

22861-I

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA.
FACULTAD DE CC. BIOLÓGICAS.
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.



* 5 3 0 9 8 4 6 5 6 2 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-346231-1

TOMO I

PREVALENCIA DE MICROORGANISMOS DEL GÉNERO
Salmonella EN HARINAS DE SOJA (*Glicine max* L.)

Lucas Domínguez.
DIRECTOR DE LA TESIS.



Rosa Amejeiras Rodríguez.

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR, 1998.

a maría.

a pablo, cristina y marina.

Agradecimientos:

A mi familia, en especial a Manuel y Milagros, mis padres, por su infinita comprensión y cariño.

Gracias a:

Susana por su apoyo incondicional.

Lydia, mi otra "hermana".

Rafael Campos, maestro y amigo.

Pilar Pérez Sedeño, compañera, jefe y sobre todo amiga.

Alicia Nájera por su paciencia estadística y su sincera amistad.

Jorge Serrano, por su ayuda cromatográfica.

Milagros, Ana, Ascensión, Inmaculada y a todos los compañeros de laboratorio y de TROUW NUTRITION que de una forma u otra han ayudado en la realización de esta tesis doctoral.

Josefina Rodríguez de Lecea.

J. F. Garayzabal, M.A. Moreno y al Dto. de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM, y muy especialmente a Lucas Domínguez, director de esta tesis, por su dosis continua de optimismo y sus inyecciones de moral.

INDICE GENERAL.

TOMO I

Abreviaturas utilizadas	A
Capítulo 1. Introducción	3
1.1.- Salmonella	3
1.2 Historia de la soja (Glicine Max L.)	16
1.3.- Factores nutricionales del haba de soja	17
1.4. - Procesado del haba de soja.....	19
1.5.- Importancia de la soja en la nutrición animal.	22
1.6.- Presencia de Salmonella en animales.....	25
1.7.- Legislación actual en piensos.....	25
1.8.- Legislación actual en alimentos.....	30
Capitulo 2. Objeto e interés general.....	34
Capítulo 3. Puesta a punto de metodología. Aislamiento e identificación.....	39
3.1.- Plan de trabajo. Antecedentes.. ..	39
3.2.- Materiales y muestras utilizadas.....	40
3.3.- Métodos de análisis utilizados.....	40
3.4.- Análisis estadístico	48
3.5.- Resultados y discusión.....	48
3.6.- Conclusiones globales.....	56
Capítulo 4 Cálculo del límite de detección y cuantificación.	57
4.1.-. Antecedentes. Plan de trabajo.	58
4.2.- Material y método.	58
4.3.- Resultados y discusión.....	60
4.4.- Conclusiones globales.....	61
Capítulo 5. Supervivencia de <i>Salmonella</i> en harinas de soja sometidas a distintas temperaturas de almacenamiento	63
5.1.-. Antecedentes. Plan de trabajo.	64
5.2.- Material y método.	64

5.4.- Conclusiones globales	74
Capítulo 6. Supervivencia de Salmonella en alimentos sometidas a distintas temperaturas de almacenamiento.....	75
6.1.- Antecedentes. Plan de trabajo.....	76
6.2.- Material y método.....	77
6.3.- Resultados y discusión.....	79
6.4.- Conclusiones globales.....	87
Capítulo 7.- Búsqueda de inhibidores en la harina de soja	89
7.1.- Antecedentes. Plan de trabajo	90
7.2.- Material y método. Presencia de residuos químicos.....	91
7.3.- Material necesario para la realización del test de inhibidores.....	94
7.4.- Resultados y discusión	96
7.5. - Conclusiones globales	97
Capítulo 8 Prevalencia de Salmonella en harina de soja.....	98
8.1. - Antecedentes. Plan de trabajo	99
8.2. - Material y método.....	99
8.3. - Resultados y discusión	101
8.4. - Conclusiones globales	109
Anexo del capítulo 8	110
Capítulo 9 Conclusiones generales	150
Anexo I Medios de cultivo y reactivos.....	153
Anexo III Fotografías	166
Bibliografía	170

TOMO II

Anexo II

- ◆ Legislación española, ordenadas por fechas de BOE (color amarillo)
- ◆ Legislación de la Comunidad Económica Europea (color verde)

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

μl	Microlitro. (10 ⁻⁶ l).
1X	Dilución 1:10.
AOAC	Association of official analytical chemists.
BGA	Agar Verde Brillante.
BOE	Boletín Oficial del Estado.
CESFAC	Confederación española de fabricante de alimentos compuestos para animales.
DNA	Acido Desoxirribonucleico.
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay.
FDA	Food and Drug Administration.
g	Gramo.
GN	Caldo de Gram Negativos.
HDNA	Hibridación por sondas de DNA.
HSST	Harina de Soja Sin Tratar.
HST	Harina de Soja Tratada.
ISO	International organization for standardization.
Kg/h	Kilogramo/hora.
l	Litro.
MB	Caldo M.
°C	Grados centígrados.
OM	Orden Ministerial.
ONPG	Actividad β-galactosidasa.
PCA	Agar de recuento.
PSBG	Preenriquecimiento con Selenito Verde Brillante.
R.D.	Real Decreto.
RV	Rappaport Vassiliadis.
<i>S.</i>	<i>Salmonella.</i>
SBG	Selenito Verde Brillante.
SC	Caldo Selenito Cistina.
SS	Agar Salmonella Shigella.
Tm/h	Tonelada/hora.
TT	Caldo Tetracionato.
ufc	Unidades formadoras de colonias.
v/v	Volumen a volumen.
WHO	Organización mundial de la salud.
XLD	Agar Xilosa Lisina Dextrosa.

CAPITULO 1.

INTRODUCCIÓN.

1.- Introducción.....	3
1.1.- <i>Salmonella</i>	3
1.1.1.- Características bioquímicas del género <i>Salmonella</i>	3
1.1.2. Clasificación antigénica	5
1.1.3.- División en serovares.....	5
1.1.4.- Subdivisión en serovares.....	6
1.1.5. Patogenia.....	6
1.1.6. Epidemiología	12
1.1.7. Tratamiento.....	15
1.2.- Historia de la soja (Glicine Max L.).....	16
1.3.- Factores nutricionales del haba de soja	17
1.4. - Procesado del haba de soja.....	19
1.4.1.-Tratamientos en caliente por vía seca:	19
1.4.1.1.- Tostado.	19
1.4.1.2.- Extrusión seca.	20
1.4.1.3.- Tratamiento con rayos infrarrojos y micronización.....	20
1.4.2.- Tratamientos por vía húmeda:.....	20
1.4.2.1.- Cocción.....	20
1.4.2.2.- Tostado húmedo.....	21
1.4.2.3.- Extrusión húmeda.....	21
1.4.2.4.- Expansión húmeda.....	21
1.5.- Importancia de la soja en la nutrición animal.....	22
1.5.1.- Avicultura.....	23
1.5.2.- Porcino:	23
1.5.3.- Vacas de leche de alta producción.....	24
1.5.4.- Cunicultura	24
1.6.- Presencia de <i>Salmonella</i> en animales.	25
1.7.- Legislación actual en piensos.	25
1.7.1.- Legislación Marco.....	26
1.7.2.- Aditivos.....	26

1.7.3.- Sustancias y productos indeseables	27
1.7.3.1.- Modificación del Anexo.....	28
1.7.4.- Sanidad animal	28
1.7.5.- Toma de muestras.	29
1.7.6.- Métodos oficiales de análisis.	30
1.8.- Legislación actual en alimentos.....	30
1.8.1.- Productos cárnicos y derivados	30
1.8.2.- Cereales	31
1.8.3.- Huevos.....	31
1.8.4.- Leche y productos lácteos.....	31
1.8.5.- Pastelería	32
1.8.6.- Pescados y mariscos.....	32
1.8.7.- Salsas , condimentos y especias	33
1.8.8.- Varios.....	33
Fig. 1.1 Vías de difusión de enteropatógenos.....	14

1.- Introducción.

1.1. Salmonella.

1.1.1. Características del género Salmonella

Este género, perteneciente a la tribu Salmonellae en la familia Enterobacteriaceae, fue denominado así en honor al veterinario americano D. E. Salmon. Agrupa bacterias patógenas, tanto del hombre como de los animales, produciendo gastroenteritis de distinta gravedad, y fiebres entéricas ó tifoideas - paratifoideas.

Está representado por bacilos gramnegativos, no esporulados, anaerobios facultativos, móviles por flagelos peritricos (salvo *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, que son inmóviles). Una de sus características bioquímicas más importantes es su imposibilidad para acidificar la lactosa, por lo cual han sido designados como "enterobacterias lactosa negativa". Existe un bajo porcentaje (0,3-0,8% según los autores) de cepas que son lactosa positivas como *S. arizonae*, que además poseen actividad β -galactosidasa (prueba ONPG). Las necesidades nutricionales de estos microorganismos son escasas y por esto crecen fácilmente en medios de cultivo comunes, aunque con frecuencia se necesitan medios altamente selectivos para aislarlos con mayor facilidad a partir de muestras polimicrobianas de distintos orígenes, como alimentos, heces, muestras clínicas, etc.

La mayor parte de las cepas de Salmonella son productoras de gas a partir de glucosa, salvo Salmonella Typhi que nunca lo produce. Forman sulfuro de hidrógeno, excepto *S. Paratyphi-A* y utilizan el citrato como única fuente de carbono. Las reacciones de descarboxilación de lisina y ornitina son negativas en *S. Paratyphi - A*, mientras que *S. Typhi* es ornitina positiva. No fermentan la sacarosa, salicina, inositol y amigdalina. Tampoco hidrolizan la urea.

El % G + C de su DNA es de 50-53 (Hill, H. 1966).

Actualmente el género Salmonella está subdividido en dos especies denominadas como *S. choleraesuis*, ésta está a su vez dividida en 6 subespecies designadas como I, II, IIIa, IIIb IV y V, y *S. bongori*. (Hernández Haba, J. y Dubón Pérez, F., 1992)
La nomenclatura del género Salmonella es bastante compleja y actualmente no

definida perfectamente. A medida que son descritos nuevos serovares, es habitual atribuirles impropriamente el nombre de especie (habitualmente del lugar o animal del cual han sido aislados), por ello son conocidos 2.267 serovares y casi otros tantos nombres de especies de *Salmonella*. Esta proliferación justificó la propuesta de Burman, Stuart y Wheeler (1948) de considerar sólo 3 especies en el género *Salmonella*: *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Typhosa* y *Salmonella Kauffmannii*, la última de las cuales parece destinada a comprender todos los serotipos conocidos. Sucesivamente, Kauffmann y Edwards (1952) propusieron la unificación de una sola especie comprendiendo todos los serotipos: *Salmonella enterica*. En 1970 Le Minor y otros propusieron que los subgéneros I, II, III, IV de las subdivisiones bioquímicas de Kauffmann fueran reclasificadas respectivamente como *Salmonella Kauffmannii*, *Salmonella Salamae*, *Salmonella Arizonae* y *Salmonella Houtenae*, cada una de cuyas especies era posteriormente subdividida en serotipos. Anteriormente también Ewing (1966), había propuesto tres especies: *Salmonella Typhi*, *Salmonella Choleraesuis* y *Salmonella Enteritidis*; las dos primeras especies constituían un serotipo único, mientras que *Salmonella Enteritidis* comprende los cerca de 2300 serotipos considerados especies anteriormente. A cada uno de éstos serotipos se les designó con el nombre de la especie *Salmonella Enteritidis*, seguido de la indicación abreviada "variedad" (pe. *Salmonella Enteritidis* var *Typhimurium*) o bien con el nombre de la especie *Salmonella Enteritidis* seguida por la indicación "serotipo" (pe. *Salmonella Enteritidis* serotipo *Paratyphi - A*). La propuesta taxonómica de Ewing hace pensar, a primera vista, que una clasificación constituida por cerca de 2.300 serotipos diferentes de una misma especie, puede ser fuente de confusión. El dato práctico, sin embargo, dice que este serotipo se reduce notablemente, ya que el 95-98% de las cepas de *Salmonella Enteritidis* que producen enfermedades en el hombre pertenecen a un número de serotipos restringidos (aproximadamente 40). En el manual de Bergey se aceptaba a *Salmonella Choleraesuis* como la única especie del género, pero Le Minor y Popoff (1987), propusieron designar a *Salmonella enterica* como la especie típica y única del género *Salmonella*. Esta propuesta no ha sido aceptada por la comisión judicial, por lo que actualmente se sigue utilizando la clasificación de 2 especies y 6 subespecies.

1.1.2. Clasificación antigénica

Salmonella es el único género cuyas serovariedades tienen rango de especie.

La estructura antigénica de las *Salmonella* se estudia tratando todas las cepas aisladas con anticuerpos específicos, mediante reacciones de aglutinación. *Salmonella* posee antígenos somáticos, flagelares y, algunos serovares, presentan un antígeno capsular denominado antígeno Vi.

El antígeno somático (O) es de naturaleza lipopolisacárida termoestable, localizado en la pared celular, que está asociado con la endotoxina y permite la división de *Salmonella* en grupos.

El antígeno flagelar (H), es termolábil de naturaleza proteica, y permite la división de las especies en monofásicas (siempre poseen el mismo antígeno flagelar) o difásicas (fase 1 y fase 2).

El antígeno Vi solamente lo poseen algunos serovares como *Salmonella* Typhi, Paratyphi - C y Dublín. Es un antígeno capsular, termolábil y responsable junto al antígeno O de la virulencia. (Hernández Haba, J. y Dubón Pérez, F., 1992)

1.1.3. División en serovares.

Para describir las numerosísimas *Salmonella* existentes ha sido elaborada una fórmula antigénica consistente en tres partes, que describen, por orden, el antígeno somático O, el antígeno flagelar H de la fase 1 y el antígeno flagelar H de la fase 2; estas tres partes son separadas mediante un par de puntos (:) y el componente de cada parte mediante coma(,). La notación adoptada para designar los diversos antígenos utiliza una combinación de letras y números árabes (por ejemplo *S. Typhimurium* se representa como 1, 4, 5, 12 : g, m: -) la descripción particularizada de esta notación se omite ya que es bastante elaborada y también porque no es de utilidad práctica para el clínico, teniendo valor sólo con fines taxonómicos y epidemiológicos. Esta clasificación, denominada de Kauffmann-White (Kauffmann y White, 1966; 1978), no pretende describir la estructura antigénica completa de cada *Salmonella*, que es mucho más compleja de lo que sugiere la fórmula antigénica; a fin de lograr la diferenciación del serotipo el esquema se ha simplificado registrando sólo los antígenos mayores o los más importantes. Se han creado 50 grupos; cada uno de ellos comprende numerosos serotipos de *Salmonella*, y todos ellos están caracterizados por la presencia de los principales antígenos O presentes en cada uno

de los serotipos de los que forman parte.

1.1.4. Subdivisión en biovares.

Los biovares se diferencian por el patrón de azúcares de cepas con el mismo serovar. Está determinado por la ausencia o presencia de enzimas. Estos biovares pueden utilizarse como marcadores y son de interés epidemiológico (p.e. la xilosa⁺ y la xilosa⁻ características de S. Typhi).

Los fagovares se determinan por la sensibilidad de los cultivos a una serie de bacteriófagos en diluciones apropiadas. La tipificación de los fagos de S. Typhi y otras Salmonella con antígeno Vi (S. Hirschfeldii y rara vez S. Dublín) está basada en una adaptación de los fagos Vi - II de Czaigie y Yen (1938). Para S. Schottmuelleri se utilizan los de Felix y Callow (1943) y para S. Typhimurium los de Anderson (1964). Análogos métodos están propuestos para otros serovares de Salmonella.

Otra subdivisión puede realizarse basándonos en la producción, o sensibilidad a bacteriocinas o su resistencia frente a antibióticos.

1.1.5. Patogenia.

Las infecciones de Salmonella son denominadas genéricamente salmonelosis, y diferenciadas en "principales" causadas por Salmonella Typhi, Salmonella Paratyphi - A, Salmonella Schottmuelleri, S. Hirschfeldii (anteriormente Paratyphi C) y "secundarias" (causadas por otros serotipos de Salmonella Enteritidis). Las salmonelosis "principales" son producidas por Salmonella de procedencia humana, capaces, sobre todo Salmonella Typhi, de dar formas septicémicas (fiebre entérica) y gastroenteritis aguda; las salmonelosis "menores" están producidas por Salmonella de origen animal pero capaces de infectar también al hombre, en el cual provocan, siendo menos invasivas, casi exclusivamente formas gastroentéricas que raramente derivan en septicemia. En general, las salmonelosis principales determinan una notable producción de anticuerpos revelado mediante la reacción de aglutinación de Widal; por el contrario, las salmonelosis secundarias producen un número de anticuerpos escaso o nulo.

Las Salmonella alcanzan el intestino delgado por vía oral. La dosis infectante mínima se sitúa alrededor de 10^5 - 10^6 bacterias, aunque en personas con aclorhidria o que han tomado recientemente antibióticos la infección puede producirse con 10^3 .

Blase, M. J y Newman, L. S (1982) estimaron que el número de Salmonella en alimentos causantes de brotes de gastroenteritis oscila entre los siguientes valores:

Chocolate	1×10^2 - 2.5×10^2 ufc/g
Queso cheddar	1×10^2 - 5×10^2 ufc/g
Queso de bola	1.5×10^3 ufc/g
Polvo de pancreatina	4.4×10^1 - 2×10^2 ufc/g

Las salmonelosis pueden expresarse en 3 formas diferentes:

- A) fiebre entérica, diferenciada en fiebre tifoidea (o ileotifus o tifus abdominal) y fiebre paratifoidea (o paratifus); la primera producida clásicamente por Salmonella typhi; la segunda, por Salmonella Choleraesuis ser. Paratyphi-A, ser. Schottmuelleri y ser. Hirschfeldii. A veces considerada principalmente una infección intestinal, la fiebre tifoidea es, de hecho, una septicemia, particularmente del sistema linfático, mientras que la eventual sintomatología gastrointestinal aparece sólo tardíamente en el curso de la enfermedad; la diarrea, casi siempre ausente o de entidad leve en las fiebres tifoideas está presente en el 20-60% de los pacientes con fiebre paratifoidea.

Salmonella coloniza la mucosa del intestino delgado y en el curso de las primeras 24 horas se encuentra en la lámina propia y en la submucosa, donde son rápidamente fagocitadas por los macrófagos, no se producen graves lesiones y no se producen diarreas. La patogenicidad de la Salmonella parece depender principalmente de su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en el interior de los fagocitos, los cuales, posteriormente, pueden ser destruidos con la consiguiente liberación de los bacilos. De la submucosa del intestino delgado la bacteria pasa, a través de los vasos linfáticos, a los ganglios mesentéricos y de ahí, después de un período de multiplicación alcanza el torrente sanguíneo y llega al hígado, bazo, riñón, y medula ósea. Después de multiplicarse en estos órganos, sobre todo en el bazo, las Salmonella pasan nuevamente a la sangre, causando una segunda y más importante bacteriemia por su mayor número, y ésta coincide con la elevación de temperatura y con otros síntomas clínicos. Por vía biliar los bacilos regresan

nuevamente al intestino, en cuyos tejidos linfoides (placas de Peyer y nódulos linfáticos aislados) se produce una reacción inflamatoria y una infiltración de los linfocitos y de células histiocitarias, seguidas de necrosis, descamación y formación de las características úlceras tifoides. La enfermedad puede verse complicada por hemorragias intestinales de diverso grado y con menos frecuencia por perforaciones intestinales en correspondencia con las placas de Peyer necrosadas. El agente etiológico puede ser aislado también en la sangre entre los primeros 7 - 10 días de la infección en el 90-100 % de los casos. Durante y después de la segunda semana, en el curso de la segunda localización intestinal, Salmonella puede ser aislada cada vez con mayor frecuencia de las heces, mientras decrece la positividad del hemocultivo, que se reduce a cerca del 30% en la tercera semana; por otra parte, durante su localización renal, Salmonella puede determinar una bacteriemia más o menos intensa y ser aislada de la orina en un 25% de los casos.

Cerca de un tercio de los individuos afectados eliminan los bacilos del tifus a las 3 semanas de la aparición de la enfermedad y cerca de 10% durante un período de 8-10 semanas: éstos constituyen los portadores convalecientes; pero un pequeño porcentaje de individuos (1-2%) continúan eliminando Salmonella durante 6 meses o más, en algunos casos durante un par de años o, en ocasiones, durante toda la vida. Habitualmente, el estado de portador fecal se debe a la persistencia de la infección en la vesícula biliar o, más raramente, en el hígado. Los portadores urinarios, son mucho menos comunes que los portadores fecales. Se ha encontrado además, sin poder ser bien explicado, que las mujeres son portadoras con mayor frecuencia que los hombres. En cualquier caso, la excreción del bacilo no es siempre continua, sino, al contrario, muy frecuentemente intermitente, por lo cual es necesario efectuar el examen seriado de varios cultivos para evidenciar el estado de portador.

No se conocen con precisión los factores moleculares de patogenicidad de Salmonella y la capacidad invasiva de estos serotipos. Durante mucho tiempo se ha creído que los síntomas generales de la enfermedad eran imputables a la actividad de la endotoxina liberada seguidamente a la bacteriolisis intravascular. En estudios más recientes se ha vuelto a poner de manifiesto su papel en la patogénesis. La fiebre, por ejemplo, se atribuye a una interacción de la endotoxina con los leucocitos. La endotoxina estimularía la producción de un pirógeno de origen endógeno, que, a su vez, actuaría sobre el sistema nervioso directamente o a través de la liberación de prostaglandina. Esto es similar en los procesos febriles

producidos por otros agentes infecciosos. Otro factor a tener en cuenta es la presencia del antígeno capsular Vi, presente en los *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y *S. Dublín*, mientras que *S. Paratyphi - B* carece de él y otras bacterias no patógenas, como *Citrobacter freundii*, lo poseen.

Los anticuerpos producidos en la infección natural son protectores, pero probablemente la inmunidad celular también juega un papel importante en la defensa de esta enfermedad, ya que la bacteria en la fase preinmune se multiplica activamente en los macrófagos.

Durante la fiebre tifoidea o paratifoidea pueden producirse una gran variedad de complicaciones en los aparatos digestivo (hemorragias, perforaciones intestinales, peritonitis, colecistitis), cardiovascular (miocarditis, flebitis), respiratorio (úlceras de laringe, pulmonía, broncopulmonía, pleuresía), sistema nervioso (encefalitis, meningitis), urinario (cistitis, cistopielitis, pielonefritis, glomerulonefritis) y esqueleto (osteitis, periostitis, osteomielitis) (Vandepitte, 1953; Loverde, 1980). La colecistitis y las osteomielitis pueden manifestarse también después de algunos años de la enfermedad tifoidea y ello indica que el bacilo es capaz de permanecer presente en varios tejidos durante años sin perder su virulencia.

B) gastroenteritis, producida por muchas variedades o serotipos de *Salmonella enteritidis*. Los síntomas, aunque varían, están por lo general, constituidos por cefaleas, escalofríos y dolores abdominales que preceden a la aparición de náuseas, vómitos, diarrea y estados febriles. Los bacilos invaden la lámina propia y las placas de Peyer en el intestino delgado, por lo cual es posible aislarlos de las heces, pero el aislamiento puede efectuarse también de vómitos y de alimentos contaminados; estos últimos pueden estar todavía disponibles, dado que el período de incubación es bastante breve (aproximadamente 12 horas). El mecanismo de la secreción de los líquidos responsables de la diarrea se lleva a cabo por la producción de una toxina, no bien caracterizada, que podría actuar como la toxina colérica, estimulando la producción de AMP cíclico.

Existen numerosos genes involucrados en la patogenicidad de *Salmonella*, como los *inv* y *bil* relacionados con la invasión de los enterocitos. Las cepas gastroentéricas poseen un plásmido cuya pérdida disminuye su virulencia y un lipopolisacárido que desempeña un papel patogénico al mediar la resistencia a la acción lítica del complemento.

C) Infecciones extraintestinales que, si bien son raras, pueden implicar prácticamente todos los órganos y tejidos, habitualmente como localizaciones purulentas metastásicas después de episodios bacteriémicos, a veces subsiguientes a intervenciones de cirugía vascular reconstructiva. Son por consiguiente responsables, además de las especies *Salmonella Typhi* y *Salmonella Choleraesuis* las variedades más invasivas de *Salmonella Enteritidis* especialmente *S. Typhimurium*.

Listado de las 6 subespecies de *Salmonella choleraesuis*

A) Subespecie I (*S. choleraesuis*) :

- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* : (del griego *κολερα*: cólera y del latín *sus:cerdo*). Fórmula antigénica: 6,7,c:1,5 Es una especie adaptada principalmente a los animales (particularmente cerdos), pero también es un patógeno importante para el hombre, no tanto por su difusión como por la gravedad de la infección: en efecto, la mortalidad es excepcionalmente alta (29-25%) en contraste con la del 5% o a veces menor de otras *Salmonella*. Cerca de la mitad de las infecciones de *Salmonella choleraesuis* están representadas por fiebres entéricas. Además, un tercio de infecciones localizadas, entre ellas neumonía, artritis séptica, osteomielitis, meningitis purulenta y endocarditis, que casi siempre se desarrollan después de una fase bacteriémica.
- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. *Enteritidis*: (de la raíz griega *εντερον*: intestino). Fórmula antigénica: 1,9,12:g,m: - . Es muy frecuente en animales y en el hombre.
- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. *Hirschfeldii* (del nombre de L. Hirschfeld). Fórmula antigénica. 6,7 {VI}:c:1,5. Denominada *Salmonella Paratyphi-C*, nombre por otra parte mucho más difundido. Causa en el hombre fiebre entérica del tipo paratifoidea y ha sido también causa de endocarditis; está difundida sobre todo en los Balcanes, Asia Menor, Extremo Oriente e India.
- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. *Paratyphi-A*: (del griego *παρα*: vecino, similar y de *τυφοζ*: fiebre con sopor). Fórmula antigénica: 1,2,12:a:- . Su espectro de huéspedes está limitado al hombre, en el cual provoca gastroenteritis

aguda y, a veces, a continuación de una bacteriemia, fiebre entérica de tipo paratifoide y con menor frecuencia se produce localización extraintestinal. La mayor parte de sus cepas no producen SH₂.

- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. *Schottmuelleri* (del nombre de R. Schottmueller). Fórmula antigénica: 1,4, {5},12:b:1,2 . Denominada *Salmonella Paratyphi-B*, nombre por otra parte mucho más difundido, causa fiebre entérica de tipo paratifoideo en el hombre y más raramente en los animales; es la variedad de paratifus más frecuente en América septentrional, en Europa septentrional y en Italia.
- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. *Typhimurium* (del griego τυφοζ: fiebre con sopor y del latín mus: ratón). Fórmula antigénica: 1,4,{5},12:i:1,2 Muestra semejanzas notables con la *S. Schottmuelleri* y es patógena para los animales y para el hombre; en este último produce sobre todo gastroenteritis, pero a veces, puede ser también responsable de fiebre entérica. Constituye probablemente la variedad con distribución más amplia entre los animales y en el ámbito humano; es la *Salmonella*, más comúnmente aislada en América del Norte y del Sur y en Europa, mientras que es mucho menos común en Asia y Africa. Presenta un elevado porcentaje de casos de mortalidad; muestra con frecuencia resistencia al cloranfenicol y la ampicilina mientras que resulta más frecuentemente sensible a la gentamicina, colistina y ácido nalidíxico.
- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. *Typhi* (Del griego τυφοζ: fiebre con sopor). Fórmula antigénica:9,12,{VI}:d: - . Denominada *Eberthella typhi* y comúnmente también "bacilo de Eberth". Su espectro de huéspedes está limitado exclusivamente al hombre, en el cual produce clásicamente la fiebre entérica de tipo tifoide y raramente localizaciones extraintestinales. Requiere triptofano como factor de crecimiento.
- *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ser. *Gallinarum* (Del latín gallina, gallinarum como forma plural). Fórmula antigénica: 1,9,12: - : - . Siempre inmóvil. Puede ser subdividida en biovares basándose en sus características de fermentación, producción de gas y de H₂S. Se aísla principalmente de pollos y otras aves.

B) Subgénero II :

- *Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*. Fórmula antigénica: 1,9,12,1,w:e,n.x. Aislada por primera vez en 1922 en la orina de un paciente de Dar-es-Salaam (Tanzania).

C) Subgénero III a:

- *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*. Fórmula antigénica: 51:Z₄Z₂₃:-. La correspondencia a *S. arizona* es: 1,2:1,2,5: - . Se aisló por primera vez en 1939 (Caldwell y Ryerson) en Arizona (Estados Unidos) en muestras de reptiles. Incluye los serovares monofásicos del grupo III de Kauffmann.

D) Subgénero III b:

- *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*. Incluye los serovares monofásicos del grupo III de Kauffmann.

E) Subgénero IV:

- *S. choleraesuis* subsp *houtenae*. Su nombre proviene de Houten, ciudad holandesa. Fórmula antigénica: 43,Z₄Z₂₃:-. .

F) Subgénero V:

- *S. choleraesuis* subsp *indica*.

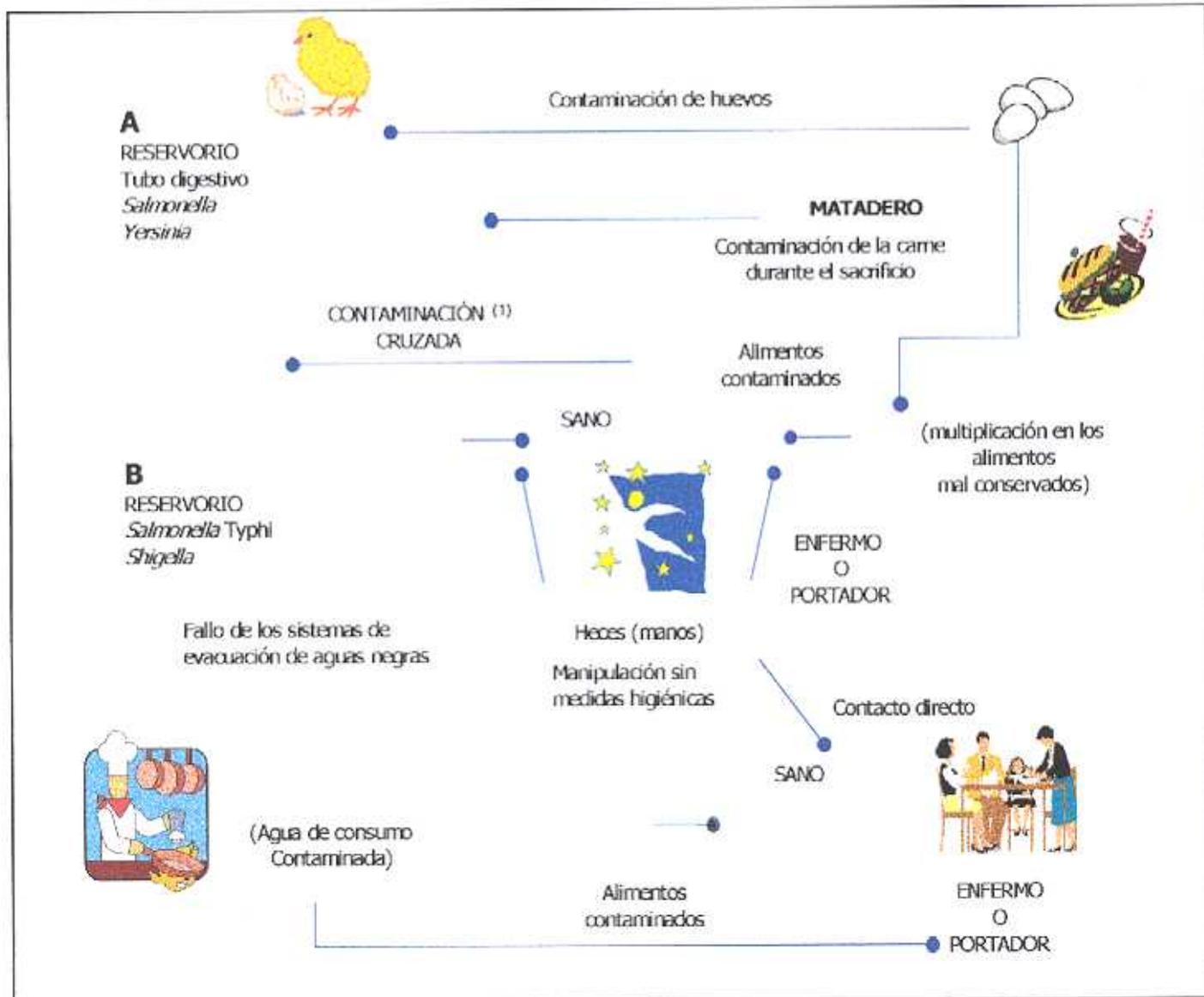
1.1.6. Epidemiología

Salmonella es reconocida como la mayor causa de diarreas en humanos. Por ejemplo, la incidencia anual de salmonelosis en la población de USA (Chalker, R.B. y Blaser, M.J.,1988) y en Países Bajos (Wit de, M.A.S., y col. 1996) está estimada entre 300 y 500 casos por cada 100.000 habitantes (0,3 - 0,5 %) y 700 por cada 100.000 habitantes (0,7 %) respectivamente. Los productos de ave están reconocidos como el mayor vehículo de infección por *Salmonella* (Bryan, F.L. y Doyle, M.P.,1995) siendo *S. Enteritidis* el serovar predominante, asociado a huevos y alimentos que contienen huevo (Anonimo,1988; St.Louis, M.E. y col. 1988). Como resultado del incremento internacional de infecciones de *Salmonella* en humanos se han establecido estrategias para su control, y especialmente el control de *S. Enteritidis* (WHO, 1992; WHO1994b) aplicando medidas higiénicas preventivas (WHO1994a), tratamiento de exclusión

competitivos (Nurmi, E. y Rantala, M.,1973; WHO 1994c), inmunización (WHO 1994c; Vielitz, E. y col. 1995). Además de estas propuestas mundiales, cada país ha tomado medidas propias en que se incluye el control de las materias primas y piensos compuestos libres de Salmonella (BOE,1988 número 41), campañas de sanidad controlada, programas de vacunación, . . .

