor distancia de migración de las *Salmonella* spp. que el extracto de carne, provocando al mismo tiempo la migración de un mayor número de no *Salmonella* y/o unas mayores distancias de migración.

Para el siguiente paso se seleccionó la combinación de peptonas más selectiva (tabla 11), es decir triptona y proteosa peptona, y la más productiva (tabla 12), que fue la combinación de las mismas peptonas, adicionadas de 1,06 g de extracto de levadura. Dichas combinaciones sirvieron como base para estudiar la influencia del cloruro de magnesio. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13. Se observa que a una mayor concentración de cloruro de magnesio se produjo una mayor distancia recorrida, tanto en la migración de las cepas de *Salmonella* como las de no *Salmonella*. Con el medio que contenía extracto de

levadura, el incremento en la migración de las cepas de *Salmonella*, fue mayor que en el caso de no *Salmonella*.

En la valoración de la influencia del verde de malaquita, se partió de la combinación más selectiva (17,25 g de cloruro de magnesio) y la más productiva (21,26 g de cloruro de magnesio y 1,06 de extracto de levadura) según la tabla 13. En la tabla 14 se exponen los resultados que se obtuvieron con la utilización de las diferentes concentraciones de verde de malaquita. A mayor concentración de dicho colorante, la selectividad fue mayor. Cuando la concentración fue de 0,096 g/l., una cepa de *Salmonella* resultó inhibida, pero la presencia de extracto de levadura, junto con una mayor concentración de cloruro de magnesio disminuyó el efecto inhibitor del verde de malaquita frente a cepas de *Salmonella* y no *Salmonella*. Para el siguiente paso se escogieron la fórmula más productiva y la más selectiva que no inhibía la migración de ninguna *Salmonella*, éstas se correspondían con las concentraciones más baja y más alta de verde de malaquita, acompañados en ambos casos de extracto de levadura (tabla 14).

La adición de novobiocina (tabla 15) en cantidades variables puso de manifiesto que la concentración de 10 mg era la única que no inhibía ninguna *Salmonella*, mientras que sólo 3 cepas no *Salmonella* podían migrar en dichas condiciones.

En la tabla 16 aparecen los resultados obtenidos tras la disminución del pH a 4,5 y 4 mediante la adición de ácido clorhídrico o ácido cítrico, y el efecto de la temperatura de incubación de 42°C en dos de dichas formulaciones. Se observa que la disminución del pH aumentó la selectividad, éste aumento también dependía de la concentración de verde de malaquita. La fórmula más selectiva que no inhibía a ninguna cepa de *Salmonella* fue la que contenía 0,096 de verde de malaquita y tenía un pH de 4,5 obtenido mediante la adición de ácido cítrico. La más productiva era la que contenía 0,021 g de verde de malaquita y el pH de 4,5 se obtenía con ácido clorhídrico. Al primer medio se le denominó Rappaport semisólido modificado 41 (RSM41) y al segundo Rappaport semisólido modificado 44 (RSM44). Cuando la temperatura se incrementó a 42°C con dos de estas formulaciones, varias cepas de *Salmonella* resultaron inhibidas.

En la tabla 17 se presenta el efecto de la adición de selenito a los medios RSM41 y RSM44. Con todas las concentraciones probadas tanto las cepas de *Salmonella* como las no *Salmonella* resultaron completamente inhibidas.

En la tabla 18 se presentan los resultados obtenidos tras la adición del antimicrobiano nitrofurantoina al RS y RSM44. En contra de lo esperado, tanto con las cepas de *Salmonella* como las de no *Salmonella* hubo una mayor productividad, alcanzandose en general mayores distancias en la migración de las bacterias a través del medio semisólido.

Tabla 11. Influencia de diferentes peptonas en la migración y en las distancias alcanzadas por las cepas de *Salmonella* y no *Salmonella*.

Componentes ^a	Cepas			
	<i>Salmonella</i> (n=13)		no <i>Salmonella</i> (n=7)	
	M ^b	D ^c	M	D
3,25g Tn	13	45	4	35
5,40g Tn	13	23	4	20
3,25g Ts	13	26	4	55
3,25g Pp	13	42	3	41
2,67g Ts + 2,67g Hc	13	44	4	34
2,67g Tn + 2,67g Pp	13	54	3	23
2,67g Ts + 2,67g Pp	13	50	4	36

^a Tn: triptona; Ts: triptosa; Pr: proteosa peptona; Hc: hidrolizado de caseína.

^b M: número de cepas que migraban en el medio semisólido.

^c D: distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 12. Influencia de la adición de extracto de carne y extracto de levadura.

Componentes ^a	Cepas			
	Salmonella (n=13)		no Salmonella (n=7)	
	M ^b	D ^c	M	D
Tn + EC	13	42	2	46
Tn + EL	13	59	5	30
Tn + Pp + EC	13	90	4	26
Tn + Pp + EL	13	92	4	31
Ts + Pp + EC	13	41	3	27
Ts + Pp + EL	13	73	6	40
Ts + Hc + EC	13	46	1	46
Ts + Hc + EL	13	57	4	33

^a Tn: Triptona 2,67g; EC: extracto de carne 2,67g; EL: extracto de levadura 1,06g; Pp: proteosa peptona 2,67g; Ts: Triptosa 2,67g; Hc: hidrolizado de caseína 2,67g.

^b M: número de cepas que migraban en el medio semisólido.

^c D: distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 13. Influencia de las diferentes concentraciones de cloruro de magnesio*

Componentes*	Cepas			
	<i>Salmonella</i> (n=13)		no <i>Salmonella</i> (n=7)	
	N ^b	D ^c	M	D
17,25g CM	13	38	4	20
18,24g CM	13	40	4	23
21,26g CM	13	43	4	24
EL + 17,25g CM	13	53	4	36
EL + 18,24g CM	13	58	4	37
EL + 21,26g CM	13	68	4	42

* Medio base: Rappaport semisólido que contenía 2,67g de triptona y 2,67 g de proteosa peptona en lugar de 3,25 de triptona.

• EL: 1,06 g de extracto de levadura; CM: cloruro de magnesio hexahidratado;

• M: número de cepas que migraban en el medio semisólido

• D: distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 14. Influencia de la concentración de verde de malaquita*

Componentes ^a	Cepas			
	Salmonella (n=13)		no Salmonella (n=7)	
	M ^b	D ^c	M	D
17,25g CM + 0,021g VM	13	69	5	81
17,25g CM + 0,065g VM	13	29	4	23
17,25g CM + 0,096g VM	12	13	2	21
EL + 21,26g CM + 0,021g VM	13	70	6	72
EL + 21,26g CM + 0,065g VM	13	48	5	50
EL + 21,26g CM + 0,096g VM	13	24	2	23

* Medio base: Rappaport semisólido que contenía 2,67g de triptona y 2,67 g de proteosa peptona en lugar de 3,25g de triptona.

^a CM: cloruro de magnesio hexahidratado; VM: oxalato verde de malaquita; EL: 1,06g de extracto de levadura.

^b M: Número de cepas que migraban en el medio semisólido.

^c D: Distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 15. Influencia de la adición de novobiocina*.

Componentes ^a	Cepas			
	<i>Salmonella</i> (n=13)		no <i>Salmonella</i> (n=7)	
	M ^b	D ^c	M	D
0,021g VM + 0,010 g N	13	50	3	34
0,021g VM + 0,015 g N	9	24	2	17
0,021g VM + 0,020 g N	9	19	2	13
0,021g VM, + 0,040 g N	2	14	1	20
0,096g VM + 0,010 g N	8	10	1	5
0,096g VM + 0,020 g N	7	9	1	3
0,096g VM + 0,040 g N	7	9	1	2

* Medio base: Rappaport semisólido que contenía 2,67g de triptona, 2,67 g de proteosa peptona, 1,06 g de extracto de levadura y 21,26 g de cloruro de magnesio hexahidratado en lugar de 3,25g de triptona y 17,25 g de cloruro de magnesio hexahidratado.

^a VM: oxalato verde de malaquita; N: novobiocina.

^b M: Número de cepas que migraban en el medio semisólido

^c D: Distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 16. Influencia del pH y temperatura*.

Componentes ^a	Cepas			
	<i>Salmonella</i> (n=13)		no <i>Salmonella</i> (n=7)	
	M ^b	D ^c	M	D
0,021g VM, pH 4,5 (C1)	13	47	5	10
0,021g VM, pH 4,5 (C1)	13	41	5	10
0,021g VM, pH 4,0 (C1)	13	32	2	7
0,021g VM, pH 4,0 (C1)	13	24	2	6
0,096g VM, pH 4,5 (C1)	13	26	1	13
0,096g VM, pH 4,5 (C1)	13	16	1	6
0,096g VM, pH 4,0 (C1)	10	14	1	3
0,096g VM, pH 4,0 (C1)	1	10	0	-
0,096g VM, pH 4,5 (C1), 42°C	4	8	0	-
0,096g VM, pH 4,5 (C1), 42°C	4	5	0	-

* Medio base: Rappaport semisólido incubado a 35°C y que contenía 2,67g de triptona, 2,67 g de proteosa peptona, 1,06 g de extracto de levadura y 21,26 g de cloruro de magnesio hexahidratado en lugar de 3,25g de triptona y 17,25 g de cloruro de magnesio hexahidratado.

^a VM: oxalato verde de malaquita; (C1): el pH indicado se obtuvo mediante la adición de ácido clorhídrico; (C1): el pH se obtuvo mediante la adición de ácido cítrico.

^b M: Número de cepas que migraban en el medio semisólido

^c D: Distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 17. Influencia de la adición de selenito.

Componentes ^a	Cepas			
	<i>Salmonella</i> (n=13)		no <i>Salmonella</i> (n=7)	
	M ^b	D ^c	M	D
RSM44	13	47	5	10
RSM44 + 0,4g S	0	-	0	-
RSM44 + 1g S	0	-	0	-
RSM44 + 4g S	0	-	0	-
RSM41	13	16	1	6
RSM41 + 0,4g S	0	-	0	-
RSM41 + 1g S	0	-	0	-
RSM41 + 4g S	0	-	0	-

^a RSM44: Rappaport semisólido modificado 44; RSM41: Rappaport semisólido modificado 41. S: selenito.

^b M: Número de cepas que migraban en el medio semisólido

^c D: Distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 18. Efecto de la adición de nitrofurantoina.

Componentes ^a	Cepas			
	<i>Salmonella</i> (n=8)		no <i>Salmonella</i> (n=8)	
	N ^b	D ^c	M	D
RS	8	30	8	21
RS + 0,03 mg/l N1	8	36	7	27
RS + 0,10 mg/l N1	8	37	8	21
RS + 0,20 mg/l N1	8	40	8	24
RSM44	8	48	6	18
RSM44 + 0,03 mg/l N1	8	48	7	28
RSM44 + 0,10 mg/l N1	8	48	8	28
RSM44 + 0,20 mg/l N1	8	49	8	30

a RS: Rappaport semisólido. RSM44: Rappaport semisólido modificado 44;

N1: nitrofurantoina.

^b M: Número de cepas que migraban en el medio semisólido

^c D: Distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Comparación de las nuevas formulaciones con otros medios semisólidos

Cultivos puros:

Los resultados obtenidos cuando se sembraron cepas de *Salmonella* y no *Salmonella* en los diferentes medios semisólidos se presentan en la tabla 19. De su estudio se desprende que el RVS, RS y la modificación de éste último, el RSM44 eran los únicos que permitían la migración de todas las salmonellas ensayadas. En los restantes medios no migraron algunas de las cepas de *Salmonella*. En el caso del RSM41 no lo hizo una cepa de *Salmonella paratyphi B* y la de *S. arizona*; en el RVS: una cepa de *S. typhimurium*, una de *S. virchow*, una de *S. paratyphi B* y la de *S. arizona*; y en el caso del SSF: dos de *S. paratyphi B*, una de *S. virchow* y una de *S. ohio*. En lo que respecta a las distancias de migración, el RSM44 fue el que presentó una mayor distancia media de migración: 59 mm, es decir más del doble del RS (25 mm). El siguiente medio en que las cepas de *Salmonella* presentaban una migración mayor fue el RVS con una media de 44 mm. Los restantes medios permitieron menores distancias de migración que el RS.

En lo referente a las cepas de bacterias no pertenecientes al género *Salmonella*, los medios semisólidos más inhibidores fueron el RSM41 y SSF seguidos del RVS. El RSM44 inhibía dos cepas más que el RS, pero las distancias de migración de las no inhibidas eran mayores. El RVS permitió el crecimiento y grandes distancias de migración con todas las cepas no-*Salmonella*.

Alimentos:

En la tabla 20 se presentan los resultados obtenidos en el aislamiento de *Salmonella* con los diferentes alimentos estudiados, y se hace una comparación entre el método convencional y los diferentes medios semisólidos. Las muestras artificialmente contaminadas, lo fueron con las cápsulas de referencia que contenían *S. typhimurium*. En el caso de las muestras naturalmente contaminadas las salmonelas que se aislaron pertenecían a otros 5 serotipos. Los medios semisólidos que presentaron un mejor comportamiento con todos los alimentos ensayados fueron el RS y RSM44. Los medios semisólidos dieron resultados similares al método

convencional en el caso de los alimentos de baja humedad (leche en polvo, piensos) o de alta humedad que contenían poca flora contaminante (leche pasteurizada), pero fueron claramente superiores cuando se estudiaban alimentos de baja humedad crudos (leche cruda y salchichas de pollo) que suelen contener una alta concentración de flora contaminante (tabla 20).

En la tabla 21 se muestra la productividad y especificidad de los diferentes medios semisólidos utilizados. Los más productivos fueron el RSM44 y RS que detectaron el 96,8 y el 93,5% de las muestras positivas. En lo referente a la especificidad, en ambos medios estaba alrededor del 60,0% y eran sólo superados ligeramente por el RVSM (61,2%). La mejor combinación entre productividad y especificidad correspondió a los medios RRM44 y RS.

Los resultados referentes a la rapidez de detección de las muestras positivas se expresan en la tabla 22. También en este caso el RSM44 y RS fueron los medios semisólidos que más muestras positivas detectaron en 3 días, siendo este número también superior al puesto de manifiesto por el método convencional en 4 días.

Debido a que el RSM44 y RS fueron los medios más rápidos, productivos y se encontraban entre los más específicos, se comparó su utilización conjunta, con el método convencional, presentándose los resultados en la tabla 23. En ella se desglosan los resultados según los diferentes tipos de alimentos estudiados. Con todas las muestras, la combinación de los dos medios semisólidos proporcionaba igual o mayor número de muestras positivas que el método convencional, tanto cuando se sembraban a partir del caldo de enriquecimiento como cuando se hacía a partir del caldo de pre-enriquecimiento. Las diferencias más acusadas se obtuvieron con los alimentos crudos de alta humedad (leche y salchichas de pollo). La utilización conjunta del RSM44 y RS permitió la detección del 100% de las 31 muestras que fueron positivas para la presencia de *Salmonella*.

Tabla 19: Comportamiento de cultivos puros de *Salmonella* y no-*Salmonella* en los diferentes medios semisólidos estudiados.

Cepas		Medios de cultivo*					
		RE	RSM44	RSM41	RVS	RVSM	SSF
<i>Salmonella</i> (n=35)	M ^a	35	35	33	35	31	31
	D ^b	25	59	23	44	15	9
no <i>Salmonella</i> (n=10)	M	9	7	2	10	3	2
	D	8	21	13	20	10	12

* RS: Rappaport semisólido; RSM44: Rappaport semisólido modificado 44; RSM41: Rappaport semisólido modificado 41; RVS: Rappaport-Vassiliadis semisólido; RVSM: Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado y SSF: Selenito semisólido fecal.

^a M: número de cepas que migraban en el medio semisólido.

^b D: distancia media en mm que migraban las cepas en el medio semisólido.

Tabla 20. Aislamiento de *Salmonella* de alimentos natural y artificialmente contaminados, según los diferentes métodos y medios utilizados.

Tipo de muestra*	Método						
	Convencional	Semisólido*					
		RS	RSM44	RSM41	RVS	RVSM	SSF
Leche en polvo (n=20)	10	9	11	9	9	9	8
Leche pasteurizada (n=10)	5	5	5	3	5	3	4
Leche cruda (n=10)	2	5	4	3	3	2	3
Salchichas de pollo (n=10)	0	9	9	8	8	8	6
Piensos (n=11)	1	1	1	1	1	1	1
Total (n=61)	18	29	30	24	26	23	22

* Las muestras de leche fueron inoculadas artificialmente con muestras de referencia que contenían *S. typhimurium*. En el caso de los otros alimentos la contaminación fue natural.

* Ver tabla 19.

Tabla 21. Productividad y especificidad de los distintos medios semisólidos utilizados en el aislamiento de *Salmonella* de 61 alimentos naturalmente contaminados o artificialmente inoculados..

	Medio semisólido*					
	RS	RSM44	RSM41	RVS	RVSM	SSF
Productividad ^a	93,5%	96,8%	77,4%	83,9%	74,2%	71,0%
Especificidad ^b	60,2%	59,8%	56,4%	45,5%	61,2%	47,9%

* Ver Tabla 19.

^a La productividad se refirió al total de muestras positivas detectadas por cualquiera de los métodos estudiados.

^b La especificidad se expresó como porcentaje de colonias típicas o bacterias que migraban y que fueron confirmados como *Salmonella*.

Tabla 22. Comparación entre la rapidez del método convencional y de los medios semisólidos en el aislamiento de *Salmonella* de muestras de alimentos.

	Método						
	Convencional	Semisólido*					
Tiempo de detección		RS	RSM44	RSM41	RVS	RVSM	SSF
3 días	---	25	28	22	20	19	12
4 días	18	29	30	24	26	23	22

* Ver Tabla 19.

Tabla 23. Comparación de un método convencional para el aislamiento de *Salmonella*, con un método semisólido (RS + RSM44 sembrados de los caldos de pre-enriquecimiento y enriquecimiento) según los diferentes tipos de alimentos.

Tipo de muestra	Método			
	Convencional	Semisólido (RS+RSM44)*		
		Pre-enr.	Enr.	Total
Leche en polvo	10	10	10	11
Leche pasteurizada	5	5	5	5
Leche cruda	2	5	3	5
Salchichas de pollo	0	8	8	9
Piensos	1	1	1	1
Total	18	29	27	31

* Ver Tabla 19.

Utilización de los medios semisólidos como un método rápido de cultivo.

Elección del tipo de filtro de membrana y su disposición en el medio semisólido:

En la tabla 24 se presentan los resultados que se obtuvieron según los diferentes tipos de filtros y la disposición de estos en el medio semisólido, tras la inoculación de caldos con cultivos puros de *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y de *E. cloacae*. En lo referente al tipo de filtro, no se observaron diferencias apreciables entre el Millipore y el S&S, ni con las cepas de *Salmonella* ni con las de *E. cloacae*. En el caso de la disposición del filtro en la placa, tampoco hubo diferencias apreciables en lo referente a *Salmonella* según se colocase el filtro invertido sobre la placa (método A) o en posición normal con una segunda capa añadida de medio semisólido (método B). En el caso de *E. cloacae* el segundo método permitía su crecimiento sobre los medios RS y RSM44. La disposición del filtro en posición normal de la superficie de un agar no selectivo (TSBY), con adición de una capa del medio semisólido (método C) aumentaba la distancia de migración de *S. enteritidis* cuando se utilizaba el medio RSM41, y con todos los medios en el caso de *S. typhimurium*, pero este método también aumentaba la migración de *E. cloacae* en el caso del medio RSM44.

Cuando la experiencia se repitió utilizando cápsulas de referencia (tabla 25) de nuevo los diferentes tipos de filtro ofrecieron resultados similares y el método C proporcionó distancias de migración superiores. Como los dos tipos de filtros y los métodos A y B mostraron en general resultados similares, se compararon a continuación sólo los métodos A y C, utilizando filtros Millipore HC y examinando el comportamiento de cepas de *Salmonella* y *E. cloacae* añadidas a piensos que no contenían previamente *Salmonella* (tabla 26). El método C permitió distancias de migración superiores al A en el caso de las dos cepas de *Salmonella* pero estos incrementos fueron aún mayores en el caso de la cepa de *E. cloacae*, superando o igualando en todos los casos las distancias de

migración de *Salmonella*. Debido a estos resultados se seleccionó para los siguientes estudios la utilización del método A y los filtros Millipore HC

Elección de los medios semisólidos a emplear:

Debido a que el medio RSM41 se mostró en el apartado anterior como inhibidor de algunas cepas de *Salmonella* (Tabla 19) y poco productivo en su utilización con alimentos (Tabla 21) se replanteó su utilización, para ello se comparó, utilizando el agar TSBY como medio de referencia, con los medios semisólidos RS, RSM44 y el medio RSM44n. El último medio era una modificación del RSM44 al que no se había disminuido su pH pero que se le había añadido novobiocina a la concentración final de 10 mg/l. Los medios se evaluaron mediante la técnica de dilución hasta extinción (tabla 27). El RSM44n proporcionó una selectividad similar al RSM41 sin mostrar una inhibición tan acusada de *S. typhimurium*. Por ello a partir de entonces se utilizó el medio RSM44n junto al RS y RSM44 en la evaluación del método filtración por membrana-semisólido (F-SS).

Valoración del método para la recuperación de células lesionadas por calor o congelación.

En la Tabla 28 se muestran los resultados de la recuperación de entre 1 y 2 células lesionadas por el calor y añadidas a pienso previamente esterilizado. Se desprende que el método permitía el aislamiento de *Salmonella* a partir de dicho tipo de células. En el caso de *S. typhimurium* sólo el medio RSM44 permitía su recuperación, siendo necesaria una pre-incubación del caldo de 8 horas, mientras que la de 6 horas no era suficiente.

Cuando las células habían sido lesionadas mediante congelación (tabla 29) la recuperación fue buena con todos los medios y tras 6 u 8 horas de pre-incubación.

Aplicación de los métodos semisólidos al análisis de alimentos para consumo humano o animal.

Para definir el tiempo necesario de pre-enriquecimiento necesario para la óptima recuperación de *Salmonella* se comparó la incubación

durante 6 u 8 horas utilizando un total de 88 muestras, cuyos resultados aparecen en la tabla 30. Se observa que con todos los medios semisólidos la prolongación de la incubación hasta 8 horas aumentaba el número de positivos, este aumento era más acusado con el medio RS. En total el número de muestras positivas pasaba de 42 a 50 cuando se prolongaba el tiempo de incubación del caldo de pre-enriquecimiento, siendo necesario por ello realizarla durante 8 horas.

En la tabla 31 se muestra la utilidad de las distintas técnicas rápidas, presentando los valores predictivos positivo y negativo en relación a la confirmación de *Salmonella* por cultivo. La prueba de fluorescencia denominada MUCAP era la que presentaba más falsos positivos, por lo que el valor predictivo positivo fue sólo de 0,86. La prueba del bacteriófago presentó menos falsos positivos pero la que más falsos negativos, con un valor predictivo negativo de sólo 0,70. La aglutinación con látex fue la más eficaz, con un valor predictivo positivo del 0,98 y negativo de 1.

La comparación entre el rendimiento del método de filtración por membrana-semisólido (F-SS, con pre-incubación durante 8 horas y confirmación con látex) con el del método semisólido y el del método convencional aparece en la tabla 32. Entre los diferentes medios empleados con el método F-SS, el RS fue el que más positivos proporcionó, seguido del RSM44 y el RSM44n con 66 y 61 positivos respectivamente. La utilización conjunta del RS y el RSM44 aumentó el número de positivos a 71. Por ello, si consideramos el método F-SS, empleando los medios RS y RSM44, su productividad fue ligeramente mayor que el método semisólido y el convencional, presentando 71 positivos frente a 69 y 70 respectivamente, ofreciendo la ventaja de poder obtener resultados al día siguiente de iniciarse el análisis.

Tabla 24. Influencia del tipo de filtro y disposición de éste en el medio semisólido tras la inoculación de frascos conteniendo 250 ml de APT con 2 ufc de *S. enteritidis*, 2 ufc de *S. typhimurium* y 3 ufc de *E. cloacae* respectivamente e incubación durante 6 horas a 35°C y filtración de 10 ml.

Tipo de filtro	Disposición en la placa*								
	A			B			C		
	RS ^a	RSM41	RSM44	RS	RSM41	RSM44	RS	RSM41	RSM44
<i>S. enteritidis</i>									
Millipore	I ^b	16	I	I	12	I	I	I	I
S&S	I	16	I	I	10	I	I	I	I
<i>S. typhimurium</i>									
Millipore	18	15	15	20	4	16	I	I	I
S&S	20	14	17	16	12	16	I	14	I
<i>E. cloacae</i>									
Millipore	0	0	0	6	0	7	0	0	5
S&S	0	0	0	5	0	8	0	0	6

* A: invertido sobre la superficie del medio semisólido; B: en posición normal sobre el medio semisólido y añadiendo posteriormente una segunda capa de éste; C: en posición normal sobre el agar TSBY y adicionando a continuación una capa de medio semisólido.
^a RS: Rappaport semisólido; RSM41: Rappaport semisólido modificado 41; RSM44: Rappaport semisólido modificado 44.
^b Distancia de migración de la bacteria en el medio semisólido (vertido en placas de 90mm) expresada en mm; I: el medio de cultivo resultó totalmente invadido.

Tabla 25. Influencia del tipo de filtro y disposición de éste en el medio semisólido tras la inoculación de APT con una cápsula de referencia conteniendo *S. typhimurium*, incubación durante 6 horas a 35°C y filtración de 10 ml.

Tipo de filtro	Disposición en la placa*								
	A			B			C		
	RS ^a	RSM41	RSM44	RS	RSM41	RSM44	RS	RSM41	RSM44
Millipore	14 ^b	12	15	20	10	I	I	I	I
S&S	18	15	17	21	10	I	I	I	I

* a -> Ver Tabla 24.

Tabla 26. Influencia de la disposición del filtro en el medio semisólido tras la inoculación de homogeneizados de pienso (n=3), incubación durante 6 horas a 35°C y filtración de 10 ml.

Bacteria	Disposición en la placa*					
	A			C		
	RS ^b	RSM41	RSM44	RS	RSM41	RSM44
<i>S. enteritidis</i> (3 ufc)	13 ^b	10	19	22	21	I
<i>S. typhimurium</i> (1 ufc)	10	12	21	17	14	26
<i>E. cloacae</i> Ch13 (2 ufc)	11	8	I	I	22	I

* = Ver Tabla 24.

^b Media de las distancias recorridas en mm de los tres experimentos realizados; I: la placa fue invadida por la bacteria correspondiente en las tres ocasiones.

Tabla 27. Títulos obtenidos con diferentes medios semisólidos cuando se utilizó la técnica de dilución hasta extinción.

Bacterias	Medios de cultivo*				
	TSBY	RS	RSM44	RSM44n	RSM41
<i>S. enteritidis</i>	9 ^a	9	9	7	7
<i>S. typhimurium</i>	9	9	9	7	3
<i>S. virchow</i>	9	9	9	7	7
<i>E. cloacae</i> 77	10	10	10	2	<2
<i>E. cloacae</i> Ch13	10	10	10	3	<2

* TSBY: Agar tripticasa soja extracto de levadura; RS: Rappaport semisólido; RSM44: Rappaport semisólido modificado 44; RSM44n: Rappaport semisólido modificado 44 con 10 mg/l de noboviocina. RSM41: Rappaport semisólido modificado 41.

* El título se expresó con el log₁₀ de la máxima dilución que tras ser sembrado en el medio produjo crecimiento (TSBY) o migración (medios semisólidos).

Tabla 28. Recuperación de células lesionadas de *S. enteritidis* y *S. typhimurium* mediante calentamiento a 52°C durante 10 minutos y añadidas a pienso esterilizado.

Cepa	Horas de preincubación	Medios de cultivo*		
		RS	RSM44	RSM44n
<i>S. enteritidis</i>	6	13 ^b	I	10
" "	8	15	I	10
<i>S. typhimurium</i>	6	0	0	0
" "	8	0	17	0

* Ver Tabla 27

^b Ver Tabla 24

Tabla 29. Recuperación de células lesionadas de *S. enteritidis* y *S. typhimurium* mediante congelación a -18°C durante 21 días y añadidas a pienso esterilizado.

Cepa	Horas de preincubación	Medios de cultivo*		
		RS	RSM44	RSM44n
<i>S. enteritidis</i>	6	I ^b	I	I
" "	8	I	I	I
<i>S. typhimurium</i>	6	I	20	I
" "	8	I	21	I

* Ver Tabla 27

^b Ver Tabla 24

Tabla 30. Comparación entre el pre-enriquecimiento durante 6 y 8 horas en el aislamiento de *Salmonella* con el método semisólido rápido utilizando 88 muestras (66 piensos y 22 carnes) naturalmente contaminadas y 8 muestras de leche en polvo artificialmente contaminadas con cápsulas de referencia.

Tiempo de incubación del pre-enriquecimiento	Medios de cultivo*			Total
	RS	RSM44	RSM44n	
6 horas	36	40	36	42
8 horas	48	45	40	50

* Ver Tabla 27.

Tabla 31. Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de las pruebas rápidas MUCAP, bacteriófago O:1 y aglutinación con látex cuando se aplicaban al aislamiento de *Salmonella* tras utilizar el método rápido semisólido al estudio de 129 muestras de alimentos.

	MUCAP	Fago	Látex
Valor predictivo positivo	0,86	0,91	0,98
Valor predictivo negativo	0,93	0,70	1

Tabla 32. Comparación entre los métodos: filtración por membrana-semisólido (F-SS), semisólido (SS) y convencional (C) para el aislamiento de *Salmonella* de 129 muestras de alimentos.

Muestras	Método*						Total
	C	SS	F-SS				
			RS	RSM44	RSM44n	RS+RSM44	
Piensos (n=66)	34	35	37	33	30	38	41
Leche en polvo** (n=22)	22	22	21	22	20	22	22
Cacao** (n=2)	2	2	2	2	2	2	2
Coco** (n=2)	2	2	2	2	2	2	2
Productos cárnicos (n=37)	9	9	7	7	7	7	9
Total (n=129)	69	70	69	66	61	71	76

* C: convencional; SS: semisólido; F-SS: filtración por membrana-semisólido; RS: Rappaportsemisólido; RSM44: Rappaport semisólido modificado 44. RSM44n: Rappaport semisólido modificado 44 con 10 mg/l de novobiocina.