La importancia de la Salmonella radica en que es la primera causa de toxiinfecciones de origen alimentario en países desarrollados (Sramová, H. y Benes, E.,1994).

Fig. 1.1 VIAS DE DIFUSIÓN DE ENTEROPATÓGENOS



Vías de difusión de los enteropatógenos. Las bacterias con reservorio animal (*Salmonella* y *Yersinia*) llegan al hombre según el esquema representado en A. Cuando el hombre ha sido infectado puede difundir según el esquema B. Por el contrario las bacterias con reservorio exclusivamente humano (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* y *Shigella*) difunden únicamente según el esquema B ⁽¹⁾ La contaminación cruzada en la cocina es muy importante y puede desorientar cuando se busca la fuente de infección. Por ejemplo, el alimento A es carne contaminada, que contamina en el mármol de la cocina a un alimento B no contaminado. El A se cuece y el B no. Se produce un brote de enteritis entre los comensales, se investigan los alimentos y se obtiene un falso resultado al confundir el vehículo (B) con el reservorio (A). (García Rodríguez, J. A. y Picazo, J. J. 1996)

- Francia: más del 80% de las toxiinfecciones alimentarias son producidas por Salmonella (Desenclos, J.C, y col.,1996; Bouvet, P. y Grimont, P.A.D.,1996; Decludt, B.,y col. ,1997; Desenclos, J.C., y col. 1996; Watier, L., y col. 1993)
- Argentina: Entre 1991 y 1995 el 79,8% de tox infecciones son debidas a S. Enteritidis (Caffer, M.I. y Eiguer, T.,1994; Picandet, A.M., y col. 1995).
- Martinica: Las toxiinfecciones que se producen con mayor frecuencia en la isla están producidas por S. Typhi y S. Paratyphi (Tchakamian, S. y col,1994; Olive, C., y col. 1996)
- Italia: En la zona sur, Salmonella es la toxiinfección más importante de origen alimentario (Nastasi, A. y Mammina, C.,1996)
- Polonia: Salmonella es la toxiinfección más importante de origen alimentario (Lalko, J., y col. 1977 y 1990)
- Estados Unidos: Un 1% de la población padece salmonelosis anualmente. (Chalker, R.B. y Blaser, M.J.,1988)
- España: es la más importante de las toxiinfecciones de origen alimentario (Usera, M.A., y col. 1991, 1992, 1993, 1994, 1995, 1996). Aproximadamente 2.3 casos por cada 100.000 habitantes.

1.1.7. Tratamiento.

Para el tratamiento de formas benignas sólo se requiere prevención a la deshidratación.

La terapia de elección en el curso de la fiebre tifoidea y paratifoidea está constituida por cotrimoxazol, ampicilina, fluoroquinolonas y cefalosporinas de 3ª generación, siendo aconsejable la realización de antibiogramas para prevenir la resistencia que se está observando en ciertas cepas principalmente de Salmonella Typhi.

Existen tres tipos de vacunas para la profilaxis de fiebres tifoideas, que sólo están indicadas para personas que viajen a países con alto riesgo de infección:

- Salmonella Ty21a. Ceba atenuada de Salmonella Typhi suministrada por vía oral.
- Antígeno Vi altamente purificado. Vía parenteral.
- Vacunas con cepas muertas por calor y fenol. Poco utilizadas por los efectos secundarios que producen.

En las formas benignas de las gastroenteritis producidas por Salmonella, no es necesario más que la prevención de la deshidratación, en casos más graves es necesaria la hospitalización, rehidratación y el suministro de antibióticos.

1.2. Historia de la soja (Glicine Max L.).

Como muchos inventos y descubrimientos que han marcado la historia de la humanidad, el de la soja se sitúa también en China. La soja era considerada uno de los cinco "granos sagrados" de la China antigua, ya que permitió suplir con ventaja la escasez de proteínas de origen animal.

Hacia el siglo VI misioneros budistas chinos introdujeron la soja en Japón, donde se hizo tan popular que se transformó en el alimento básico nipón.

Hasta el siglo XVII no hay referencia de la soja en Europa. Misioneros y comerciantes portugueses y holandeses introdujeron la semilla en Occidente, donde pasó sin pena ni gloria, mientras que el arroz, mucho más pobre y de cultivo más complicado, se extendió con rapidez. Las primeras plantaciones de soja en Europa, situadas en los Jardines Botánicos de París y Londres, no despertaron interés. Habrá que esperar hasta 1.875 cuando el investigador austriaco Friedrich Habulandt se dedicó a cruzar distintas semillas y tras varios fracasos consiguió su primera cosecha. Así comenzó el interés científico por la soja. En 1.885 ya se cataloga como leguminosa, pero su empleo seguía reducido a pequeños círculos experimentales, como el de la Sociedad Nacional de Alimentación.

Por otra parte, los colonos llevaron la semilla a América donde la soja empezó a utilizarse como medio de regeneración del suelo, alternándola con el cultivo, casi exclusivo, del maíz. El empleo de la planta era casi secundario, ya que empezó a utilizarse como forraje y en la industria aceitera.

Después de la Segunda Guerra Mundial, los granjeros se dieron cuenta de las enormes posibilidades de esta planta leguminosa y su cultivo se extendió rápidamente, situándose su habitat más indicado en las mismas zonas de producción del maíz (los estados del Corn-belt- Cinturón del maíz). Illinois, Iowa, Missouri, Indiana y Minnesota generan más de la mitad de la producción del país.

En pocos años, Estados Unidos pasó de ser el mayor importador de materias grasas a ser el principal exportador, superando las dos terceras partes de la producción mundial (62%). Brasil ocupa la segunda posición, con un 14%, seguido de Argentina (11%), Paraguay (6%) y China (4%). En Europa su cultivo está limitado a pequeñas áreas de Francia, Italia, Hungría, Bulgaria, Rusia, etc.

La soja es una planta anual de verano, con un rápido desarrollo y que proporciona una elevada producción (Piccioni, M. 1971). Su producción en España es meramente testimonial y, por ello, la dependencia de las importaciones es muy grande, ya que es la principal fuente de proteína en las fórmulas de piensos compuestos en España.

1.3. Factores nutricionales del haba de soja

En 1905 comenzó la extracción del aceite de soja mediante presión. El subproducto resultante de esta actividad extractora empezó a utilizarse en la alimentación del ganado doméstico. Dicho subproducto es la harina de soja, principal fuente de proteína en los piensos para monogástricos.

Su alto contenido en proteínas (especialmente rica en aminoácidos como lisina, triptófano y treonina) hace de la soja un alimento muy rico desde el punto de vista nutricional. Pero en ella se encuentran presentes determinados factores antinutritivos que hacen necesario su procesamiento para que pueda ser utilizada. Mediante el tratamiento físico y térmico del haba de soja se eliminan los factores antinutritivos y se facilita la disponibilidad del aceite.

La composición aproximada del haba de soja es (Piccioni, M. 1971):

Proteína	38-40%
Aceite	17-20%
Carbohidratos	26-29%
Agua	810%
Fibra	6-7%
Ceniza	5%

El aceite de soja tienen un alto contenido de ácidos grasos saturados, monosaturados y poliinsaturados, siendo la distribución de estos ácidos en 100 gramos la siguiente:

Monosaturados	14,05 g
Monoinsaturados	24,26 g
Poliinsaturados	56,73 g
Linoléico	50 g
Linolénico	6 g

Los factores antinutricionales tienen un efecto negativo sobre el valor nutritivo y la digestibilidad de las proteínas del haba de soja cruda. Cabe destacar (Hanrahan T, 1987; Garlich, J.D., 1988):

- Inhibidores de proteasas pancreáticas (Factores antitripsicos y antiqumotripsicos). Provocan retraso en el crecimiento y se empeora el índice de conversión, al no ser los animales capaces de digerir las proteínas suministradas en el pienso. Cuando se suministran estos factores, el páncreas se ve estimulado a producir mayor cantidad de proteasas lo que produce su hipertrofia.

- Hemoaglutininas: Provocan la reducción de la absorción de nutrientes. Sus efectos negativos son inferiores a los producidos por los factores antitripsicos. Si no se producen su eliminación se forman aglutinaciones de glóbulos rojos. (Jaffe, W.V, 1969)

- Saponinas: Producen sabores amargos y tienen capacidad de destruir los glóbulos rojos.

- Lipasas y lipoxidasas: No actúan en condiciones normales de conservación del haba de soja. Tras la molienda o el triturado del producto, pueden provocar que el aceite liberado se rancie.

- Ureasa: Tiene una acción débil como factor antinutricional, aunque su actividad es un parámetro indirecto de la presencia de factores antitripsicos en la soja procesada.

En rumiantes su degradación puede producir una grave intoxicación amoniacal e incluso la muerte. En otras especies, sin llegar a ese extremo, su presencia impide el total aprovechamiento de la fracción proteínica del pienso.

Todos estos factores antinutritivos son termolábiles, por lo que son inactivados cuando se somete el haba de soja cruda a tratamientos térmicos.

1.4. Procesado del haba de soja.

Los tratamientos tecnológicos aplicados al haba de soja implican la combinación de humedad, temperatura, y tratamiento físico o químico, variando en tiempo, intensidad y forma. Los tratamientos más utilizados son (Banks, W. y col., 1980; Dijk, H.J., y col., 1983; Chalupa, W. y col. 1984; Wiseman, J., 1984; Ruesgsegger, G.J. y Schultz, L.H. 1985; Wiseman, J., 1987; Wiseman, J., 1992).

1.4.1. Tratamientos en caliente por vía seca

1.4.1.1. Tostado.

Calentamiento en seco de las habas. Las semillas pierden, de este modo, hasta un 30% de su humedad inicial y alcanzan una temperatura, al final de proceso, de 110-170° C. Es necesario eliminar finos y polvo antes del tostado para evitar el riesgo de incendios o explosiones

Hay equipos diferentes para el tostado del haba de soja. Uno de los más innovadores es el "Jet-Sploder". Esta maquinaria somete el haba a una temperatura de 316° C durante 26 segundos aproximadamente. Su capacidad de procesamiento es de 4-6 toneladas a la hora. El producto sale con una temperatura de unos 170° C o entero o aplastado a través de rodillos. La alta humedad de la semillas y las condiciones exteriores de temperatura son determinantes de la capacidad de procesamiento. Por

último, el tamaño de la semilla es un factor que teóricamente puede afectar al resultado final, de tal modo que las habas más pequeñas sufrirían un tratamiento más exhaustivo

1.4.1.2. Extrusión seca.

No precisa de una instalación de vapor, lo cual es una ventaja. Los equipos para esta tecnología combinan la presión y la fricción con la temperatura. Su capacidad oscila entre los 300 y los 900 Kg. por hora, dependiendo del tipo de maquinaria. El coste energético es muy grande, pero la calidad del producto final es muy buena. Se utilizan extrusores de un tornillo.

La humedad del haba de soja es determinante de la humedad del producto final. Así, la semilla debe tener una humedad no superior al 20%, siendo recomendable que ésta sea del 13-15%. El producto final tendrá una humedad del 7-9% para el anterior rango de humedad del producto inicial. La temperatura del producto a la salida es de unos 150° C.

1.4.1.3. Tratamiento con rayos infrarrojos y micronización.

Se realiza mediante una batería de quemadores infrarrojos de gas, a través de la que se hacen pasar las semillas de soja. La radiación infrarroja penetra en los granos produciendo un aumento de la temperatura interna y de la presión de vapor del agua. Posteriormente el grano pasa a través de unos rodillos para ser aplastado y se refrigera. El tiempo de procesado es de unos 90 segundos y el rendimiento es de 800 Kg. /h.

1.4.2. Tratamientos por vía húmeda

1.4.2.1. Cocción.

Es el método más antiguo y sencillo. Las semillas se someten a un proceso de cocción durante 30 minutos y posteriormente son secadas al aire para ser, de este modo, administradas enteras o molidas al ganado.

1.4.2.2. Tostado húmedo.

Este tostado se hace en un medio con vapor saturado y sobrecalentado. En general, el tostador tiene un diseño vertical con un eje central y varios pisos, en el que se inyecta

vapor, calentando su base. Los rendimientos medios están entre 10-50 Kg/h., alcanzándose unas temperaturas de 110-130° C. En algunos modelos se introduce aire en los pisos inferiores para secar y enfriar el producto.

Esta técnica procede de la que emplean las extractoras de aceite en el proceso de desolventización y tostado de la harina de soja.

1.4.2.3. Extrusión húmeda.

El fundamento es el mismo que el de la extrusión seca, aunque previamente se produce un acondicionamiento de la semilla de soja al vapor y se inyecta vapor en la extrusora.

La humedad de salida del aparato está entre el 12% y el 14%, reduciéndose al 9-12% tras el proceso de secado y enfriado.

Hay gran variedad de equipos en el mercado, oscilando sus rendimiento entre 100 y 900 Kg/h.

1.4.2.4. Expansión húmeda.

Por su elevado consumo de vapor de agua, es un método exclusivo de las extractoras de aceite de soja.

Los equipos para esta tecnología derivan de los utilizados por los extractores con el fin de mejorar la eficacia de la extracción del aceite. Su capacidad oscila entre las 5 y las 10 Tm/h. y su mecánica es sencilla y fácil de mantener.

Al igual que en la extrusión, además de destruir los factores antinutritivos, se obtienen los siguientes fenómenos:

A) Químicos: Destrucción de estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, respetando los aminoácidos.

B) Físicos: Destrucción de la estructura celular, lo que conlleva la reorganización de la fibra en un sentido preferencial y la liberación del aceite al producirse la texturización de la proteína. El resultado es la expansión de los polisacáridos, que implica el obtener

un producto de menor densidad y estructura porosa.

La elección de cualquiera de los procesos expuestos, pasa por la realización de un estudio técnico-económico previo, siendo todos ellos efectivos para la destrucción de los factores antinutritivos

Una vez aplicado correctamente cualquiera de los tratamientos de procesado (tostado, extrusión seca, infrarrojos y micronización, cocción, tostado húmedo, extrusión húmeda, o expansión húmeda), el haba de soja pasa a denominarse soja integral o soja full-fat (Harper, J.H., 1986). En el desarrollo de este trabajo la denominaremos **Harina de Soja No Tratada (HSST)**, ya que durante su procesamiento no intervienen componentes químicos.

Otro de los tratamientos a los que puede ser sometida el haba de soja es el de extrusión seca con solventes como el hexano, lo que hace posible la extracción del aceite de soja en cantidades que oscilan entre un 13 y un 22 %. El haba tratada de esta forma se denomina soja 44%, soja 47,5%, y en general, harina de soja. (Piccioni, M., 1971). Nosotros la denominaremos **Harina de Soja Tratada (HST)**.

1.5 Importancia de la soja en la nutrición animal.

El haba de soja cruda contiene factores antinutricionales, que deben desactivarse mediante la aplicación de tratamientos adecuados, como el calor y la presión. La composición química de esta materia prima refleja un alto contenido en materia grasa, y en proteína bruta, lo que le confiere una alta densidad nutricional y la hace válida para alimentos donde se requiera una gran concentración energética (Nicols, D.A. y col. 1982):

- Cerdas en lactación.
- Ponedoras ligeras (pico de puesta)
- Aves con stress por calor.
- Vacas de leche (primera fase de lactación).
- Conejas lactantes.

1.5.1. Avicultura.

La incorporación de harina de soja en piensos destinados a avicultura, en general, depende del precio del resto de las materias primas.

La soja integral contiene una alta energía metabolizable que se considera como la mejor fuente de energía para las aves (Wiseman J. 1984).

El contenido en ácido linoléico permite sustituir en parte cereales como el maíz por otros de bajo contenido como el trigo y la cebada.

Es de gran interés en dietas, para combatir el stress por calor (Waldroup, W. 1985).

Puede estimarse que la incorporación de la harina de soja iintegral o full-fat en un pienso de avicultura puede oscilar entre un 5-20%. (Scott, M. L. 1973; Latshaw, J. D. 1974; Latshaw, J. D. y Clayton, P. C. 1976; Waldroup, P. W. y Hazen, K. R. 1978; Wiseman, J. J. 1984; Arscott, G. H. 1985).

Las dietas de pavos juvenes, entre los 9 y los 24 días requieren un alto contenido en proteína que suele variar entre el 35-50% de soja (Hamerstrand, G. E. y col., 1981; Mian, A. y Garlich, J.D., 1985; Garlich, J.D., 1988).

1.5.2. Porcino

La soja full-fat extrusionada cumple el primer requisito, su palatabilidad, para poder incorporarse al pienso de lechones (Aumaitre, A. 1985).

Por regla general, se acepta que para lechones no es recomendable más de un 10%. Hay que tener en cuenta que el animal es muy sensible a los factores antitripsicos y antiquimiotripsicos presentes en el haba de soja cruda. (Hanraham, T., 1987). Para cerdos de terminación (65 - 100 kg), puede incorporarse hasta un 20% del total de la ración. (Ledesma, D. V y Rene, A.; Campabadal, H. C. y col. 1982).

1.5.3. Vacas de leche de alta producción.

Para mantener la calidad de la leche (grasa y proteína), es preciso buscar una máxima ingestión de forraje. El concentrado nunca debe sobrepasar el 50% de la sustancia seca de la ración. Por esto, la soja extrusionada cuenta con un gran interés en este tipo de alimentos. (Ruesgsegger, G.J. y Schultz, L.H. 1985)

Su inclusión permite: (Dijk, H.J., y col., 1983):

- Elevar la concentración energética del alimento.
- Reducir la inclusión de otras fuentes energéticas como el almidón (trastornos metabólicos) o grasas añadidas que disminuyen la actividad rumial sobre la fibra.
- Aportar proteína de baja degradabilidad y semiprotegida (grasas by pass). (Banks, W. y col., 1980; Dijk, H.J., y col., 1983; Chalupa, W. y col. 1984; Ruesgsegger, G.J. y Schultz, L.H. 1985)

Las recomendaciones de utilización de soja full-fat extrusionada pueden sintetizarse en: (Palmquist, D.L. y Jenkins, C. 1980; Mielke, C.D. y Schingoethe, D.J. 1981; Wiseman J. J. 1984).

- No sobrepasar el 6% de la grasa sobre el total de la sustancia seca de la ración.
- No sobrepasar un 20% de soja integral en el concentrado.
- Maximizar la ingestión de forraje.

Asegurar que los niveles de calcio suplementados son suficientes.

1.5.4. Cunicultura.

El conejo tiene gran sensibilidad a los factores de la tripsina, especialmente los gazapos en crecimiento (Cheeke, P.R. y Amberg, K.W.. 1972; Cheeke, P.R. 1988).

La incorporación de soja extrusionada en piensos de conejos puede alcanzar niveles de hasta un 10% (Cheeke, P.R. y Amberg, K.W.. 1972; De Blas, J.C., y col. 1981; Cheeke, P.R. 1988).

En madres lactantes existen numerosos trabajos que demuestran la respuesta en producción a la concentración energética del alimento. (Cheeke, P.R. y Amberg K.W. 1972; Santoma G., y De Blas. J.C. 1987; Cheeke, P.R. 1988).

1.6. Presencia de Salmonella en animales.

La importancia del género *Salmonella* reside en que prácticamente todos sus serotipos son potencialmente patógenos, tanto para el hombre como para otros vertebrados.

En la cadena epidemiológica juegan un papel decisivo los portadores animales (carnes, huevos, ovoproductos, etc), ya que son los responsables de muchos brotes toxiiinfecciosos (Rigby, C.E., 1984; Board, R.G. y col. 1989; Humphrey, T.J., 1989; Perales, I. y Audicana, A., 1989; Berrang, M.E., y col. 1991; Denton, J.H., 1991; Roel-Mulder, 1991; Stephenson, P y col. 1991; Nascimiento, V.P. y col. 1992; Entis, P., 1996; Stadelman, W.J. y col. 1996).

Una de las formas de contaminación más importante de los animales es a través del tubo digestivo, por los piensos utilizados para su alimentación, y éste a través de las materias primas que lo componen. Hay numerosos estudios (Liu, T.S. y col. 1969; Greenwood, D.E. y col. 1980; Emswiler-Rose, B. y col. 1984; Beckers, J.H. y col. 1986; Mackey, S.M. y Kerridge, A.L., 1988; Perales, I. y Audicana, A., 1989) sobre contaminaciones de *Salmonella* en materias primas de origen animal, existiendo numerosas lagunas en cuanto a materias primas de origen vegetal.

1.7. Legislación actual en piensos.

En España existe legislación sobre piensos y sus materias primas. Podemos seguir la clasificación recomendada por la CESFAC (Confederación española de fabricantes de alimentos compuestos para animales). En el presente trabajo la legislación la tenemos actualizada a febrero de 1997.

Ver Anexo II Tomo 2.

1.7.1. Legislación Marco

Real Decreto 418/1987 de 20 de Febrero sobre sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales (BOE 28.03.87). Corrección de errores en el BOE de 13.05.87.

1.7.2. Aditivos

- Orden de 23 de marzo de 1988 por la que se dictan normas relativas a los aditivos en la alimentación de los animales (BOE 16.4.88).
- Orden de 30 de marzo de 1994 por la que se modifica la del 23 de marzo de 1988 por la que se dictan normas relativas a los aditivos en la alimentación de los animales (BOE 12.4.94)
- Orden de 4 de julio de 1994 sobre utilización y comercialización de enzimas, microorganismos y sus preparados en la alimentación animal (BOE 8.7.94). Corrección de errores en BOE de 4 de agosto de 1994.
- Resolución de 26 de noviembre de 1996, de la Dirección General de Producciones y Mercados Ganaderos, por la que se hace pública la lista de enzimas, microorganismos y sus preparados en la alimentación animal, autorizados para su uso y comercialización (BOE 21.12.96)
- Real Decreto 1329/1995 de 28 de julio por el que se fijan las líneas directrices para la evaluación de los aditivos en la alimentación animal (BOE 19.8.95). Modificación del Anexo por Orden Ministerial de 6 de noviembre 95 (BOE 14.11.95)

1.7.2.1. Modificaciones del Anexo de las O.M. de 23.3.88 y 26.11.91

- Orden de 26 de noviembre de 1991 (BOE 11.12.91). Corrección de errores en Orden de 28 de febrero de 1992 (BOE 28.3.92 y 1.4.92)
- Orden de 28 de febrero de 1992 (BOE 28.3.92 y 1.4.92). Nueva publicación de las Ordenes de 28.2.92 en BOE de 14.4.92
- Orden de 3 de febrero de 1993 (BOE 24.2.93)
- Orden de 8 de julio de 1993 (17.7.93)
- Orden de 7 de febrero de 1994 (BOE 11.2.94)

- Orden de 10 de octubre de 1994 (BOE 18.10.94). Corrección de errores en BOE 4.11.94
- Orden de 14 de marzo de 1995 (BOE 17.3.95)
- Orden de 7 de noviembre de 1995 (BOE 7.2.96)
- Orden de 24 de enero de 1996 (BOE 7.2.96)
- Orden de 23 de febrero de 1996 (BOE 8.3.96)
- Orden de 25 de julio de 1996 (BOE 1.8.96)
- Orden de 20 de febrero de 1997 (BOE 28.2.97)

1.7.3.- Sustancias y productos indeseables:

- Orden de 11 de octubre de 1988, relativa a sustancias y productos indeseables en alimentación animal (BOE 18.11.88). Corrección de errores en Orden de 12 de abril de 1989 (BOE 24.4.89)
- Orden de 19 de noviembre de 1993, por la que se modifica la del 11 de octubre de 1988 relativa a sustancias y productos indeseables en alimentación animal.

1.7.3.1. Modificación del Anexo

- Orden de 26 de noviembre de 1991 (BOE 11.12.91)
- Orden de 24 de marzo de 1993 (BOE 31.3.93)
- Orden de 10 de octubre de 1994 (BOE 18.10.94)
- Orden de 25 de julio de 1996 (BOE 1.8.96)

1.7.4.- Sanidad animal

- Real Decreto 157/1995 de 3 de febrero, por el que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos (BOE 16.3.95)
- Real Decreto 1423/87 de 22 de noviembre, por el que se dan normas sobre sustancias de acción hormonal y tiroestática de uso en los animales (BOE 23.11.87)
- Orden de 12 de julio de 1988, por la que se dan normas sobre vigilancia de sustancias y productos de acción hormonal y tiroestática (BOE 18.7.88)
- Real Decreto 1262/89 de 20 de octubre, por el que se aprueba el Plan Nacional de investigación de residuos en los animales y en las carnes frescas (BOE 26.10.89).

Real Decreto 569/90 de 27 de abril, relativo a la fijación de contenidos máximos para los residuos plaguicidas sobre y en los productos alimenticios de origen animal (BOE 9.5.90). Modificación de los anexos por Real Decreto 246/1995 de 17 de febrero (BOE 16.3.95) y por Real Decreto 2460/1996 de 2 de diciembre (BOE 13.12.96)

- Real Decreto 570/90 de 27 de abril, relativo al intercambio de animales tratados con determinadas sustancias de efecto hormonal y su carne (BOE 9.5.90)
- Real Decreto 2022/93 de 19 de noviembre, por el que se establece los controles veterinarios aplicables a los productos que se introduzcan en territorio nacional procedentes de países terceros (BOE 5.1.94)
- Real Decreto 2224/93, de 17 de diciembre, sobre normas sanitarias de eliminación y transformación de animales muertos y desperdicios de origen animal y protección frente a agentes patógenos en piensos de origen animal (BOE 19.1.94)
- Real Decreto 2551/94, de 29 de diciembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal y sanitarias aplicables a los intercambios e importaciones de productos no sometidos, con respecto a estas condiciones, a normas específicas (BOE 10.2.95)

- Resolución de la Dirección General de la Salud Pública del Ministerio de Sanidad y Consumo de 4 de julio de 1996, por la que se adoptan medidas urgentes de supresión cautelar de la entrada de determinados productos de animales bovinos procedentes de Francia, Irlanda, Portugal y Suiza (BOE 24.7.96)
- Orden del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de 10 de septiembre de 1996, por la que se adoptan medidas de protección contra la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BOE 11.9.96)
- Resolución del Ministerio de Sanidad y Consumo de 9 de octubre de 1996, por la que se adoptan medidas de protección frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles de algunos rumiantes (BOE 19.10.96).

1.7.5. Toma de muestras:

- Orden del Ministerio de Relaciones con las Cortes de 12 de mayo de 1989 por la que se aprueban los métodos de toma de muestras de alimentos para animales (BOE 22.5.89)

1.7.6. Métodos oficiales de análisis

Real Decreto 2257/1994 del Ministerio de la Presidencia, de 25 de noviembre, por el que se aprueban los métodos oficiales de análisis de piensos simples o alimentos para animales y sus primeras materias (BOE 2.3.95)

En general, podríamos decir que todas las materias primas utilizadas en la fabricación de piensos y los piensos mismos, deben mantenerse en las debidas condiciones higiénico - sanitarias para su consumo durante un tiempo variable. De esta forma, la alimentación correcta a los animales es obligada, para evitar procesos patológicos que repercutan en la calidad y cantidad de las producciones, y para evitar que no se produzcan alimentos destinados a consumo humano en malas condiciones.

En este sentido, está establecido en el BOE Nº 41 de fecha 17 de febrero de 1988, las especificaciones bacteriológicas para productos destinados a la alimentación de los animales.

1.8. Legislación actual en alimentos.

La legislación recogida está actualizada a Septiembre de 1997.

1.8.1. Productos cárnicos y derivados:

- Orden de 29 de junio de 1983 (BOE de 5 de julio) por la que se aprueban las normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón, paleta cocida y fiambre de paleta y magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo.
- Resolución de 26 de diciembre de 1983 (BOE de 3 de enero) de la Subsecretaría, por la que se modifica la Orden de la Presidencia del Gobierno, de 29 de junio de 1983, que aprueba las normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón , paleta cocida y fiambre de paleta y magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo .
- Orden de 6 de abril de 1984 (BOE de 9 de abril) por la que se aprueban las normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón , paleta cocida y fiambre de paleta y magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo destinados al mercado interior.
- Orden 14 de enero de 1986 (Presidencia). Código alimentario español. Normas de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas al mercado interior.
- Real Decreto 30 de octubre 1992, número 1317/1992. Mº Industria, Comercio y Turismo. Avicultura. Establece las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros.

1.8.2. Cereales

- Real Decreto 26 de junio 1987, número 1094/1987 (Mº de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno). Cereales. Reglamentación Técnico-Sanitaria para elaboración, circulación y comercio de cereales en copos o expandidos.

1.8.3. Huevos

- Real Decreto 6 de noviembre de 1992, número 1348/1992. Mº. de Relaciones con las Cortes y de Secretaría del Gobierno. Huevos. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la producción y comercialización de los ovoproductos.

1.8.4. Leches y productos lácteos

- Orden de 12 de julio de 1983 (BOE de 20 de julio), por la que se aprueban las normas generales de calidad para la nata y nata en polvo con destino al mercado interior.
- Orden de 21 de diciembre de 1984(BOE 5 de enero de 1985), por la que se ratifica el Reglamento de la denominación de origen "queso manchego" y de su Consejo Regulador.
- Orden de 29 de noviembre de 1985 (BOE 6 de diciembre de 1985), por la que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos destinados al mercado interior.
- Real Decreto 30 de enero de 1987, número 340/1987 (Mº Relaciones con las Cortes y Secretaría del Gobierno). Helados. Modifica la reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio.
- Orden 8 de mayo de 1987 (Mº Relaciones con las Cortes y Secretaría del Gobierno). Cuajada. Modifica la norma de calidad en el mercado interior.
- Real Decreto 30 de abril de 1987, número 874/4987 (Mº Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno). Yogur. Deroga el R. D. 5 de marzo de 1976, por el que se aprueba la norma específica
- Orden 1 de julio de 1987 (Mº Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno). Yogur. Norma de calidad para el destinado al mercado interior.
- Real Decreto 1679/1994, de 22 de julio por el que se establece las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos.

1.8.5. Pastelería

- Real Decreto 19 mayo de 1978, número 2419/78 (Presidencia). Confiterías y Pastelerías. Reglamentación Técnico-Sanitaria para elaboración, fabricación, circulación y comercio de productos de confitería, pastelería, bollería y repostería.

1.8.6. Pescados y mariscos

- Orden 2 de agosto de 1991. Mº Sanidad y Consumo. Pescado. Normas microbiológicas, límites de contenido en metales pesados y métodos analíticos para su determinación en los productos de la pesca y acuicultura con destino al consumo humano.
- Real Decreto 308/1993, de 26 de febrero, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la comercialización de moluscos bivalvos vivos.
- Real Decreto 345/1993, de 5 de marzo, por el que se establecen las normas de calidad de las aguas y de la producción de moluscos y otros invertebrados marinos vivos.

1.8.7. Salsas, condimentos y especias

- Real Decreto 358/1984, de 28 de marzo (BOE de 10 de mayo), por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de salsas de mesa.
- Real Decreto 2242/1984, de 26 de septiembre (BOE de 22 de diciembre), por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias.

1.8.8. Varios

- Orden de 5 de agosto de 1983 (BOE 13 de agosto), por la que se aprueba la norma de calidad para la miel destinada al mercado interior.