** Muestras artificialmente inoculadas

DISCUSSION

Evaluación del Rappaport semisólido con productos cárnicos

El que se consiga o no el aislamiento de *Salmonella* de un alimento, depende de los diferentes medios de cultivo que se utilizan secuencialmente (53, 81, 187). En nuestro estudio se utilizó un medio de pre-enriquecimiento (APT), y varias combinaciones de medios de enriquecimiento y medios en placa. La productividad global del caldo MK fue ligeramente superior al RV y claramente superior al SF (tabla 2). Por el contrario en la mayoría de los estudios publicados el RV se ha mostrado superior a las preparaciones comerciales de MK y caldos selenitos (25, 27, 122, 163, 238). Nuestros resultados serían comparables a los de dichos autores si sólo consideráramos la siembra de los caldos de enriquecimiento en VB y SB, pero fue la incorporación del RS incubado a 35°C lo que aumentó la productividad del SF y especialmente del MK, que llegó a ser similar a la del RV. Esto sugiere que el MK permite el crecimiento de *Salmonella* al menos tan bien como el RV, lo que contradice las observaciones de otros autores (197) y el posible efecto tóxico del MK sobre *Salmonella* (18, 19, 50, 149, 187), aunque apoyando la opinión de Beumer et al. (32). El menor rendimiento del MK en otros estudios se explicaría no en el hecho de que fuese tóxico para *Salmonella*, sino en que éste no inhibiría adecuadamente a los microorganismos competidores, que enmascararían la presencia de *Salmonella* (24, 122, 240) en medios como el VB y SB. Al ser el RS un medio más selectivo, los competidores no interferirían con la migración de *Salmonella*, pudiéndose obtener de esta forma cultivos prácticamente puros. El menor incremento en el número de muestras positivas que produjo la utilización del RS tras enriquecimiento en RV, se debe probablemente a que el RV es más selectivo que el SF y MK, inhibiendo preferentemente a los organismos competidores que se asemejan a *Salmonella* en los medios en placa y facilitando así su selección (144, 163, 238, 248).

Entre los medios en placa, el más productivo fue en todos los casos el RS incubado a 35°C (tablas 2 y 3), presentando además una especificidad del 72,6%, superior al VB y SB (tabla 4). Esta especificidad fue inferior al 95,1% obtenido en la descripción original

del medio realizada por Goossens et al. (90), utilizandolo con heces humanas. Esta diferencia puede deberse, además de a la distinta naturaleza de las muestras empleadas, a que nosotros consideramos para identificación todas las bacterias que migraban, independientemente de la distancia de dicha migración, ya que observamos que en ocasiones había cepas de *Salmonella* que migraban menos de los 20 mm que Goossens et al. (90) consideraban como sospechosos de ser *Salmonella*. Por el contrario la sensibilidad obtenida por nosotros fue del 90,2% frente al 80,3% del estudio original. En nuestra evaluación también estudiamos la sugerencia de realizar la incubación a más de 40°C con el fin de intentar aumentar la especificidad del medio (90). De esta forma, cuando el RS se incubó a 43°C, la especificidad aumentó al 100% (tabla 4), pero con una inaceptable pérdida de productividad (tabla 3). En nuestro estudio, y coincidiendo con las observaciones de Goossens et al. (90), la mayoría de los microorganismos que eran capaces de migrar en el RS pertenecían a los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*.

La mejor combinación productividad-especificidad se obtuvo con el RS incubado a 35°C. Si este medio no se hubiera utilizado, se habrían producido 11 falsos negativos, dicho de otro modo su incorporación a la detección de *Salmonella* incrementó el número de muestras positivas en un 36,6%. El aumento en el número de cepas detectadas fue especialmente importante en el caso de *S. enteritidis*, poniendo de manifiesto el RS 22 cepas, mientras que los otros medios sólo detectaron 9 cepas. Svastová et al. (217) también observaron un incremento de este serotipo cuando utilizaron medios semisólidos.

Algunos autores (123, 145, 240) han criticado la utilización de medios semisólidos debido al retraso en la obtención de resultados cuando éstos medios se aplicaban como un método de enriquecimiento secundario tras un enriquecimiento previo en caldo (211). En nuestro estudio el caldo de enriquecimiento se sembraba directamente en el medio semisólido en placa y la identificación podía realizarse tomando la porción más avanzada de la migración del cultivo, lo que permitía la caracterización de *Salmonella* en el mismo número de días que los otros medios en placa. Entre los inconvenientes que puede presentar el empleo del RS se pueden incluir el no ser adecuado para el aislamiento de

serotipos de *Salmonella* sensibles al verde de malaquita o que presentan una movilidad inferior a otras *Salmonella*, como *S. typhi* y *S. paratyphi* A (45, 46, 79, 90, 93) o de serotipos inmóviles. En nuestro estudio el RS no permitió el aislamiento de una *Salmonella* del grupo D en la cual no se pudo poner de manifiesto posteriormente la presencia de flagelos. La frecuencia de estas cepas inmóviles fue un factor a tener en cuenta en los siguientes estudios de medios semisólidos.

Los resultados de este apartado permiten concluir que el Rappaport semisólido, descrito originalmente para aislamiento de *Salmonella* de heces humanas, es útil para el aislamiento de dichas bacterias de productos cárnicos, presentando una mayor productividad y especificidad que otros medios en placa de uso frecuente en microbiología de los alimentos.

Evaluación de medios semisólidos con aguas de playa

En este apartado se evaluó la utilidad del empleo del RS y del Rappaport-Vassiliadis semisólido (RVS) con aguas de playa. Dichos medios se inocularon además de con los caldos de enriquecimiento, directamente del caldo de preenriquecimiento según lo sugerido por De Smedt et al. (64), aunque la inoculación se realizó mediante asa de cultivo.

De los 9 serotipos que detectamos más frecuentemente con nuestra metodología, 7 se encontraban entre los 10 más comunes aislados en España en 1986 (10). *S. enteridis* fue el serotipo más frecuentemente encontrado, con gran diferencia frente a los otros, tanto en nuestro estudio de aguas de mar como en casos humanos aislados o en forma de brotes epidémicos (10, 171). Esto da idea de que los serotipos aislados con nuestra metodología reflejan la situación que prevalece en el habitat terrestre más fielmente que lo encontrado por otros autores (113, 124).

Tras el enriquecimiento en SF o RV, los medios semisólidos presentaban una productividad similar o ligeramente superior a los medios en placa habituales (tabla 5). Comparando estos resultados con los obtenidos con productos cárnicos en el apartado anterior, la combinación SF/RS no presentaba un incremento de positivos tan claro

como las combinaciones SF/VB y SF/SB. Esto podría explicarse basándose en que la situación fisiológica de las células de *Salmonella* es mejor en los productos cárnicos que en aguas de mar donde probablemente se producen ciertos grados de lesiones o cambios fisiológicos (124, 155, 196, 200) y que a pesar de la reparación que se produce durante el preenriquecimiento, las células serían más sensibles a la combinación SF/RS. Por el contrario presentarían una menor sensibilidad a la combinación SF/RVS, que es probablemente menos tóxica al contener el RVS aproximadamente la tercera parte de verde de malaquita que el RS. Morifigo et al. (154) también encontraron al caldo selenito tóxico para el aislamiento de *Salmonella* de aguas naturales. Tras el enriquecimiento en RV, los resultados de los medios semisólidos no presentaban grandes diferencias con los medios sólidos, al igual que ocurrió con los productos cárnicos.

La novedad de este apartado fue la de evaluar la utilidad de la siembra directa de los medios semisólidos con la siembra directa del caldo de preenriquecimiento (APT). Esta metodología fue la que proporcionó un mayor aumento en el número de muestras positivas: 7 en el caso del RS y 4 en el caso del RVS (tabla 5). Este hecho apoya la mayor selectividad de los medios semisólidos, ya que cuando se realiza una siembra directa del APT en VB y SB era prácticamente imposible aislar *Salmonella* debido a las interferencias producidas por el sobrecrecimiento de la flora acompañante. La dificultad para el aislamiento de *Salmonella* por siembra directa del caldo de preenriquecimiento en medios sólidos en placa ha sido puesta de manifiesto por otros autores (39, 40, 98).

Los resultados de la tabla 5 sugieren también que la utilidad del RS, que es más selectivo que el RVS al contener mayor concentración de verde de malaquita, es mayor cuando se siembra a partir de un caldo no selectivo (APT). Por el contrario presenta un mayor rendimiento el RVS cuando se siembra a partir de caldos de enriquecimiento que han producido una selección previa (RV y SF).

Cuando se compara la utilización de los medios semisólidos con la del método convencional (tabla 6), se observa que, sea empleando sólo el RS o sólo el RVS, el número de muestras positivas era mayor que con el

método convencional. Cuando se utilizaban ambos conjuntamente se detectaban 73 muestras positivas frente a las 53 del método convencional, siendo la diferencia estadísticamente significativa. Sin duda este mayor número de muestras positivas justifica su empleo aunque la especificidad disminuya del 34,2% del método convencional al 22,2% del método semisólido. La observación de la tabla 6 también apoya el que el RVS es un medio menos selectivo que el RS, al presentar una acusada disminución de especificidad, pero una mayor productividad. En las 10 ocasiones en las que no se detectaron muestra positivas por el método semisólido y sí por el convencional el motivo no fue la presencia de serotipos inmóviles, sino que como ha sido bien establecido, ningún método disponible detecta todas las muestras que contienen *Salmonella* (39, 47, 69).

La siembra directa del caldo de preenriquecimiento proporcionó 11 cepas no detectadas ni tras enriquecimiento en SF ni RV (tabla 5), lo que sugiere que para algunas cepas dichos enriquecimientos pueden ser tóxicos. Otra ventaja adicional de la siembra directa del caldo de preenriquecimiento es que permite obtener resultados un día antes que el método convencional, de esta forma 45 muestras (54,2% del total) pudieron ser detectadas en menos tiempo.

Como conclusión de este apartado se puede asumir que los medios semisólidos RS y RVS son útiles en el aislamiento de *Salmonella* de aguas costeras, presentando una mayor productividad que los métodos convencionales. Además su siembra directa del caldo de preenriquecimiento permite aislar cepas no detectadas tras enriquecimiento y reducir en ocasiones el tiempo necesario para su detección.

Comparación entre el RS y el Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado

Con los productos cárnicos estudiados se puso de nuevo de manifiesto que la presencia de *Salmonella* era mucho más frecuente en los productos derivados del pollo que en los derivados de carne de cerdo y/o vacuno (tabla 7), lo que confirma los resultados obtenidos en otros países (58, 242). Probablemente este mayor número de muestras positivas en derivados

del pollo influye también en que el serotipo que más aislamos fuera *S. enteritidis* (31 de las 50 cepas), una bacteria que cada vez se asocia más a aves, tanto en nuestro país como en otros occidentales (72, 105, 107).

Respecto a la productividad de los medios de cultivo utilizados (tabla 8) llama la atención que ésta era mayor cuando el caldo de preenriquecimiento se sembraba directamente en los medios semisólidos que cuando los medios en placa se sembraban tras el enriquecimiento en SC y MK. Comparado con el apartado anterior en el que utilizábamos aguas de playa, la productividad de la siembra directa del APT en los medios semisólidos era mejor. Para explicar estas diferencias hay que tener en cuenta que las muestras analizadas eran de diferente naturaleza, y por tanto la flora acompañante es distinta; además en las aguas de mar las células de *Salmonella* pueden estar en un estado fisiológico distinto y presentar lesiones, como se expuso en el apartado anterior. Pero probablemente tuvo una gran influencia la metodología utilizada que presentó las siguientes diferencias: (i) la inoculación de los medios semisólidos fue con tres gotas de pipeta pasteur (0,1 ml aprox.) depositadas en la superficie de una placa petri de 90 mm de diámetro en lugar de inocular el contenido de un asa (0,0005 ml aprox.) en la superficie de una placa de 50 mm, esto permite efectuar la siembra con un inóculo mayor y por tanto mayores posibilidades de que se siembre el medio con células de *Salmonella* y (ii) los medios de enriquecimiento fueron el SC y MK con el fin de aproximarse a la metodología que utilizaron De Smedt et al. (64, 65) y poder realizar una comparación adecuada. La utilización del MK presenta el inconveniente de una gran variabilidad entre los diferentes fabricantes y diferentes lotes y además es difícil de estandarizar (24, 25, 28, 163, 236). En este estudio dio resultados próximos a los obtenidos con el SC y no mejores, lo que podría sugerir un bajo rendimiento del MK. Sin embargo esta posibilidad pudo ser descartada, ya que se obtuvieron resultados similares cuando en un número limitado de muestras se comparó el MK utilizado (Oxoid) con caldo tetracionato (Difco), produciendo ambos un

crecimiento similar en los medios en placa, tanto en lo que respecta a las bacterias contaminantes, como a las cepas de *Salmonella*.

La mayor productividad de la siembra directa del APT en el RS podría explicarse basandose en que las cepas de *Salmonella* deben de superar menos "desafíos" que cuando se realiza además un enriquecimiento. Es decir, el hecho de sembrarse en el medio de enriquecimiento líquido implica una dilución del caldo de preenriquecimiento y de nuevo las células han de crecer, esta vez en un medio selectivo y en competencia con la flora acompañante, hasta alcanzar un valor en u.f.c. adecuado para ser detectado en los medios en placa. Al disminuir el número de "desafíos" a que ha de someterse la bacteria que buscamos, las posibilidades de su aislamiento aumentan, sobre todo si disponemos de un medio selectivo adecuado para su detección entre una flora contaminante en abundancia, como es el caso del RS. En el caso del RVSM también se obtuvieron mejores resultados con la siembra directa del preenriquecimiento que con la siembra tras enriquecimiento (tabla 8).

En lo referente a la productividad global de los medios VB y SB tras su enriquecimiento en SC y MK, la del VB⁵ fue inferior a la obtenida en el apartado primero de nuestro estudio, observandose un mayor crecimiento en las placas de bacterias pertenecientes al género *Proteus*, una bacteria que posee una tetratinato reductasa y por ello puede sobrevivir en el MK (53) e interferir posteriormente en la visualización de *Salmonella* en los medios en placa. Esta mayor presencia de *Proteus* podría deberse a que las muestra se recogieron en una época no tan fría como la del apartado primero lo que influiría en la flora de los alimentos, siendo más abundante en enterobacterias termotrofas.

Respecto a la productividad global de los medios en placa (tabla 9) el RS detectó el 100% de las muestras positivas mientras que los otros medios fueron claramente inferiores, detectando como máximo el 40,3%. Estas diferencias son más acusadas que en el apartado primero y sin duda influyó en ellas el que no se utilizase el RV, lo que provocaría un peor rendimiento de los medios VB y SB.

El RVSM tuvo una productividad muy inferior al RS (tabla 9) y no se mostró como un método tan útil como se presenta en el trabajo de De Smedt et al. (64). Sin embargo si comparamos los resultados, obtenidos con las muestras naturalmente contaminadas, cuando se sembraba el RVSM directamente del APT con los medios sólidos sembrados a partir del MK, estos son similares (tablas 8 y 9) y coinciden con los obtenidos en el trabajo de dichos autores (64). Creemos que si en el trabajo original se hubiera utilizado un medio de enriquecimiento más productivo, como el RV, en lugar del MK, el RVSM no se habría mostrado eficaz. En nuestro estudio no se utilizó el RV pero sí el RS y en el apartado primero observamos que la combinación MK-RS era igual o superior a cualquier combinación RV-medio en placa.

En lo que respecta a la especificidad, el RVSM fue el mejor, sobre todo después del enriquecimiento en MK. Esta situación de alta especificidad y baja productividad del RVSM era similar a la obtenida en el caso del apartado primero cuando el RS se incubaba a alta temperatura (43°C). Este hecho y el que De Smedt et al. (64, 65) recomiendan la incubación a 42°C, nos hizo estudiar la influencia de dicha temperatura y observamos que sólo 4 de las 30 cepas probadas crecían a 42°C en el medio RVSM, mientras que todas lo hacían si la temperatura de incubación era de 35°C. Esto permite afirmar que la temperatura de 42°C es inapropiada para este medio de cultivo, ya que la posibilidad de que hubiera oscilaciones de la temperatura de la estufa y que se superase la temperatura crítica de 42°C fue descartada al realizarse la prueba también mediante la incubación de las placas envueltas en bolsas de plástico en el interior de un baño maría. Otros factores que podrían haber influido como la diferente composición del RS y RVSM se estudiarán en apartados posteriores.

Entre las conclusiones más importantes de este apartado destaca el aumento de la productividad del RS cuando se siembra directamente del caldo de preenriquecimiento y la poca utilidad del RVSM, debido al menos a que la temperatura de incubación recomendada es demasiado elevada.

Modificación del medio Rappaport semisólido

Según la descripción original, la eficacia del caldo Rappaport se basa en la acción selectiva del verde de malaquita y cloruro de magnesio en un medio bajo en pH y pobre en nutrientes (185). Dicho medio contiene como única sustancia nutritiva 5 g de triptona, destacando Rappaport la importancia de su utilización (184, 185). Por el contrario otros autores han sugerido que el empleo de otras peptonas puede ser útil (83, 231). Además la selección de *Salmonella* en los medios semisólidos es en gran parte independiente de la acción inhibidora del medio de cultivo (93, 95, 96, 217), y se basa en la mayor velocidad de migración de esta bacteria. Por ello está indicado estudiar la influencia, que en las características productivas y selectivas, tienen las diferentes cantidades y calidades de las peptonas y otros nutrientes. Apoyando esto, De Smedt et al. señalaron que el tipo de peptidos presentes en el medio son cruciales para la migración (64).

El incremento en la concentración de triptona o la sustitución de ésta por triptosa disminuyó las distancias de migración de *Salmonella* (tabla 11) al contrario de lo obtenido por De Smedt et al. (64) cuando utilizaban el RVSM como base. El empleo de combinaciones de peptonas proporcionó mejores resultados de productividad y selectividad que cuando se utilizaban los componentes individuales, como ha sido puesto de manifiesto por otros autores (63). La mejor combinación fue la de 2,67 g de triptona y la misma cantidad de proteosa peptona. Esta última se ha utilizado previamente en medios semisólidos selectivos y presenta la ventaja de que al contener cistina unida, incrementa la selectividad de los medios para *Salmonella* (220). Las ventajas que según se ha señalado (63) presenta la combinación de triptosa e hidrolizado de caseína no fueron puestas de manifiesto en nuestro estudio.

La adición a diferentes peptonas o combinaciones de éstas, de extracto de carne o de levadura con el fin de enriquecer el medio (tabla 12) reveló que este último favorecía la migración de mayores distancias en el caso de *Salmonella*, pero también favorecía la migración en el caso de las cepas no *Salmonella*. El extracto de carne y/o levadura han sido

utilizados como componentes de medios semisólidos para el aislamiento de *Salmonella* por otros autores (45, 93, 96, 217).

Para el siguiente paso en la evaluación se seleccionaron la combinación más selectiva (triptona más proteosa peptona) y la más productiva (la misma más extracto de levadura) de las tablas 11 y 12 y con ellas como base se estudiaron diferentes concentraciones de cloruro de magnesio. En la descripción original del caldo Rappaport (184, 185) se señaló que el verde brillante y el cloruro de magnesio inhibían sinérgicamente a los gramnegativos contaminantes, a la vez que éste último componente tenía efectos antitóxicos que contrarrestaban el efecto del colorante frente a *Salmonella*. Esta acción antitóxica ha sido puesta de manifiesto en otro estudio (46) que al mismo tiempo resalta la mayor utilidad de los cationes divalentes sobre los monovalentes en la inhibición de bacterias entéricas otras que *Salmonella* spp. y *Citrobacter* spp. (46). La acción inhibidora directa del cloruro de magnesio sobre bacterias tales como *E. coli* y *P. aeruginosa* no se debe a un aumento en la presión osmótica del medio, ya que concentraciones equivalentes de cloruro sódico no son inhibitoras (206). Alcaide et al. (3) utilizando muestras naturalmente contaminadas han resaltado la importancia que también tiene el anión, ya que la sustitución del cloruro de magnesio por el sulfato de magnesio reduce la selectividad. En nuestro estudio el aumento de la concentración de cloruro de magnesio incrementó en todos los casos las distancias de migración de todas las bacterias probadas (tabla 13), siendo máximas con la concentración de 21,26 g/l. En otros estudios que utilizaban medios líquidos o semisólidos se ha puesto de manifiesto que cantidades superiores pueden ser inhibidores para *Salmonella* (175) o retardar su migración (45). De Smedt et al. (64) observaron que cuando se incubaba a 42°C y se incrementaba la concentración de cloruro de magnesio de 17,8 a 23,3 g/l se obtenía una mayor distancia de migración de *Salmonella* y una inhibición de *E. cloacae* y *C. diversus*. La inhibición de las cepas de *Enterobacter* y *Citrobacter* no se produjo en nuestro estudio, pero hay que tener en cuenta que tanto las temperaturas de incubación como la composición de los medios eran diferentes, sobre todo la concentración de verde de malaquita, que era de 0,037 g/l en el medio de De Smedt et

a1. y de 0,065 en el RS. El medio que contenía extracto de levadura y 21,26 g de cloruro de magnesio fue el más productivo y el que sólo contenía 17,27 g sin extracto de levadura el más selectivo y estos fueron seleccionados para evaluar la influencia del verde de malaquita.

Los colorantes trimetilmetano tales como verde de malaquita, verde brillante o cristal violeta se han mostrado útiles para el aislamiento de *Salmonella* mediante su incorporación a medios de cultivo líquidos (53, 81, 185, 154, 232), sólidos (53, 73, 81) y semisólidos (45, 46, 215, 220). Su utilización con los medios semisólidos ha sido amplia, siendo el verde de malaquita y el verde brillante los más eficaces y más empleados. Sin embargo son inhibidores de *S. typhi*, lo que junto con la menor movilidad de esta bacteria los hacen inapropiados para su aislamiento (45, 90, 93, 94, 215). Aunque no mostrado en la tabla 14, en nuestras pruebas la inclusión de *S. typhi* entre la cepas utilizadas para valorar las modificaciones en los medios semisólidos fue descartada al no crecer ni migrar en dichos medios. Respecto a las otras cepas, se observa que conforme aumentaba la concentración de verde de malaquita en el medio aumentaba la selectividad, pero también disminuía la distancia migrada por las cepas de *Salmonella* (tabla 14). Este efecto tóxico del verde de malaquita era amortiguado en los medios que contenían extracto de levadura y concentraciones mayores de cloruro de magnesio. Estos resultados están de acuerdo con lo establecido por otros autores sobre los efectos antitóxicos del cloruro de magnesio frente al verde de malaquita (3, 184) y el verde brillante (46). La combinación más productiva fue la que contenía extracto de levadura, la máxima cantidad de cloruro de magnesio y la mínima de verde de malaquita, mientras que la más selectiva pero que a la vez no inhibía a ninguna cepa de *Salmonella* era la misma fórmula pero con la máxima concentración de verde de malaquita. Ambas fueron seleccionadas para probar a continuación el efecto de la novobiocina.

El antibiótico novobiocina se ha utilizado en los medios selectivos para *Salmonella* debido a su efecto inhibitor sobre otras enterobacterias (101, 115, 151, 154, 159, 194). La cantidad que se recomienda añadir a cada medio varía ampliamente según la composición de éste (193) e incluso según el fabricante que elabora el medio base (195), habiendose

establecido valores entre 5 y 80 mg/l para los diferentes medios selectivos líquidos o sólidos (3, 4, 20, 66, 155, 189, 193, 195). *S. typhi* tiene una mayor sensibilidad que otras salmonelas, por lo que no son útiles para su aislamiento los medios que contienen este antibiótico (66, 155, 195, 205). Cuando la novobiocina se ha adicionado a los medios semisólidos, lo ha sido a concentraciones de 20 mg/l (46, 63-65, 220), consiguiendo inhibir a algunas cepas de *Citrobacter* pero no a las de *Enterobacter* (46, 220). Nuestros resultados utilizando 10 mg/l son similares, ya que comparando la tabla 15 y 14, la incorporación del antibiótico a la fórmula más productiva hizo que no migrasen tres cepas adicionales, de las cuales sólo una pertenecía al género *Enterobacter*. Cuando la concentración fue superior a 10 mg/l algunas cepas de *Salmonella* no pudieron migrar, por lo que se consideró a ésta como la única concentración útil. El hecho de que otros autores (46, 63, 220) hayan encontrado la concentración de 20 mg/l no inhibidora podría explicarse, como se expuso anteriormente, considerando la diferente composición de los medios utilizados.

Los caldos Rappaport (184, 185) y Rappaport-Vassiliadis (11, 233) tienen un pH bajo, de 5,0-5,2 que contribuye a la selectividad del medio. Además en estudios sobre el comportamiento de *Salmonella* en medios con diferentes pHs se ha comprobado que dicha bacteria puede sobrevivir e incluso reproducirse a pHs bajos dependiendo también de la naturaleza del ácido utilizado (77, 128, 173.). De esta forma el hecho de que *Salmonella* pueda crecer a pH de 4 o 4,5 nos hizo estudiar la posibilidad del empleo de la acidez como un factor selectivo adicional. En la tabla 16 se observa que todas las cepas de *Salmonella* estudiadas podían crecer a pHs de 4, independientemente de que se emplease ácido cítrico o clorhídrico para alcanzar dicho pH. Sólo cuando estos bajos pHs se combinaban con la concentración más alta de verde de malaquita se producía inhibición de algunas cepas de *Salmonella*. Lo mismo ocurría a pH 4,5 cuando éste se combinaba con la incubación a 42°C. Respecto a la selectividad, el medio que contenía 0,096 g/l de verde de malaquita y tenía un pH de 4,5 obtenido con ácido cítrico era el más selectivo sin inhibir a ninguna cepa de *Salmonella* (RSM41). El medio más productivo

fue el denominado RSM44 y contenía 0,021 g de verde de malaquita y el pH de 4,5 se obtenía con ácido clorhídrico.

También se estudio la posibilidad de incrementar la selectividad de las formulaciones citadas con la adición de selenito sódico. En la tabla 17 se observa que dicha combinación era extremadamente tóxica tanto para las cepas de *Salmonella* como para las restantes, incluso a la concentración de 0,4 g/l. Esto confirma las observaciones que aparecen en la literatura sobre la toxicidad de la combinación del selenito con otro colorante del trimetilmetano, el verde brillante (20) y nuestros resultados obtenidos con aguas de playa en las que la combinación del enriquecimiento en caldo selenito con la siembra en RS daba resultados claramente inferiores a cuando el RS se sembraba a partir de otros caldos. Esta toxicidad también la hemos observado cuando hemos utilizado el RS para el aislamiento de *Salmonella* de heces humanas (resultados no mostrados), en ese caso era necesario diluir el caldo selenito, una vez incubado, en solución salina en proporción 1/10 antes de depositar las gotas en la superficie del medio RS, ya que en caso contrario un gran número de cepas de *Salmonella* no podían ser detectadas.

La utilización del antimicrobiano nitrofurantoina con el fin de incrementar la selectividad de los medios para el aislamiento de *Salmonella* fue propuesta por Bullock y Frodsham (37) que obtuvieron inhibición de *E. cloacae* sin inhibir a *Salmonella*. Sin embargo y paradójicamente, cuando lo adicionamos al RS y al RSM44 no produjo inhibición de ninguna de las cepas, sino por el contrario un incremento en las distancias recorridas. Cuando se añadía al RSM44 el incremento fue aún mayor en el caso de las cepas de no *Salmonella* que en las de *Salmonella*.

Comparación de las nuevas formulaciones con otros medios semisólidos

En el caso del aislamiento de *Salmonella* y como se expuso anteriormente y se encuentra ampliamente descrito en la literatura (39, 52, 53, 69, 110, 180), no hay un sólo medio que permita el crecimiento de todas cepas. Por ello es conveniente disponer de al menos dos medios,

uno muy productivo, aunque pierda algo de especificidad, y otro muy selectivo, aunque los serotipos más sensibles sean inhibidos.

Las nuevas formulaciones obtenidas en el apartado anterior se compararon con los restantes medios semisólidos que para su uso en placa se encuentran descritos en la literatura. La primera comparación se realizó con cultivos puros para así poder determinar la posible toxicidad de los medios frente a los distintos serotipos de *Salmonella* y a la vez determinar la selectividad frente a otras bacterias seleccionadas previamente por su capacidad de migrar en medios selectivos semisólidos. Los únicos que permitieron el crecimiento de todos los serotipos de *Salmonella* fueron el RS, RSM44 y RVS, siendo al mismo tiempo los menos selectivos (tabla 19). Por el contrario los otros tres medios presentaron una selectividad mucho mayor, permitiendo que sólo migraran 2 o 3 cepas no-*Salmonella*, pero a costa de inhibir a 4 cepas de *Salmonella* en el caso del SSF y RVSM y a dos en el caso del RSM41. Como se citó anteriormente, los medios semisólidos selectivos no son apropiados para el aislamiento de *S. typhi* y *S. paratyphi A*, pero además hay otros serotipos que son más sensibles a los agentes selectivos, como es el caso de *S. paratyphi B* y *S. arizona* (46, 117), lo que se ha confirmado en este estudio, ya que algunas de las cepas probadas que pertenecían a estos serotipos no migraron en los medios SSF, RVSM y RSM41. Pero además los dos primeros medios inhibieron a otros serotipos tradicionalmente considerados como más resistentes, lo que apunta a una toxicidad excesiva de los medios RVSM y SSF.

Cuando se trabajó con alimentos natural o artificialmente contaminados, todos los medios semisólidos fueron superiores al método convencional en el número total de muestras detectadas (tabla 20), hecho por otra parte previsible ya que los enriquecimientos se realizaron sobre SC y MK y no se utilizó el RV. Sin embargo el mejor comportamiento de los medios semisólidos no se producía en el caso de los alimentos de baja humedad (leche en polvo y piensos) o alimentos de alta humedad muy poco contaminados con flora acompañante, como era el caso de la leche pasteurizada. Esto se puede explicar porque en este tipo de alimentos el aislamiento de *Salmonella* no presenta grandes dificultades y los diferentes medios de cultivo dan resultados similares (5, 26, 54, 56,

52). Para evaluar adecuadamente el rendimiento de los medios es preferible utilizar alimentos con una flora contaminante elevada (5, 26, 257) y fue con este tipo de alimentos con los que mayores diferencias hubo entre el método convencional y el semisólido.

Entre los diferentes medios semisólidos, las mayores diferencias también se dieron con los alimentos de alta humedad muy contaminados, siendo los más productivos el RSM44 y el RS seguidos del RVS (tablas 20 y 21). Los menos productivos fueron el RSM41, RVSM y SSF, lo que coincide con los resultados obtenidos con los cultivos puros. Por el contrario, y salvo en el caso del RVSM, esa menor productividad no se correspondió con una mayor especificidad (tabla 21).

Respecto a la rapidez de detección de los medios semisólidos (tabla 22), el RSM44 y el RS confirmaban su rendimiento, siendo posible detectar la mayoría de las muestras en tres días. El RSM41 era más sensible que el RVS cuando se consideraban las muestras positivas en dicho periodo de tiempo. El RVSM y el SSF fueron de nuevo los menos eficaces, en especial este último que frecuentemente necesitaba dos días para la migración, confirmando lo apuntado en la descripción original (99).