- Real Decreto 380/1984, de 25 de enero (BOE de 27 de febrero), con el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de jarabes.
- Real Decreto 27 de septiembre 1991, número 1410/1991. Mº de Relaciones con las Cortes y de Secretaría de Gobierno. Horchata. Modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y venta de las de chufa, aprobada por R. D. 1338/1988, de 28 de octubre.
- Real Decreto 2817/1983, de 13 de octubre (BOE 11 de noviembre) por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los Comedores Colectivos.

CAPITULO 2.

OBJETO E INTERÉS GENERAL.

En los últimos 11 años he desempeñado mi trabajo en el laboratorio de Microbiología de una empresa privada. Dicho laboratorio se dedica desde hace aproximadamente treinta años a realizar controles microbiológicos a las materias primas y a los piensos que utiliza tanto la empresa como un gran número de clientes. Debido a la actividad a la que se dedica la empresa (alimentación animal), desde un principio se han mantenido contactos con la Facultad de Veterinaria. Hace aproximadamente 8 años, en uno de estos trabajos en común, surgió la necesidad de realizar un estudio sobre harinas de soja, debido a que el número de aislamientos positivos nos llamaron mucho la atención. En aquel momento no pensábamos que en un producto de origen vegetal, como la harina de soja, hubiese tanta contaminación por *Salmonella*. Centrados en estos aspectos nos planteamos un estudio interlaboratorial entre el departamento de Patología Animal I de la Facultad de Veterinaria y nuestro laboratorio.

En el transcurso del estudio observamos que, cuando hacíamos un contradictorio, principalmente de harina de soja, muchas de las muestras resultaban negativas a *Salmonella*.

En un primer estudio comprobamos que no existía bibliografía sobre la presencia de *Salmonella* en harinas de soja de origen comercial. En la mayoría de los artículos aparece como un producto que se contamina artificialmente, para realizar intercomparaciones entre medios de cultivo, métodos de ensayo, etc. En el resto de los artículos encontrados, aparece como la mejor aportación de proteína bruta de origen vegetal, para la fabricación de piensos compuestos para distintas especies animales, y su control de calidad es puramente químico.

Por esto, y como primer objetivo, nos planteamos estudiar distintas metodologías para el análisis de *Salmonella* en este tipo de productos, y conocer cuál podía ser la más rápida y eficaz. Se compararon técnicas convencionales de microbiología:

- con y sin preenriquecimiento
- distintos enriquecimientos como Rappaport Vassiliadis y Selenito Verde Brillante
- técnicas inmunológicas (ELISA)
- técnicas basadas en sondas de DNA

- medios selectivos de aislamiento distintos como Salmonella-Shigella (SS), Xilosa lisina dextrosa (XLD), agar verde brillante (BGA)

Además, queríamos conocer si todos los serovares aislados en harinas de soja se disponen de igual medida en uno u otro medio y si existían cultivos mixtos de Salmonella en una misma muestra.

Una vez establecida una sistemática de trabajo para el aislamiento de Salmonella, y como siguiente objetivo, nos planteamos conocer las ufc (unidades formadoras de colonias) que contenían nuestras muestras y si podíamos establecer un método de recuento rápido y sensible que nos sirviese para conocer estos niveles en una muestra naturalmente contaminada y el recuento de los inóculos preparados como controles.

El muestreo y la analítica son dos procesos ampliamente estudiados y legislados. Sin embargo, existe un vacío en la reglamentación referente al almacenamiento y conservación de las muestras tomadas en estos procesos. En esta línea queríamos conocer una técnica sensible de estudio y establecer un protocolo para indicar la temperatura óptima de almacenamiento y el tiempo de conservación de la muestra, fundamentalmente para la realización de análisis contradictorios.

A continuación, nos planteamos la necesidad de conocer qué ocurría con otros alimentos como la carne, el pescado o los productos de pastelería, que a pesar de tener una inspección constante, tampoco tienen una legislación de almacenaje o conservación de muestras.

Al utilizar productos con procesados distintos sobre el haba de soja y observar que el número de muestras positivas en harinas de soja sin tratar (HSST) era muy superior al de muestras positivas en harinas de soja tratadas (HST), pensamos que era posible que el procesado tuviese algún papel en esta diferencia, y por tanto que existiese alguna sustancia inhibidora que impidiese el desarrollo de Salmonella en las HST.

Durante 7 años estudiamos la presencia de Salmonella en las harinas de soja, para conocer si el elevado número de muestras con presencia de Salmonella presentaba cambios anuales, si era estacional, o si la contaminación era constante a lo largo del tiempo. Además, ya que es un producto de importación, se quería saber si la procedencia o el tipo de procesado del haba entera de soja tenía alguna relación con la aparición de este patógeno. También era

importante conocer si había diferencias entre los serovares aislados de estas harinas de soja y las encontradas en animales enfermos y toxiinfecciones de tipo alimentario en humanos.

CAPITULO 3

PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍA. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

3.- Puesta a punto de metodología. aislamiento e identificación.....	39
3.1.- Plan de trabajo. Antecedentes.....	39
3.2.- Materiales y muestras utilizadas.....	40
3.2.1.- Medios de cultivo y reactivos.....	40
3.2.2.- Muestras utilizadas.....	40
3.3.- Métodos de análisis utilizados.....	40
3.3.1- Introducción.....	40
3.3.2.- preenriquecimiento + selenito verde brillante (PSBG).....	41
3.3.2.1.- Preparación de la muestra. Preenriquecimiento.....	41
3.3.2.2.- Realización del ensayo.....	41
3.3.3.- Selenito verde brillante (SBG).....	41
3.3.3.1.- Preparación de la muestra.....	41
3.3.3.2.- Realización del ensayo.....	42
3.3.4.- Rappaport Vassiliadis (RV).....	42
3.3.4.1.- Preparación de la muestra. Preenriquecimiento.....	42
3.3.4.2.- Realización del ensayo.....	42
3.3.5.- Gene-trak systems.....	43
3.3.5.1.- Preparación y enriquecimiento de la muestra.....	43
3.3.5.2.- Procesado de los cultivos.....	43
3.3.5.3.- Interpretación de resultados.....	45
3.3.6.- Enzima inmunoensayo (ELISA).....	45
3.3.6.1.-Preparación y enriquecimiento de la muestra.....	45
3.3.6.2.- ELISA.....	46
3.3.6.3.- Interpretación de resultados.....	46
3.3.7.- Distribución de serotipos de <i>Salmonella</i>	47
3.3.8.- Preparación de inoculos de <i>Salmonella</i>	47
3.4.- Análisis estadístico.....	48
3.5.- Resultados y discusión.....	48
3.6.- Conclusiones globales.....	56

GRAFICO 3.1. TIEMPO PARA LA REALIZACIÓN DE DISTINTOS ANÁLISIS DE <i>Salmonella</i> (Tiempos mínimos para muestras negativas).	52
TABLA 3. 1 Presencia de <i>Salmonella</i> . PSBG - SBG.....	48
TABLA 3. 2 Presencia de <i>Salmonella</i> . SBG-RV	49
TABLA 3. 3 Presencia de <i>Salmonella</i> . ELISA - SBG.....	49
TABLA 3. 4. Presencia de <i>Salmonella</i> . HDNA -SBG.....	50
TABLA 3. 5 Disposición de serovares en distintos medios de cultivo selectivo sólido.....	54
TABLA 3. 6 Serotipos aislados por duplicado o triplicado en una misma muestra.	55

3.- Puesta a punto de metodología. Aislamiento e identificación.

3.1. Antecedentes. Plan de trabajo

En la legislación española no se indica ningún método de análisis concreto para el aislamiento e identificación de *Salmonella*. En el anexo II se encuentra el BOE nº41 de 17 de febrero de 1988, que marca las especificaciones bacteriológicas para los productos destinados a la alimentación de los animales. En el artículo 6º dice literalmente “ *las tomas de muestras, los controles analíticos, la calificación de las infracciones, las sanciones y demás normas sobre procedimientos, se llevarán a efecto de acuerdo con lo que establece el Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio (R.1513, 1803, 2247, 2343 y Ap. 1975-85, 11245) ...* ” que también se encuentra en el mismo anexo. En ninguno de ellos se especifica el método a utilizar en los análisis de productos de consumo animal.

Así mismo, queríamos comprobar si los medios selectivos utilizados soportaban el crecimiento de todos los serovares de *Salmonella* presentes en las muestras analizadas, y comprobar si existía más de un serovar por muestra.

Por todo ello nos planteamos conocer:

- Un método de análisis que permitiera minimizar el tiempo de respuesta
- Conocer el o los medios sólidos selectivos más adecuados para el aislamiento de *Salmonella*.
- Comprobar la existencia o no de distintos serovares en una misma muestra.

En primer lugar estudiamos el mismo método con y sin preenriquecimiento y comparamos los resultados con el recomendado por Rappaport Vassiliadis ya que era un método ampliamente contrastado y recomendado por la FDA y la AOAC. Por último se comparó el método “tradicional” microbiológico con otras técnicas como ELISA o sondas de DNA (disponibles comercialmente en ese momento).

3.2. Materiales y muestras utilizadas.

3.2.1. Medios de cultivo y reactivos.

Los medios de cultivo y los reactivos se encuentran detallados en el anexo I.

3.2.2. Muestras utilizadas.

Las muestras utilizadas en todos los ensayos son Harinas de soja tratadas (HST) y harinas de soja sin tratar (HSST).

3.3. Métodos de análisis utilizados

3.3.1. Introducción.

En todos los métodos utilizados, se llevó a cabo una identificación y confirmación de *Salmonella* de la siguiente forma:

A todas las colonias aisladas en medios de cultivo con morfología típica de *Salmonella* se les realizó:

- Seroaglutinación rápida en porta con antisuero polivalente O y Vi
- Confirmación con pruebas bioquímicas de Enterotube II.

De todas las placas en las que se confirmó la presencia de *Salmonella* se efectuó:

- Siembra en tubos inclinados con agar de recuento (PCA)
- Se enviaron a serotipificación al Centro Nacional de Referencia de Majadahonda (Madrid)

3.3.2. Preenriquecimiento + selenito verde brillante (PSBG)

Stokes, H. y Osborne, G.,1955 ; Amejeiras, R.,1991; Amejeiras, R. y col. ,1993 y 1994

3.3.2.1. Preparación de la muestra. Preenriquecimiento.

Se pesaron $25 \pm 0,2$ g de la muestra y se añadieron a un matraz con 225 ml. de agua de peptona estéril.

Se incubó unas 16-18 horas en estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.3.2.2. Realización del ensayo

Enriquecimiento: Se tomaron 10 ml del preenriquecimiento y se añadieron a 100 ml de Selenito Verde Brillante (SBG).

Se incubó unas 20-24 horas en estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Pasado este tiempo se sembraron en estría, en placas de Agar Salmonella - Shigella (SS), agar Xilosa Lisina Dextrosa (XLD) y agar Verde Brillante (BGA) guardando siempre las máximas condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones cruzadas y ambientales.

Se incubaron unas 24 horas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en estufa, una vez transcurrido este tiempo, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.1 de introducción.

3.3.3. Selenito verde brillante (SBG)

Stokes, H. y Osborne, G.,1955 ; Amejeiras, R.,1991; Amejeiras, R. y col. ,1993 y 1994

3.3.3.1. Preparación de la muestra.

Se pesaron $25 \pm 0,2$ g de la muestra y se añadieron a un matraz con 100 ml de SBG. Se incubó unas 24 h en estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.3.3.2. Realización del ensayo

Pasado este tiempo se sembraron en estría por agotamiento de asa alícuotas del enriquecimiento, en placas de Agar Salmonella - Shigella (SS), agar Xilosa Lisina Dextrosa (XLD) y Agar Verde Brillante (BGA), guardando siempre las máximas condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones cruzadas y ambientales.

Se incubaron unas 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa; una vez transcurrido este tiempo, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.1 de introducción.

3.3.4. Rappaport Vassiliadis (RV).

Rappaport, F. y col, 1956; Vassiliadis, P., 1983; Van-Schothorst, M y Renaud, A.M. 1985; Kalapothaki, V. y col. , 1986; Rhodes, P. y Quesnel, L.B., 1986; Beckers, J.H. y col. 1987; June, G.A., y col. 1996.

3.3.4.1. Preparación de la muestra. Preenriquecimiento.

En matraces con 225 ml. de agua de peptona tamponada y estériles se añadieron 25 g de muestra, y se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 - 20 horas.

3.3.4.2. Realización del ensayo

Se inoculó 0,1 ml del preenriquecimiento en 10 ml caldo Rappaport Vassiliadis (previamente atemperado a unos 42°C) y se incubó a $42 \pm 1^\circ\text{C}$.

Pasadas 24 horas, se sembró el caldo sobre placas de BGA incubándose a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 - 24 horas. Los tubos se mantuvieron en baño otras 24 horas y se sembraron de nuevo en BGA y se incubaron unas 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa; una vez transcurrido este tiempo, se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.1 de introducción.

3.3.5. Gene-trak systems.

Mozola, M.A., y col. , 1988; Izat, A.L., y col. , 1989; Curiale, M.S. y Klatt, M.J., 1990; King, W., y col, 1990; Bailey, J.S., y col. ,1991.

3.3.5.1. Preparación y enriquecimiento de la muestra.

De acuerdo con las instrucciones del fabricante se homogeneizaron 25 g de muestra en 225 ml de caldo lactosa y se incubó de 22 a 24 horas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$. (Fase de preenriquecimiento).

Se agitó la muestra tras la incubación y se transfirió 1 ml del caldo de preenriquecimiento a 10 ml de caldo tetratonato (TT) y a 10 ml de caldo selenito cistina (SC). Se incubaron tanto el TT como el SC a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16 - 18 horas.

Se agitaron los tubos después de la incubación, y se transfirió 1 ml de TT a 10 ml de caldo Gram negativos (GN) y 1 ml de SC a un segundo tubo de GN con 10 ml. Se incubaron estos cultivos a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas.

Para el ensayo de GENE-TRAK se utilizaron 0,25 ml de cada tubo de cultivo GN (0,5 ml. por muestra). Los cultivos de GN se reservaron para una posible confirmación.

3.3.5.2. Procesado de los cultivos.

Antes de comenzar la experiencia, se ajustó un baño de agua a $65^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para cada muestra a analizar se utilizó un tubo de vidrio de 12 x 75 mm con la referencia apropiada y se colocó en una gradilla; además se incluyó un tubo para el control positivo y otro para el control negativo.

Se agitaron los cultivos de GN y se añadieron 0,25 ml de cada uno de los 2 cultivos GN en el tubo apropiado. Se agitaron las soluciones de control positivo y negativo y se añadieron 0,5 ml de cada una a su tubo correspondiente.

Se añadió 0,1 ml de la solución 1 (solución lisis) en cada tubo y se agitó la gradilla de tubos con la mano durante 5 segundos. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Se añadieron 0,20 ml de solución 2 + 3 (Sonda de *Salmonella*) en cada tubo y se agitó la gradilla de tubos en la mano durante 5 segundos.

Se colocó una varilla en cada tubo de muestra en el baño a 65°C. e incubándose durante 1 hora; se añadieron 0,75 ml de conjugado enzimático 1X a cada tubo de una segunda gradilla y se lavaron a 65°C.

Se colocaron las varillas sobre la segunda gradilla de tubos que contenían el conjugado enzimático y se incubó a temperatura ambiente.

Se preparó una tercera gradilla de tubos y se añadió un tubo para el " blanco ".

Después de la incubación, se sacaron las varillas de los tubos del conjugado enzimático y con suavidad se lavaron.

Se colocaron las varillas en la tercera gradilla que contenía el sustrato-cromógeno.

Pasado este tiempo de incubación se sacaron las varillas de los tubos y se descartaron.

Se añadió 0,25 ml de la Solución Stop a cada tubo incluido el "blanco". Se agitaron suavemente.

Se colocó el "blanco" en la ranura izquierda (referencia) del fotómetro y se insertó el control negativo en la ranura derecha (muestra). Cuando la lectura se estabilizó se realizó la lectura. Se procedió de igual forma para determinar el valor de absorbancia del control positivo.

Para cada muestra se mantuvo el control negativo en la ranura izquierda y el de la muestra en la derecha.

3.3.5.3. Interpretación de resultados

- Para los controles:

El valor de absorbancia obtenido en el control negativo debía de ser menor o igual a 0,15. (Leído frente al blanco).

El valor de absorbancia obtenido en el control positivo debía ser mayor o igual a 1,00. (Leído frente al blanco).

- Para las muestras:

Los valores menores o iguales a 0,1 (leídos frente al control negativo) se interpretaron como negativos, es decir, ausencia de *Salmonella*.

Los resultados mayores a 0,10 frente al control negativo, se interpretaron como positivos, por tanto presencia de *Salmonella* en la muestra. Los resultados positivos se confirmaron desde el caldo GN y sembrando a Hektoen entérico, XLD, y a SS. A continuación se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.1 de introducción.

3.3.6. Enzima inmunoensayo (ELISA).

3.3.6.1. Preparación y enriquecimiento de la muestra.

Krysinski, E.P. y Heimsch, R.C., 1977; Swaminathan, B. y Ayres, J.C., 1980; Minnich, S.A., y col., 1982; Robison, B.J., y col. 1983; D'Aoust, J.Y., 1987; Todd, L.S., y col. 1987; Flowers, R.S., y col. 1988; Ng, S.P., y col. 1996; Hanai, K., y col. 1997

Se homogeneizaron 25 g de muestra en 225 ml de caldo lactosa y se incubó 24 ± 2 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. (Fase de preenriquecimiento).

Se agitó la muestra tras la incubación y se transfirió 1 ml del caldo de preenriquecimiento a 10 ml de caldo tetrionato (TT) y 10 ml de caldo selenito cistina (SC). Se incubaron tanto el TT como el SC a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas.

Se agitaron los tubos después de la incubación, y se transfirió 1 ml de TT a 10 ml de caldo-M (MB) y 1 ml de SC a un segundo tubo de MB con 10 ml, se incubaron estos cultivos a $43 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 - 18 horas.

Se tomaron 0,5 ml de cada enriquecimiento y se mezclaron en un tubo limpio y estéril. Se colocó en un baño a 100°C durante 20 minutos.

Para el ensayo de ELISA se tomaron 100 μl para realizar el ensayo. Los tubos de MB se reservaron para confirmar los resultados positivos.

3.3.6.2. ELISA.

Se añadieron 100 μl de los caldos de cultivo y se colocaron por duplicado en las placas de ELISA. También se colocaron por duplicado los controles positivos y negativos. Se incubaron las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante unos 30 minutos.

Transcurrido este tiempo se lavaron las placas 3 veces y se añadieron 100 μl de conjugado. Se incubó a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante unos 30 minutos.

A continuación se lavaron las placas 6 veces, se les añadió 100 μl de sustrato y se mantuvieron a temperatura ambiente durante unos 30 minutos.

Se añadieron 100 μl de solución de frenado y se realizó la lectura con espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

3.3.6.3. Interpretación de resultados

El valor de absorbancia obtenido en el control negativo debía de ser menor o igual a 0,300.

El valor de absorbancia obtenido en el control positivo debía ser mayor o igual a 0,700.

Valor del punto de corte: Se calculó sumando 0,250 al valor del control negativo.

- Para las muestras:

Se interpretaron como negativos, es decir, ausencia de *Salmonella*, aquellos valores que resultaron menores que el valor de "punto de corte".

Los resultados mayores al valor del punto de corte, se interpretaron como positivos, por tanto presencia de *Salmonella* en la muestra. Los resultados positivos se confirmaron desde el caldo GN y sembrando en Hektoen entérico, XLD, y a SS. A continuación se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.1 de introducción.

3.3.7. Distribución de serotipos de *Salmonella*

El método de ensayo utilizado fue el descrito en el apartado 3.3.3 de este capítulo y se analizaron tanto harinas de soja como otras materias primas y piensos compuestos en los que se detectó presencia de *Salmonella*

3.3.8. Preparación de inóculos de *Salmonella*.

Se utilizó el método descrito para la preparación de inóculos a partir de cepas de la colección española de cultivos tipo de Berenguer Soler, J. y col, 1992; Diez, P. y col, 1994.

Se inoculó un matraz con agua de peptona con la cepa de *Salmonella* Typhimurium CECT 443 y se incubó a $37 \pm 1^\circ$ C durante, aproximadamente, 20 horas.

Se hizo un recuento en placas de PCA realizando un banco de diluciones con agua de peptona y sembrando de cada dilución 0,33 ml en cada una de ellas. Se incubaron las placas durante unas 24 horas a $37 \pm 1^\circ$ C. Una vez conocida la concentración de células por ml, se ajustó a la concentración deseada. Cuando el ajuste requirió diluir el cultivo, se utilizó el mismo medio de cultivo líquido en el que se inoculó; y cuando fue necesario concentrar, se centrifugó el cultivo resuspendiéndolo en una cantidad menor de medio

Una vez ajustado, se diluyó el cultivo en proporción 1/10 (1 ml cultivo + 9 ml diluyente) con la solución de glicerol salino o, indistintamente, con metilcelulosa (Anexo I). Se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos y se pasó el cultivo a un vaso de precipitados estéril.

Se mantuvo en agitación con un imán estéril y agitador magnético y se procedió a tomar alícuotas de 1 a 1,5 ml con micropipeta, dispensando en microtubos estériles con tapa,

convenientemente identificados. Se congelaron los tubos, bien cerrados, a -40° C. Se tuvo en cuenta que la agitación y la distribución en los microtubos fuese homogénea para evitar diferencias entre la concentración de células por ml. de distintos microtubos.

Se mantuvieron los tubos en congelación durante un tiempo mínimo de 1 mes. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar el recuento de, al menos, un 10% de los microtubos preparados. Cuando los recuentos obtenidos de distintos microtubos no presentaron grandes desviaciones con respecto a la media, se utilizó este valor para las inoculaciones. Cuando se produjeron grandes variaciones entre los distintos microtubos se hizo un recuento de cada uno de ellos antes de utilizarlos, ya que no era posible confiar en el valor medio.

3.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test de homogeneidad para muestras basadas en frecuencias del tipo presencia/ausencia denominado test de Mac Nemar (Siegel, 1956; Flowers, R.S., y col. 1987; Eckner, K.F., y col. 1987; Sachs L., 1988)

3.5. Resultados y discusión.

En todos los casos, se han analizado las mismas muestras por varios procedimientos para poder saber cual de los métodos presentaba mayor sensibilidad para el aislamiento de *Salmonella* en este tipo de productos.

TABLA 3. 1	
PRESENCIA DE <i>Salmonella</i>. PSBG - SBG	
PSBG	31 (510)
SBG	30 (510)
PSBG (+) SBG (-)	2 (510)
PSBG (-) SBG (+)	4 (510)
Dif. significativa	*
* No existen diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.	

La primera prueba realizada fue comparar si existían o no diferencias significativas entre un método con preenriquecimiento (PSBG) y uno sin él (SBG). Los resultados pueden observarse en la tabla 3.1. Se analizaron un total de 510 muestras, de las cuales 31 resultaron positivas utilizando PSBG (6,0%), mientras que con SBG fueron 30 (5,8%). En esta experiencia no se obtuvieron diferencias significativas entre SBG y PSBG para un α de 0,05 y se optó por la comparación con otro método de aislamiento ampliamente conocido como Rappaport Vassiliadis (RV), con incubaciones a 24 y a 48 horas. Los resultados pueden verse en la tabla 3.2. Comparando SBG con las distintas etapas de RV vemos que existen diferencias significativas entre los distintos métodos para $\alpha=0,05$ y 0,01. De 250 muestras analizadas, 25 de las muestras resultaron positivas a SBG y confirmadas posteriormente por el Centro Nacional de Referencia de Majadahonda (Madrid). Sin embargo con RV solamente resultaron positivas 18, lo que supone un 7,2% frente a un 10% en SBG. El medio SBG no proporcionó ningún falso negativo, mientras que con RV obtuvimos 15 muestras lo que indica un 6%. Es importante destacar el bajo número de muestras positivas recuperadas después de 24 horas de incubación en RV

TABLA 3. 2

PRESENCIA DE <i>Salmonella</i>. SBG-RV	
SBG	25 (250)
RV - 24 h	4 (250)***
RV - 48 h	8 (250)***
RV - 24+48 h	18 (250)***
SBG (+) RV 24 h (-)	15 (250)
SBG (+) RV 48 h (-)	15 (250)
SBG (-) RV 24 h (+)	0 (250)
SBG (-) RV 48 h (+)	0 (250)
Dif. significativa	**/**
** Existen diferencias significativas para un $\alpha = 0,01$.	
*** Existen diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.	

TABLA 3. 3

PRESENCIA DE <i>Salmonella</i>. ELISA - SBG	
ELISA	20 (93)
SBG	23 (93)
ELISA (+) SBG (-)	15 (93)
ELISA (-) SBG (+)	16 (93)
Dif. significativa	*
* No existen diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.	

En la tabla 3.3 pueden observarse los resultados obtenidos comparando un método inmunológico como el ELISA con un método microbiológico sin preenriquecimiento (SBG). En este caso no se encontraron diferencias significativas para un $\alpha=0,05$. El número de muestras que resultaron positivas con SBG fueron 23, del total (93) frente a 20 obtenidas por ELISA. Además ELISA proporcionó un falso negativo más que SBG.

En la tabla 3.4 pueden observarse los resultados obtenidos con 93 muestras que se analizaron tanto por SBG como por HDNA. El número de muestras que resultaron positivas por SBG fue de 26, lo que supone un 27,9% del total; por HDNA y confirmadas microbiológicamente se obtuvo el mismo

TABLA 3. 4	
PRESENCIA DE <i>Salmonella</i>. HDNA - SBG	
HDNA	26 (93)
SBG	26 (93)
HDNA (+) SBG (-)	2 (93)
HDNA (-) SBG (+)	12 (93)
Dif. significativa	***
*** Existen diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$.	

porcentaje de recuperación. Dos de las 93 muestras resultaron positivas por HDNA y confirmadas como tales, lo que supone un 2,15% de falsos negativos para la técnica de SBG. Sin embargo, 12 muestras que resultaron positivas a SBG no lo fueron con HDNA, y esto supone un 12,9% de falsos negativos para la técnica de hibridación. Este alto porcentaje de negativos por HDNA frente a SBG puede deberse a que el número de serotipos distintos de *Salmonella* aislados en este tipo de producto, es muy alto, y no todos ellos estén representados en las sondas utilizadas en aquel momento.

D'Aoust, J.Y., y col. (1983) comparan un método con preenriquecimiento en caldo nutritivo con un enriquecimiento selectivo en selenito cistina o caldo tetrationato para el aislamiento de *Salmonella* encontrando resultados similares a los nuestros (ver tabla 3.1). También Cox, y col, (1982 y 1983) presentan resultados como los encontrados en este estudio Otros autores como Gerichter, C.B. y Sechter, I.,(1966); Edel, W. y Kampelmacher, E.H., (1974) y Kafel, S., (1981) encuentran diferencias significativas entre uno y otro método aunque ninguno de ellos utiliza la harina de soja en sus experiencias. Con PSBG, según nuestros resultados, no aparecen diferencias significativas entre ambos métodos de análisis, pero se obtienen un 0,2% más de aislamientos positivos de *Salmonella* frente al SBG, pero el porcentaje es asumible teniendo en cuenta que el resultado se obtiene en 24 horas menos (gráfico 3. 1)

Flowers, R.S y col. (1986) realizaron un ensayo interlaboratorial utilizando distintos productos, entre los que se encontraba la harina de soja. Esta fue contaminada con *Salmonella* Typhimurium y *S. Blukwa* y se analizaron por BAM/AOAC y ELISA, no encontrándose diferencias significativas entre ambos métodos. En nuestros resultados tampoco se observan diferencias significativas, aunque el SBG es sensiblemente mejor ya que es capaz de poner de manifiesto un 3% más de muestras positivas que ELISA.

El método basado en RV presenta un pobre rendimiento con productos como harinas de soja, existiendo diferencias significativas tanto para un α de 0,05 como para 0,01, además se obtiene un 2,8% más de muestras positivas con SBG que con RV. Esto podría deberse a que el método recomienda el aislamiento selectivo en agar verde brillante (BGA) como único medio (Rappaport, F., y col.,1956; Van-Schothorst, M y Renaud, A.M.,1983; Vassiliadis, P.,1983; Beckers, J.H., y col.,1985; Kalapothaki, V., y col. 1986; Patil, M.D. y Parhad, N.M.,1986; Smedt De, J.M y Bolderdijk, R.F.,1987; Perales, I. y Audicana, A.,1989; Peter, M., y col.,1989) y es el tipo de placa que menor porcentaje de recuperación ha demostrado (Tabla 3. 5).

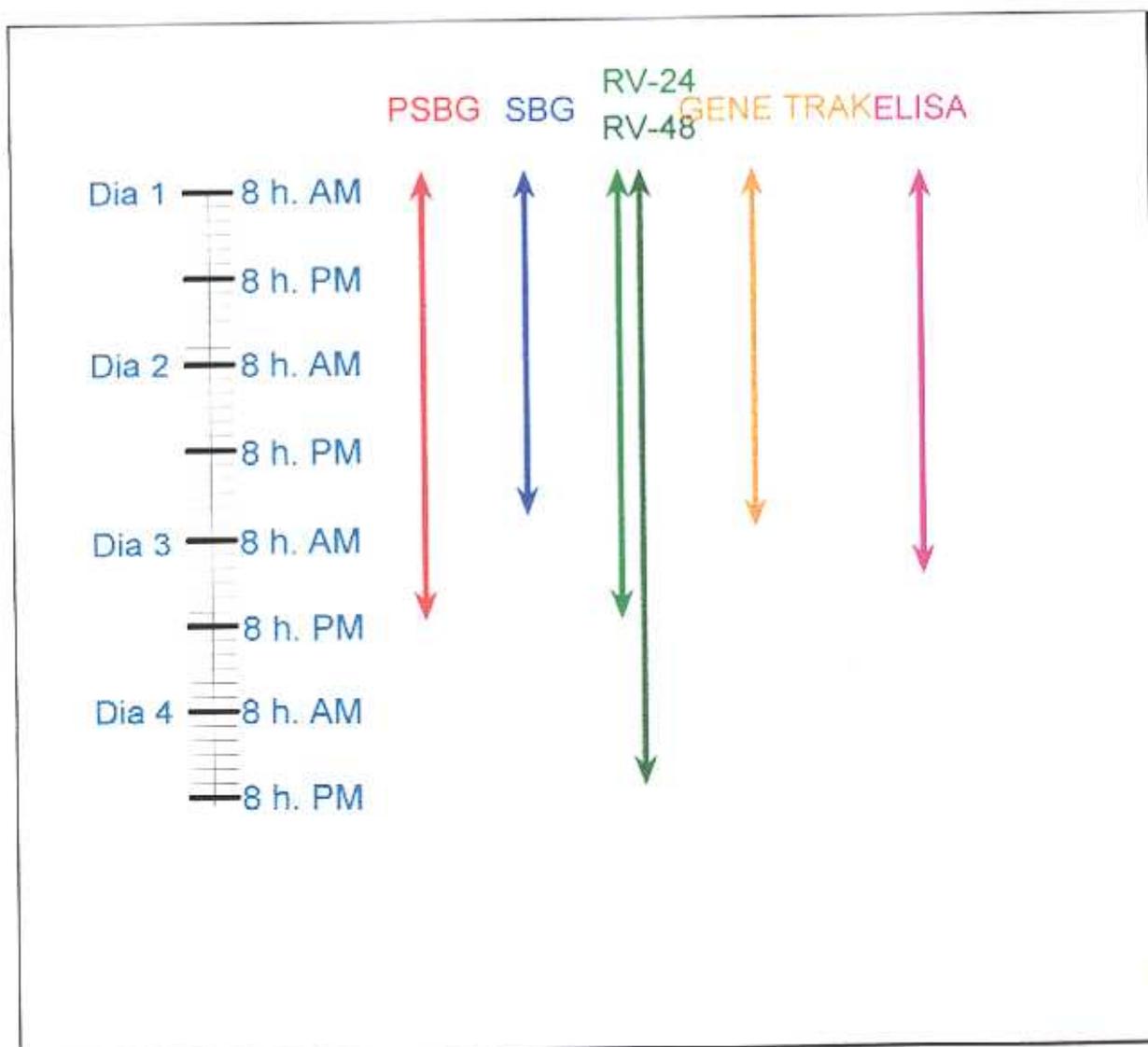
Otro punto que queríamos comprobar es el tiempo de respuesta de cada método, principalmente para muestras negativas. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de los laboratorios (salvo los que dependen de centros hospitalarios), mantienen un horario de 7 u 8 horas, generalmente continuadas y en ese tiempo hay que organizar los análisis ajustándose lo mejor posible a los tiempos de incubación, lo que supone 8 horas de trabajo y 16 horas de incubaciones mínimo. En el gráfico 3. 1 podemos comprobar la relación en el tiempo entre los métodos ensayados. En todos los casos, se ha tenido en cuenta solamente el tiempo necesario para la visualización de *Salmonella*, en placa en los análisis microbiológicos o la lectura por espectrofotómetro en el caso de HDNA o ELISA. Por tanto, a todos ellos hay que sumar, al menos 24 a 48 horas más para la confirmación bioquímica de la colonias sospechosas. Suponiendo que una materia prima resulte con ausencia de *Salmonella*, el tiempo mínimo para su utilización en un proceso de fabricación con garantías es de unas 50 horas si se utiliza el método de SBG. ELISA o HDNA, no necesitan tiempos mucho mayores pero suponen un coste mucho mayor y si se obtienen muestras positivas, su confirmación, lleva en el mejor de los caso otras 48 horas.