En conjunto el RVSM se comportó peor que los medios RS y RSM44 a pesar de que en esta ocasión la incubación se efectuó a 35°C. El RVSM contiene menos concentración de verde de malaquita que el RS y la concentración de cloruro de magnesio es sólo ligeramente superior a la del RSM44 (ver anexo de medios de cultivo), por lo que probablemente no sean estas las causas de su toxicidad frente a cultivos puros y su bajo rendimiento con alimentos. Creemos que la explicación sea posiblemente el que contenga 20 mg/l de novobiocina, una concentración que cuando en el apartado anterior se añadía a un medio base similar, se mostraba inhibidora de algunas cepas de *Salmonella*.

El SSF fue el medio menos productivo y específico de los estudiados. Este hecho se corresponde con lo que ocurre con el caldo selenito que utiliza como base, que es menos eficaz que los caldos Rappaport y Rappaport-Vassiliadis de los que proceden los restantes medios semisólidos (143, 154, 191, 246, 258). Hine et al. (99) propusieron al

SSF para el aislamiento de *Salmonella* de heces de roedores, pero era necesario realizar la incubación durante 48 horas y las distancias de migración eran frecuentemente pequeñas, migrando algunas cepas sólo escasos mm. En nuestro estudio, aunque superior al método convencional, fue claramente inferior a los demás medios semisólidos, inhibiendo a serotipos como *S. paratyphi B*, *S. ohio* y *S. virchow*, serotipos que no fueron incluidos por Hyne et al. (99) cuando estudiaron su medio. También Stuart y Pivnick (215) trabajando con medios semisólidos vertidos en tubos en U encontraron que los medios basados en el caldo selenito eran inferiores a los que utilizaban el caldo Rappaport como base.

La modificación del RS denominada RSM44 y diseñada en el apartado anterior con el fin de obtener un medio más productivo, proporcionó resultados ligeramente superiores al RS tanto en el número total de muestras detectadas como en la rapidez de detección. La utilización conjunta de ambos medios permitió detectar el 100% de las muestras positivas, la mayoría de las cuales fueron positivas en tres días (tabla 23).

Utilización de los medios semisólidos como un método rápido de cultivo.

Como se expuso en apartados anteriores, los medios semisólidos suponen un avance en lo referente a la rapidez en el aislamiento de *Salmonella*, ya que permiten sustituir simultáneamente al medio de enriquecimiento y al medio de aislamiento en placa. Esta ventaja nos hizo pensar en la posibilidad de combinarlo con el método de filtración a través de membrana, que permite el poder realizar una concentración de la muestra, aumentando así la sensibilidad del método y reduciendo el tiempo necesario para el análisis. Las posibilidades de la utilización de los filtros de membrana en microbiología de alimentos han sido revisadas recientemente por Sharpe y Peterkin (206).

La filtración por membrana se ha utilizado en el aislamiento de *Salmonella* de alimentos con el fin de acortar el tiempo de incubación del caldo de pre-enriquecimiento (227). La técnica consistía en la filtración de 5 ml de dicho caldo tras su incubación durante sólo 6

horas, e introduciendo el filtro en un caldo líquido de enriquecimiento. Otros autores (220) los han utilizado para filtrar el caldo de enriquecimiento, depositandolos a continuación sobre un medio semisólido. En nuestro caso la filtración se realizaba a partir del caldo de pre-enriquecimiento tras 6-8 horas de incubación. Para conseguir filtrar 10 ml de este caldo, que era a la vez una suspensión del alimento, se siguieron las recomendaciones de Sharpe y Peterkin (206).

El método que proponemos está basado en que teóricamente las células de *Salmonella* podrían, durante las 6-8 horas de incubación en un caldo no selectivo, reparar sus lesiones y reproducirse hasta aumentar en, al menos, 25-125 veces su número inicial. De esta forma se pasaría de haber 1 célula en 250 a 1 en 2-10 ml, pudiendo así ser detectadas mediante la filtración de dichas cantidades. Los filtros de membrana se depositarían en medios semisólidos, se incubaría hasta el día siguiente y si había migración del cultivo, se confirmaría la presencia de *Salmonella* mediante el empleo de alguna de las técnicas rápidas de detección que existen disponibles.

El caldo de pre-enriquecimiento utilizado fue el M-broth, cuya fórmula permite un buen crecimiento de *Salmonella* y desarrollo de sus flagelos, y que fue propuesto para la técnica de enriquecimiento serológico (75, 213), siendo además utilizado posteriormente en diversas técnicas para el aislamiento y detección de *Salmonella* (61, 74, 149, 216, 221, 229).

Los dos tipos de filtros que se valoraron con cultivos puros y cápsulas de referencia (tablas 24 y 25), Millipore HC de 0,7 μ m de diámetro y S&S de 0,45, no ofrecieron diferencias importantes. Esto coincide con lo descrito por otros autores que apuntan a que ambos permiten una difusión adecuada de los componentes de los medios de cultivo, sin que la diferencia de tamaño de poro tenga efectos importantes en la filtrabilidad de la suspensión del alimento (207) y sin que el poro de 0,7 μ m afecte negativamente a la retención de enterobacterias (210). Utilizando la metodología descrita en el apartado de métodos, en la mayoría de los casos no había dificultades para filtrar

en pocos minutos 2 ml para los alimentos de alta humedad, como salchichas de pollo y 10 ml para los de baja humedad como leches en polvo y piensos.

En lo referente a la disposición del filtro en el medio semisólido, el colocarlo invertido sobre el medio, o en posición normal cubriéndolo posteriormente con una capa del mismo medio semisólido, no ofreció grandes diferencias (tablas 24 y 25), sin embargo cuando éste se disponía sobre el agar no selectivo TSBY y luego se añadía la capa del medio semisólido selectivo, aumentaba la productividad (tablas 24 y 25) pero simultáneamente disminuía excesivamente la selectividad (tabla 26), superando la cepa de *E. cloacae* Ch13 a las distancias de migración de las cepas de *Salmonella*. Por ello se seleccionó el método la disposición invertida del filtro sobre el medio semisólido, que coincidió con lo realizado por Swaminathan et al. (220).

Para la elección de los medios a utilizar en el método definitivo se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior, pero como el medio RSM41 inhibía a algunas cepas de *Salmonella*, se estudió la posibilidad de sustituirlo por el RSM44--adicionado de 10 ng/l para aumentar su selectividad y denominado RSM44n. El RSM41 fue el más selectivo frente a las cepas de *E. cloacae* escogidas por su gran resistencia (tabla 27), pero inhibía excesivamente a *S. typhimurium*, mientras que el RSM44n era menos selectivo pero también menos tóxico, por lo que se escogió para los sucesivos estudios.

El método aquí referido podía detectar entre 1 y 3 ufc de *Salmonella* cuando éstas se añadían al caldo de pre-enriquecimiento y se realizaba una incubación de 6 horas (tabla 26). Pero otra de las funciones del pre-enriquecimiento es la reparación de las lesiones que puedan presentar las células, como paso previo al inicio del crecimiento. Esta función se realizaba adecuadamente en 6 horas cuando se trataba de detectar un número escaso de células de *Salmonella* deshidratadas incluidas en las cápsulas cápsulas de referencia (tabla 25). Lo mismo ocurría cuando se trataba de células lesionadas por congelación (tabla 29), sin embargo cuando las lesiones se producían por calor, eran necesarias 8 horas para poder detectar *S. typhimurium* (tabla 28). Cuando se compararon los resultados de la detección de *Salmonella* con muestras

de alimentos (tabla 30) la incubación durante 8 horas proporcionó 50 muestras positivas frente a las 42 detectadas mediante la pre-incubación de sólo 6 horas. Por ello consideramos imprescindible la utilización de 8 horas ya que incubaciones inferiores afectan adversamente la productividad del método. El tiempo mínimo requerido para que el pre-enriquecimiento realice sus funciones sin disminuir la productividad ha sido ampliamente discutido en la literatura, algunos autores consideran insuficientes 6 horas (50, 55, 179, 233, 234,), mientras que otros han obtenido buenos resultados con incubaciones de 5-8 horas (D. A. A. Mossel, comunicación personal, 42, 112, 119, 132, 188, 216). En nuestro caso tanto los estudios experimentales como los buenos resultados obtenidos con muestras naturalmente contaminadas o artificialmente inoculadas (tabla 32) apoyan la utilidad del pre-enriquecimiento reducido a 8 horas. Probablemente este buen rendimiento haya sido favorecido por la utilización del caldo M, que estimula el crecimiento y desarrollo de los flagelos, y la posterior concentración por filtración que aumenta la sensibilidad del método. La utilización de éste pre-enriquecimiento acortado reducía en un día la duración del procedimiento analítico.

El ahorro de otro día adicional se podría conseguir mediante la aplicación de una de las técnicas rápidas de detección. Experiencias previas (resultados no incluidos) pusieron de manifiesto que la aglutinación en porta del cultivo que migraba en el medio semisólido, según lo propuesto por De Smedt et al. (63-65), no proporcionaba resultados valorables y que la disposición en el medio semisólido de un disco conteniendo antisuero polivalente frente a *Salmonella* según lo sugerido por Swaminathan et al. (220) daba resultados de difícil interpretación, debido a la poca especificidad de los sueros comerciales. Por ello se valoró la utilidad de otras técnicas rápidas de detección aplicadas a cultivos crecidos durante 6 horas en agar TSBY incubado a 42°C. Entre ellas se escogieron para su estudio el bacteriófago O:1, la técnica fluoroenzimática conocida como MUCAP y la aglutinación con látex. Esta última está compuesta por anticuerpos frente a antígenos flagelares correspondientes a las fases 1 y 2 y está diseñada para aglutinación de cultivos que previamente han migrado en

medios semisólidos (102, 103), siendo la que mejores resultados proporcionó, ofreciendo altos valores predictivos positivos y negativos (tabla 31). Otros autores también han puesto de manifiesto la alta correlación entre el diagnóstico utilizando anticuerpos unidos a partículas de látex y los métodos clásicos de confirmación de *Salmonella* (41, 139, 146). La técnica fluoroenzimática (MUCAP) se realizó sobre cultivos crecidos en forma de botón, ya que la aplicación directa sobre el medio semisólido daba resultados de difícil interpretación. En nuestro estudio se obtuvo un valor predictivo negativo de 0,93, siendo inferior el valor predictivo positivo (tabla 31), lo que coincide con lo encontrado en otros trabajos (2, 108, 165), aunque los valores obtenidos varían según el medio de cultivo de partida (2, 106). La aplicación del bacteriófago O-1 de Felix y Callow para la identificación de *Salmonella* fue propuesta por Cherry et al. (48) y aunque algunos autores han encontrado sensibles a la mayoría de las cepas de *Salmonella* (78, 250), otros han observado un alto porcentaje de cepas negativas (229) y que algunas cepas de ciertos serotipos de *Salmonella*, como *S. agona* y *S. enteritidis* no soportan la replicación del bacteriófago (102). Esto coincide con el bajo valor predictivo negativo encontrado por nosotros (tabla 31).

La eficacia del método que proponemos en comparación con el método convencional se puede observar en la tabla 32. El método F-SS, además de obtener resultados al día siguiente del inicio del análisis, era más sensible que el método convencional, que en esta ocasión incluía enriquecimiento en RV con resiembras en VB y XLD como una de las combinaciones más efectivas.

Este método puede ser útil para el diagnóstico de *Salmonella* del medio ambiente y alimentos y aunque no es apropiado para el aislamiento de *S. typhi* y *S. paratyphi A*, estas son serotipos de presencia muy infrecuente en este tipo de muestras. Tampoco es útil en la detección de cepas inmóviles de *Salmonella*, pero estas no son frecuentes, no suponiendo más del 0,1% del total de las cepas de origen clínico estudiadas en Gran Bretaña (103) y en nuestro laboratorio sobre un millar de cepas procedentes de diversos orígenes y estudiadas durante un periodo de 5 años sólo la hemos encontrado en 2 ocasiones.

CONCLUSIONES

- 1.- La utilización de los medios semisólidos inoculados directamente del caldo de pre-enriquecimiento, aumentan el rendimiento del cultivo, y pueden acortar la duración de éste.
- 2.- El método de cultivo rápido propuesto en este estudio permite reducir el tiempo de detección de *Salmonella* que es generalmente de 4-5 días, a 1 día y ofreciendo al mismo tiempo una productividad igual o mayor al método convencional.
- 3.- El medio Rappaport semisólido presenta una mayor productividad y especificidad para el aislamiento de *Salmonella*, de alimentos y aguas de mar, que otros medios en placa de uso frecuente.
- 4.- De los medios semisólidos descritos en la literatura para su utilización en placa, el Rappaport semisólido es el más eficaz.
- 5.- La modificación del Rappaport semisólido realizada en este estudio y denominada RSM44 presenta ligeras ventajas, sobre el Rappaport semisólido, en lo referente a su productividad.
- 6.- El empleo de los medios semisólidos pone de manifiesto la presencia de la mayoría de los serotipos de *Salmonella* habituales en los alimentos y medio ambiente, siendo especialmente útiles para el aislamiento de *S. enteritidis*.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrahamsson, K., G. Patterson y H. Riemann. 1968. Detection of *Salmonella* by a single-culture technique. *Appl. Microbiol.* 16: 1695-1698.
2. Aguirre, P. M., J. B. Cacho, L. Folgueira, M. López, J. García y A. C. Velasco. 1990. Rapid fluorescence method for screening *Salmonella* spp from enteric differential agars. *J. Clin. Microbiol.* 28: 148-149.
3. Alcaide, E., J. P. Martínez y E. Garay. 1984. Comparative study on *Salmonella* isolation from sewage-contaminated natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 365-371.
4. Alcaide, E., J. P. Martínez, P. Martínez - Germes y E. Garay. 1982. Improved *Salmonella* recovery from moderate to highly polluted waters. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 143-146.
5. Allen, G., F. B. Satchell, W. E. Andrews y V. R. Bruce. 1989. Abbreviated selective enrichment, post enrichment and a rapid immunodiffusion method for recovery of *Salmonella* from instant dry milk. *J Food Protect.* 52: 350-355.
5. American Public Health Association. 1985. Standar methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.
7. Andrews, W. H. 1985. A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods. *Food Technol.* 39: 77-82.
8. Andrews, W. H., P. L. Poelma y C. R. Wilson. 1981. Comparative efficieny of brilliant green, bismuth sulfite, *Salmonella-Shigella*, Hektoen enteric, and xylose lysine desoxycholate agars for the recovery of *Salmonella* from foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64: 899-928.
9. Andrews, W. H., C. R. Wilson y P. L. Poelma. 1983. Improved *Salmonella* species recovery from nonfat dry milk pre-enriched under reduced rehydration. *J. Food Sci.* 48: 1162-1165.