Existe gran cantidad de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *Salmonella* y siguiendo las recomendaciones de la FDA utilizamos 3 distintos en cada análisis,

mayores pero suponen un coste mucho mayor y si se obtienen muestras positivas, su confirmación, lleva en el mejor de los caso otras 48 horas.

Existe gran cantidad de medios de cultivo selectivos para el aislamiento de *Salmonella* y siguiendo las recomendaciones de la FDA utilizamos 3 distintos en cada análisis, XLD, BGA y SS. Se tomó una colonia de cada placa que resultó positiva a *Salmonella* y se envió al centro Nacional de Referencia de Majadahonda. Los serovares aislados en cada uno de ellos se encuentran en la tabla 3.5.

ESQUEMA 3.1: TIEMPO PARA LA REALIZACIÓN DE DISTINTOS ANÁLISIS DE *Salmonella*



NOTA: Tiempos mínimos para muestras negativas.

En agar SS se aislaron un total de 223 *Salmonella* (66,2%) siendo los serovares más frecuentes los mismos encontrados en XLD.

En BGA el número de *Salmonella* fue significativamente menor que en los otros dos medios selectivos, 144 (42,7%). Los serovares más frecuentes fueron Tilburg y Montevideo.

TABLA 3.5 DISPOSICIÓN DE SEROVARES EN DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVO SÓLIDO.

Serovares	XLD	SS	BGA
Agona	8	8	5
Anatum	7	8	5
Autoaglutinable	2	1	1
Bredeney	6	5	5
Cubana	4	4	2
Derby	12	13	4
Enteritidis	2	4	2
Grupo E4	4	4	2
Kentucky	5	7	4
Lexington	5	8	4
Llandoff	5	5	2
Mbandaka	8	7	6
Meleagridis	0	2	2
Monofásica	4	2	3
Montevideo	23	26	18
Newport	3	3	2
Nima	3	3	2
Ohio	6	4	1
Ridean	5	4	3
Senftenberg	5	8	4
Tennessee	14	12	7
Tilburg	31	63	53
Typhimurium	12	13	5
Virchow	5	5	1
Worthington	4	4	1

En XLD *S. Meleagridis* no se aisló en ninguna ocasión. En SS y en BGA solamente apareció en dos ocasiones. Como el número de muestras es tan bajo no se puede deducir que ese serotipo no aparezca nunca en este medio. Lo que sí se puede deducir de los resultados obtenidos es que hay cierta predisposición de algunas *Salmonella* por uno u otro medio de aislamiento. Por ejemplo, *S. Typhimurium* en SS se presenta en 13 ocasiones y en XLD en 12. En BGA tan solo se pudieron identificar 5, lo que supone un 61,5 % menos que en SS. Este dato, teniendo en cuenta la importancia de *S. Typhimurium*, es fundamental a la hora de seleccionar un medio sólido de aislamiento. Casos parecidos se pueden observar con *S. Virchow* en el que se producen un 80% menos de aislamientos en BGA, *S. Worthington* con un 75% o *S. Derby* en el que la reducción es de un 69,2%.

TABLA 3.6 SEROTIPOS AISLADOS POR DUPLICADO O TRIPLICADO EN UNA MISMA MUESTRA.

Mbandaka - Hadar	Derby - Ridean
Typhimurium - Derby	- Rissen
- Ohio	- Tennessee
- Taksony	Tilburg - Seftemberg
- Kentucky	- Monofásica
- Indiana	- Svedi
Enteritidis - Brazzaville	- Montevideo
Virchow - Derby	Llandoff - Give
- Infantis	- Ohio
Tennessee - Duesseldorf	Calabar - Meleagridis
- Livingston	
Monofásica – Ohio - Meleagridis	Montevideo - Rissen

23 muestras presentaron contaminación con más de un serovar de *Salmonella*.

Una de las muestras presentó tres serotipos distintos, es decir uno distinto en cada placa de aislamiento. Esto nos hace pensar que cuando se manda a serotipar cepas al centro de referencia, normalmente se aísla una colonia de una de las placas. ¿Solamente las harinas de soja presentan más de un serovar como queda demostrado en la tabla 3.6? Posiblemente no. Esto nos hace pensar en el BOE 292 del 5/12/92, y BOE 15 del 18/01/95 y en los boletines de la Organización de la Salud WHO1992; WHO1994b en los que solamente se tienen en cuenta la presencia de *S. Enteritidis* y

S. Typhimurium ya que en la tabla 3.6 vemos que aparecen éstos junto a otros serovares, teóricamente "poco importantes".

3.6. Conclusiones globales.

Las conclusiones generales a las que hemos llegado en este capítulo son:

- Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las consideraciones anteriormente expuestas podemos concluir que el método denominado SBG es lo suficientemente rápido y sensible para el aislamiento de Salmonella en este tipo de productos, proponiendo este método de aislamiento de Salmonella en harinas de soja.
- Para nosotros el método descrito por Rappaport Vassiliadis no actúa sobre harinas de soja con la misma sensibilidad descrita por otros autores para otros productos.
- El agar SS es el medio más sensible para la recuperación de Salmonella a partir de harina de soja.
- De los tres medios de aislamiento selectivos utilizados, el BGA se mostró como el menos sensible ya que en él se obtuvo el número más bajo de muestras positivas aisladas así como el menor número de serovares encontrados.
- Ha sido frecuente en nuestro estudio, encontrar más de una serovariedad de Salmonella en las muestras analizadas. Tanto S. Enteritidis como S. Typhimurium pueden encontrarse junto a otros serovares.
- Recomendamos por tanto:
 - * El uso de SBG como método de aislamiento de Salmonella en harinas de soja.
 - * Tres medios sólidos para el aislamiento (SS, XLD y BGA).
 - * El envío de, al menos, una cepa de Salmonella de cada placa en la que se aísle cuando se desee conocer el o los serovares que forman la contaminación de los productos.

CAPITULO 4

CÁLCULO DEL LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

4.1.- Antecedentes. Plan de trabajo.....	58
4.2.- Material y método.	58
4.2.1.- Medios de cultivo y diluyentes.	58
4.2.2.- Preparación del inóculo.....	58
4.2.3.- Cálculo del límite de detección	59
4.2.4.- Método de cuantificación de <i>Salmonella</i> en muestras naturalmente contaminadas.	60
4.2.5.- Estudio estadístico	60
4.3.- Resultados y discusión.	60
4.3.1.- Resultados del límite de detección.	60
4.4.- Conclusiones globales.	61
 GRAFICO 4.1 Esquema del cálculo del límite de detección.	 59
 TABLA 4.1 Cuantificación de <i>Salmonella</i> en muestras naturalmente contaminadas.....	 61

4. CÁLCULO DEL LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

4.1. Antecedentes. Plan de trabajo.

Cuando queremos saber si una muestra de alimento destinado al consumo animal está contaminada por un patógeno como *Salmonella*, se lleva a cabo un aislamiento y se determina su presencia o ausencia BOE del 17/02/88 (Anexo II).

Nos planteamos la necesidad de conocer qué número de *Salmonella* estaba presente en una muestra y saber cuál era el límite de detección de la técnica que queríamos utilizar.

Comprobamos que en la literatura había muchos autores que utilizaban el método del Número Más Probable (NMP) (Andrews, W.H. y Col, 1987; Dickson, J.S, 1989), pero nos parecía un método tedioso a la hora de verificar la presencia de *Salmonella* en cada tubo y con un límite de confianza muy alto para este tipo de analítica. Por ello recurrimos a otro método que describimos en el apartado 4.2.3 modificación de otro descrito por Cox, N.A. y Col 1982, que resultó más rápido y con un límite de detección de 10 ufc/g.

4.2. Material y método.

4.2.1. Medios de cultivo y diluyentes.

Los medios de cultivo y los reactivos se encuentran detallados en el anexo I.

4.2.2. Preparación del inóculo.

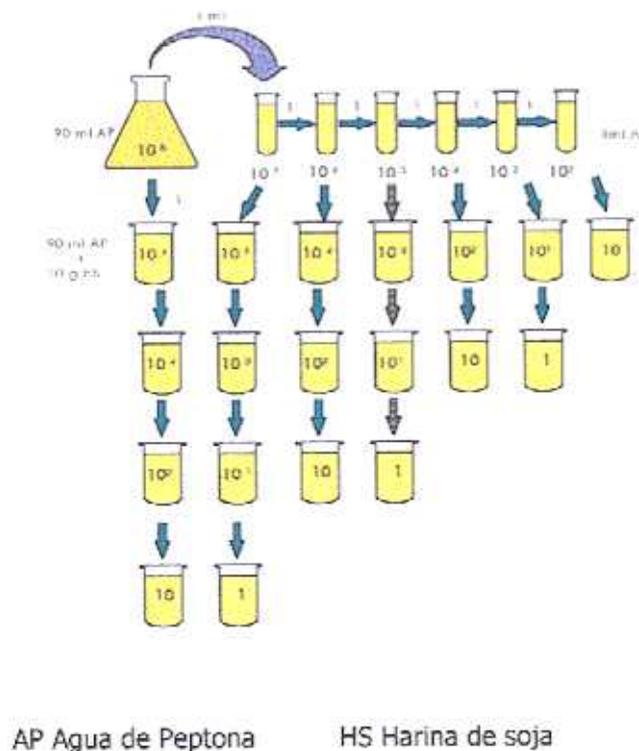
Se utilizó el método descrito para la preparación de inóculos a partir de cepas de la colección española de cultivos tipo de Berenguer Soler, J. y Calderón, V., 1992; Díez, P. y Calderón, V. 1992; Díez, P. y Col. 1994., incluido en el capítulo 3 de puesta a punto de metodología, aislamiento e identificación.

4.2.3. Cálculo del límite de detección

Se utilizaron inóculos de *Salmonella* Typhimurium (CECT 443) preparados según se describe en el capítulo 3.

Se tomó un vial de *Salmonella*, se dejó atemperar y se añadió a un matraz con 90 ml. de agua de peptona (AP) estéril y se incubó a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Pasado este tiempo se estima que la concentración de microorganismos alcanza valores entre 10^8 - 10^9 ufc/ml. (Berenguer Soler, J. y Calderón, V., 1992; Diez, P. y Calderón, V. 1992; Diez, P., Col. 1994.). Se realizó un banco de diluciones con tubos de AP con 9 ml. según se describe en el esquema del gráfico 4. 1. De cada uno de los tubos se realizaron siembras en matraces con 90 ml. de AP y 10 g de harina de soja. Finalmente de cada uno de ellos se sembraron en 3 placas de XLD con 0,33 ml. por triplicado, es decir 9 placas por matraz. Las placas se incubaron durante unas 24 horas en estufa de cultivo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

GRAFICO 4. 1 Esquema del cálculo del límite de detección.



4.2.4. Método de cuantificación de Salmonella en muestras naturalmente contaminadas.

De todas las harinas de soja, tanto tratadas como sin tratar, se tomaron 10 g de muestra y se añadieron a 90 ml. de agua de peptona. Se agitaron y se mantuvieron aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizó un banco de diluciones hasta alcanzar la 10^{-3} . Se sembraron 3 placas por dilución con 0,33 ml cada una. Se Incubaron durante aproximadamente 24 horas en estufa de cultivo a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se procedió a su recuento. Se verificaron, al menos, 3 colonias sospechosas por placa con Suero polivalente de Salmonella. La confirmación bioquímica se realizó con Enterotube II.

4.2.5. Estudio estadístico.

Para que los resultados obtenidos en los recuentos microbiológicos se ajusten a una distribución normal se utiliza una media geométrica (g) (Anónimo,1985; Ríos Castro, A.,1994)

Los parámetros analizados se han llevado a cabo con el paquete informático SAS (Siegel, S., 1956; SAS Institute Inc. 1985)

4.3. Resultados y discusión.

4.3.1. Resultados del límite de detección.

Los inóculos preparados fueron de $5,0 \times 10^8$ ufc/ml con un intervalo de $3,0 \times 10^8$ y $6,3 \times 10^8$ ufc como valor más probable.

En todos los ensayos, las siembras realizadas nos ofrecieron valores que estaban entre los intervalos marcados, por lo que se deduce que el límite de detección se sitúa en la primera dilución realizada, es decir, no podemos cuantificar valores por debajo de 10 ufc. Por ello, el valor asignado cuando no se obtiene crecimiento es de < 10 ufc/g.

Para las muestras naturalmente contaminadas se cuantificaron 30 muestras de harina de soja contaminadas con Salmonella. Los análisis, tanto el cuantitativo como el

cualitativo, se realizaron al mismo tiempo. Se descartaron los que resultaron con calificación de ausencia. De estas 30 muestras sólo 8 ofrecieron resultados mayores de 10 ufc/g (ver tabla 4.1), lo que indica que solamente el 26,66% de las muestras tiene valores cuantificables según nuestra técnica. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Brewer, D.G. y Col. 1977; D'Aoust, J.Y. y Col.1983; Andrews, W.H. y Ray, B.,1989) que sostienen que los niveles de patógenos en alimentos son muy bajos, mientras que la flora competitiva es muy alta.

TABLA 4.1 Cuantificación de Salmonella en muestras naturalmente contaminadas.

Número de cuantificación	log xi	Recuento ufc/g
Nº 2	1,30	20
Nº 7	1,48	30
Nº 11	2	100
Nº 16	1	10
Nº 19	1,30	20
Nº 27	1,48	30
Nº 28	1	10
Nº 30	1,60	40
$\bar{x} = 32,5$		
$g = 24,83$		

Blaser, M.J y Newman, L.S. (1982) estiman que el número de Salmonella en alimentos que han causado gastroenteritis obtienen recuentos similares a los nuestros.

4.4. Conclusiones globales.

- La metodología analítica aplicable a estos productos debe tener un alto grado de sensibilidad.
- Podemos concluir que la harina de soja tiene unos niveles de contaminación comparables con otros alimentos.
- El límite de detección del método descrito en este capítulo es de 10 ufc/g. Este método se ha aplicado al estudio del almacenamiento a distintas temperaturas, tanto en harinas de soja como en carne, pescado y crema pastelera. (Capítulos 5 y 6).

CAPITULO 5.

SUPERVIVENCIA DE *Salmonella* EN HARINAS DE SOJA SOMETIDAS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

5.1.- Antecedentes. Plan de trabajo.....	64
5.2.- Material y método.....	64
5.2.1.- Medios de cultivo y diluyentes.....	64
5.2.2.- Preparación del inóculo.....	64
5.2.3.- Método de análisis.....	65
5.2.4.- Análisis estadístico.....	66
5.3.- Resultados y discusión.....	66
5.4.- Conclusiones globales.....	74
GRÁFICO 5.1 Comparación tiempo/temperatura Ensayo I (HSST).....	68
GRÁFICO 5.2 Comparación tiempo/temperatura Ensayo II (HST).....	70
TABLA 5.1 Resultados obtenidos en HSST. (DE 0 A 48 HORAS).....	66
TABLA 5.2 Resultados obtenidos en HSST. (DE 8 A 256 DÍAS).....	67
TABLA 5.3 Resultados obtenidos en HST. (De 0 a 48 Horas).....	68
TABLA 5.4 Resultados obtenidos en HST. (De 8 a 256 días).....	69

5.SUPERVIVENCIA DE Salmonella EN HARINAS DE SOJA SOMETIDAS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

5.1. Antecedentes. Plan de trabajo.

Habíamos detectado que aparecían algunos productos de origen vegetal, como la harina de soja, con altos porcentajes de Salmonella. A priori, estas materias primas no presentan contaminación por este microorganismo. Cuando una muestra resultaba positiva, se guardaba para un posible análisis contradictorio. Cuando éste se realizaba, en la mayor parte de los casos, resultaba negativo.

A pesar de la extensa bibliografía referente a la toma de muestras (BOE número 121 de 2 de mayo de 1989) y muestreo (UNE 66-020-88), no hemos encontrado ninguna explicación clara sobre el modo de transporte más adecuado, ni el tipo de conservación que se ha de realizar para que la muestra se mantenga en las condiciones más óptimas o más próximas a la realidad.

Nos planteamos establecer cuál era el tiempo y la temperatura que nos permitiese realizar análisis que pusieran de manifiesto las características del producto que queremos analizar.

5.2. Material y método.

5.2.1. Medios de cultivo y diluyentes.

Los medios de cultivo y los reactivos se encuentran detallados en el anexo I.

5.2.2. Preparación del inóculo.

Se utilizó el descrito en el capítulo 4.

5.2.3. Método de análisis.

El ensayo se realizó con HSST y con HST. En ambos casos se había realizado un primer análisis según el método descrito en el Capítulo 3, para comprobar que la muestra se encontraba libre de Salmonella.

Se tomaron 500 g de HSST y 500 g de HST, y se colocaron en contenedores plásticos estériles para su inoculación con una suspensión de Salmonella previamente valorada para que la muestra final estuviera contaminada con valores entre 10^2 y 10^3 ufc/g, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el capítulo 4 (Cálculo del límite de detección y cuantificación en muestras naturalmente contaminadas)

El método de inoculación utilizado fue el siguiente:

La muestra se homogeneizó durante unos 15 minutos, se inoculó con la suspensión de Salmonella, y se volvió a homogeneizar la muestra otros 15 minutos. A continuación se repartió de 10 en 10 g. en bolsas de plástico. Estas se almacenaron a -80°C , -40°C , -18°C , 4°C y temperatura ambiente (20°C).

Como control, a tiempo 0 se realizaron 6 réplicas, ya que la temperatura en ese momento era la ambiente (aproximadamente 20°C).

Los recuentos se realizaron mediante diluciones decimales con agua de peptona hasta la dilución 1:1000 (10^{-3}).

Se tomaron 0,33 ml de cada dilución y se sembró por triplicado en placas de XLD. las placas se incubaron a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas. Se hizo la lectura de las placas y se confirmaron con suero polivalente de Salmonella.

Con las muestras almacenadas se realizó la misma experiencia a las 6, 12, 24 horas, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 días.

Además, a partir del día 8, las muestras se incubaron en SBG por si no presentaban crecimiento. De esta forma podríamos comprobar si Salmonella estaba destruida, dañada y no la recuperábamos, o bien si su número se encontraba por debajo del límite de detección.

5.2.4. Análisis estadístico.

Para que los resultados obtenidos en los recuentos microbiológicos se ajusten en una distribución estadística normal, desde un punto de vista estadístico, es preferible el uso de la media geométrica (g) (Ríos Castro, A. 1994). Por tanto como valores medios hemos utilizado ésta.

Para comparar los resultados hemos aplicado métodos de comparación de pendientes (Siegel, S., 1956; SAS Institute Inc. 1985)

5.3. Resultados y discusión.

TABLA 5.1 Resultados obtenidos en HSST. (De 0 a 48 horas)

	0 Horas	6 Horas	12 Horas	24 Horas	48 Horas	% ^c
20°C		205,23	123,02	119,72	65,42	-81,11
		57,65	17,44	8,16	12,47	
4° C		149,10	172,47	149,78	148,34	-57,18
		16,33	16,99	8,16	21,60	
-18° C	346,44 ^a	216,66	199,83	153,26	109,69	-68,34
	12,47 ^b	12,47	8,16	4,71	8,16	
-40° C		313,19	320,00	293,30	310,00	-10,52
		9,43	9,42	4,71	8,17	
-80°C		329,60	329,90	349,90	316,42	-8,79
		16,33	8,17	8,17	12,47	

^a Media geométrica

^b Desviación típica

^c % de disminución pasadas 48 horas.

TABLA 5.2 Resultados obtenidos en HSST. (De 8 a 256 días)

HSST	8 Días	16 Días	32 Días	64 Días	128 Días	256 Días	%
20° C	6,23 ^a	15,87	5 ^c	6,30	0 ^e	0 ^e	-100 ^c
	2,36 ^b	4,71	0	2,36	0	0	-100 ^d
4° C	109,70	12,60	5 ^c	2,92 ^g	1,71 ^f	2,92 ^h	-99,16
	8,16	4,71	0	1,89	1,89	1,89	-97,34
-18° C	89,62	59,43	6,29	10	18,17	5 ^c	-98,56
	8,16	8,16	2,35	6,23	8,16	0	-94,42
-40° C	329,71	289,88	302,85	283,06	196,61	189,49	-45,30
	14,14	8,16	17,00	12,47	4,71	14,14	-42,53
-80° C	326,23	292,83	296,19	275,89	216,31	209,84	-39,43
	17,00	17,00	17,00	20,55	12,47	8,16	-35,68

^a Media geométrica

^b Desviación típica

^c % de disminución entre la hora 0 y el día 256.

^d % de disminución entre el día 8 y el día 256.

^e Muestras enriquecidas con SBG y con recuentos menores de 10 ufc/g en todas las réplicas.

^f Una muestra con un valor de 10 ufc/g en los recuentos y el resto con valores < 10 ufc/g y enriquecidas en SBG con presencia de *Salmonella*.

^g Dos muestras con valores de 10 ufc/g en los recuentos y el resto con valores < 10 ufc/g y enriquecidas en SBG con presencia de *Salmonella*.

GRÁFICO 5.1 Comparación tiempo/temperatura. Ensayo I (HSST)

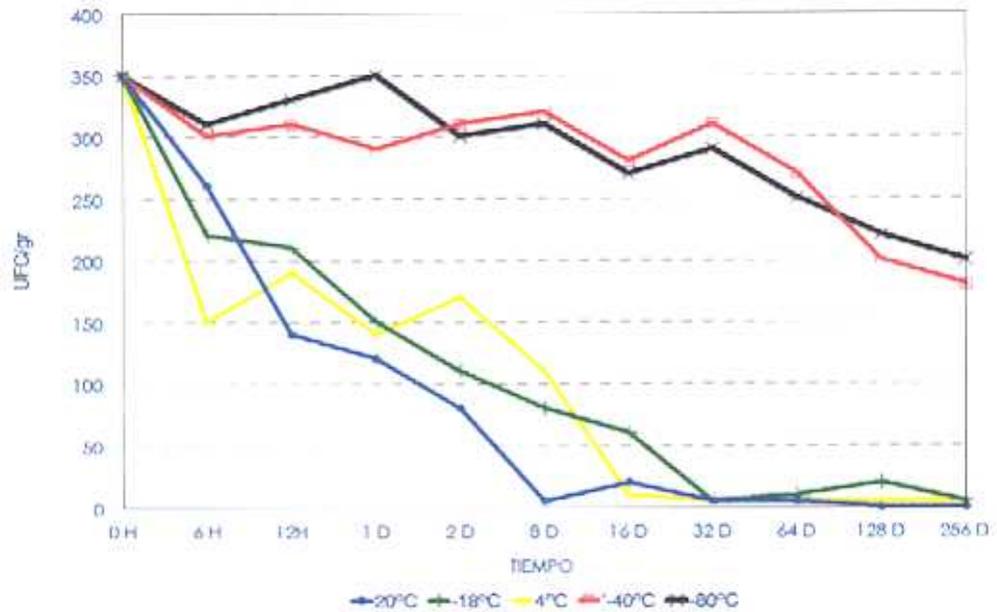


TABLA 5.3 Resultados obtenidos en HST. (De 0 a 48 horas)

HST	0 Horas	6 Horas	12 Horas	24 Horas	48 Horas	% ^c
20° C	229,42 ^a 16,33 ^b	189,82	118,17	69,52	54,29	- 76,34
		8,16	21,60	8,16	17,00	
4° C		179,81	166,19	139,04	118,88	- 48,18
		8,16	12,47	16,33	16,33	
-18° C		117,88	95,83	89,63	86,18	- 62,44
		10,27	12,47	8,16	9,43	
-40° C		212,97	198,88	212,97	182,92	- 20,27
		12,47	21,60	12,47	12,47	
-80° C		213,12	192,94	219,85	216,30	- 5,72
		9,43	14,47	8,16	12,47	

^a Media geométrica

^b Desviación típica

^c % de disminución respecto al inóculo inicial

TABLA 5.4 Resultados obtenidos en HST. (de 8 a 256 días)

HST	8 Días	16 Días	32 Días	64 Días	128 Días	256 Días	%
20° C	28,84 ^a	6,30	10,00	7,94	2,92 ^g	0,00	- 100,00 ^c
	8,16 ^b	2,36	0,00	2,36	1,89	0,00	- 100,00 ^d
4° C	49,32	10,00	6,30	2,92 ^g	5,00	2,92 ^g	- 94,08
	8,16	6,24	2,36	1,89	0,00	1,89	- 98,73
-18° C	65,42	26,21	7,94	7,94	2,92 ^g	0,00	- 100,00
	12,47	4,71	2,36	2,36	1,89	0,00	- 100,00
-40° C	196,45	156,39	148,34	155,77	132,76	112,66	- 42,65
	9,43	9,43	21,60	17,00	12,47	12,47	- 50,89
-80° C	212,97	186,24	175,44	132,76	112,66	122,72	-42,37
	12,47	12,47	20,55	12,47	12,47	12,47	- 46,51

^a Media geométrica

^b Desviación típica

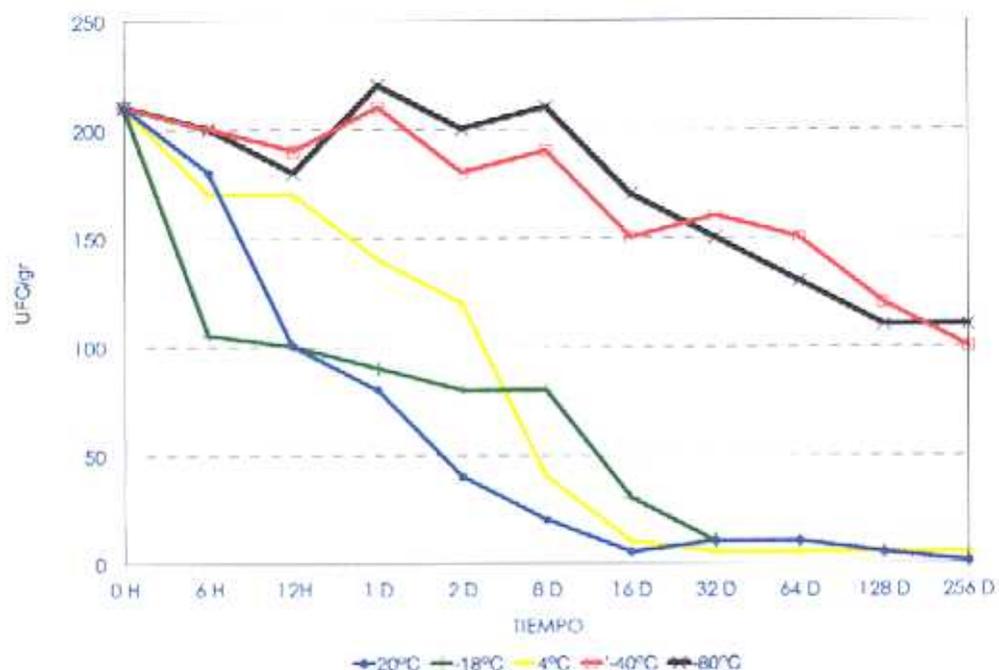
^c % de disminución respecto al inóculo inicial

^d % de disminución respecto al inóculo del octavo día

^e Una muestra con un valor de 10 ufc/g en los recuentos y el resto con valores < 10 ufc/g y enriquecidas en SBG con presencia de *Salmonella*

^f Dos muestras con valores de 10 ufc/g en los recuentos y el resto con valores < 10 ufc/g y enriquecidas en SBG con presencia de *Salmonella*

GRÁFICO 5.2 Comparación tiempo/temperatura. Ensayo II (HST)



Se llevaron a cabo dos tipos de evaluación con los datos obtenidos:

- Comparación de la disminución del número de *Salmonella* en la muestra utilizando distintas temperaturas de almacenamiento.
- Comparación de la disminución del número de *Salmonella* en los dos tipos de harinas de soja (HST y HSST) utilizando distintas temperaturas de almacenamiento.

Resultados obtenidos con HSST:

El valor teórico medio del inoculo fue de $3,46 \times 10^2$ ufc para la inoculación de HSST, oscilando entre $2,5 \times 10^2$ y $4,6 \times 10^2$ ufc, a tiempo 0. El cálculo se realizó sobre 9 determinaciones.

En las tablas 5.1 y 5.2 se exponen los resultados obtenidos en las harinas de soja sin tratar (HSST).

En la tabla 5.1. se reflejan los valores obtenidos en las primeras 48 horas. La reducción del inóculo más alto se produce manteniendo las muestras a 20° C con un resultado de -81,11%, lo que indica que la muestra contiene entre 4,91 y 8,7 x 10¹ ufc de Salmonella. Las muestras mantenidas a -18° C presentan también una fuerte disminución, superior a un 68%.

Esto indica la importancia de un análisis rápido una vez tomada la muestra. En caso de no ser posible, lo más recomendable es mantenerla en frío en nevera (entre 4 y 8°C).

En la tabla 5.2 vemos que después de pasar aproximadamente 1 mes, en las muestras mantenidas a 20° como las de 4° y las congeladas a -18°C, el recuento de Salmonella es prácticamente nulo. Las muestras marcadas como (5) son aquellas que resultaron negativas en el recuento, es decir, el resultado fue < 10 ufc/g y , por tanto, se enriquecieron para saber si el número de Salmonella se encontraba en el rango de 1 a 10, o si se habían dañado tanto que no podían ser detectadas salvo por enriquecimiento. En el caso de resultar positivas, es decir presencia de Salmonella, se les asignó un valor 5, para poder ser representadas, aunque el valor real es de <10. Si el resultado fue ausencia, se le dio valor 0. Las muestras a 20°C pasados 32 días resultaron negativas en el recuento y con presencia en el enriquecimiento, pero a los 128 y 256 días el resultado fue negativo en ambas.

En el gráfico 5.1 se muestran los resultados obtenidos de temperatura y tiempo de almacenamiento. Comparando las pendientes de las curvas vemos que existen dos tipos de rectas:

A.- El grupo correspondiente a las temperaturas de -40 y -80°C entre las que no existen diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

B.- El grupo formado por las temperaturas de 20, 4 y -18° C, entre las que tampoco existen diferencias significativas para el mismo nivel de significación.

Entre el primer y el segundo grupo existen diferencias significativas para niveles de confianza tanto del 95 como del 99%.

Resultados obtenidos con HST:

El valor teórico medio es de $2,29 \times 10^2$ ufc para la inoculación en HST, con un intervalo de seguridad entre $1,57 \times 10^2$ y $3,34 \times 10^2$.

En las tablas 5.3 y 5.4 se resumen los datos obtenidos referentes a temperatura y tiempo de almacenamiento para las harinas de soja tratadas (HST).

En la tabla 5.3 se recogen los resultados obtenidos durante las primeras 48 horas, período crítico debido a que puede ser el tiempo que se tarda en el envío de una muestra al laboratorio y el comienzo de su análisis. Pasado este tiempo, la temperatura de almacenamiento en la que menos Salmonella encontramos es la de temperatura ambiente (20° C), seguida de la de -18° C, en la que se pierde más del 60% del inóculo. A -40° C observamos que el número de Salmonella inicial se reduce solamente en un 20%.

En la tabla 5.4 tenemos los resultados para tiempos de almacenamiento entre 8 y 256 días para todas las temperaturas estudiadas. Podemos observar que en el día 16 a 20° C el resultado obtenido es < 10 ufc/g, que indica que sólo enriqueciendo la muestra hemos podido recuperarla. Las temperaturas de almacenamiento que tras 256 días resultaron negativas a la presencia de Salmonella son las de -18° y 20° C. Conservadas las muestras a 4° C, se mantiene aproximadamente un 6% del inóculo inicial, suponiendo unas 14 ufc/g. La temperatura de -40° C, en este período, se comporta de forma similar a la de -80° C.