10. Anónimo. 1989. Estudio de las cepas de *Salmonella* recibidas en el Centro Nacional de Referencia del CNMVIS durante el año 1988. Bol. Microbiol. Semanal 29-30: 1-2
11. Anónimo. 1987. Rappaport-Vassiliadis (RV) broth. Int. J. Food Microbiol. 5: 254-255.
12. Anónimo. 1987. Testing methods for use in quality assurance of culture media. Int. J. Food Microbiol. 5: 291-296.
13. Anónimo. 1989. Rappaport (SR) medium - semisolid modification, Int. J. Food Microbiol. 9: 135-137.
14. Anónimo. 1989. Rappaport-Vassiliadis (MSRV) medium - semisolid modification. Int. J. Food Microbiol. 9: 138-140.
15. Anónimo. 1988. Conclusiones y recomendaciones de la I Reunión de Grupos de Trabajo en Microbiología de los Alimentos de los Laboratorios de Salud Pública. Alimentaria. 194: 85-86.
16. Archer, D. L. 1988. The true impact of foodborne infections. Food Technol. 42: 53-58.
17. Archer, D. L. y F. E. Young. 1988. Contemporary issues: diseases with a food vector. Clin. Microbiol. Rev. 1: 377-398.
18. Bailey, J. S., J. Y. Chiu, N. A. Cox y R. W. Johnston. 1988. Improved selective procedure for detection of salmonellae from poultry and sausage products. J. Food Prot. 51: 391-396.
19. Bailey, J. S., N. A. Cox y J. E. Thomson. 1981. Efficiency of selenite cystine and TT enrichment broths for the detection of *Salmonella*. J. Appl. Bacteriol. 51: 409-414.
20. Baleux B., J. Alibou, K. Trussellier y P. Got. 1989. Utilisation du bouillon selenite F modifié pour denombrez *Salmonella* dans les milieux aquatiques. Revue Sci. Eau. 401-408.
21. Banwart, G. J. 1968. Glassware apparatus for determining motile bacteria. 1. *Salmonella*. Poultry Sci. 47: 1209-1212.
22. Banwart, G. J. y J. C. Ayres. 1953. Effect of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. Appl. Microbiol. 1: 296-301.
23. Banwart, G. J., A. Mercuri y T. R. Ryan. 1966. Screening method for determining *Salmonella*-negative samples of dried egg. Poultry Sci. 45: 1067.

24. Beckers H. J., J. V. D. Heide, U. Fenigsen-Narucka y R. Peters. 1987. Fate of salmonellas and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. J. Appl. Bacteriol. 62: 97-104.
25. Beckers, H. J., R. Peters y P. M. Pateer. 1987. Collaborative study on the isolation of *Salmonella* from reference material using selective enrichment media, prepared from individual ingredients or commercial dehydrated products. Int. J. Food Microbiol. 4: 1-11.
26. Beckers, H. J., D. Roberts, O. Pietzsch, M. van Schothorst, P. Vassiliadis y E. H. Kampelmacher. 1987. Reference samples for checking the performance of *Salmonella* isolation methods. Int. J. Food Microbiol. 4: 51-57.
27. Beckers, H. J., D. Roberts, O. Pietzsch, M. van Schothorst, P. Vassiliadis y E. H. Kampelmacher. 1987. Replacement of Muller-Kauffmann's tetrathionate brilliant green bile broth by Rappaport-Vassiliadis' magnesium chloride malachite green broth in the standard method for the detection of salmonellae. Int. J. Food Microbiol. 4: 59-64.
28. Beckers, H. J., F. M. van Leusden y R. Peters. 1986. Comparison of Muller-Kauffmann's tetrathionate broth and modified Rappaport's medium for isolation of salmonella. J. Food Safety. 8: 1-9.
29. Berchieri Jr. A., K. Irino, A. C. Paulillo, S. N. Neme, S. A. Fernandes, S. N. Kronka y G. V. A. Pessôa. 1986. Pré-enriquecimento e enriquecimento direto na pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne. Pesq. Vet. Bras. 6: 93-97.
30. Berchieri Jr. A., K. Irino, A. C. Paulillo, S. N. Neme, S. A. Fernandes, S. N. Kronka y G. V. A. Pessôa. 1986. Eficácia dos caldos selenito-novobiocina e tetracionato-novobiocina na pesquisa de *Salmonella* em farinha de carne. Pesq. Vet. Bras. 6: 133-136.
31. Bergdoll, M. S. 1979. Staphylococcal intoxications. En: H. Riemann y F. L. Bryan (eds.) Food-borne infections and intoxications, Academic Press, Londres pp. 443-494.

32. Beumer, R. R., C. J. M. Silvis y E. H. Kampelmacher. 1986. Quantitative aspects of salmonella isolation. Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin (West). 426-430.
33. Botas, J., L. Tavares, H. Feliciano, M. M. Doroana, A. Graca, C. Carvalho, F. Antunes y F. C. Araujo. 1986. Typhoid fever in Portugal - An epidemiological clinical and laboratorial analysis. Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin (West). 1155-1159
34. Bryan, F. L. 1979. Epidemiology of food-borne diseases. En: H. Riemann y F. L. Bryan (eds.) Food-borne infections and intoxications, Academic Press, Londres pp. 3-69.
35. Bryan, F. L. 1986. New approaches in the control of foodborne diseases. Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections and intoxications, Berlin (West). 70-81.
36. Bryan, F. L., M. J. Fanelli, y H. Riemann. 1979. *Salmonella* infections. En: H. Riemann and F. L. Bryan (eds.) Food-borne infections and intoxications, Academic Press, Londres pp. 74-130.
37. Bullock, R. D. y D. Frodsham. 1989. Rapid impedance detection of salmonellas in confectionary using modified LICMR broth. J. Appl. Bacteriol. 66: 385-391.
38. Carlson, V. L., G. H. Saoyenbos, B. A. McKie, y C. F. Smyser. 1967. A comparison of incubation time and temperature for the isolation of *Salmonella*. Avian Dis. 11: 217-225.
39. Catsaras, M. y C. Sery. 1981. *Salmonella* et milieu d'enrichissement, d'isolement. A propos de 173 souches isolées de 2225 prélèvements d'abattoirs et de boucheries. Sci. Alim. 1: 477-488.
40. Catsaras, M., R. Seynave y C. Sery. 1972. *Salmonella* dans les boucheries, I: Considerations techniques. Bull. Acad. Vét. France, 45: 379-382.
41. Clark, C. A. A. G. Candlish y W. Steell. 1989. Detection of *Salmonella* in foods using a novel coloured latex test. Food Agr. Immunol. 1: 3-9.

42. Clark, C. W. y Z. J. Ordal. 1969. Thermal injury and recovery of *Salmonella typhimurium* and its effect on enumeration procedures. *Appl. Microbiol.* 18: 332-336.
43. Cook, G. T. 1952. Comparison of two modifications of bismuth sulfite agar for the isolation and growth of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*. *J. Pathol. Bacteriol.* 64: 559-566.
44. Cox, N. A. 1988. *Salmonella* methodology update. *Poultry Sci.* 67: 921-927.
45. Chau, P. Y. y C. T. Huang. 1974. A one day selective migration procedure for detecting salmonellae in faeces. *J. Clin. Pathol.* 27: 405-407.
46. Chau, P. Y. y C. T. Huang. 1976. A simple procedure for screening of salmonellae using a semi-solid enrichment and a semi-solid indicator medium. *J. Appl. Bacteriol.* 41: 283-294.
47. Cheng, C. M., W. C. Boyle y J. A. Goepfert. 1971. Rapid quantitative method for *Salmonella* detection in polluted waters, *Appl. Environ. Microbiol.* 21: 662-667.
48. Cherry, W. B., B. R. Davis, P. R. Edwards y R. B. Hogan. 1954. A simple procedure for the identification of the genus *Salmonella* by means of a specific bacteriophage. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 51-55.
49. D'Aoust, J. Y. 1977. Effect of storage conditions on the performance of bismuth sulfite agar. *J. Clin. Microbiol.* 5: 122-124.
50. D'Aoust, J. Y. 1981. Update on pre-enrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* 44: 369-374.
51. D'Aoust, J. Y. 1984. *Salmonella* detection in foods: Present status and research needs for the future. *J. Food Prot.* 47: 78-81.
52. D'Aoust, J. Y. 1984. Effective enrichment-plating conditions for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* 47: 588-590.
53. D'Aoust, J. Y. 1989. *Salmonella*. en: M. P. Doyle (ed.) *Foodborne bacterial pathogens*, Marcel Dekker Inc. Nueva York, pp 326-445.

54. D'Aoust, J. Y., H. J. Beckers, M. Boothroyd, A. Mates, C. R. McKee, A. B. Moran, P. Sado, G. E. Spain, W. H. Sperber, P. Vaesiliadis, D. E. Wagner y C. Wiberg. 1983. ICMSF methos studies. XIV. Comparative study on recovery of *Salmonella* from refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. J. Food. Prot. 46: 391- 399.
55. D'Aoust, J. Y. y C. Maishment. 1979. Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients. J. Food Prot. 42: 153-157.
56. D'Aoust, J. Y., C. Maishment, D. M. Burgener, D. R. Conley, A. Loit, M. Milling y U. Purvis. 1980. Detection of *Salmonella* in refrigerated preenrichment and enrichment broth cultures. J. Food Prot. 43: 343-345.
57. D'Aoust, J. Y., C. Maishment, P. Stotland y A. Boville. 1982, Surfactants for the effective recovery of *Salmonella* in fatty foods. J. Food Prot. 45: 249-252.
58. D'Aoust, J. Y., U. T. Purvis, R. M. Coulter y K. Weiss. 1985. *Salmonella* in pork liver and chicken liver in Canada: a 1979-80 survey. Can. Ins. Food Sci. Technol. J. 18: 323-325.
59. D'Aoust, J. Y. y A. M. Sewell. 1986. Slow rehydratation for detection of *Salmonella* spp. in feeds and feed ingredients. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1220-1223.
60. D'Aoust, J. Y. y A. M. Sewell. 1984. Efficacy of an international method for detection of *Salmonella* in chocolate and cocoa products. J. Food Prot. 47: 111-113.
61. D'Aoust, J. Y. y A. M. Sewell. 1988. Detection of *Salmonella* with the Bioenzabed enzyme immunoassay technique. J. Food Prot. 51: 538-541.
62. D'Aoust, J. Y., A. Sewell y A. Boville. 1983. Rapid cultural methods for detection of *Salmonella* in feeds and feed ingredients. J. Food Prot. 46: 851-855.
63. De Smedt, J. M., R. F. Bolderdijk and H. F. Rappold. 1986. Rapid *Salmonella* detection from foods by motility enrichment: a simple, cheap and reliable method. p. 422-425. Proc. 2nd World Congress on Foodborne Infections and Intoxications , Berlin.

64. De Smedt, J. M., R. F. Bolderdijk, H. F. Rappold, y D. Lautenschlaeger. 1986. Rapid *Salmonella* detection in foods by motility enrichment on a modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. *J. Food Prot.* 49: 510-514.
65. De Smedt, J. M. y F. Bolderdijk. 1987. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium. *J. Food Prot.* 50: 658-661.
66. Devenish, J. A., B. W. Ciebin y M. H. Brodsky. 1986. Novobiocin-brilliant green-glucose agar: New medium for isolation of salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 539-545.
67. Difco Laboratories. 1953. Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures, 9th ed., Difco Laboratories, Detroit.
68. Doyle, M. P. 1989. Foodborne bacterial pathogens. Marcel Dekker Inc, Nueva York, 796 pp.
69. Dutka, B. J. y J. B. Bell. 1973. Isolation of salmonellae from moderately polluted waters. *J. Water Poll. Control Fed.* 45: 316-324.
70. Edel, W. y E. H. Kampelmacher. 1973. Comparative studies on isolation methods of 'sublethally injured' salmonellae in nine European laboratories. *Bull. World Health Org.* 48: 167-174.
71. Edgar, D. y M. S. Soar. 1979. Evaluation of culture media for the isolation of salmonellas from sewage and sludge. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 237-241.
72. Editorial. 1988. *Salmonella enteritidis* phage type 4: chicken and egg. *Lancet* 2: 720-722.
73. Edwards, P. R. y M. M. Galton. 1967. Salmonellosis. *Adv. Vet. Sci.* 11: 1-63.
74. Emswiller-Rose, B., W. D. Gehle, R. W. Johnston, A. Okrend, A. Moran y B. Bennett. An enzyme immunoassay technique for the detection of *Salmonellae* in meat and poultry products. *J. Food Sci.* 49: 1018-1020.
75. Fantasia, L. D., W. H. Sperber y R. H. Deibel. 1969. Comparison of two procedures for detection of *Salmonella* in food, feed and pharmaceutical products. *Appl. Microbiol.* 17: 540-541.

76. Ewing, E. H. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4th edition. Elsevier Science Publishing Co., New York.
77. Ferreira, M. A. y B. M. Lund. 1987. The influence of pH and temperature on initiation of growth of *Salmonella* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 5: 67-70.
78. Fey, H., E. Birgi, A. Margadant y E. Boller. 1978. An economic and rapid diagnostic procedure for the detection of *Salmonella*, *Shigella* using the polyvalent phege O-1. *Z. Bakteriolog. Hyg. I Abt. Orig. A.* 240: 7-15.
79. Fricker, C. R. 1984. A comparison of isolation procedures for salmonellas from polluted water using two forms of Rappaport's medium. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 305-309.
80. Fricker, C. R. 1984. A note on salmonella excretion in the black headed gull (*Larus ribibundus*) feeding at sewage treatment works. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 499-502.
81. Fricker, C. R. 1987. The isolation of salmonellas and campylobacters. *J. Appl. Bacteriol.* 63: 99-116.
82. Fricker, C. R. y R. W. A. Girdwood. 1984. The effect of the use of different selective media on the ability to isolate salmonellae from seagull faeces. *J. Hyg.* 93: 35-42.
83. Fricker, C. R. y R. W. A. Girdwood. 1985. A note on the isolation of salmonellas from environmental samples using three formulations of Rappaport's broth. *J. Appl. Bacteriol.* 58: 343-346.
84. Fricker, C. R., E. Quail, L. McGibbon y R. W. A. Girdwood. 1985. An evaluation of commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis medium for the isolation of salmonellae from poultry. *J. Hyg.* 95: 337-344.
85. Fung, D. Y. C. y A. A. Kraft. 1970. A rapid and simple method for the detection of *Salmonella* from mixed cultures and poultry products. *Poultry Sci.* 49: 46-54.
86. Gabis, D. A. y J. H. Sikiller. 1974. ICMSF methods studies. VI. The influence of selective enrichment media and incubation temperatures on the detection of *Salmonella* in dried foods and feeds. *Can. J. Microbiol.* 20: 1509-1511.

87. Galton, M. M., W. D. Lowery y A. V. Hardy. 1954. *Salmonella* in fresh and smoked pork sausage. J. Infect. Dis. 95: 232-235.
88. Gilbert, R. J. 1979. *Bacillus cereus* gastroenteritis En: H. Riemann y F. L. Bryan (eds,) Food-borne infections and intoxications, Academic Press, Londres pp. 495-518.
89. Goo, V. Y. L., G. Q. L. Ching y J. M. Gooch. 1973. Comparison of brilliant green agar and Hektoen enteric agar media in the isolation of salmonellae from food products. Appl. Microbiol. 26: 288-292.
90. Goossens, H., G. Wauters, M. De Boeck, M. Janssens and J. P. Butzler. 1984. Semisolid selective-motility enrichment medium for isolation of salmonellae from fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 19: 940-941.
91. Grimes, D. J., F. L. Singleton, J. Stemmler, L. M. Palmer, P. Brayton and R. R. Colwell. 1984. Microbiological effects of wastewater effluent discharge into coastal waters of Puerto Rico. Water Res. 18: 613-619.
92. Grunnet, K. y B. B. Nielsen. *Salmonella* types isolated from the gulf of Aarhus compared with types from infected human beings, animals, and feed products in Denmark. Appl. Microbiol. 18: 985-990.
93. Harper, J. 1968. Semi-solid agar as a selective medium for salmonella. J. Pathol. Bacteriol. 95: 550-554.
94. Harper, J. y K. F. Shortridge. 1969. A selective motility medium for routine isolation of *Salmonella*. J. Hyg. 67: 181-186.
95. Harvey, R. W. S., D. E. Mahabir y T. H. Price. 1966. A method of secondary enrichment for salmonellas independent of selectively toxic chemicals. J. Hyg. 64 : 361-366.
96. Harvey, R. W. S. y T. H. Price. 1967. The isolation of salmonellas from animal feeding stuffs. J. Hyg. 65: 237-244
97. Harvey, R. W. S. y T. H. Price. 1979. Principles of *Salmonella* isolation. J. Appl. Bacteriol. 46: 27-56.
98. Harvey, R. W. S. y T. H. Price. 1982. Influence of multiple plating from fluid media on *Salmonella* isolation from animal feeding stuffs. J. Hyg. 88: 113-119.