Al igual que en gráfico 5.1 para la HSST, en el gráfico 5.2 podemos observar los resultados de cada temperatura respecto al tiempo de almacenaje, y de igual forma que en la HSST, al comparar las pendientes podemos establecer dos grupos entre los que existen diferencias significativas para $\alpha=0,05$ y $0,01$; uno de ellos formado por las temperaturas de -40 y -80° C y otro con las de 20 , 4 y -18° C.

Las muestras naturalmente contaminadas, como hemos visto en el Capítulo 4, tienen un número de Salmonella realmente bajo, lo que implica que si las muestras no se conservan adecuadamente, el resultado, normalmente, no podrá ajustarse a la realidad y en caso de ser necesaria su reconfirmación los resultados siempre serán contradictorios.

Las normas fijadas en el BOE aplicables al análisis microbiológico en alimentos para animales son las siguientes:

- BOE, número 168, de fecha 15 de julio de 1983. Real Decreto 1945/1983 de 22 de junio en el que se regulan las infracciones y sanciones en defensa del consumidor y de la producción agroalimentaria.
- BOE, número 41 de fecha 15 de febrero de 1988 sobre normas microbiológicas para productos destinados a la alimentación de los animales.
- BOE número 121 de fecha 22 de mayo de 1989. Orden Ministerial de 12 de mayo de 1989. Piensos. Métodos oficiales de toma de muestras de alimentos para animales.

En ninguno de ellos, se describe cual ha de ser la sistemática para el transporte y conservación de las muestras, limitándose a citar el **número de muestras que representan un muestreo** y el orden analítico de su realización. Estas normas ponen en evidencia a la Administración, siendo obvio que sin una normativa clara y definitiva pueden plantearse problemas legales en su interpretación. Un transporte y conservación inadecuada de las muestras puede producir resultados analíticos dispares, que tendrán especial importancia en aquellas muestras en las que sea necesario realizar un análisis contradictorio y dirimente.

5.4. Conclusiones globales

A la vista de los resultados obtenidos, podemos enumerar las siguientes conclusiones:

- La temperatura de almacenamiento de este tipo de productos ha de ser de -40°C , como máximo para evitar la destrucción de *Salmonella*.
- Si se sospecha que una muestra ha de conservarse para la realización de un análisis contradictorio se recomienda que sea almacenada a -40 ó -80°C .
- El envío al laboratorio debe realizarse lo más rápidamente posible. Si se realiza en las siguientes 6 horas, es suficiente que se lleve a cabo a temperatura ambiente, siempre que estemos en rangos próximos a 20°C . Si no se puede garantizar esta temperatura, o tiempo necesario para el envío de la muestra es de 24 horas, éste

- Antes de realizar su análisis nunca han de congelarse estos productos a -18° C(congeladores caseros).
- No se encuentran diferencias a lo largo del tiempo entre las harinas de soja tratadas (HST) y las harinas de soja sin tratar (HSST) a las temperaturas de almacenamiento utilizadas.
- Revisiones periódicas de las normas. Recomendamos la conveniencia de legislación, dada la falta de normativa respecto al transporte y conservación de muestras remitidas para su estudio, principalmente, teniendo en cuenta el bajo número de Salmonella presentes en muestras naturalmente contaminadas.
- Creación de comisiones de estudio entre la administración y el sector implicado.

CAPITULO 6.

SUPERVIVENCIA DE *Salmonella* EN ALIMENTOS SOMETIDAS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

6. Supervivencia de <i>Salmonella</i> en alimentos sometidas a distintas temperaturas de almacenamiento.	
6.1.- Antecedentes. Plan de trabajo.....	76
6.2.- Material y método.....	77
6.2.1.- Medios de cultivo y diluyentes.....	77
6.2.2.- Preparación del inóculo.....	77
6.2.3.- Método de análisis.	77
6.2.4.- Análisis estadístico.....	78
6.3.- Resultados y discusión.	79
6.4.- Conclusiones globales.	87
GRAFICO 6.1 Recuentos realizados sobre Carne Picada.....	80
GRAFICO 6.2 Curva de tendencia de <i>Salmonella</i> en carne picada respecto al tiempo y la temperatura de almacenamiento.....	80
GRAFICO 6.3 Recuentos realizados sobre gambas.....	82
GRAFICO 6.4 Curva de tendencia de <i>Salmonella</i> en gambas respecto al tiempo y la temperatura de almacenamiento.....	82
GRAFICO 6.5 Recuentos realizados sobre crema pastelera.....	84
GRAFICO 6.6 Curva de tendencia de <i>Salmonella</i> en crema pastelera respecto al tiempo y la temperatura de almacenamiento.....	84
TABLA 6.1 Resultados obtenidos sobre carne picada.	79
TABLA 6.2 Resultados obtenidos con gambas.....	81
TABLA 6.3 Resultados obtenidos con crema pastelera.....	83

6.- SUPERVIVENCIA DE Salmonella EN ALIMENTOS SOMETIDAS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO.

6.1.- Antecedentes. Plan de trabajo.

Al conocer los resultados en harinas de soja, nos planteamos conocer qué tiempo y temperaturas eran las adecuadas para almacenar alimentos que se recogen habitualmente en inspecciones sanitarias y se envían a los laboratorios para su análisis. Es práctica habitual el mantenimiento de la muestra en nevera (de 4 a 8°C) hasta su análisis, si se realiza durante las primeras 24 horas después de la recepción. Si el análisis se lleva a cabo después de este tiempo, como las muestras normalmente son perecederas, se guardan en congeladores caseros a unos -18°C. Además de saber si la muestra mantiene las mismas condiciones en que se tomó, queríamos establecer un protocolo a seguir en caso de que se necesite realizar un análisis contradictorio.

Como en el capítulo anterior, la bibliografía es extensa referente a la toma de muestras (BOE número 121 de 2 de mayo de 1989) y muestreo (UNE 66-020-88), pero no hemos encontrado ninguna explicación clara sobre el modo de transporte más adecuado, ni el tipo de conservación que se ha de realizar para que la muestra se mantenga en condiciones óptimas sin dañar a las Salmonella presentes.

Para ello, tomamos tres tipos de alimentos como representativos de aquellos vinculados a *toxiinfecciones alimentarias*, como son: la crema pastelera, la carne picada tipo hamburguesa y gambas. De esta forma podíamos establecer unos tiempos y temperaturas mínimas para cada grupo de productos.

6.2.- Material y método.

6.2.1.- Medios de cultivo y diluyentes.

Los medios de cultivo y los reactivos se encuentran detallados en el anexo I.

6.2.2.- Preparación del inóculo.

Se utilizó el método descrito en el capítulo 4.

6.2.3.- Método de análisis.

Se tomaron 500 g de crema pastelera, 500 g de carne picada y 500 g de gambas peladas.

En todos los casos se tomaron muestras y se realizó un análisis previo, siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 3, para comprobar que estaban libres de Salmonella.

Se colocaron en contenedores de plástico estériles y se les añadió un inóculo de Salmonella para que la muestra final estuviera contaminada con valores entre 10^2 y 10^3 ufc/g según los niveles determinados en el capítulo 4 (Blaser M. J. , Newman, L.S., 1982).

Todas las muestras se homogeneizaron, tras la inoculación, durante unos 15 minutos y se repartieron en bolsas de plástico a razón de unos 10 g. Estas se almacenaron a -80°C , -40°C , -18°C , 4°C y 20°C (temperatura ambiente).

Se cultivaron dos muestras de cada alimento para realizar el recuento de Salmonella a tiempo 0 con seis réplicas cada una.

Los recuentos se realizaron mediante diluciones decimales en agua de peptona hasta la dilución 1:1000 (10^{-3}).

Se tomaron 0,33 ml de cada dilución y se sembró por triplicado en placas de XLD. Las placas se incubaron a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 18-24 horas. Se realizó la lectura de las placas y se confirmaron con suero polivalente de Salmonella, al menos, tres colonias por placa, ya que se aislaban colonias en cultivo puro.

Con las muestras almacenadas se realizó la misma experiencia a las 24 horas, y los días 2, 8, 16 y 32 por triplicado en cada momento. Para las muestras almacenadas a 20°C solamente se pudieron realizar recuentos a las 24 y 48 horas y a 4°C a las 24 y 48 horas y los días 4 y 8, ya que la alteración de los productos era acusada.

6.2.4.- Análisis estadístico.

Para que los resultados obtenidos en los recuentos microbiológicos se ajusten a una distribución estadística normal, desde un punto de vista estadístico, es preferible el uso de la media geométrica (g) (Ríos Castro, A. 1994). Por tanto como valores medios hemos utilizado ésta.

Para comparar los resultados hemos aplicado métodos de comparación de pendientes. (Siegel, S., 1956; SAS Institute Inc. 1985).

6.3.- Resultados y discusión.

TABLA 6.1 Resultados obtenidos sobre carne picada.

	0 Horas	24 Horas	48 Horas	% ^(c)	8 Días	16 Días	32 Días	%
20° C		2,1 x 10 ³ 9,7	1,9 x 10 ² 7,3	-91,7	---	---	---	-91,7 ^(f)
4° C		2,4 x 10 ³ 11,7	9,5 x 10 ² 9,1	-58,7	1,3 x 10 ³ 11,4	---	---	-43,5 ^(f)
-18° C	2,3 x 10 ³ ^(a) 12,4 ^(b)	3,4 x 10 ³ 17,1	1,1 x 10 ¹ 7,0	-99,5	5 ^(d) 0	10 6,23	0 ^(e) 0	-100,0 ^(g) -100,0 ^(f)
-40° C		5,1 x 10 ² 19,8	5,7 x 10 ² 13,1	-75,2	5,3 x 10 ² 11,1	4,1 x 10 ² 9,8	4,0 x 10 ² 7,9	-29,8 ^(g) -82,6 ^(f)
-80° C		6,7 x 10 ² 7,8	7,1 x 10 ² 9,3	-69,1	6,9 x 10 ² 8,1	6,3 x 10 ² 7,1	6,4 x 10 ² 10,3	-9,9 ^(g) -72,2 ^(f)

^a Media geométrica (g)

^b Desviación típica

^c % de disminución de *Salmonella* pasadas 48 horas..

^d Muestras enriquecidas con SBG positivas y recuentos <10 ufc/g.

^e Muestras enriquecidas con SBG negativas y recuentos <10 ufc/g en todas las réplicas.

^f % de disminución de *Salmonella* entre el inicio y el fin del ensayo

^g % de disminución de *Salmonella* desde el día 8 al día 32.

GRAFICO 6.1 Recuentos realizados sobre carne picada

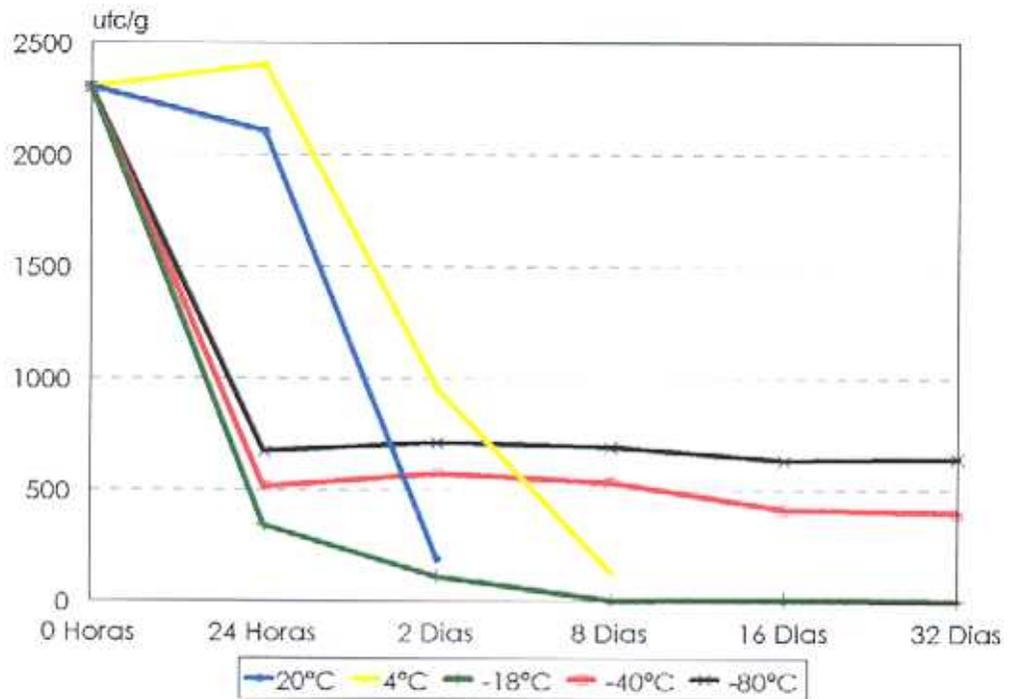


GRAFICO 6.2 Curva de tendencia de *Salmonella* en carne picada respecto al tiempo y la temperatura de almacenamiento.

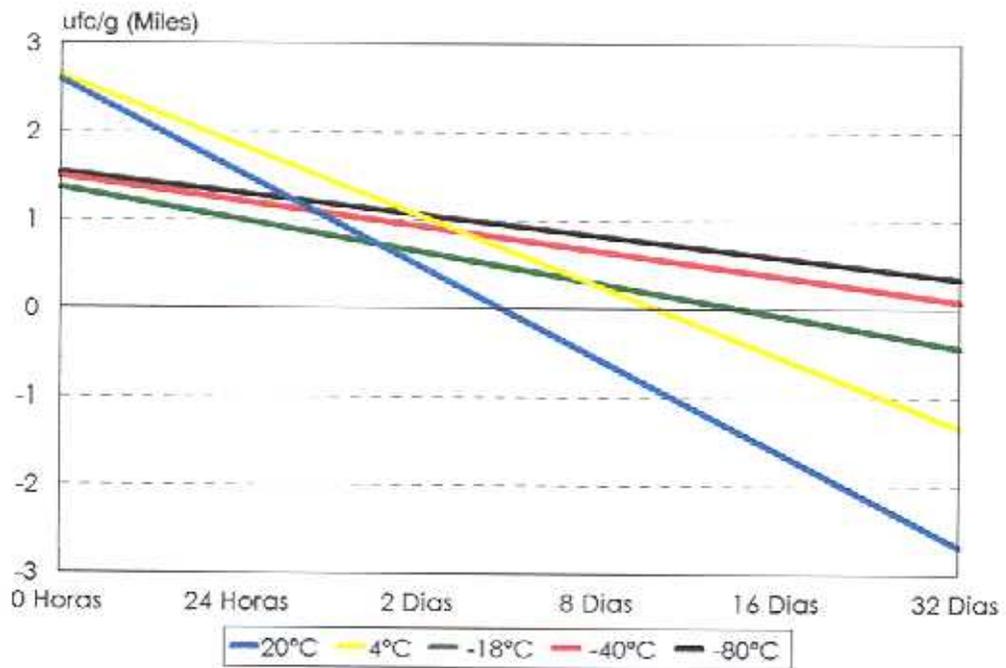


TABLA 6.2 Resultados obtenidos con gambas.

	0 Horas	24 horas	2 Días	% ^(c)	8 Días	16 Días	32 Días	%
20° C		2,0 x10 ³ 5,1	2,1 x10 ² 7,9	-90, 9	---	---	---	-90, 9 ^(f)
4° C		2,1 x10 ³ 8,7	2,0 x10 ³ 11,4	-13, 1	9,0 x10 ² 9,3	---	---	-60, 8 ^(f)
-18° C	2. 3 x 10 ³ ^(a) 12, 4 ^(b)	5,1 x10 ² 3,5	1,7 x10 ¹ 10,1	-99, 3	10 10	0 ^(e) 0	0 ^(e) 0	-100,0 ^(f) -100,0 ^(g)
-40° C		7,1 x10 ² 4,3	8,3 x10 ² 17,1	-63, 9	7,1 x10 ² 9,7	6,4 x10 ² 16,3	5,3 x10 ² 8,7	-25,4 ^(f) -76,9 ^(g)
-80° C		8,6 x10 ² 5,8	7,4 x10 ² 5,7	-6, 8	6,9 x10 ² 11,3	7,2 x10 ² 7,5	5,7 x10 ² 8,3	-17,4 ^(g) -70,0 ^(f)

^a Media geométrica (g)

^b Desviación típica

^c % de disminución de *Salmonella* pasadas 48 horas..

^d Muestras enriquecidas con SBG positivas y recuentos <10 ufc/g.

^e Muestras enriquecidas con SBG negativas y recuentos <10 ufc/g en todas las réplicas.

^f % de disminución de *Salmonella* entre el inicio y el fin del ensayo

^g % de disminución de *Salmonella* desde el día 8 al día 32.

GRAFICO 6.3 Recuentos realizados sobre gambas

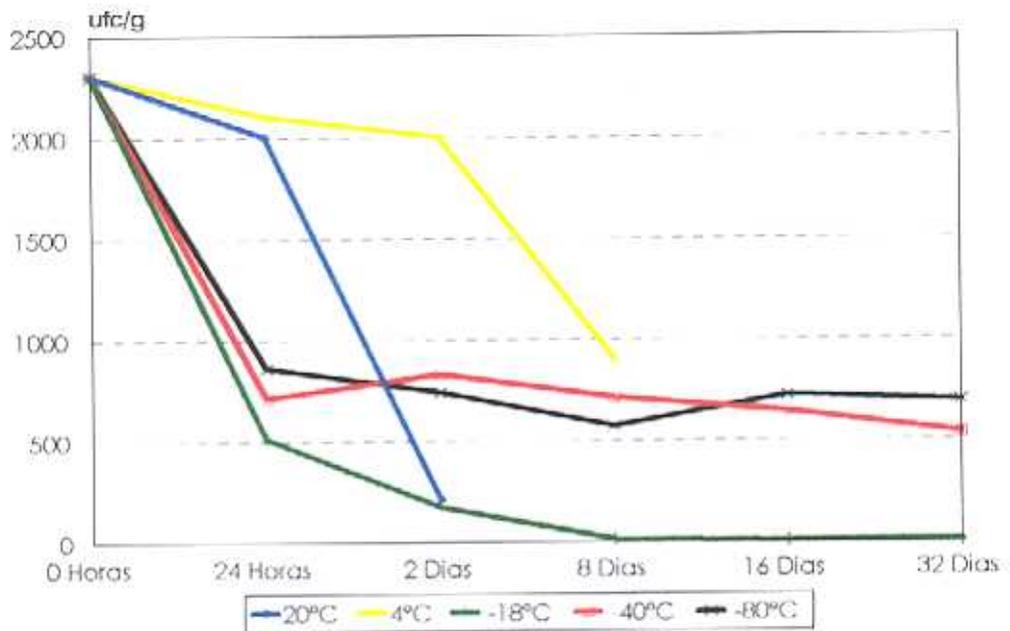


GRAFICO 6.4 Curva de tendencia de *Salmonella* en gambas respecto al tiempo y la temperatura de almacenamiento.

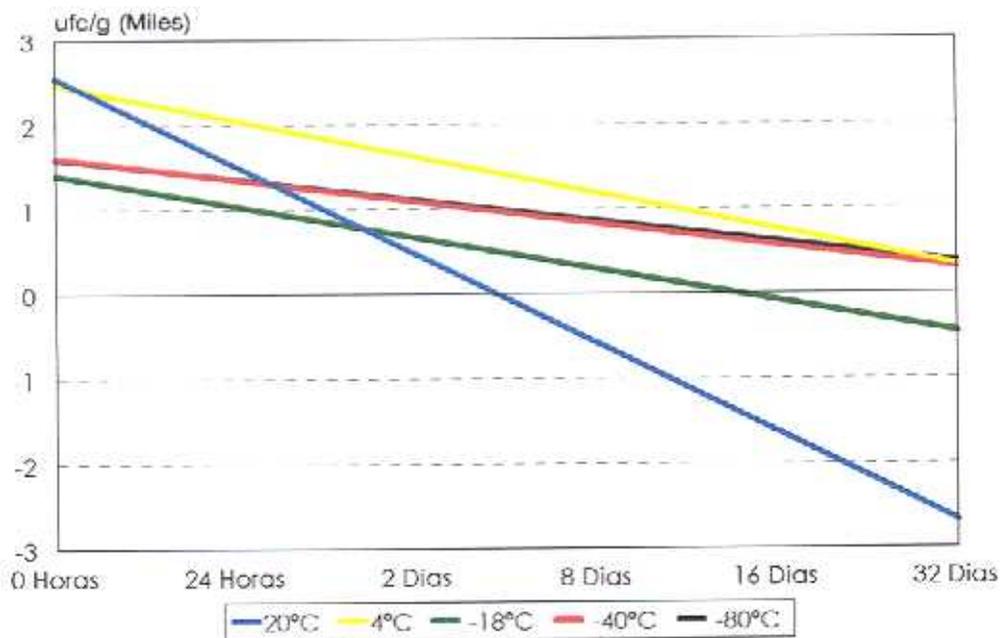


TABLA 6.3 Resultados obtenidos con crema pastelera.

	0 Horas	24 horas	2 Días	% ^(c)	8 Días	16 Días	32 Días	%
20° C		2,0 x10 ³ 6,3	2,5 x10 ² 6,9	-89, 1	---	---	---	-89, 1 ^(f)
4° C		2,0 x10 ³ 8,7	1,8 x10 ³ 9,6	-21, 7	1,0 x10 ³ 9,3	---	---	-56, 5 ^(f)
-18° C	2. 3 x 10 ³ ^(a) 12, 4 ^(b)	6,1 x10 ² 11,5	3,3 x10 ² 8,1	-85, 65	5 1, 2	0 ^(e) 0	0 ^(e) 0	-100, 0 ^(f) -100, 0 ^(g)
-40° C		1,1 x10 ³ 8,8	9,7 x10 ² 5,8	-57, 8	9,3 x10 ² 11,6	7,6 x10 ² 10,9	6, 5 x10 ² 12,7	-33, 0 ^(g) -71, 7 ^(f)
-80° C		2, 1 x10 ¹ 11,8	1,9 x10 ³ 0,7	-17, 4	1,9 x10 ³ 2,3	9,2 x10 ² 9,5	7,7 x10 ² 10,3	-59, 5 ^(g) -66, 5 ^(f)

^a Media geométrica (g)

^b Desviación típica

^c % de disminución de *Salmonella* pasadas 48 horas..

^d Muestras enriquecidas con SBG positivas y recuentos <10 ufc/g.

^e Muestras enriquecidas con SBG negativas y recuentos <10 ufc/g en todas las réplicas.

^f % de disminución de *Salmonella* entre el inicio y el fin del ensayo

^g % de disminución de *Salmonella* desde el día 8 al día 32.

GRAFICO 6.5 Recuentos realizados sobre crema pastelera

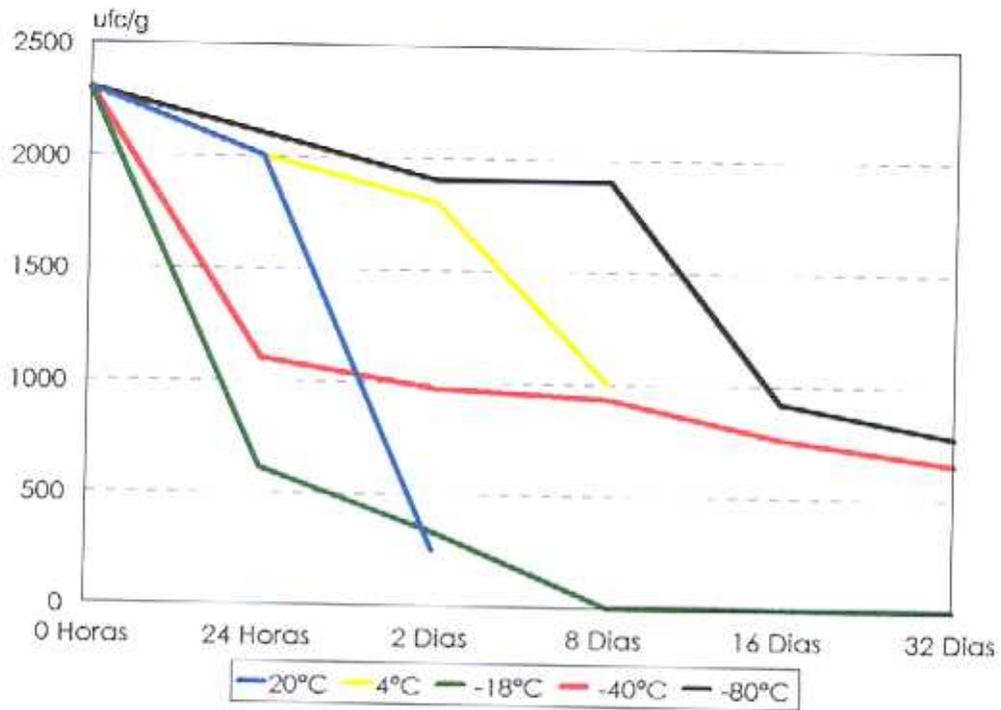
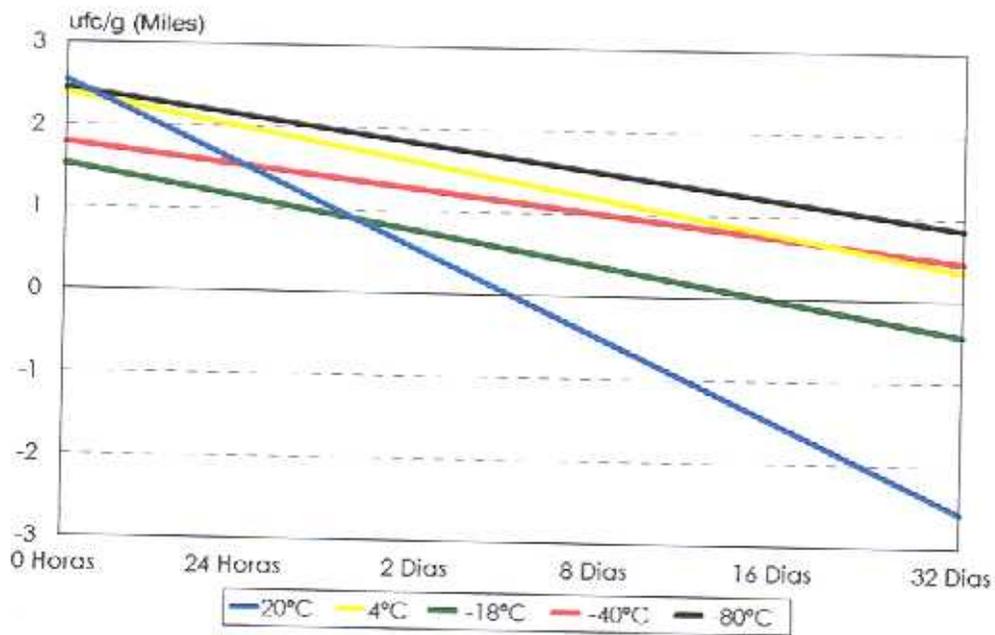


GRAFICO 6.6 Curva de tendencia de *Salmonella* en crema pastelera respecto al tiempo y la temperatura de almacenamiento.



Se llevaron a cabo dos tipos de evaluación con los datos obtenidos:

- Comparación de la disminución del número de Salmonella en la muestra utilizando distintas temperaturas de almacenamiento.
- Comparación de la disminución del número de Salmonella utilizando distintas matrices, carne picada, gambas y crema pastelera a distintas temperaturas de almacenamiento.

El valor teórico medio del inóculo utilizado fue de $2,30 \times 10^3$ ufc, oscilando entre $1,7 \times 10^3$ y $3,1 \times 10^3$ ufc.

En las tablas 6.1, 6.2 y 6.3 se exponen los resultados obtenidos sobre carne picada, gambas y crema pastelera. Durante las primeras 24 horas, después de la inoculación con Salmonella, se produce la reducción más brusca, principalmente en carne picada y gambas.

Los tres productos son perecederos y por tanto, no pueden realizarse almacenamientos de los productos hasta el 8º día sin que se alteren. A 4°C pueden almacenarse hasta el 8º día, esta temperatura ha proporcionado resultados sorprendentes, ya que en productos como las gambas se mantuvo la concentración inicial de Salmonella mejor que a temperaturas de congelación de -40 e incluso -80°C. Para cuando sean necesarios periodos superiores a 8 días sólo debe confiarse en estas temperaturas de congelación.

Las temperaturas de -18°C, el almacenamiento de estos productos para su análisis posterior, resultó fatal ya que disminuye el inóculo de Salmonella entre un 85,6% para la crema pastelera y 99,3 y un 99,5% para gambas y carne picada en tan sólo 48 horas.

En las gráficas 6.2, 6.4 y 6.6, podemos comparar las pendientes de las curvas, y dado que algunos productos no han podido ser analizados a temperatura ambiente (20°C) y a 4°C más de 8 días, haremos la comparación de las pendientes en dos grupos:

- Del día 0 al 8

- Del día 0 al 32.

Para carne picada (Tabla 6. 1, gráficos 6.2 y 6.3):

- ◆ Del día 0 al 8. Encontramos tres grupos entre los que existen diferencias significativas para un α de 0,01 y 0,05 y no aparecen dentro de ellos:
 - 20°C
 - 4 y -18°C
 - -40 y -80°C
- ◆ Del día 0 al 32. Encontramos tres grupos entre los que existen diferencias significativas para un α de 0,01 y 0,05 y no aparecen dentro de ellos:
 - -18°C
 - 4 y 20°C
 - -40 y -80°C

Para gambas (Tabla 6.2, gráficos 6.4 y 6.5):

- ◆ Del día 0 al 8. Encontramos tres grupos entre los que existen diferencias significativas para un α de 0,01 y 0,05 y no aparecen dentro de ellos:
 - -18°C
 - 20°C
 - 4, -40 y -80°C
- ◆ Del día 0 al 32. Encontramos tres grupos entre los que existen diferencias significativas para un α de 0,01 y 0,05 y no aparecen dentro de ellos:
 - -18°C
 - 20°C
 - 4, -40 y -80°C

Para crema pastelera (Tabla 6.3, gráficos 6.5 y 6.6):

- ◆ Del día 0 al 8. Encontramos cuatro grupos entre los que existen diferencias significativas para un α de 0,01 y 0,05 y no aparecen dentro de ellos:
 - -18°C
 - 20°C
 - 4, -40° C
 - -80°C
- ◆ Del día 0 al 32. Encontramos tres grupos entre los que existen diferencias significativas para un α de 0,01 y 0,05 y no aparecen dentro de ellos:
 - -18 y 20°C
 - 4°C
 - -40 y -80°C

Tal y como comentábamos en el capítulo 5, la toma de muestras se lleva a cabo basándose en el BOE número 11 R. D. 1945/1983 de 22 de junio. Aunque en este caso existen normas de realización de análisis mediante la UNE o ISO correspondiente, en ninguna de éstas se indica la temperatura óptima de almacenamiento ni el método de transporte de las muestras hasta el laboratorio. Como observamos en los resultados, es muy importante el tiempo transcurrido desde la toma de muestra hasta su análisis, mucho más si es necesario realizar análisis contradictorio y la temperatura de conservación de la misma.

6.4.- Conclusiones globales.

Las conclusiones principales de este capítulo son:

En las muestras tomadas de alimentos para análisis de *Salmonella*, se debe tener en cuenta:

- Si el análisis se lleva a cabo durante las primeras 48 horas, el almacenamiento ha de realizarse:
 - Para los tres productos la temperatura preferente es la de 4°C, e incluso puede utilizarse la temperatura ambiente (próxima a los 20°C).
- Si el análisis ha de realizarse después de las primeras 48 horas:
 - El almacenamiento ha de realizarse a -40 y si es posible a -80°C.
- **En ningún caso ha de utilizarse la temperatura de -18°C (congeladores caseros).**

CAPITULO 7.

BÚSQUEDA DE INHIBIDORES EN LA HARINA DE SOJA.

7.- Búsqueda de inhibidores en la harina de soja.....	90
7.1.- Antecedentes. Plan de trabajo	90
7.2.- Material y método. Presencia de residuos químicos.....	91
7.2.1.- Cuantificación de hexano en la harina de soja tratada.....	91
7.2.2.- Extracción y concentración..	91
7.2.3.- Condiciones cromatográficas.....	91
7.2.4.- Cuantificación de residuos...	92
7.2.5.- Resultados.	92
7.2.5.1.- Cromatogramas	93
7.3.- Material necesario para la realización del test de inhibidores.....	94
7.3.1.- Delvotest (Gist-Brocades) y con BR TEST	94
7.3.1.1.- Preparación de la muestra.....	95
7.3.1.2.- Preparación de las placas con <i>Salmonella Typhimurium</i>	95
7.3.1.3.- Preparación de las placas con <i>B. stearothermophilus</i>	95
7.3.1.4.- Lectura de los resultados.	95
7.4.- Resultados y discusión	96
7.5. - Conclusiones globales	97
 TABLA 7.I Resultados obtenidos sobre muestras de harina de soja.	 92

7. Búsqueda de inhibidores en la harina de soja

7.1. Antecedentes. Plan de trabajo

Debido a que encontrábamos Salmonella en distinta proporción en las harinas de soja tratadas (HST) y en las harinas de soja sin tratar (HSST), pensamos que el proceso de fabricación de ambos productos tendría un papel importante en este sentido.