99. Hine, E. A. S., E. K. Steffen y J. E. Wagner. 1988. New semisolid agar for the detection of motile salmonellae. *J. Clin. Microbiol.* 26: 875-878.
100. Hirsh, D. C. y L. D. Martin. 1983. Detection of *Salmonella* spp. in milk by using Felix O-1 bacteriophage and high pressure liquid chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1243-1245.
101. Hoben, D. A., D. H. Ashton y A. C. Peterson. 1973. A rapid presumptive procedure for the detection of *Salmonella* in foods and food ingredients. *Appl. Microbiol.* 25: 123-129.
102. Holbrook, R., J. M. Anderson, A. C. Baird-Parker, L. M. Dodds D. Sawhney, S. H. Stuchbury y D. Swaine. 1989. Rapid detection of salmonella in foods - a convenient two day procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 139-142.
103. Holbrook, R., J. M. Anderson, A. C. Baird-Parker y S. H. Stuchbury. 1989. Comparative evaluation of the Oxoid Salmonella Rapid Test with three other rapid salmonella methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 161-164.
104. Hubert, B. 1988. Mise au point sur l'épidémie d'infections à *Salmonella enteritidis*. *Bull. Epidémiol. Hebdomadaire* 38: 151.
105. Hubert, B., E. Malliot, B. Quenum y C. Massenot. 1989. Les infections à *Salmonella enteritidis*. *Bull. Epidémiol. Hebdomadaire.* 16: 66-67.
106. Humbert, F., G. Salvat, P. Colin, C. Labellec y G. Bennejeau. 1989. Rapid identification of *Salmonella* from poultry meat products by using 'Mucap test'. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 79-83.
107. Humprey, T. J., G. C. Mead y B. Robe. 1988. Poultry meats as a source of human salmonellosis in England and Wales. *Epidemiol. Inf.* 100: 175-184.
108. Hussong, D., N. K. Enkiri y W. D. Burge. 1984. Modified agar medium for detecting environmental salmonellae by the most-probable-number method. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1026-1030.
109. Hynes, M. 1942. The isolation of intestinal pathogens by selective media. *J. Pathol. Bacteriol.* 54: 193-207.
110. Ibrahim, G. F. y G. H. Fleet. 1985. Detection of salmonellae using accelerated methods. *Int. J. Food Microbiol.* 2: 259-272.

111. ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications in foods. 1978. Microorganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd ed. University of Toronto Press, Toronto.
112. Insalata, N. F., C. W. Mahnke y W. G. Dunlop. 1972. Rapid direct fluorescent-antibody method for the detection of salmonellae in foods and feeds. Appl. Environ. Microbiol. 24: 645-649.
113. Isern, A. M., M. D. Ferrer y F. Fernández. 1987. Estudio de la *Salmonella* en el agua de mar de las playas de la ciudad de Barcelona. Gac. Sanit. 3: 118-122.
114. Jacquain, E. y G. Daras. 1987. Recherche de la presence de salmonella dans les aliments en poudre. Bel. J. Food Chem. Biotechnol. 42: 75-77.
115. Jeffries, L. 1959. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of salmonella from faeces. J. Clin. Pathol. 12: 568-571.
116. Jiménez, L., I. Mufiz, G. A. Toranzos y T. C. Hazen. 1989. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in tropical waters. J. Appl. Bacteriol. 67: 61-69.
117. Jones, P. W., P. Collins y A. J. Hayle. 1984. The effect of sodium sulphacetamide and sodium mandelate in brilliant green agar on the growth of salmonellas. J. Appl. Bacteriol. 57: 423-428.
118. Juven, B. J., W. A. Cox, J. S. Bailey, J. E. Thomson, O. W. Charles y J. V. Shutze. 1984. Recovery of *Salmonella* from artificially contaminated poultry feeds in non-selective and selective broth media, J. Food Prot. 47: 299-302.
119. Kafel, S. y F. L. Bryan. 1977. Effects of enrichment media and incubation conditions on isolating salmonellae from ground-meat filtrate. Appl. Environ. Microbiol. 34: 285-291.
120. Kafel, S. y E. Pogorzelska. 1987. Improvement of *Salmonella* recovery from frozen ground meat by transfer of small volumes of pre-enriched samples. Int. J. Food Microbiol. 5: 81-85.
121. Kafel, S y E. Pogorzelska. 1987. Transfer volume-dependent recovery of *Salmonella* from minced meat. J. Food Prot. 50: 584-586. 1987.

122. Kalapothaki, V., P. Vassiliadis, CH Mavrommati y D. Trichopoulos. 1983. Comparison of Rappaport-Vassiliadis enrichment medium and tetrathionate brilliant green broth for isolation of salmonellae from meat products. J. Food Prot. 46: 618-621.
123. Kalapothaki, V., P. Vassiliadis, E. Xirouchaki, D. Trichopoulos, CH. Mavrommati y CH. Série. 1980. Etude comparée du pré-enrichissement des ganglions mésentériques de porcs d'abattoir et enrichissement sur gélose molle sélective et sur milieu de Rappaport modifié, dans l'isolement des salmonelles. Arch. Inst. Pasteur Hellénique 26 : 29-40.
124. Kaper, J. B., G. S. Sayler, M. M. Baldini y R. R. Colwell. 1977. Ambient temperature primary nonselective enrichment for isolation of *Salmonella* spp. from an estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. 33: 829-835.
125. Kauffmann, F. 1930. Ein kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus und Paratyphusbazillen. Zbl. Bakt. Par. Infect. I. Abt. Orig. 119: 148-152.
126. Kauffmann, F. 1935. Weitere Erfahrungen mit dem kombinierten Anreicherungsverfahren für *Salmonella* bazillen. Zeitschrift Hyg. Infect. 117: 26-32.
127. King, S. y W. I. Metzger. 1968. A new plating medium for the isolation of enteric pathogens. I. Hektoen enteric agar. Appl. Microbiol. 16: 577-578.
128. Kintner, T. C. y M. Manges. 1953. Survival of staphylococci and salmonellae experimentally inoculated into salad dressing prepared with dried eggs. Food. Res. 18: 6-10. 1953.
129. Kristensen, M., V. Lester y A. Jurgens. 1925. Use of trypsinized casein, brom-thymol-blue, brom-cresol-purple, phenol-red and brilliant-green for bacteriological nutrient media. Brit. J. Exp. Pathol. 6: 291-299.
130. Krogh, F. 1989. The role of mycotoxins in disease of animals and man. J. Appl. Bacteriol. 67: 99S-104S (suppl.)
131. Langeland, G. 1982. *Salmonella* spp. in the working environment of sewage treatment plants in Oslo, Norway. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1111-1115.

132. La Roche, R. N., V. Desai, B. Friedman y B. Swaminathan. 1981. Field evaluation of the membrane filter-disc immunoinmobilization technique in the detection of salmonellae in egg products. *Poultry Sci.* 60: 2265-2269.
133. Leifson, E. 1935. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J. Pathol. Bacteriol.* 40: 581-599.
134. Leifson, E. 1936. New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (*Salmonella*) bacilli. *Am. J. Hyg.* 24: 423-432.
135. Le Minor, L. y M. Y. Popoff. 1987. Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. no., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst. Bacteriol* 37: 465-468.
136. Le Minor, L. 1984. Genus III *Salmonella*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1.* N. R. Krieg y J. G. Holt (Eds.). Williams & Wilkins, Baltimore. 427-458.
137. Le Minor, L. 1988. Typing of *Salmonella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 214-218.
138. Le Minor, L. 1988. Comment designer les serotypes de *Salmonella*?. *Med. Mal. Infect.* 18: 859-862.
139. Lim, P. L. e Y. P. Fok. 1987. Detection of group D salmonellae in blood culture broth and of soluble antigen by the agglutination using an O-9 monoclonal antibody latex conjugate. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1165-1168. 1987.
140. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J. Hyg.* 5: 333-379.
141. McCoy, J. H. 1962. The isolation of salmonellae. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 213-224.
142. McPherson, K. A. y C. A. Needham. 1987. Method evaluation and test selection. En: *Diagnostic procedures for bacterial infection.* 7th ed. Wentworth, B. B. (Ed.), American Public Health Association, Washington, D.C.

143. Mavrommati, Ch., V. Kalapothaki, D. Trichopoulos, P. Vassiliadis, y Ch. Série. 1984. Recovery of *Salmonella* from refrigerated preenrichment and refrigerated enrichment media. *Int. J. Food Microbiol.* 1: 5-11.
144. Mavrommati, Ch., J. A. Papadakis, D. Trichopoulos, P. Vassiliadis, E. Xirouchaki y Ch. Série. 1980. Isolement de salmonelles a partir de saucisses de porcs, par enrichissement en milieu au tétrathinate de Muller-Kauffmann et enrichissement secondaire en milieu de Rappaport-Vassiliadis (Milieu RV). *Arch. Inst. Pasteur Hellénique.* 26: 21-28.
145. Mavrommati, Ch., E. Xirouchaki, P. Vassiliadis, D. Trichopoulos y Ch. Série. 1981. Isolement de salmonelles à partir de carcasses de poulets par enrichissement sur milieu de Rappaport-Vassiliadis. *Rec. Méd. Vétérin.* 157: 659-665.
146. Metzler, J e I. Nachamkin. 1988. Evaluation of a latex agglutination test for the detection of *Salmonella* and *Shigella* spp. by using broth enrichment. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2501-2504.
147. Miller, M. L. y J. A. Koburger. 1984. Evaluation of direct enrichment at elevated temperature for recovery of salmonellae from oysters. *J. Food Prot.* 47: 267-269.
148. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1987. Programa de prevención y control de salmonelosis. Madrid.
149. Minnich, S. A., P. A. Haztman y R. C. Heimsch. 1982. Enzyme immuniassay for detection of salmonellae in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 877-883.
150. Mirelis, B., M. Portús, N. Rabella, R. Pericas, V. Ausina, P. Coll y G. Prats. 1986. Estudio clínico de las gastroenteritis en un hospital universitario de Barcelona durante 1983. *Enf. Infec. Microbiol. Clín.* 4: 106-112.
151. Moats, W. A. 1978. Comparison of four agar plating media with and without added novobiocin for isolation of salmonellae from beef and deboned poultry meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 747-751.
152. Monzón Moreno, C., Z. González-Lama y R. H. López-Orge. 1986. *Salmonella* en aguas residuales: comparación de tres métodos de aislamiento. *Rev Esp. Microbiol. Clín* 1: 299-302.

153. Montford, J. y F. S. Tatcher. 1961. Comparison of four methods of isolating salmonellae from foods and elaboration of a preferred procedure. *J. Food Sci.* 26: 510-517
154. Morifigo, M. A., J. J. Borrego y P. Romero. 1986. Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 169-176.
155. Morifigo, M. A., E. Martínez-Manzanares, A. Muñoz, R. Cornax, P. Romero y J. J. Borrego. 1989. Evaluation of different plating media used in the isolation of salmonellas from environmental samples. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 353-360.
156. Mossel, D. A. A. 1988. Persistencia de la morbilidad de las toxoinfecciones alimentarias: Un reto para la industria y la ciencia. En: J. Sáenz de Buruaga, L. González de Galdeano y J. J. Gandarias (Edit.) *Problemas de la nutrición en las sociedades desarrolladas.* Salvat (Barcelona), pp: 211-227.
157. Mossel, D. A. A. y B. Moreno. 1985. *Microbiología de los alimentos.* Editorial Acribia, Zaragoza
158. Mossel, D. A. A., F. van Rossem, M. Koopmans, M. Hendriks, M. Verouden e I. Eelderink. 1980. Quality control of solid culture media: A comparison of the classic and the so-called ecometric technique. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 439-454.
159. Mossel, D. A. A., T. M. G. Bonants-van Laarhoven., A. M. Th. Ligtemberg-Merkus y M. E. B. Werdler. 1983. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: An attempt of standardisation at the international level. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 313-317.
160. Muller, L. 1923. Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du bacille typhique et des paratyphique. *Compt. Rend. Séances Soc. Biol. Filiales.* 89: 434-437.
161. North, W. R. 1960. Use of crystal violet or brilliant green dyes for the determination of salmonellae in dried food products. *J. Bacteriol.* 80: 861.
162. North, W. R. y M. T. Bartran. 1953. The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* 1: 130-134.

163. Northolt, M. D., J. Stadhouders and W. van Asseldonk. 1985. Comparison of Rappaport-Vassiliadis medium and Müller-Kauffmann medium for the detection of salmonellae in caseinate and milk powder. *Netherl. Milk Dairy J.* 39: 49-55.
164. Osborne, W. W. y J. L. Stokes. 1955. A modified selenite brilliant green medium for the isolation of *Salmonella* from egg products. *Appl. Microbiol.* 3: 295-299.
165. Ottaviani, F. 1988. Esperienze su una tecnica fluoro-enzimatica per la screening rapida di salmonella. *Ind. Alim.* 27: 974-975, 979.
166. Parker, W. F. y B. J. Mee. 1982. Survival of *Salmonella adelaide* and fecal coliforms in coarse sands of the swan coastal plain, western Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 981-986.
167. Papadakis, J. y M. A. Efstratiou. 1980. Isolation of salmonellae from vegetables with the use of Rappaport-Vassiliadis magnesium chloride-malachite green enrichment medium. *Hippocrates.* 5: 1-5.
168. Papadakis, J., D. Trichopoulos, E. Pateraki, N. Papaiconomou y P. Vassiliadis. 1972. Inhibition du *Proteus* sur la gelose au vert brilliant sulfadiazine-desoxycholate, utilisée dans l'isolement de *Salmonella*. *Arch. Inst. Pasteur Hellenique.* 18: 31-39.
169. Patil, M. D. y N. M. Parhad. 1986. Growth of salmonellas in different enrichment media. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 19-24.
170. Peel, B. 1976. Occurrence of salmonellas in raw and pasteurized liquid whole egg. *Queen J. Agric. Animal Sci.* 33 : 13-21.
171. Perales, I. y A. Audicana. 1988. *Salmonella enteritidis* and eggs. *Lancet*, 2: 1133.
172. Perales I. y A. Audicana. 1989. The role of hens' eggs in outbreaks of salmonellosis in North of Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 175-180.
173. Perales, I. y M. I. García. 1990. The influence of pH and temperature on the behaviour of *Salmonella enteritidis* phage type 4 in home made mayonnaise. *Lett. Appl. Microbiol.* 10: 19-22.