Durante el procesamiento de la HST se utiliza un disolvente químico, generalmente hexano, para extraer el aceite del haba de soja. El disolvente se separa de los flóculos extraídos mediante un aparato conocido con el nombre de DT (disolventizador/tostador). El DT alcanza temperaturas de vapor entre 71 y 82°C. Mientras que en las HSST, no se utiliza ningún tipo de extractor de grasa.

Se tomaron un total de 14 muestras de HST y se analizaron para conocer si el nivel de solventes utilizados durante su fabricación permanecían en el producto. Se realizó mediante cromatografía de gases con sistema de inyección por purga y trampa y detector de ionización de llama (FID), y cuantificación con patrón externo.

También se llevó a cabo la determinación biológica para detectar la presencia de inhibidores analizándose un total de 24 muestras de HST y HSST mediante ensayos microbiológicos basados en el crecimiento o no de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, mediante dos tipos de pruebas comerciales. Paralelamente, se realizó una prueba de inhibición utilizándose como cepa indicadora *Salmonella Typhimurium* CECT 443, especie utilizada en todos los ensayos de este trabajo.

7.2. Material y método. Presencia de residuos químicos.

7.2.1. Cuantificación de hexano en la harina de soja tratada.

Dado que el disolvente residual en la harina no debe exceder de 600 ppm según Woerfel. J.B.,1992, utilizamos para la cuantificación de hexano y otros residuos en las muestras los métodos recomendados por la AOAC y la EPA para la cuantificación de residuos químicos orgánicos.(Métodos EPA: SW-846, Método 8280 y 613; Horwitz, W. y otros, 1980; Pesticide analytical manual, volumen I -II)

7.2.2. Extracción y concentración.

Se tomó 0,5 g de muestra y se calentó a 100°C durante 2 minutos en el portamuestras. Pasado este tiempo, se aplicó un flujo de 60 ml/minuto de N₂ durante 15 minutos para recoger el hexano en la trampa.

La temperatura de desorción de la trampa fue de 100°C y el tiempo de desorción utilizado de 2 minutos con un flujo de 60 ml/minutos.

7.2.3. Condiciones cromatográficas.

Cromatógrafo: GC Shimadzu 14-A

Columna SPB-1 de 30 m. de longitud y 0,25 mm de diámetro interno con 0,25 µm de espesor de película.

Detector FID (flame ionization detector).

Temperatura del horno: 35°C

Temperatura del inyector: 125°C

Temperatura del detector: 150°C

Gas portador: N₂

Flujo: 0,8 ml/minuto.

7.2.4. Cuantificación de residuos.

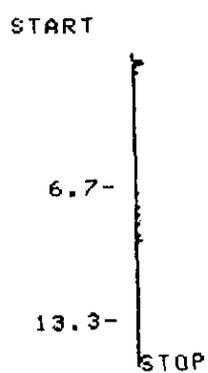
La cuantificación de residuos de hexano se realizó mediante una recta de calibración con patrón externo.

7.2.5. Resultados.

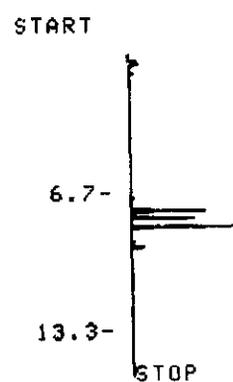
TABLA 7.1 Resultados obtenidos sobre muestras de harina de soja.

Nº de muestra	Resultado($\mu\text{g}/\text{Kg.}$)
1	21,3
2	<0,1
3	<0,1
4	1,5
5	<0,1
6	1,5
7	<0,1
8	<0,1
9	<0,1
10	<0,1
11	<0,1
12	0,1
13	<0,1
14	0,2

7.2.5.1. Cromatogramas



Cromatograma con valor considerado de $< 0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$.



Cromatograma con $20 \mu\text{g}/\text{kg}$.



Cromatograma con $200 \mu\text{g}/\text{kg}$.

7.3. Material necesario para la realización de la prueba de inhibidores.

Para los ensayos se tomaron 11 muestras de harina de soja tratada (HST) y 11 muestras de harina de soja sin tratar (HSST), además de dos muestras de las harinas utilizadas en el estudio de prevalencia. (Ver Capítulo 7).

Los medios de cultivo y los reactivos se encuentran detallados en el anexo I.

7.3.1. Delvotest (Gist-Brocades) y con BR TEST

El principio de la prueba consiste en la utilización de esporas de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953. Este microorganismo es sensible a gran cantidad de inhibidores microbianos. La germinación de la spora, con los nutrientes y la temperatura adecuados, forma un medio ácido que hace virar el indicador del medio. Si la muestra contiene algún tipo de inhibidor, no se multiplica el bacilo y por tanto no se produce ácido y el medio se mantiene del color original (púrpura).

El material que se utilizó fue el recomendado por la casa comercial:

- Ampollas con *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*: el bacilo se encuentra en forma esporulada estabilizada. Las esporas no pasan a la fase vegetativa hasta no haberse añadido la pastilla nutritiva al medio de cultivo y la temperatura alcance y se mantenga a 64°C.
- Tabletas nutritivas
- Micropipeta de volumen variable.
- Puntas de pipeta estériles
- Placas de ELISA estériles.
- *Salmonella* Typhimurium (CECT 443)
- La descripción y preparación de los medios de cultivo se encuentran en el Anexo I
- Púrpura de Bromocresol al 0,04% (DIFCO):
- PBS salino al 1% (Saco, M.; M.A. Díaz y A. San Gabriel. 1986M; Tschape. H, 1996)
- Agua peptonada.
- Control negativo: se llevará en paralelo una ampolla marcada con CN, y se añadirá 0,1 del control negativo estándar proporcionado por la casa comercial.

7.3.1.1. Preparación de la muestra.

Se pesó 1 g de harina de soja en 10 ml de PBS al 1% y se mantuvo 2 horas en agitación. A continuación se centrifugó durante 2 minutos a 2000 r.p.m. El sobrenadante se filtró con un poro de 0,22 μm , y se tomaron 100 μl para la realización de la prueba.

7.3.1.2. Preparación de las placas con Salmonella Typhimurium

Se tomó un vial de Salmonella Typhimurium (CECT 443) y se inoculó en un matraz con 10 ml de agua de peptona. Se incubó durante unas 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A continuación se centrifugó durante 2 minutos a 2000 r.p.m. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se disolvió de forma aséptica en cabina de flujo laminar, con 2 ml de la solución de púrpura de bromocresol al 0,04%. Se mantuvo en agitación 2 minutos y se tomaron 100 μl y se añadieron a los pocillos necesarios.

El resto de la prueba se llevó a cabo igual que para el caso de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*

7.3.1.3. Preparación de las placas con *B. stearothermophilus*.

Se tomó una ampolla por cada muestra a probar y se le añadió una tableta nutritiva y 0,1 ml de la muestra problema.

Se incubaron las ampollas utilizadas en un "baño maría" a $64 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

7.3.1.4. Lectura e interpretación de los resultados.

Después de 2 ½ horas, se comprobó el color de las ampollas, y se utilizó el mismo sistema tanto para Salmonella como para *B. stearothermophilus* :

- Muestras Negativas (-): Color amarillo, no contienen ningún residuo de sustancias inhibidoras.
- Muestras Positivas (+): Color púrpura, contiene residuos de sustancias inhibidoras.

7.4. Resultados y discusión

Según Woerfel, J.B.,1992, el hexano residual en la harina de soja no debe exceder de 600 ppm, aunque recomienda que no pase de 200 ppm. En la tabla 7. 1 puede observarse que ninguna de las muestras analizadas contiene estos niveles, muy al contrario, los datos indican que prácticamente la totalidad de los solventes utilizados se ha volatilizado. Por ello podríamos concluir que éste no era el factor limitante para que en la soja tratada el número de muestras positivas a Salmonella fuese menor a la de HSST. Por tanto, sólo nos quedaba estudiar si existían o no otro tipo de inhibidores.

Las pruebas microbiológicas para ver presencia de inhibidores están destinadas, fundamentalmente, a muestras de leche y/o huevos. La sensibilidad es muy alta aunque la especificidad no lo es. Por eso, aunque estas pruebas no están diseñadas específicamente para harinas de soja, pensamos que si existía cualquier tipo de inhibición podríamos ponerla de manifiesto.

También se realizaron los mismos ensayos con Salmonella Typhimurium (G-) por si había diferencias con el Bacillus stearothermophilus (G+).

En ninguna de las pruebas utilizadas (BR test y Delvotest) encontramos presencia de ningún residuo inhibidor, tampoco se aprecia diferencias respecto al microorganismo utilizado.

7.5. Conclusiones globales

Por todo esto, el hecho de que haya mayor porcentaje de muestras de HSST con presencia de Salmonella que en las HST, no depende de la presencia de inhibidores en las harinas de soja.

Como conclusión final, se puede decir que la destrucción o no contaminación en las HST se debe a factores distintos y no a la presencia de ningún tipo de sustancias inhibidoras de la propia harina de soja.

CAPITULO 8

PREVALENCIA DE *Salmonella* EN HARINA DE SOJA.

8.- PREVALENCIA DE *Salmonella* EN HARINA DE SOJA.

8.1.- Antecedentes. Plan de trabajo.....	99
8.2.-Material y método.	99
8.2.1.- Medios de cultivo y reactivos.	99
8.2.2.- Muestras utilizadas.	100
8.2.3.- Método de ensayo.	100
8.2.4.- Análisis estadístico.....	100
8.3. Resultados y discusión.	101
Resultados estadísticos para los años 1990 - 1996.....	102
Resultados estadísticos para los años 1990 - 1996 por tratamientos (HST y HSST). ..	103
Resultados estadísticos para los años 1990 - 1996 por áreas geográficas.	104
Resultados estadísticos para los años 1990 - 1996 por estaciones.	105
Presencia de <i>Salmonella</i> en HST (1990-1996) GRÁFICO 8.27.....	106
Presencia de <i>Salmonella</i> en HSST (1990-1996) GRÁFICO 8.28.	107
Serotipos aislados con mayor frecuencia entre 1990 - 1996.	107
8.4. - Conclusiones globales.....	109

8. PREVALENCIA DE Salmonella EN HARINA DE SOJA.

8.1. Antecedentes. Plan de trabajo.

Salmonella es un patógeno que obligatoriamente debe controlarse en productos destinados a la alimentación de los animales según se describe en el BOE nº 41 del 17 de Febrero de 1988 (ver Anexo II). La creencia general es que las materias primas utilizadas en la fabricación de piensos compuestos más "peligrosas", desde el punto de vista de este microorganismo, son las de origen animal (harinas de carne, huesos, sangre y pescado), aunque teníamos datos que resultaban contradictorios con esta afirmación.

La incorporación de soja para la elaboración de piensos compuestos para los animales se viene realizando desde principio de siglo (ver capítulo 1). En España la utilización de esta materia prima depende de importaciones de otros países, ya que el cultivo de la soja en nuestro país es meramente testimonial.

Entre enero de 1990 y diciembre de 1996 se han analizado, para este trabajo, un total de 4.504 muestras de harina de soja de distintos orígenes geográficos. Con la finalidad de establecer conclusiones de utilidad para la industria de los piensos compuestos, hemos considerado una serie de variables, como son:

- ORIGEN. Las hemos clasificado como HN, hemisferio norte (Estados Unidos) y HS hemisferio sur (Brasil, Argentina).
- ÉPOCA de aislamiento. Estaciones, meses y años.
- Tipo de TRATAMIENTO de la soja. Harinas de soja tratadas, después de extracción del aceite (HST) y harinas de soja sin tratar, o full-fat (HSST).
- AÑOS: Desde Enero de 1990 a Diciembre de 1996.

8.2. Material y método.

8.2.1. Medios de cultivo y reactivos.

Los medios de cultivo y los reactivos se encuentran detallados en el anexo I.

8.2.2. Muestras utilizadas.

Las muestras utilizadas han sido 4.504 para todos los ensayos de harinas de soja tratadas (HST) y harinas de soja sin tratar (HSST).

Las muestras de harinas de soja tratadas (HST) han sido 2.890, lo que corresponde a un porcentaje del 64,16 % del total

Las muestras de harinas de soja sin tratar (HSST) han sido 1.158, lo que corresponde a un porcentaje del 25,71 % del total.

No fue posible la identificación de las 456 muestras restantes, mediante el correspondiente análisis químico, por ello se han denominado genéricamente como soja, siendo su porcentaje un 10,13 % del total.

8.2.3. Método de ensayo.

El método utilizado es el descrito en el capítulo 3 y está basado en un enriquecimiento con selenito verde brillante (SBG), aislamiento sobre placas de Salmonella - Shigella (SS), Xilosa Lisina Dextrosa (XLD) y agar verde brillante (BGA).

Las tipificaciones de Salmonella, entre 1990 y 1995 se realizaron en el Centro de Salud Carlos III de Majadahonda de Madrid y las de 1996 en el departamento de Bacteriología del Centro Nacional de referencia de Salmonelosis Animal de Algete (Madrid).

8.2.4. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el paquete informático SAS. Las pruebas estadísticas utilizadas han sido:

- Test no paramétricos (SAS, programa informático, 1985; Siegel, S, 1956) Para resultados basados en presencia/ausencia. Se utilizaron los siguientes test:
 - * Wilcoxon Score.
 - * Test de Kolmogorov-Smirnov.
 - * Test de Cramer - Von Mises.
 - * Test de Van der Waerden Scores.

* Chi-Square Approximation.

- Análisis de varianza: test de GLM para muestras en las que el número de datos no es igual por tratamiento. En aquellos casos en que aparecen diferencias significativas se utilizaron tests de comparaciones posteriores múltiples. En nuestro caso utilizamos Duncan (para diseños equilibrados) y Scheffe (para diseños desequilibrados). En las tablas 8. 27, 8. 28, 8. 29 y 8. 30 los agrupamientos con igual letra no presentan diferencias significativas para un $\alpha = 0,05$; las tablas que tienen distintas letras presentan entre sí diferencias significativas para el mismo valor de significación.
- Test de homogeneidad. Test de Mac Nemar: Estos tests se han utilizado para muestras basadas en frecuencias de tipo presencia/ausencia (Siegel, 1956; Flowers, R.S.y col., 1987; Eckner, K.F. y col., 1987; Sachs, L., 1988).

8.3. Resultados y discusión.

Entre 1990 y 1996 se analizaron un total de 4504 muestras de harina de soja de origen comercial.

En el anexo del capítulo 8, se encuentran los resultados obtenidos entre 1990 y 1996, ordenados por años:

- Áreas geográficas, producto y resultados.
- Áreas geográficas, producto y tiempo.
- Correlación de los serotipos aislados por nosotros con los identificados a partir de alimentos. (φ)
- Correlación de los serotipos aislados por nosotros con los obtenidos a partir de animales enfermos. (φ)
- Caracterización de los aislados en HSST.
- Caracterización de los aislados en HST.

(φ) En estos dos casos los datos se tomaron a partir del Boletín Epidemiológico emitido por el laboratorio de referencia.(instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo)

a) Resultados estadísticos para los años 1990 - 1996.

TABLA 8.27

Años	Nº de datos	Nº de Muestras positivas	Media	Agrupamiento
1990 ^(*)	567	61	0,1076	A
1991 ^(*)	636	91	0,1431	B
1992 ^(*)	480	78	0,1625	B
1993 ^(*)	375	21	0,0560	C
1994	539	24	0,0445	C
1995	768	38	0,0495	C
1996	683	26	0,0381	C

(*) No se han tenido en cuenta las muestras clasificadas genéricamente como soja. Todos los datos han sido calculados teniendo en cuenta, como variable dependiente, el número de muestras con presencia de *Salmonella*.

Tras el análisis estadístico por años, en lo que hace referencia al número de aislamientos, hemos podido comprobar que existe agrupación con una significación del $\alpha=0,05$ y con una clara tendencia a la disminución de la prevalencia en los últimos años (grupo C).

- ✓ Grupo A: 1990
- ✓ Grupo B: 1991 y 1992
- ✓ Grupo C: 1993, 1994, 1995 y 1996

No hemos podido establecer ninguna correlación con el clima y las áreas de importación en España, ya que la llegada de estos productos se produce en cinco puertos diferentes, situados principalmente en el norte y en el este del país, siendo la climatología de ambas zonas muy diferente. Se observa que la tendencia de estos años se mantiene en un 4 %. En 1997 para estos productos, se espera obtener los mismos porcentajes de prevalencia de *Salmonella*, lo que estaría en concordancia con las **disminuciones** observadas **durante los últimos 4** años, lo que conduce a pensar en el esfuerzo que se realiza para presentar productos de mayor calidad.

b) Resultados estadísticos para los años 1990 - 1996 por tratamientos (HST y HSST).

TABLA 8.28

Producto	Nº de datos	Nº de Muestras positivas	Media	Agrupamiento
HSST	1158	210	0,18135	I
HST	2890	129	0,04464	II

En la tabla 8.28, se observan los resultados totales de muestras positivas a *Salmonella* en las HST y HSST en los siete años del estudio. Tras un análisis estadístico hemos comprobado que existen diferencias significativas entre un tratamiento y otro para un nivel de significación del 0,05, con un claro predominio de aislamientos positivos en las HSST sobre las HST.

Consideramos importante hacer hincapié en el vacío legal que encontramos para este tipo de problemas. La legislación actual es muy escasa al respecto. La norma en vigor de las especificaciones bacteriológicas para productos destinados a la alimentación de los animales, es del 15 de febrero de 1988, BOE número 41 (Anexo II). En ella se citan los niveles máximos para productos lácteos en el Artículo 2º apartado a) y en el apartado b) para los demás productos. En dicha orden se cita en el capítulo 4 que los productos de origen animal procedentes del exterior deberán venir acompañados de un certificado oficial en el que se garanticen las especificaciones bacteriológicas y además se **tomarán muestras sistemáticamente** con fines analíticos. Los productos de naturaleza distinta únicamente se someterán a **muestreo esporádico** y no se les exigirá certificación veterinaria. Son muchas las dudas que nos plantea esta norma, siendo algunas de las más obvias ¿qué significa muestreo esporádico?, ¿por qué no están sujetas a control las materias primas como la harina de soja, que presenta tan altos porcentajes de contaminación, a veces mayor que las de origen animal?. Lo anterior nos lleva a pensar en la conveniencia de establecer un plan de revisión de la legislación a este respecto.

c) Resultados estadísticos para los años 1990 - 1996 por áreas geográficas.

TABLA 8.29

Zona	Nº de datos	Nº de Muestras positivas	Media	Agrupamiento
H. Norte	2193	234	0,10670	α
H. Sur	1855	128	0,06900	β

En la tabla 8.29, tras el análisis estadístico, comprobamos que existen diferencias significativas entre los aislamientos positivos realizados a partir de sojas importadas del hemisferio norte y del hemisferio sur, siendo significativamente mayores con un 10,7% frente a un 6,9% , con un α del 0,05, las realizadas a partir del HN.

En las tablas 8. 1, 8. 5, 8. 9, 8. 13, 8. 17, 8. 21 y 8. 23 del anexo se encuentran los resultados obtenidos por áreas geográficas entre 1990 y 1997. El año con mayor incidencia de Salmonella en el Hemisferio Sur fue 1994 con un 16,67% para las HST y con un 43,75% para las HSST. Respecto al Hemisferio Norte, en 1995 fue de un 52,63% para HST y de un 37,5% en 1994 para las HSST. En todos los casos, los porcentajes encontrados son muy altos, teniendo en cuenta que en 1995 en más de la mitad de las muestras de HST se aislaron Salmonella.

En los gráficos 8. 1, 8. 5, 8. 9, 8. 13, 8. 17, 8. 21 y 8. 23 de anexo pueden observarse con claridad estos resultados.

El haba de soja se cosecha en primavera - verano en el HN y en otoño - invierno en el HS, no existiendo problemas de suministro a lo largo del año por ser un producto que se cultiva en ambos hemisferios.

El harina de soja o el haba de soja llega a España en barcos, siendo generalmente el almacenamiento en zonas próximas a puertos. Los almacenes son abiertos y de gran capacidad, usándose palas y excavadoras para mover la mercancía. En estas condiciones, la presencia de aves (gorriones, palomas, gaviotas), junto con roedores e insectos, es normal que se produzcan contaminaciones constantes (Madsen, M., Hald, B. , y Olsern, A. , 1977; Pfeiffer, D. G. y Axtell, R. C. , 1980; McAllister, J. C. , y col., 1995). A este factor de contaminación se une el polvo provocado por la entrada y

salida de camiones, así como el de palas y excavadoras. Este polvo es capaz de contaminar otros productos almacenados en una zona distinta de la nave, como la harina de colza que no presenta habitualmente problemas con Salmonella. Durante los encuentros de Ploufragan, en mayo de 1997, comenzó a hablarse de contaminación por Salmonella en productos vegetales, como la alfalfa, por dos brotes acaecidos en Finlandia y USA simultáneamente, como insospechados, cuando es un hecho que la harina de soja presenta en nuestro estudio contaminaciones por Salmonella de hasta un 45% en algunos casos comparables con las existentes para productos considerados de mucho mayor riesgo como las harinas de origen animal.(Ver anexo III)

d) Resultados estadísticos para los años 1990 – 1996 por estaciones.

TABLA 8.30

Estaciones	Nº de datos	Nº de Muestras positivas	Media	Agrupamiento
Primavera	971	71	0,0731	a
Verano	896	49	0,0547	a
Otoño	1100	112	0,1018	b
Invierno	1081	108	0,0991	b

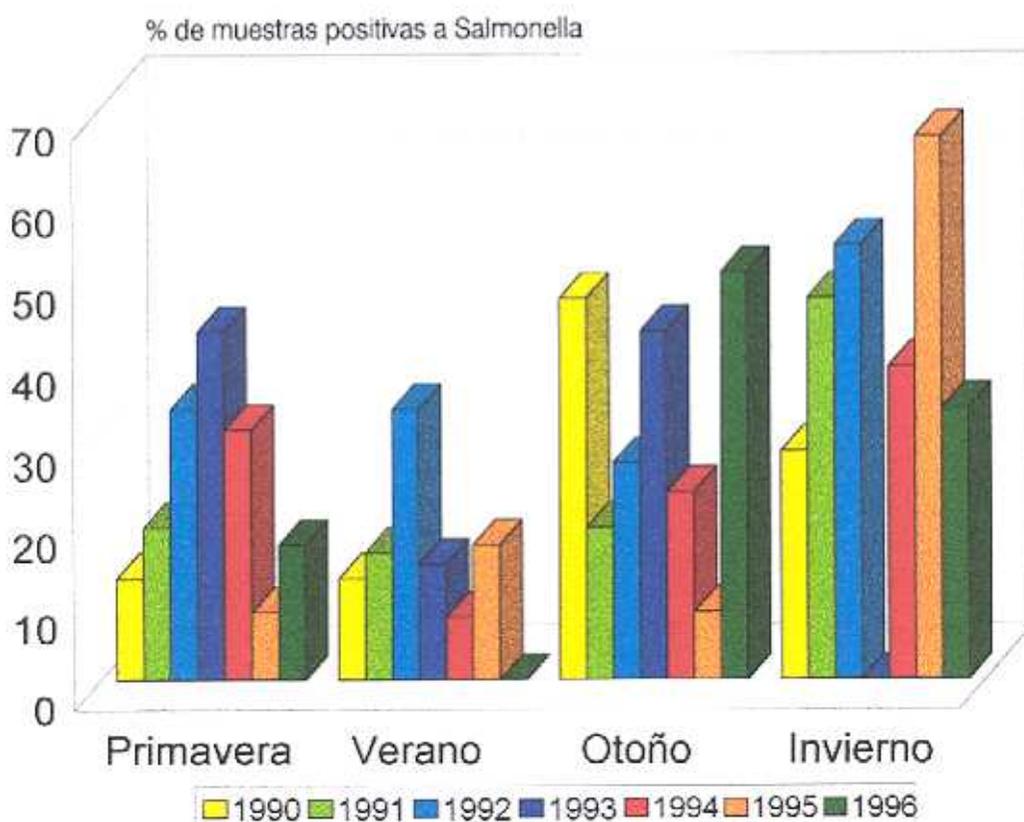
Tras el análisis estadístico, observamos como se produce un doble agrupamiento, por un lado la primavera y el verano y por otro el otoño y el invierno.

Las importaciones, por regla general, del HS, se producen entre los meses de Abril y Octubre, mientras que las del HN se llevan a cabo entre Octubre y Abril, coincidiendo con las campañas de recolección de este producto en el país de origen. En cuanto a la procedencia, observamos (tabla 8.29) cómo existían diferencias significativas entre ambas zonas; los resultados por estaciones vienen a reforzar estos resultados. Por tanto podemos plantear las siguientes hipótesis:

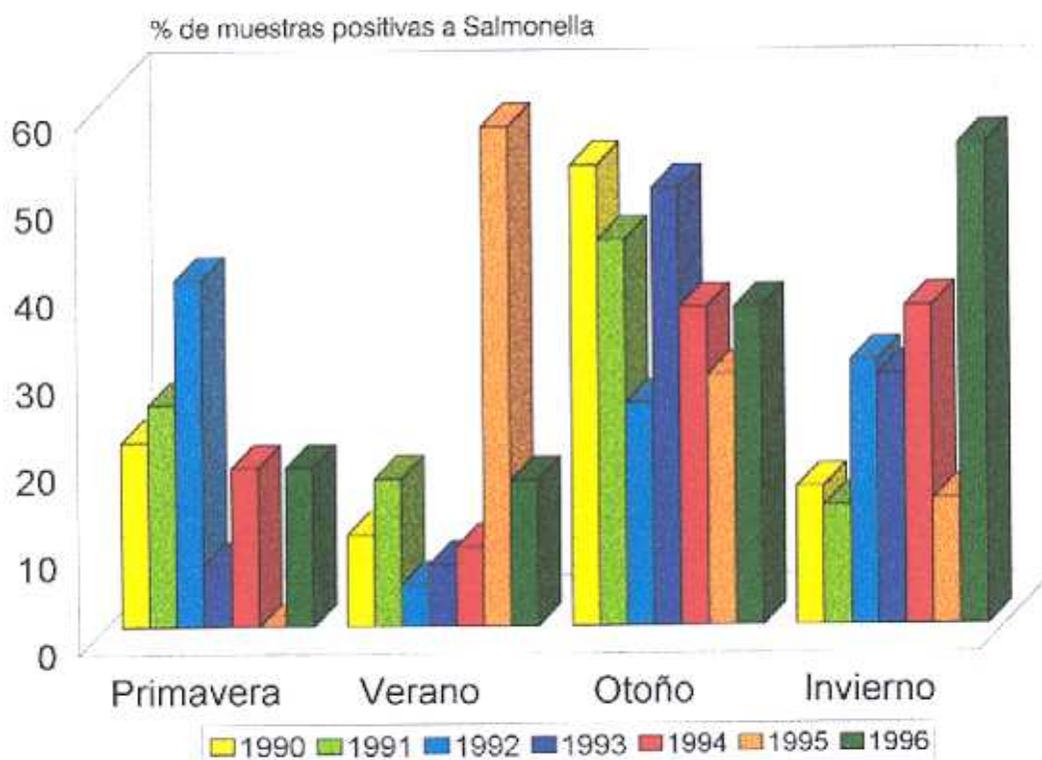
- La contaminación se produce en origen y a pesar del tratamiento de la soja en destino mantiene parte de la carga microbiana y es por tanto el origen el punto de contaminación.
- La mayor parte de las importaciones se realizan con soja manufacturada; es decir, el producto viene preparado para el consumo y, o bien la contaminación se

- La mayor parte de las importaciones se realizan con soja manufacturada; es decir, el producto viene preparado para el consumo y, o bien la contaminación se realiza en el barco durante el transporte, o ya va contaminada desde los almacenes del origen de la mercancía.
- El producto se transforma en España y el tratamiento esteriliza el producto, la contaminación se lleva a cabo en los almacenes de las extractoras de soja durante su almacenamiento.

e) Presencia de *Salmonella* en HST (1990-1996). **GRAFICO 8.27**



f) Presencia de *Salmonella* en HSST (1990-1996) **GRÁFICO 8.28**



g) Serotipos aislados con mayor frecuencia entre 1990 - 1996.

TABLA 8.32

SEROTIPO	Máximo detectado %	Año de aparición
Agona	20,8	1993
Llandoff	17,74	1990
Mbandaka	16,13	1990
Montevideo	15,1	1992
Tilburg	41,5	1992

Basándonos en los serovares aislados entre 1990 y 1997, hemos confeccionado unas tablas con los resultados obtenidos en los aislamientos de origen alimentario (Centro Nacional de Referencia, Instituto Carlos III) (Ver tablas 8. 3, 8. 7, 8. 11, 8. 15, 8. 19 y 8. 23 del anexo).

En estos resultados puede observarse que, salvo en 1991 y 1993, en todos los casos existe algún serovar aislado a partir de harina de soja que también se encuentra en huevos y ovoproductos. En el resto de los alimentos y en el agua, están representados básicamente los mismos serovares que los encontrados en las harinas de soja.

Los serovares aislados con mayor frecuencia entre 1990 y 1996 pueden observarse en la tabla 8.32. *S. Tilburg* con un 41,5 % en 1992 es el serovar más frecuentemente aislado. *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, frecuentemente aisladas en brotes de toxiinfecciones alimentarias en el hombre fueron aisladas a partir de soja en los años 1993, 1995 y 1996.

En cuanto a los serotipos aislados a partir de los animales enfermos (tabla 8. 4, 8. 8, 8. 12, 8. 16, 8. 20 y 8. 24 del anexo), al compararlos con los identificados a partir de harina de soja, se comprueba que anualmente se produce algún brote que podría estar relacionado con la presencia de *Salmonella* en harina de soja. No debemos olvidar, tal y como se indica en el capítulo 1, que en las raciones suministradas a distintas especies animales la cantidad de soja oscila entre los valores siguientes: avicultura del 5 al 50%, porcino del 15 al 20%, vacuno del 30 al 50% y cunicultura hasta el 10%.

Por lo que no sería extraño que alguno de los brotes aparecidos en los animales o de las cepas aisladas en los alimentos tuvieran su origen en la soja contaminada. Por lo que recomendamos que sería imprescindible la realización de un estricto control microbiológico de este producto, dado que además cada vez se incorpora con mayor frecuencia en alimentos destinados al consumo humano.

8.4. Conclusiones.

A la vista de los resultados obtenidos en estos 7 años, podemos deducir que:

- La harina de soja tiene un altísimo porcentaje de contaminación por Salmonella por lo que es imprescindible que se lleve a cabo un exhaustivo control microbiológico de la misma. Hay que tener en cuenta que los productos de proteína de soja cada vez son más utilizados en consumo humano.
- La aparición de Salmonella en HST es mayor que en las HSST y ésta es estacional, siendo el otoño y sobre todo el invierno las estaciones que conllevan mayor riesgo.
- Las Salmonella presentes en la harina de soja pueden ser las causantes de algunos de los problemas clínicos que aparecen en los animales. S. Tilburg con un 41,5 % es el serovar aislado con mayor frecuencia que se presenta en más alto porcentaje. Tal y como comentamos en el capítulo 3, es muy importante el tipado de más de una colonia para asegurar que el serotipo causal es único o está producido por un grupo de ellos.
- Revisión de la legislación entre la Administración y los sectores implicados.

ANEXO DEL CAPITULO 8.
PREVALENCIA DE Salmonella EN HARINA DE SOJA.

ANEXO DEL CAPITULO 8.

PREVALENCIA DE *Salmonella* EN HARINA DE SOJA.

8.3.1.- Resultados obtenidos en 1990.	114
8.3.2.- Resultados obtenidos en 1991.	120
8.3.3.- Resultados obtenidos en 1992.	126
8.3.4.- Resultados obtenidos en 1993.	131
8.3.5.- Resultados obtenidos en 1994.	136
8.3.6.- Resultados obtenidos en 1995.	140
8.3.7.- Resultados obtenidos en 1996.	145



111

GRÁFICO 8.1 Presencia de Salmonella en 1990. Áreas geográficas.	114
GRÁFICO 8.2 Datos obtenidos en 1990.(Producto/Mes de aislamiento).	116
GRÁFICO 8.3 Serovares de Salmonella aislados en HSST durante 1990.....	119
GRÁFICO 8.4 Serovares de Salmonella aislados en HST durante 1990.....	119
GRÁFICO 8.5 Presencia de Salmonella en 1991. Áreas geográficas.	120
GRÁFICO 8.6 Datos obtenidos en 1991. (Producto /Mes de aislamiento).	122
GRÁFICO 8.7 Serovares aislados en HSST en 1991.	125
GRÁFICO 8.8 Serovares aislados en HST en 1991.	125
GRÁFICO 8.9 Presencia de Salmonella en 1992.Áreas geográficas	126
GRÁFICO 8.10 Datos obtenidos en 1992. (Producto/Mes de aislamiento)	128
GRÁFICO 8.11 Serovares aislados en HSST en 1992.	130
GRÁFICO 8.12 Serovares aislados en HST en 1992.	130
GRÁFICO 8.13 Presencia de Salmonella en 1993.Áreas geográficas	131
GRÁFICO 8.14 Datos obtenidos en 1993. (Producto /Mes de aislamiento).	133
GRÁFICO 8.15 Serovares aislados en HSST en 1993.	135
GRÁFICO 8.16 Serovares aislados en HST en 1993.	135
GRÁFICO 8.17 Presencia de Salmonella en 1994.Áreas geográficas	136
GRÁFICO 8.18 Datos obtenidos en 1993. (Producto /Mes de aislamiento).	138
GRÁFICO 8.19 Serovares aislados en HSST en 1994.	139
GRÁFICO 8.20 Serovares aislados en HST en 1994.	140
GRÁFICO 8.21 Presencia de Salmonella en 1995.Áreas geográficas	141
GRÁFICO 8.22 Datos obtenidos en 1995. (Producto/mes de aislamiento	143
GRÁFICO 8.23 Serovares aislados en HSST en 1995.	144
GRÁFICO 8.24 Serovares de Salmonella aislados en HST durante 1995.....	145
GRÁFICO 8.25 Presencia de Salmonella en 1996. Áreas geográficas.	146
GRÁFICO 8.26 Datos obtenidos en 1996. (Producto/Mes de aislamiento).	148
GRÁFICO 8.27 Serovares aislados en HSST en 1996.	149
GRÁFICO 8.28 Serovares de Salmonella aislados en HST durante 1996.....	149

TABLA 8.1 Resultados obtenidos en 1990 por áreas geográficas.....	114
TABLA 8.2 Resultados obtenidos en 1990 por meses.....	115
TABLA 8.3 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario 1990.....	117
TABLA 8.4 Serotipos de Salmonella aisladas de animal enfermo 1990.....	118
TABLA 8.5 Resultados obtenidos en 1991 por áreas geográficas.....	120
TABLA 8.6 Resultados obtenidos en 1991 por meses.....	121
TABLA 8.7 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1991).....	123
TABLA 8.8 Serotipos de Salmonella aisladas de animal enfermo (1991).....	124
TABLA 8.9 Resultados obtenidos en 1992 por áreas geográficas.....	126
TABLA 8.10 Resultados obtenidos en 1992 por meses.....	127
TABLA 8.11 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1992).....	129
TABLA 8.12 Serotipos de Salmonella aisladas de animal enfermo (1992).....	129
TABLA 8.13 Resultados obtenidos en 1993 por áreas geográficas.....	131
TABLA 8.14 Resultados obtenidos en 1993 por meses.....	132
TABLA 8.15. Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1993).....	134
TABLA 8.16 Serotipos de Salmonella aislados de animal enfermo (1993).....	134
TABLA 8.17 Resultados obtenidos en 1994 por áreas geográficas.....	136
TABLA 8.18 Resultados obtenidos en 1994 por meses.....	137
TABLA 8.19 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1994).....	138
TABLA 8.20 Serotipos de Salmonella aislados de animal enfermo (1994).....	139
TABLA 8.21 Resultados obtenidos en 1995 por áreas geográficas.....	140
TABLA 8.22 Resultados obtenidos en 1995 por meses.....	142
TABLA 8.23 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1995).....	143
TABLA 8.24 Serotipos de Salmonella aislados de animal enfermo (1995).....	144
TABLA 8.25 Resultados obtenidos en 1996 por áreas geográficas.....	145
TABLA 8.26 Resultados obtenidos en 1996 por meses.....	147
TABLA 8.27 Serotipos de Salmonella aislados de animal enfermo (1996).....	148

ANEXO DEL CAPITULO 8. PREVALENCIA DE *Salmonella* EN HARINA DE SOJA.

8.3.1.- RESULTADOS OBTENIDOS EN 1990.

TABLA 8.1.- Resultados obtenidos en 1990 por áreas geográficas.

HSST/HST	ZONA	MUESTRAS NEGATIVAS	MUESTRAS POSITIVAS
SOJA			
	H. SUR	34 (5,65 %)	1 (1,49%)
	H. NORTE	62 (10,30 %)	5 (7,46%)
Total Soja		96 (15,95 %)	6 (8,96 %)
HSST			
	H. SUR	30 (4,98%)	6 (8,96 %)
	H. NORTE	95 (15,78 %)	23 (34,33 %)
Total HSST		125 (20,76 %)	29 (43,28 %)
HST			
	H. SUR	152 (25,25 %)	6 (8,96 %)
	H. NORTE	229 (38,04 %)	26 (38,81 %)
Total HST		381 (63,29 %)	32 (47,76 %)
Suma total		602	67

GRÁFICO 8.1 Presencia de *Salmonella* en 1990. Áreas geográficas.

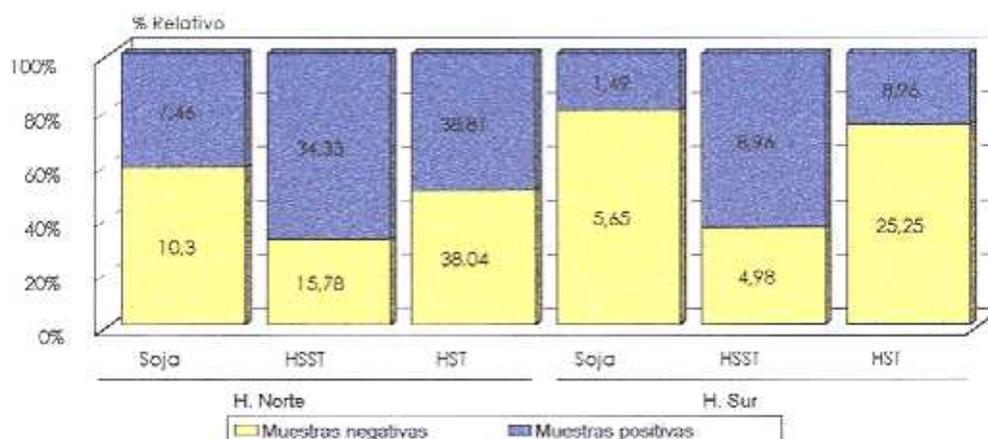


TABLA 8.2.- Resultados obtenidos en 1990 por meses.

HSST/HST	MES	MUESTRAS NEGATIVAS ^(a)	MUESTRAS POSITIVAS ^(a)
SOJA	ENE	21(3,49 %)	1 (1,49 %)
	FEB	2 (0,33 %)	0 (0,00 %)
	MAR	4 (0,66 %)	1 (1,49 %)
	ABR	4 (0,66%)	0 (0,00 %)
	MAY	4 (0,66%)	0 (0,00 %)
	JUN	6 (1,00 %)	0 (0,00 %)
	JUL	1 (0,17 %)	0 (0,00 %)
	AGO	9 (1,50%)	0 (0,00 %)
	SEP	5 (0,83 %)	1 (1,49 %)
	OCT	17(2,82 %)	1 (1,49 %)
	NOV	10(1,66 %)	2 (2,99 %)
	DIC	13(2,16%)	0 (0,00 %)
Total Soja		96 (15,95%)	6 (10,52%)
HSST	ENE	15 (2,49 %)	2 (2,99 %)
	FEB	21 (3,49 %)	0 (0,00 %)
	MAR	9 (1,50 %)	1 (1,49 %)
	ABR	6 (1,00 %)	0 (0,00 %)
	MAY	6 (1,00 %)	3 (4,48 %)
	JUN	4 (0,66 %)	1 (1,49 %)
	JUL	6 (1,00 %)	1 (1,49 %)
	AGO	5 (0,83 %)	0 (0,00 %)
	SEP	9 (1,50 %)	1 (1,49 %)
	OCT	12 (1,99 %)	3 (4,48 %)
	NOV	16 (2,66 %)	1 (1,49 %)
	DIC	16 (2,66 %)	6 (8,96 %)
Total de HSST		125 (20,76 %)	19 (33,33 %)

TABLA 8.2.- Continuación: Resultados obtenidos en 1990 por meses.

HST	ENE	7 (1,16 %)	1 (1,49 %)
	FEB	30 (4,98 %)	0 (0,00 %)
	MAR	34 (5,65 %)	8 (11,94 %)
	ABR	28 (4,65 %)	2 (2,99 %)
	MAY	19 (3,16 %)	1 (1,49 %)
	JUN	36 (5,81%)	1 (1,49 %)
	JUL	28 (4,65 %)	2 (2,99 %)
	AGO	30 (4,98 %)	2 (2,99 %)
	SEP	22 (3,65 %)	0 (0,00 %)
	OCT	28 (4,65 %)	0 (0,00 %)
	NOV	64 (10,63 %)	14 (20,90 %)
	DIC	55 (9,14 %)	1 (1,49 %)
Totales de HST		381 (63,29 %)	32 (56,14 %)
Suma total :		602	57

(a) Frecuencias absolutas.

GRÁFICO 8.2 Datos obtenidos en 1990. (Producto /Mes de aislamiento)

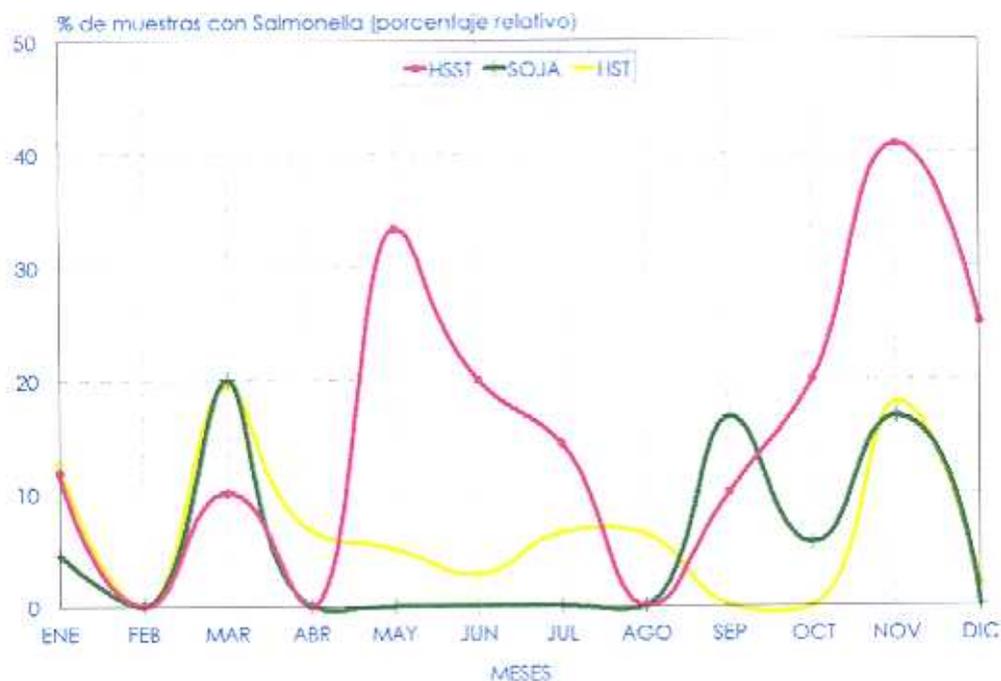


TABLA 8.3. Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1990)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1991)

SEROTIPO	Huevo	Aves	Embut ¹	Agua ⁴	Soja ²
Agona ³		1,89	0,93	1,56	4,83
Anatum	1,61	7,55	7,41	2,72	6,45
Cubana					3,23
Havana					6,45
Infantis ³		0,95	2,78	11,67	3,23
Kentucky					3,23
Lexington					3,23
Llandoff			0,46	1,95	17,74
Mbandaka				0,78	16,13
Montevideo ³	4,8		0,46	1,17	8,06
Orion					4,83
Riesen			0,93		4,83
Senftenberg				7,39	8,06
Tennessee			0,93		9,68

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

¹ Embutido de carne y carne fresca.

² Harinas de soja.

³ Serovares productores de brotes de toxoinfección alimentaria durante 1990.

⁴ Serotipos ambientales aislados de agua de bebida, de río, de mar y aguas residuales.

TABLA 8.4. Serotipos de Salmonella aisladas de animal enfermo 1990^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1991)

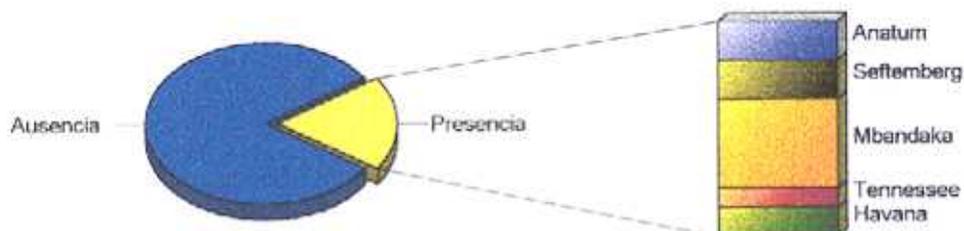
SEROTIPO	Aviar	Vacuno	Cunicultura	Soja ²
Agona ³				4,83
Anatum	6,16	5,56	20,00	6,45
Cubana				3,23
Havana				6,45
Infantis ³				3,23
Kentucky	0,69			3,23
Lexington				3,23
Llandoff				17,74
Mbandaka				16,13
Montevideo ³	1,38			8,06
Orion				4,83
Riesen				4,83
Senftenberg	0,69			8,06
Tennessee				9,68

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

² Harinas de soja.

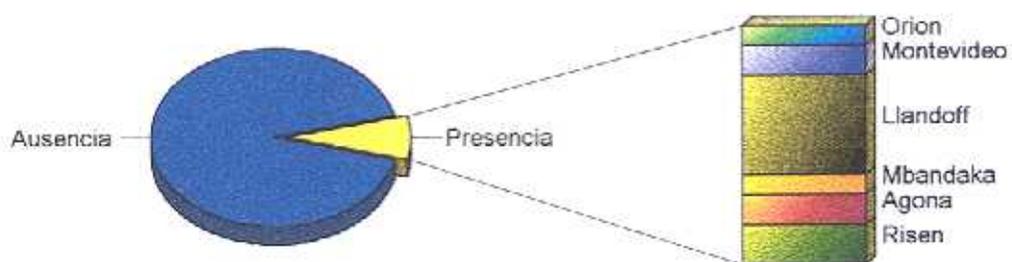
³ Serovares productores de brotes de toxoinfección alimentaria durante 1990.

GRÁFICO 8.3 Serovares de *Salmonella* aislados en HSST durante 1990.



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

GRÁFICO 8.4 Serovares de *Salmonella* aislados en HST durante 1990.



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

8.3.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN 1991.

TABLA 8.5. Resultados obtenidos en 1991 por áreas geográficas.

HSST/HST	ZONA	MUESTRAS NEGATIVAS	MUESTRAS POSITIVAS
SOJA			
	H. SUR	27 (4,40%)	1(1,04%)
	H. NORTE	42 (6,84%)	4(4,17%)
Total Soja		69 (11,24%)	5 (5,21%)
HSST			
	H. SUR	102 (16,61%)	27 (28,13%)
	H. NORTE	84 (13,68 %)	32 (33,33 %)
Total HSST		186 (30,29 %)	59 (61,46 %)
HST			
	H. SUR	185 (30,13 %)	15 (15,63 %)
	H. NORTE	174 (28,34 %)	17 (17,71 %)
Total HST		359 (58,47 %)	32 (33,33 %)
Suma total		614	96

GRÁFICO 8.5 Presencia de *Salmonella* en 1991. Áreas geográficas.

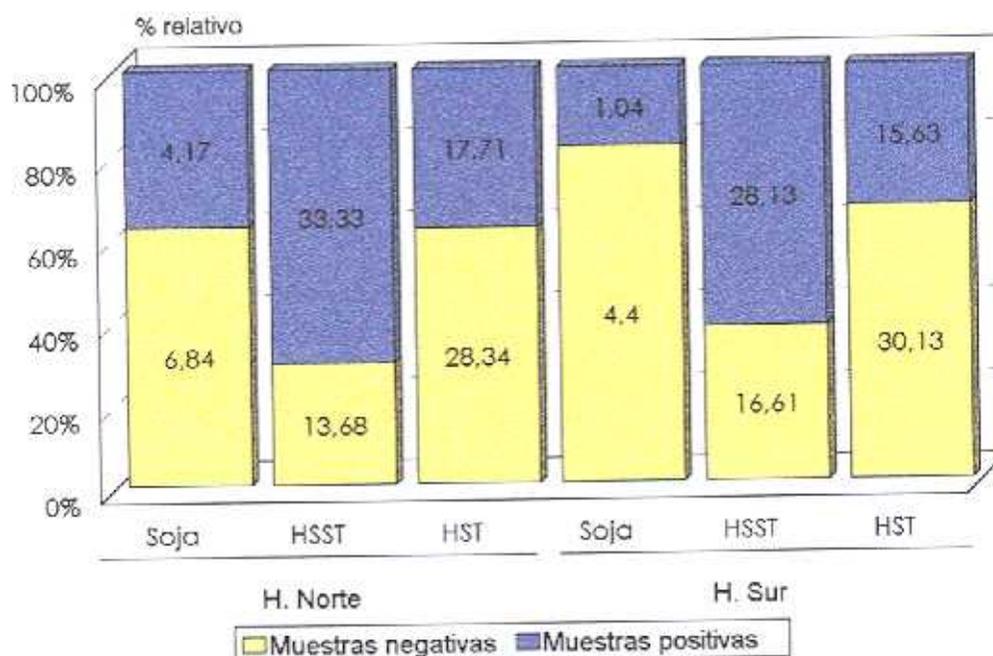


TABLA 8.6 Resultados obtenidos en 1991 por meses

HSST/HST	MES	MUESTRAS NEGATIVAS ^(a)	MUESTRAS POSITIVAS ^(a)
SOJA	ENE	7 (1,14 %)	0 (0,00 %)
	FEB	5 (0,81 %)	0 (0,00 %)
	MAR	6 (0,98 %)	0 (0,00 %)
	ABR	4 (0,65%)	2 (2,08 %)
	MAY	8 (1,30%)	0 (0,00 %)
	JUN	3 (0,49 %)	0 (0,00 %)
	JUL	9 (1,47%)	0 (0,00 %)
	AGO	2 (0,33 %)	1 (1,04 %)
	SEP	3 (0,49 %)	0 (0,00 %)
	OCT	6(0,98 %)	0 (0,00 %)
	NOV	11 (1,79 %)	2 (2,08 %)
	DIC	5 (0,81%)	0 (0,00 %)
Total Soja		69 (11,24%)	6 (5,21%)
HSST	ENE	24 (3,91 %)	3 (3,13 %)
	FEB	20 (3,26 %)	4 (4,17 %)
	MAR	20 (3,26 %)	1 (1,04 %)
	ABR	20 (3,26 %)	7 (7,29 %)
	MAY	20 (3,26 %)	3 (3,13 %)
	JUN	18 (2,93 %)	5 (5,21 %)
	JUL	23 (3,75 %)	3 (3,13 %)
	AGO	13 (2,12 %)	4 (4,17 %)
	SEP	11 (1,79 %)	3 (3,13 %)
	OCT	6 (0,98 %)	5 (5,21 %)
	NOV	5 (0,81 %)	13 (13,54 %)
	DIC	6 (0,98 %)	8 (8,33 %)
Total de HSST		186 (30,29 %)	59 (61,46 %)

Continuación: Resultados obtenidos en 1991 por meses.

HST	ENE	29 (4,72 %)	4 (4,17 %)
	FEB	49 (7,98 %)	7 (7,29 %)
	MAR	51 (8,31 %)	4 (4,17 %)
	ABR	60 (9,77 %)	4 (4,17 %)
	MAY	34 (5,54 %)	1 (1,04 %)
	JUN	31 (5,05%)	1 (1,04 %)
	JUL	34 (5,54 %)	4 (4,17 %)
	AGO	24 (3,91 %)	1 (1,04 %)
	SEP	15 (2,44 %)	0 (0,00 %)
	OCT	13 (2,12 %)	1 (1,04 %)
	NOV	13 (2,12 %)	3 (3,13 %)
	DIC	6 (0,98 %)	2 (2,08 %)
Totales de HST		359 (58,47 %)	32 (33,33 %)
Suma total :		614	96

(a) Frecuencias absolutas.

GRÁFICO 8.6 Datos obtenidos en 1991. (Producto /Mes de aislamiento)

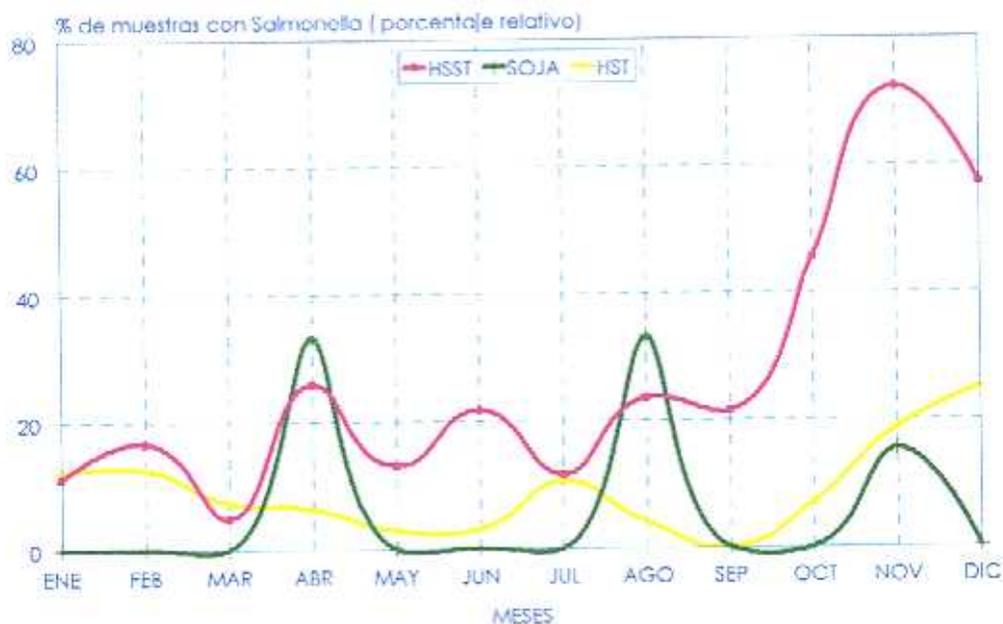


TABLA 8.7 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1991)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1992)

SEROTIPO	Huevo	Aves	Embut ¹	Agua ⁴	Soja ²
Agona		1,72	4,92		6,59
Anatum		0,86	8,20	11,92	4,40
Cubana				0,42	5,49
Havana					4,40
Kentucky		0,86	0,55	5,91	6,59
Llandoff				0,42	16,49
Mbandaka ³			0,55		6,59
Montevideo ³				0,42	7,69
Monofásica			0,55		2,20
Senftenberg ³		0,86			4,40
Tennessee					5,49
Tilburg			0,55		15,39
Worthington			1,64	3,38	5,49

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

¹ Embutido de carne y carne de consumo público.

² Harinas de soja.

³ Serovares productores de brotes de toxiinfección alimentaria durante 1991.

⁴ Serotipos ambientales aislados de agua de bebida, de río, de mar y aguas residuales.

TABLA 8.8 Serotipos de Salmonella aislados de animal enfermo (1991)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1992)

SEROTIPO	Aviar	Vacuno	Cunicultura	Soja ²
Agona				6,59
Anatum		10,00		4,40
Cubana				5,49
Havana				4,40
Kentucky				6,59
Llandoff				16,49
Mbandaka ³		5,00		6,59
Montevideo ³				7,69
Monofásica				2,20
Senftenberg ³				4,40
Tennessee				5,49
Tilburg	2,78	5,00		15,39
Worthington				5,49

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

² Harinas de soja.

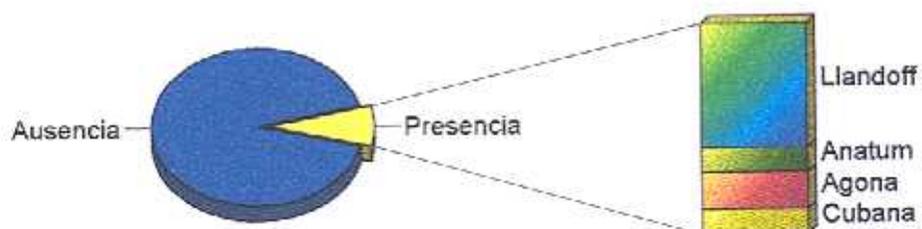
³ Serovares productores de brotes de toxoinfección alimentaria durante 1991.

GRÁFICO 8.7 Serovares de *Salmonella* aislados en HSST durante 1991



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

GRÁFICO 8.8 Serovares de *Salmonella* aislados en HST durante 1991



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

8.3.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN 1992.

TABLA 8.9 Resultados obtenidos en 1992 por áreas geográficas

HSST/HST	ZONA	MUESTRAS NEGATIVAS	MUESTRAS POSITIVAS
SOJA			
	H. SUR	132 (22,34%)	1(1,25%)
	H. NORTE	57 (9,64%)	1(1,25%)
Total Soja		189 (31,98%)	2 (2,50%)
HSST			
	H. SUR	145 (24,53%)	35 (43,75%)
	H. NORTE	65 (11,00 %)	28 (35,00 %)
Total HSST		210 (35,53 %)	63 (78,75 %)
HST			
	H. SUR	107 (18,11 %)	4 (5,00 %)
	H. NORTE	85 (14,38 %)	11 (13,75 %)
Total HST		192 (32,49 %)	15 (18,75 %)
Suma total		591	80

GRÁFICO 8.9 Presencia de *Salmonella* en 1.992. Áreas geográficas.

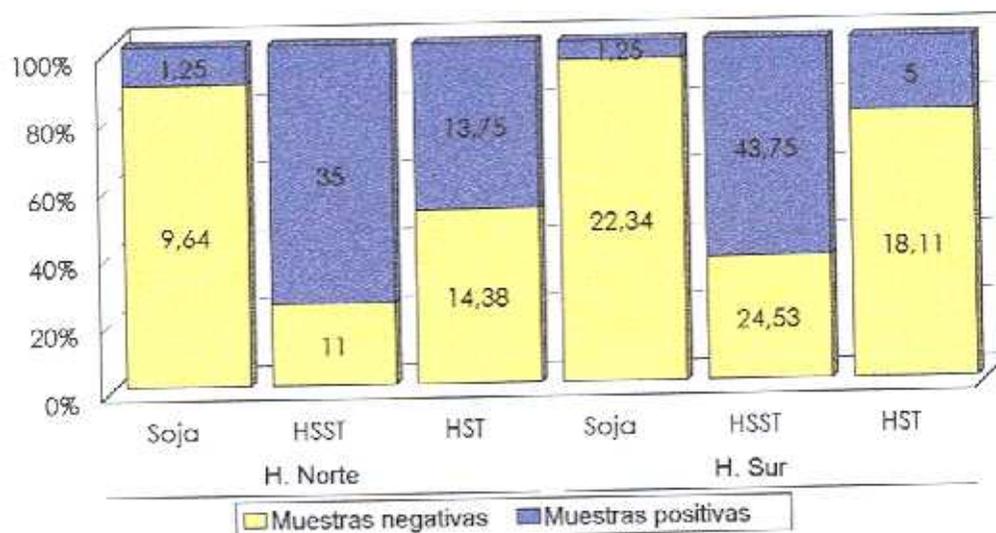


TABLA 8.10 Resultados obtenidos en 1992 por meses.

HSST/HST	MES	MUESTRAS NEGATIVAS ^(a)	MUESTRAS POSITIVAS ^(a)
SOJA	ENE	5 (0,85 %)	0 (0,00 %)
	FEB	12 (2,03 %)	0 (0,00 %)
	MAR	13 (2,20 %)	0 (0,00 %)
	ABR	26 (4,40%)	1 (1,25 %)
	MAY	19 (3,21%)	0 (0,00 %)
	JUN	25 (4,23 %)	0 (0,00 %)
	JUL	15 (2,54%)	0 (0,00 %)
	AGO	15 (2,54 %)	1 (1,25 %)
	SEP	14 (2,37 %)	0 (0,00 %)
	OCT	15 (2,54 %)	0 (0,00 %)
	NOV	26 (4,40 %)	0 (0,00 %)
	DIC	4 (0,68%)	0 (0,00 %)
Total Soja		189 (31,98%)	2 (2,50%)
HSST	ENE	23 (3,89 %)	7 (8,75 %)
	FEB	15 (2,54 %)	10 (12,50%)
	MAR	10 (1,69 %)	2 (2,50 %)
	ABR	16 (2,71 %)	19 (23,75 %)
	MAY	15 (2,54 %)	6 (7,50 %)
	JUN	16 (2,71 %)	0 (0,00 %)
	JUL	40 (6,77 %)	2 (2,50 %)
	AGO	28 (4,74 %)	1 (1,25 %)
	SEP	12 (2,03 %)	0 (0,00 %)
	OCT	14 (2,37 %)	5 (6,25 %)
	NOV	8 (1,35 %)	9 (11,25 %)
	DIC	13 (2,20 %)	2 (2,50 %)
Total de HSST		210 (35,53 %)	63 (78,75 %)

Continuación: Resultados obtenidos en 1992 por meses.

HST	ENE	12 (2,03 %)	1 (1,25 %)
	FEB	20 (3,38 %)	7 (8,75 %)
	MAR	10 (1,69 %)	0 (0,00 %)
	ABR	26 (4,40 %)	4 (4,17 %)
	MAY	19 (3,21 %)	1 (1,25 %)
	JUN	13 (2,20%)	0 (0,00 %)
	JUL	8 (1,35 %)	4 (4,17 %)
	AGO	5 (0,85 %)	1 (1,25 %)
	SEP	6 (1,02 %)	0 (0,00 %)
	OCT	24 (4,06 %)	2 (2,50 %)
	NOV	28 (4,74 %)	2 (2,50 %)
	DIC	21 (3,55 %)	0 (0,00 %)
Totales de HST		192 (32,49 %)	15 (18,75 %)
Suma total :		591	80

(^a) Frecuencias absolutas.

GRÁFICO 8.10 Datos obtenidos en 1992. (Producto/Mes de aislamiento)

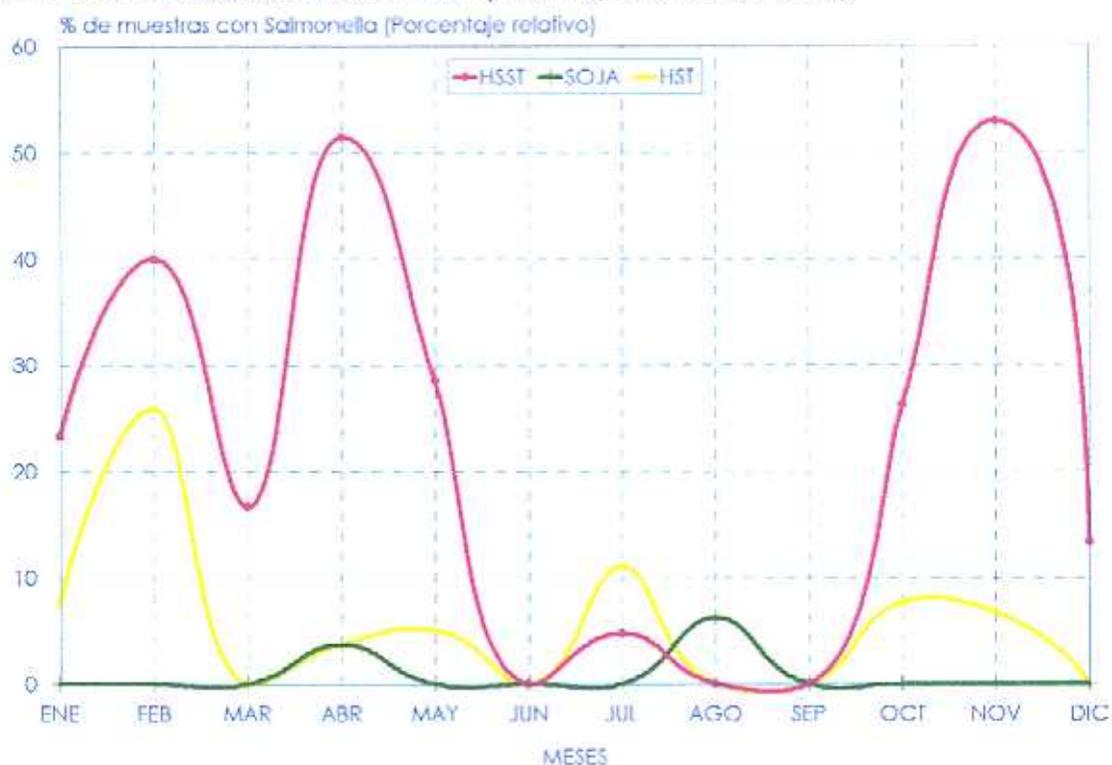


TABLA 8.11 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1992)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. (1993))

SEROTIPO	Huevo	Aves	Embut ¹	Agua ⁴	Soja ²
Grupo E4					5,5
Lexington					9,4
Llandoff					3,8
Mbandaka				0,84	3,8
Montevideo ³				0,84	15,1
Tennessee			0,4	0,84	15,1
Tilburg			2,5	1,69	41,5

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

¹ Embutido de carne y carnes frescas.