174. Perales, I. J. Mufiz, C. Zigorraga, M. Dorronsoro, F. Martín y M. A. García-Calabuig. 1989 Toxi-infecciones alimentarias en la Comunidad Autónoma Vasca: 1984-1986. *Enf. Inf. Microbiol. Clín.* 7: 525-529.
175. Pérez, J., O. Tello, M. Mata y J. Fuente. 1986. Foodborne infections and intoxications- Outbreaks evolution in Spain: 1976-1984. Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin (West). 104-109.
176. Peterz, M., C. Wiberg y P. Norberg. 1989. The effects of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of salmonella in home-made and in commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 523-528.
177. Pietzsch, O. 1984. Methods of the detection of *Salmonella* - Standardization and harmonization of the procedure. Proceedings International Symposium on Salmonella. New Orleans. 7-13.
178. Pietzsch, O y G. Kempf. 1984. Salmonellen in Futtermittlen. *Zbl. Vet. Med. B.* 31: 343-347.
179. Pietzsh, O., F. J. Kretschmer y E. Bulling. 1975. Vergleichsuntresuchungen über Salmonella-Anreicherungsverfahren. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 232: 232-246.
180. Poelma, P. L., W. H. Andrews y J. H. Sikiller. 1984. *Salmonella*. En: M. L. Speck (ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2nd ed. American Public Health Association, Washington, D. C. 286-326.
181. Poelma, P. L., W. H. Andrews y C. R. Wilson. 1984. Recovery of *Salmonella* species from nonfat dry milk rehydrated under rapid and reduced pre-enrichment conditions: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 807-810.
182. Poelma, P. L., C. R. Wilson y W. A. Andrews. 1986. Influence of sample reconstitution on recovery of *Salmonella* species from low-moisture dairy foods. *J. Food Prot.* 49: 121-125.
183. Quail, E., L. McGibbon y C. R. Fricker. 1986. A study of the relative efficiencies of three commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis media. *J. Hyg.* 96: 425-429.

184. Rappaport, F y N. Konforti. 1959. Selective enrichment medium for paratyphoid bacteria. Inhibitory and growth promoting factors. *Appl. Microbiol.* 7: 63-66.
185. Rappaport, F., N. Konforti y B. Navon. 1956. A new enrichment medium for certain salmonellae. *J. Clin. Pathol.* 9: 261-266.
186. Rappold, H y R. F. Bolderdijk. 1979. Modified lysine iron agar for isolation of *Salmonella* from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 162-163.
187. Rappold, H., R. F. Bolderdijk and J. M. De Smedt. 1984. Rapid cultural method to detect *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* 47: 46-48.
188. Ray, B., J. J. Jezeski y F. F. Busta. 1972. Isolation of salmonellae from naturally contaminated dried milk products III. Influence of pre-enrichment conditions. *J. Milk Food Technol.* 35: 607-614.
189. Reamer, R. H., R. E. Hargrove y F. E. McDonough. 1974. A selective plating agar for direct enumeration of *Salmonella* in artificially contaminated dairy products. *J. Milk Food Technol.* 37: 441-444.
190. Reilly, W. J. 1981. Human and animal salmonellosis in Scotland associated with environmental contamination 1973-79. *Vet. Rec.* 108: 553-555.
191. Reina, J., F. Salvá, J. Gil y P. Alomar. 1988. Estudio epidemiológico de la gastroenteritis aguda en Palma de Mallorca durante el periodo 1983-1986. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* 3: 123-127.
192. Rengel, A. y S. Mendoza. 1984. Isolation of *Salmonella* from raw chicken in Venezuela. *J. Food Prot.* 47: 213-216.
193. Restaino, L., G. S. Grauman, W. A. McCall y W. M. Hill. 1977. Effects of varying concentration of novobiocin incorporated into two *Salmonella* plating media on the recovery of four *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 585-589.
194. Restaino, L. y K. K. Komatsu. 1982. Determination of the effectiveness of novobiocin incorporated into two agar plating media for the isolation of *Salmonella* from various fresh meat products. *J. Food Safety* 3: 183-193.

195. Restaino, L., K. K. Komatsu y M. J. Syracuse. 1982. A note on novoviocin in XLD and HE agars: the optimum levels required in two commercial sources of media to improve isolation of salmonellas. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 285-288.
196. Rhodes, M. W. y H. Kator. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2902-2907.
197. Rhodes, P. y L. B. Quesnel. 1986. Comparison of Muller-Kauffmann tetrathionate broth with Rappaport-Vassiliadis (RV) medium for the isolation of salmonellas from sewage sludge. *J. Appl. Bacteriol.* 60: 161-167.
198. Rhodes, P., L. B. Quesnel y P. Collard. 1985. Growth kinetics of mixed culture in salmonella enrichment media. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 231-237.
199. Roszak, D. B., D. J. Grimes y R. R. Colwell. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30: 334-338.
200. Sakaguchi, G. 1979. Botulism. En: H. Riemann y F. L. Bryan (eds.) Food-borne infections and intoxications, Academic Press, Londres, pp. 389-442
201. Saylor, G. S., J. D. Nelson Jr. A. Justice and R. R. Colwell. 1976. Incidence of *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum* and *Vibrio parahaemolyticus* in an Estuary, *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 723-730.
202. Schoebitz, R. y L. Montes. 1984. Indicadores de presencia bacteriológica y presencia de *Salmonella* en aguas del río Valdivia (Chile). *Arch. Med. Vet.* 16: 83-92.
203. Scholl, D. R., C. Kaufmann, J. D. Jollick, C. K. York, G. R. Goodrum y P. Charache. 1990. Clinical application of novel sample processing technology for the identification of salmonellae by using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* 28: 237-241.
204. Sesma, B., M. J. Alvarez, P. Aranendia, B. Gofí, N. de Pablo y P. Gofí. 1987. Aislamiento extraintestinal de *Salmonella* en gallinas: estudio epidemiológico de dos brotes de salmonelosis por consumo de huevo crudo. *Microbiol. Sem* 3: 209-212.

205. Shanson, D. C. 1974. A new selective medium for the isolation of salmonellae other than *Salmonella typhi*. J. Med. Microbiol. 8: 357-364.
206. Sharpe, A. N. y P. I. Peterkin. 1988. Membrane filter food microbiology, Research Studies Press Ltd, Letchworth, Inglaterra. 323pp.
207. Sharpe, A. N., P. I. Peterkin e I. Dudas. 1979. Membrane filtration of food suspensions. Appl. Environ. Microbiol. 37: 21-35.
208. Siliker, J. H. y D. A. Gabis. 1974. ICMSF methods studies. V. The influence of selective enrichment media and incubation temperatures on the detection in raw frozen meats. Can J. Microbiol. 20: 813-816.
209. Skovgaard, N. 1986. Developments and trends in food hygiene. Risk and benefit. Final Congress Document, 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications. Berlin (West), 32-38.
210. Sladek, K. J., R. V. Suslavich, B. I. Sohn y F. W. Dawson. 1975. Optimum membrane structures for growth of coliform and fecal coliform organisms. Appl. Microbiol. 30: 685-691.
211. Smeltzer, T. L. y F. Duncalfe. 1979. Secondary selective enrichment of *Salmonella* from naturally contaminated specimens by using a selective motility system. Appl. Environ. Microbiol. 37: 725-728.
212. Snyder, J. D. y M. H. Merson. 1982. The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. Bull WHO, 60: 605-613.
213. Sperber, W. H. y R. H. Deibel. 1969. Accelerated procedure for *Salmonella* detection in dried foods and feeds involving only broth cultures and serological reactions. Appl. Microbiol. 17: 533-539.
214. St Louis, M. E., D. L. Morse, M. E. Potter, T. M. DeMelfi, J. J. Guzewich, R. V. Tauxe y P. A. Blake. 1988. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New implications for the control of salmonellosis J. Am. Med. Assoc. 259: 2103-2107.
215. Stuart, P. F. y H. Pivnic. 1965. Isolation of salmonellae by selective motility systems, Appl. Microbiol. 13: 365-372.

216. Surdy, T. E. y S. O. Haas. 1981. Modified enrichment-serology procedure for detection of salmonellae in soy products. Appl. Environ. Microbiol. 42: 704-707.
217. Svastová, A., B. Skalka y J. Smola. 1984. A modified medium for *Salmonella*-isolation by the selective motility test. Zbl. Veter. Med. (Serie B) 31: 396-399
218. Sveum, W. H. y P. A. Hartman. 1977. Timed-release capsule method for the detection of salmonellae in foods and feeds. Appl. Environ. Microbiol. 33: 630-634.
219. Sveum, W. H. y A. A. Kraft. 1981. Recovery of salmonellae from foods using a combined enrichment technique. J. Food Sci. 46: 94-99.
220. Swaminathan, B., J. M. Denner y J. C. Ayres. 1978. Rapid detection of salmonellae by membrane filter-disc immunoinmobilization technique. J. Food Sci. 43: 1444-1447.
221. Swaminathan, B. y J. C. Ayres. 1980. A direct immunoassay method for the detection of salmonellae in foods. J. Food Sci. 45: 352-361.
222. Taylor, W. I. 1965. Isolation of shigellae. I. Xylose lysine agars; new media for isolation of enteric pathogens. Am. J. Clin. Pathol. 44: 471-475.
223. Thomason, B. M., D. J. Dodd y W. B. Cherry. 1977. Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. Appl. Environ. Microbiol. 34: 270-273.
224. Todd, E. C. D. 1987. Impact of spoilage and foodborne diseases on national and international economies. Int. J. Food Microbiol. 4: 83-100.
225. Todd, E. C. D. 1989. Preliminary estimates of cost of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis. J. Food Prot. 52: 586-594.
226. Todd, E. C. D. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. J. Food Prot. 52: 595-601.
227. Truscott, R. B. y A. M. Lammerding. 1987. Millipore filtration and use of RV medium for isolation of *Salmonella* from preenrichment broths. J. Food Protect. 50: 815-819.

228. van Netten, P., H. van der Zee y D. A. A. Mossel. 1984. A note on catalase enhanced recovery of acid injured cells of Gram-negative bacteria and its consequences for the assessment of the lethality of L-lactic acid decontamination of raw meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 169-173.
229. van Poucke, L. S. G. 1990. *Salmonella*-TEK, a rapid screenig method for *Salmonella* species in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 924-927.
230. van Schothorst, M., R. J. Gilbert, R. W. S. Harvey, O. Pietzsch y E. H. Kampelmacher. 1978. Ccparative studies on the isolation of *Salmonella* from minced meat. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B* 167: 138-145.
231. van Schothorst, M. y A. M. Renaud. 1983. Dynamics of *Salmonella* isolation with modified Rappaport's medium (R10). *J. Appl. Bacteriol.* 54: 209-215.
232. van Schothorst, M. y A. M. Renaud. 1985. Malachite green pre-enrichment medium for improved salmonella isolation from heavily contaminated samples. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 223-230.
233. van Schothorst, M., F. M. van Leusden. 1972. Studies on the isolation of injured salmonellae from foods. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt Orig. A.* 221: 19-29.
234. van Schothorst, M. y F. M. van Leusden. 1975. Futher studies on the isolation of injured salmonellae from foods. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* 230: 186-191.
235. van Schothorst, M., F. M. van Leusden, 1975. Comparison of several methods for the isolation of salmonellae from egg products. *Can. J. Microbiol.* 21: 1041-1045.
236. van Schothorst, M., F. M. van Leusden, A. C. Ghosh, M. P. M. Hofstee, T. H. Price, I. Simon, R. J. Gilbert, R. W. S. Harvey, G. Pietzsch, y E. H. Kampelmacher. 1980. Laboratory induced variation in a standardized salmonella isolation method. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 171: 224-230.
237. van Schothorst, M., F. M. van Leusden, E. de Gier, V. F. M. Rijnierse, y A. J. D. Veen. 1979. Influence of reconstitution on isolation of *Salmonella* from dried milk. *J. Food Prot.* 42: 936-937.

238. Vassiliadis, P. 1983. The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas: An overview. J. Appl. Bacteriol. 54: 69-76
239. Vassiliadis, P. V. Kalapothaki, Ch. Mavrommati y D. Trichopoulos. 1984. A comparison of the original Rappaport medium (R medium) and the Rappaport-Vassiliadis medium (RV medium) in the isolation of salmonellae from meat products. J. Hyg. 93: 51-58.
240. Vassiliadis, P., V. Kalapothaki, D. Trichopoulos, Ch. Mavrommati y Ch. Sérié. 1981. Improved isolation of salmonellae from naturally contaminated meat products by using Rappaport-Vassiliadis enrichment broth. Appl. Environ. Microbiol. 42: 615-618.
241. Vassiliadis, P., Ch Mavrommati, M. Efstratiou y G. Chronas. 1985. A note on the stability of Rappaport-Vassiliadis enrichment medium. J. Appl. Bacteriol. 59: 143-145.
242. Vassiliadis, P., Ch. Mavrommati, V. Kalapothaki, G. Chronas y M. Efstratiou. 1985. Salmonella isolation with Rappaport-Vassiliadis enrichment medium seeded with different sized inocula of pre-enrichment cultures of meat products and sewage polluted water. J. Hyg. 95: 139-147.
243. Vassiliadis, P., E. Pateraki, N. Papaiconomou, J. A. Papadakis y D. Trichopoulos. 1976. Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 127 B, 195-200.
244. Vassiliadis, P., D. Trichopoulos, A. Kalandidi y E. Xirouchaki. 1978. Isolation of salmonellae from sewage with a new procedure of enrichment. J. Appl. Bacteriol. 44: 233-239.
245. Vassiliadis, P., D. Trichopoulos, J. Papadakis, V. Kalapotaki y Ch Sérié. 1979. Brilliant green deoxycholate agar as an improved selective medium for the isolation of *Salmonella*. Ann. Soc. Belbe Med. Trop. 59, 117-120.
246. Vassiliadis, P., D. Trichopoulos, G. Papoutrakis y E. Pallandiou. 1979. A note on the comparison of two modifications of Rappaport's medium with selenite broth in the isolation of salmonellas. J. Appl. Bacteriol. 46: 567-569.

247. Wakker, A. P. 1981. A note on the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a modification of brilliant green agar for improved salmonella isolation. J. Appl. Bacteriol. 51: 405-408.
248. Watson, D. C. 1985. A note on the use of Rappaport-Vassiliadis medium (R10/RV) for the isolation of salmonellas from sewage and sewage sluges. J. Appl. Bacteriol. 59: 205-206.
249. Watson, D. C. y A. P. Walker. 1978. A modification of brilliant green agar for improved isolation of *Salmonella*. J. Appl. Bacteriol. 45: 195-204.
250. Welkos, S., M. Schreiber y H. Baer. 1974. Identification of *Salmonella* with the O-1 bacteriophage. Appl. Microbiol. 28: 618-622.
251. WHO. 1978. WHO Chronicle. 32: 472-474.
252. WHO. 1984. Technical report Series No. 705. The role of food safety in health and development. Report of a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Safety.
253. Williams, J. E. 1981. Salmonellas in poultry feeds-A worldwide review. World's Poultry Sci. J. 37: 6-25
254. Williams, B. M., D. V. Richards, D. P. Stephens y T. Griffith. 1977. The transmission of *Salmonella livingstone* to cattle by the herring gull (*Larus argentatus*). Vet. Rec. 100: 45.
255. Wilson, C. R., W. A. Andrews, P. L. Poelma y D. E. Wagner. 1985. Recovery of *Salmonella* species from dried foods rehydrated by the soak method. J. Food Prot. 48: 505-508.
256. Wilson, W. J. y E. M. McV. Blair. 1927. Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of *B. typhosus* and *B. proteus*. J. Hyg. 26: 371-391.
257. Wilson, C. R., W. H. Andrews, P. L. Poelma y V. R. Bruce. 1988. Recovery of *Salmonella* from fluid milk. J. Food. Prot. 51: 409-411.
258. Yde, M. y G. Ghysels. 1984. Performance of several enrichment medium in the isolation of salmonellae from liquid egg products. J. Food Prot. 47: 217-219.