² Harinas de soja.

³ Serovares productores de brotes de toxiinfección alimentaria durante 1992.

⁴ Serotipos ambientales aislados de agua de bebida, de río, de mar y aguas residuales.

TABLA 8.12 Serotipos de Salmonella aislados de animal enfermo (1992)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. (1993))

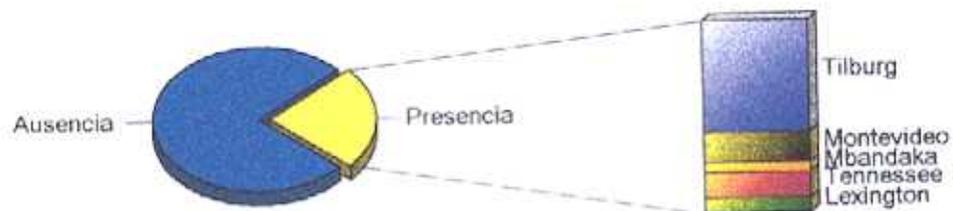
SEROTIPO	Aviar	Vacuno	Cunicultura	Soja ²
Grupo E4				5,5
Lexington				9,4
Llandoff				3,8
Mbandaka				3,8
Montevideo ³	5,3			15,1
Tennessee				15,1
Tilburg	1,3			41,5

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

² Harinas de soja.

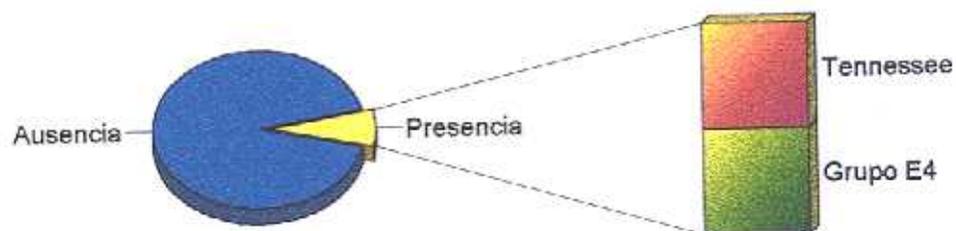
³ Serovares productores de brotes de toxiinfección alimentaria durante 1992.

GRÁFICO 8.11 Serovares de *Salmonella* aislados en HSST durante 1992.



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

GRÁFICO 8.12 Serovares de *Salmonella* aislados en HST durante 1992



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

8.3.4.- RESULTADOS OBTENIDOS EN 1993.

TABLA 8.13 Resultados obtenidos en 1993 por áreas geográficas.

HSST/HST	ZONA	MUESTRAS NEGATIVAS	MUESTRAS POSITIVAS
SOJA			
	H. SUR	50 (11,31%)	0(0,00%)
	H. NORTE	38 (8,60%)	1(4,55%)
Total Soja		88 (19,91%)	1 (4,55%)
HSST			
	H. SUR	22 (4,98%)	6 (27,27%)
	H. NORTE	27 (6,11 %)	8 (36,36 %)
Total HSST		49 (11,09 %)	14 (63,64 %)
HST			
	H. SUR	140 (31,67 %)	3 (13,64 %)
	H. NORTE	165 (37,33 %)	4 (18,18 %)
Total HST		305 (69,00 %)	7 (31,82 %)
Suma total		442	22

GRÁFICO 8.13 Presencia de *Salmonella* en 1993. Áreas geográficas

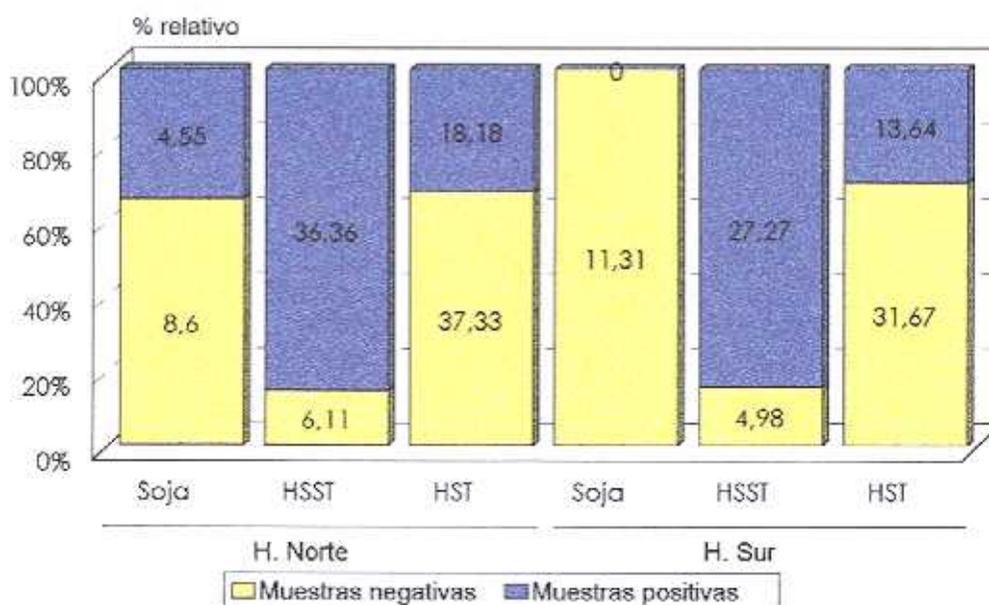


TABLA 8.14 Resultados obtenidos en 1993 por meses

HSST/HST	MES	MUESTRAS NEGATIVAS ^(a)	MUESTRAS POSITIVAS ^(a)
SOJA	ENE	10 (2,26 %)	0 (0,00 %)
	FEB	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)
	MAR	14 (3,17 %)	0 (0,00 %)
	ABR	19 (4,30%)	1 (4,55 %)
	MAY	7 (1,58%)	0 (0,00 %)
	JUN	6 (1,36 %)	0 (0,00 %)
	JUL	8 (1,81%)	0 (0,00 %)
	AGO	6 (1,36 %)	0 (0,00 %)
	SEP	2 (0,45 %)	0 (0,00 %)
	OCT	7 (1,58 %)	0 (0,00 %)
	NOV	5 (1,13 %)	0 (0,00 %)
	DIC	4 (0,90%)	0 (0,00 %)
Total Soja		88 (19,91%)	1 (4,55%)
HSST	ENE	10 (2,26 %)	2 (9,09 %)
	FEB	7 (1,58 %)	2 (9,09 %)
	MAR	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)
	ABR	6 (1,36 %)	0 (0,00 %)
	MAY	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)
	JUN	6 (1,36 %)	1 (4,55 %)
	JUL	4(0,90 %)	1 (4,55 %)
	AGO	1 (0,23 %)	0 (0,00 %)
	SEP	3 (0,68 %)	0 (0,00 %)
	OCT	6 (1,36 %)	2 (9,09 %)
	NOV	3 (0,68 %)	2 (9,09 %)
	DIC	3 (0,68 %)	3(13,64 %)
Total de HSST		49 (11,09 %)	14(63,64 %)

Continuación: Resultados obtenidos en 1993 por meses.

HST	ENE	32 (7,24 %)	0 (0,00 %)
	FEB	28 (6,33 %)	0 (0,00 %)
	MAR	25 (5,66 %)	0 (0,00 %)
	ABR	12 (2,71 %)	1 (4,55 %)
	MAY	24 (5,43 %)	2 (9,09 %)
	JUN	15 (3,39%)	0 (0,00 %)
	JUL	12 (2,71 %)	0 (0,00 %)
	AGO	13 (2,94 %)	1 (4,55 %)
	SEP	13 (2,94 %)	1 (4,55 %)
	OCT	38 (8,60 %)	1 (4,55 %)
	NOV	41 (9,28 %)	1 (4,55 %)
	DIC	52 (11,76 %)	1 (4,55 %)
Totales de HST		305 (69,00 %)	7 (31,82 %)
Suma total :		442	22

(a) Frecuencias absolutas.

GRÁFICO 8.14 Datos obtenidos en 1993. (Producto /Mes de aislamiento)

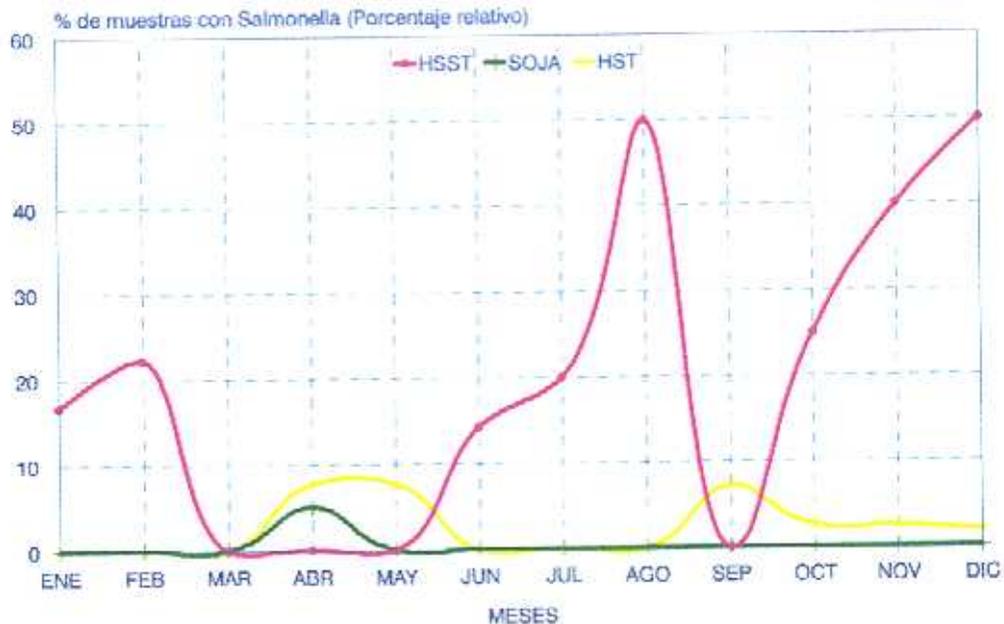


TABLA 8.15 Serotipos de Salmonella distribuidos por origen alimentario (1993)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1994)

SEROTIPO	Huevo	Aves	Embut ¹	Agua ⁴	Soja ²
Agona		0,6	0,5	1,35	20,8
Derby		0,6	11,7	1,96	20,8
London		0,6	2,2	0,61	8,3
Mbandaka				0,12	12,5
Montevideo		0,6	0,7	1,47	12,5
Tilburg		0,6		0,12	12,5

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

¹ Embutido de carne y carnes frescas.

² Harinas de soja.

⁴ Serotipos ambientales aislados de agua de bebida, de río, de mar y aguas residuales.

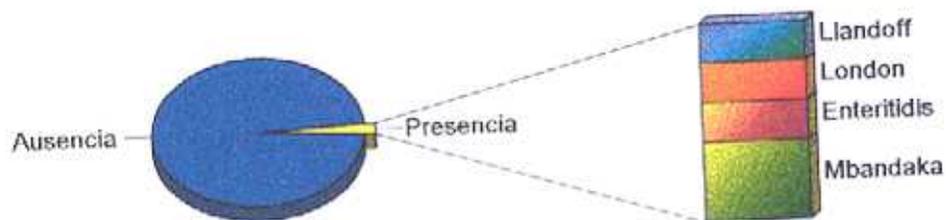
TABLA 8.16 Serotipos de Salmonella aislados de animal enfermo (1993)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1994)

SEROTIPO	Aviar	Vacuno	Porcino	Cunicultura	Soja ²
Agona					20,8
Derby			10,0		20,8
London	2,7				8,3
Mbandaka	2,7				12,5
Montevideo					12,5
Tilburg					12,5

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

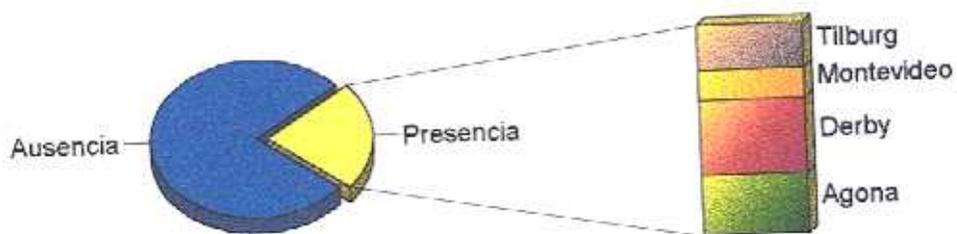
² Harinas de soja.

GRÁFICO 8.15 Serovares de *Salmonella* aislados en HST durante 1993



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

GRÁFICO 8.16 Serovares de *Salmonella* aislados en HSST durante 1993



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

8.3.5.- RESULTADOS OBTENIDOS EN 1994.

TABLA 8.17 Resultados obtenidos en 1994 por áreas geográficas

HSST/HST	ZONA	MUESTRAS NEGATIVAS	MUESTRAS POSITIVAS
HSST			
	H. SUR	40 (7,77%)	2 (8,33%)
	H. NORTE	41 (7,96 %)	9 (37,50%)
Total HSST		81 (15,73 %)	11 (45,83%)
HST			
	H. SUR	184 (35,73 %)	4 (16,67 %)
	H. NORTE	250 (48,54 %)	9 (37,50 %)
Total HST		434 (84,27 %)	13 (54,17 %)
Suma total		515	24

GRÁFICO 8.17 Presencia de *Salmonella* en 1994. Áreas geográficas

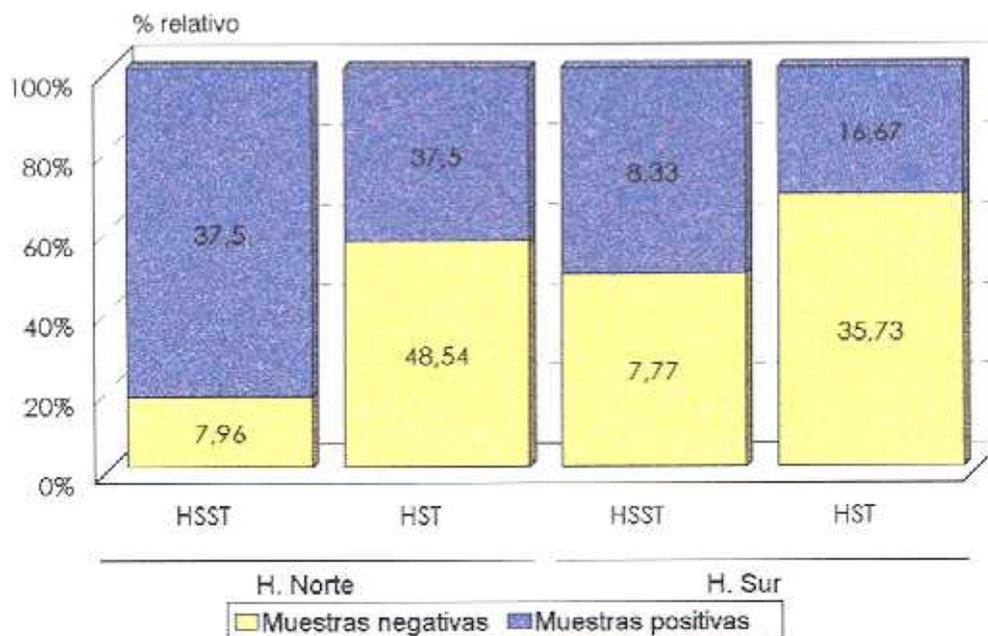


TABLA 8.18 Resultados obtenidos en 1994 por meses

HSST/HST	MES	MUESTRAS NEGATIVAS ^(a)	MUESTRAS POSITIVAS ^(a)
HSST	ENE	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)
	FEB	8 (1,55 %)	4 (16,67 %)
	MAR	7 (1,36 %)	0 (0,00 %)
	ABR	16 (3,11 %)	1 (4,17 %)
	MAY	6 (1,17 %)	0 (0,00 %)
	JUN	10 (1,94 %)	1 (4,17 %)
	JUL	9 (1,75 %)	1 (4,17 %)
	AGO	7 (1,36 %)	0 (0,00 %)
	SEP	8 (1,55 %)	0 (0,00 %)
	OCT	8 (1,55 %)	2 (8,33 %)
	NOV	0 (0,00 %)	2 (8,33 %)
	DIC	2 (0,39 %)	0 (0,00 %)
Total de HSST		81 (15,73 %)	11 (45,83 %)
HST	ENE	40 (7,77 %)	3 (12,50 %)
	FEB	31 (6,02 %)	1 (4,17 %)
	MAR	51 (9,90 %)	1 (4,17 %)
	ABR	43 (8,35 %)	1 (4,17 %)
	MAY	28 (5,44 %)	3 (12,50 %)
	JUN	28 (5,44%)	0 (0,00 %)
	JUL	39 (7,57 %)	1 (4,17 %)
	AGO	50 (9,71 %)	0 (0,00 %)
	SEP	39 (7,57 %)	0 (0,00 %)
	OCT	33 (6,41 %)	1 (4,17 %)
	NOV	31 (6,02 %)	2 (8,33 %)
	DIC	21 (4,08 %)	0 (0,00 %)
Totales de HST		434 (84,27 %)	13 (54,17 %)
Suma total :		515	24

^(a) Frecuencias absolutas.

GRÁFICO 8.18 Datos obtenidos en 1993. (Producto /Mes de aislamiento)

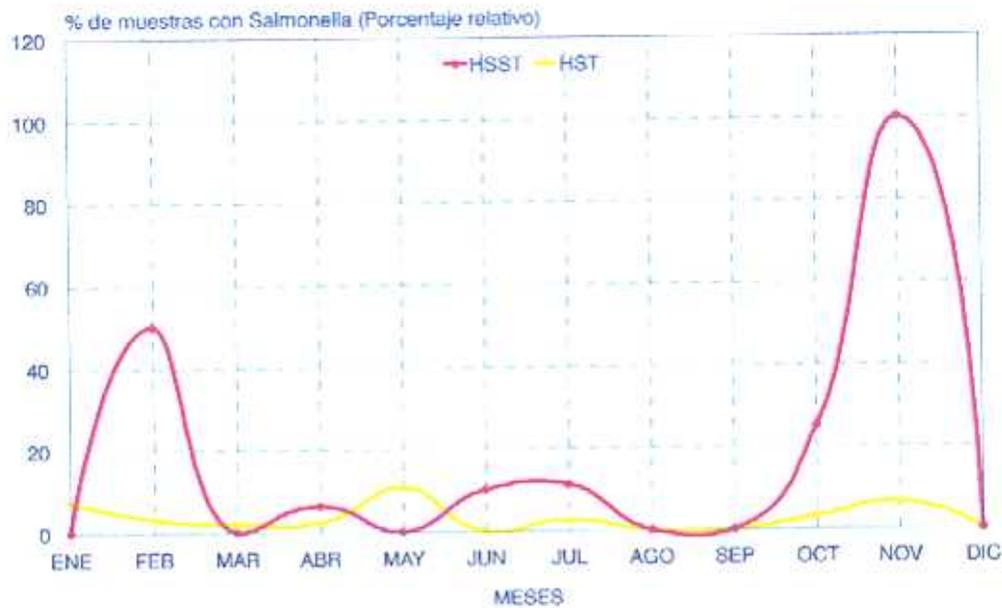


TABLA 8.19 Serotipos de *Salmonella* distribuidos por origen alimentario (1994)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1995)

SEROTIPO	Huevo	Aves	Embut ¹	Agua ⁴	Soja ²
Cubana					5,0
Mbandaka			0,3	2,54	2,0
Monofásica		0,8	0,3		3,0
Montevideo		0,8	2,7	2,22	5,0
Poona				0,32	2,0
Tilburg ³		0,8	2,5	0,32	3,0
Typhimurium ³	7,1	11,8	34,4	5,40	2,0

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

¹ Embutido de carne y carnes frescas.

² Harinas de soja.

³ Serovares productores de brotes de toxoinfección alimentaria durante 1994.

⁴ Serotipos ambientales aislados de agua de bebida, de río, de mar y aguas residuales.

TABLA 8.20 Serotipos de *Salmonella* aislados de animal enfermo (1994)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1995)

SEROTIPO	Aviar	Vacuno ⁴	Porcino	Cunicultura	Soja ²
Cubana					5,0
Mbandaka					2,0
Monofásica	1,8				3,0
Montevideo	3,6				5,0
Poona					2,0
Tilburg ³	1,8				3,0
Typhimurium ³	23,2	28,3	88,9	36,4	2,0

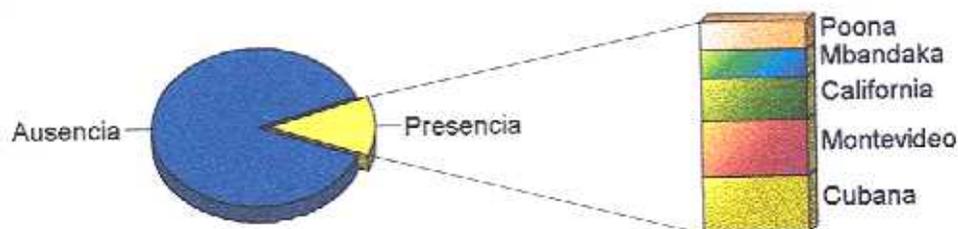
^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

² Harinas de soja.

³ Serovares productores de brotes de toxoinfección alimentaria durante 1994

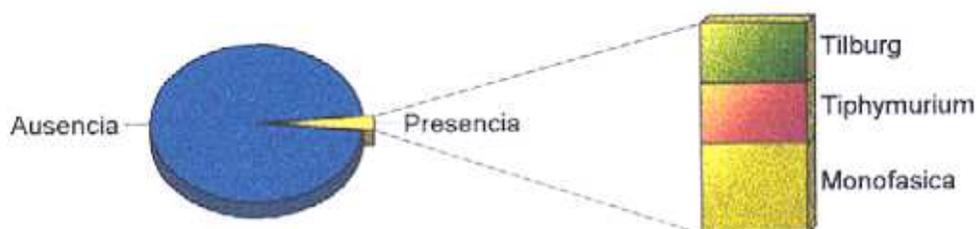
⁴ Se encuentra agrupado el ganado ovino y bovino

GRÁFICO 8.19 Serovares de *Salmonella* aislados en HSST durante 1994



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

GRÁFICO 8.20 Serovares de *Salmonella* aislados en HST durante 1994



Los serovares representados corresponden al 90% del total.

8.3.6.- RESULTADOS OBTENIDOS EN 1995.

TABLA 8.21 Resultados obtenidos en 1995 por áreas geográficas

HSST/HST	ZONA	MUESTRAS NEGATIVAS	MUESTRAS POSITIVAS
HSST			
	H. SUR	44 (5,91 %)	8 (21,05%)
	H. NORTE	82 (11,02 %)	6 (15,79%)
Total HSST		126 (16,94 %)	14 (36,84%)
HST			
	H. SUR	230 (30,91 %)	4 (10,53 %)
	H. NORTE	388 (52,15 %)	20 (52,63 %)
Total HST		618 (83,06 %)	24 (63,16 %)
Suma total		744	38

GRÁFICO 8.21 Presencia de *Salmonella* en 1995. Áreas geográficas

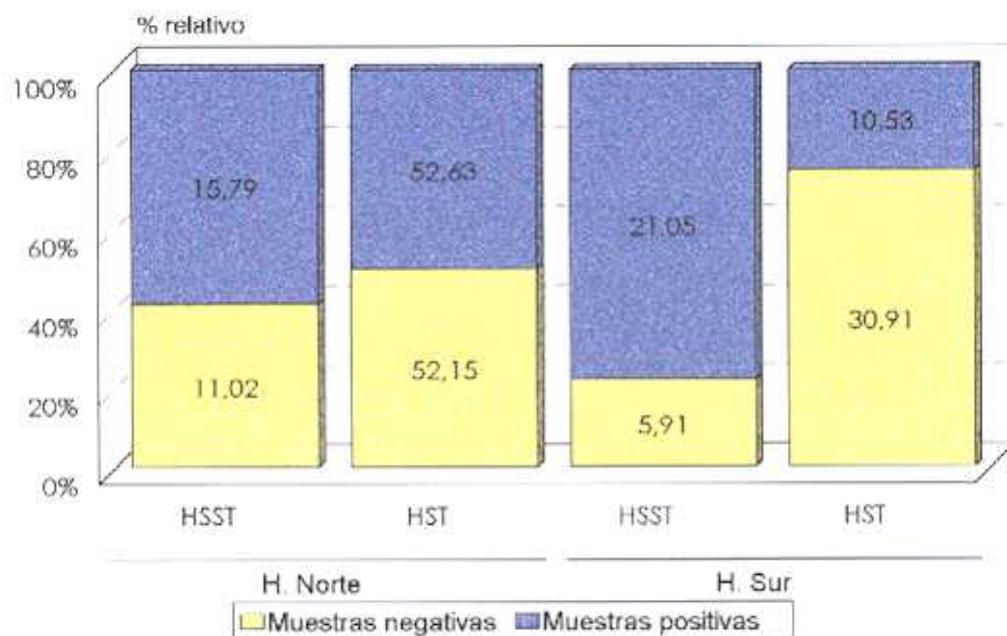


TABLA 8.22 Resultados obtenidos en 1995 por meses.

HSST/HST	MES	MUESTRAS NEGATIVAS ^(a)	MUESTRAS POSITIVAS ^(a)
HSST	ENE	6 (0,81 %)	2 (5,26 %)
	FEB	8 (1,08 %)	0 (0,00 %)
	MAR	8 (1,08 %)	0 (0,00 %)
	ABR	6 (0,81 %)	0 (0,00 %)
	MAY	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)
	JUN	2 (0,27 %)	0 (0,00 %)
	JUL	12 (1,61 %)	0 (0,00 %)
	AGO	18 (2,42 %)	6 (15,79 %)
	SEP	12 (1,61 %)	2 (5,26 %)
	OCT	20 (2,69 %)	0 (0,00 %)
	NOV	16 (2,15 %)	0 (0,00 %)
	DIC	18 (2,42 %)	4 (10,53 %)
Total de HSST		126 (16,94 %)	14 (36,84 %)
HST	ENE	72 (9,68 %)	16 (42,11 %)
	FEB	56 (7,53 %)	0 (0,00 %)
	MAR	36 (4,84 %)	0 (0,00 %)
	ABR	48 (6,45 %)	2 (5,26 %)
	MAY	40 (5,38 %)	0 (0,00 %)
	JUN	50 (6,72 %)	0 (0,00 %)
	JUL	42 (5,65 %)	0 (0,00 %)
	AGO	54 (7,26 %)	0 (0,00 %)
	SEP	44 (5,91 %)	4 (10,53 %)
	OCT	44 (5,91 %)	0 (0,00 %)
	NOV	70 (9,41 %)	2 (5,26 %)
	DIC	62 (8,33 %)	0 (0,00 %)
Totales de HST		618 (83,06 %)	24 (63,16 %)
Suma total :		744	38

(a) Frecuencias absolutas.

GRÁFICO 8.22 Datos obtenidos en 1995. (Producto/mes de aislamiento)

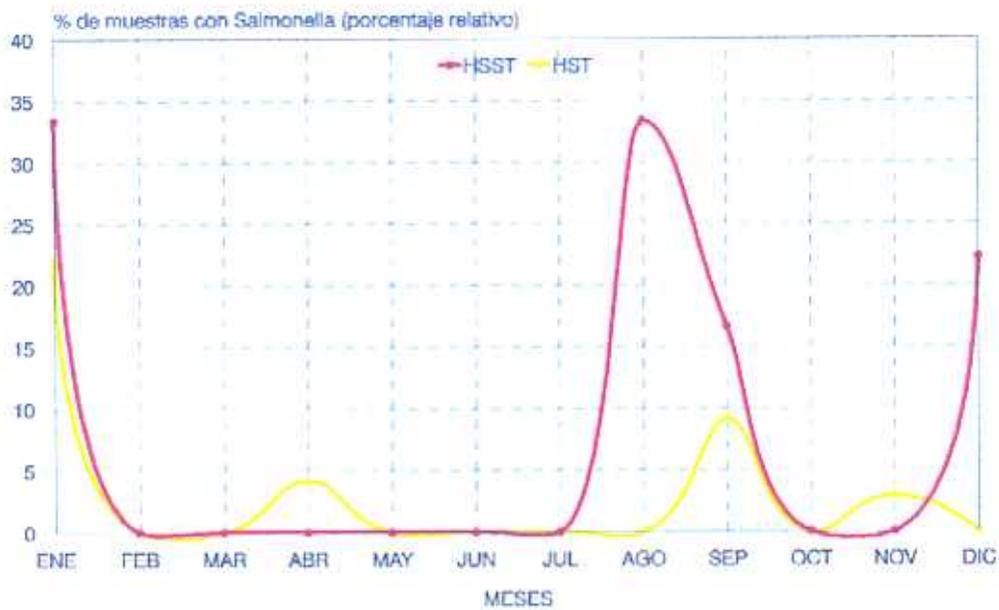


TABLA 8.23 Serotipos de *Salmonella* distribuidos por origen alimentario (1995)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1996)

SEROTIPO	Huevo	Aves	Embut ¹	Soja ²
Agona			1,4	2,8
Bredeney ³		1,0	4,3	13,0
Derby				4,6
Enteritidis ³	50,0	35,1	12,8	2,8
Ridean				7,4
Riesen			0,5	2,8
Tennessee			0,5	3,4
Tilburg			0,5	4,6
Typhimurium ³	6,7	18,5	25,6	4,6
Virchow ³	3,4	4,9	3,3	6,5

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

¹ Embutido de carne y carnes frescas.

² Harinas de soja.

³ Serovares productores de brotes de toxoinfección alimentaria durante 1996.

TABLA 8.24 Serotipos de *Salmonella* aislados de animal enfermo (1995)^a (Usera, M.A., Echeita, A., Aladueña, A. 1996)

SEROTIPO	Aviar	Vacuno ^d	Porcino	Cunicultura	Soja ²
Agona					2,8
Bredeney ³	3,9	2,9			13,0
Derby	1,3		5,5		4,6
Enteritidis ³	40,3		5,5	1,6	2,8
Ridean					7,4
Riesen					2,8
Tennessee					3,4
Tilburg					4,6
Typhimurium ³	26,0	29,4	55,0	6,3	4,6
Virchow ³	9,1				6,5

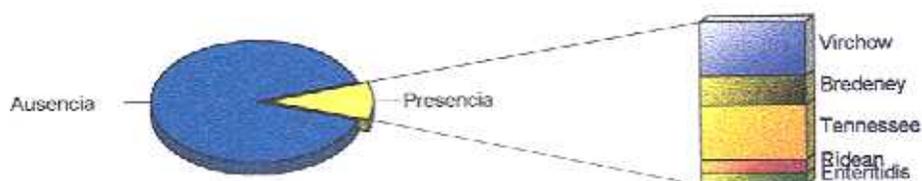
^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

² Harinas de soja.

³ Serovares productores de brotes de toxoinfección alimentaria durante 1994

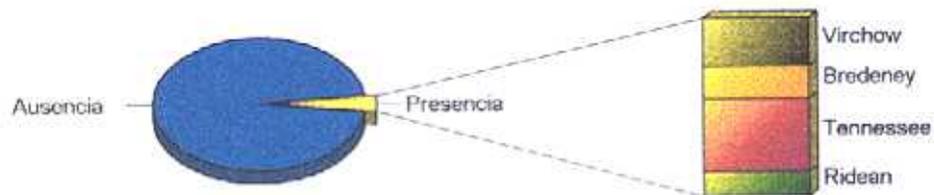
⁴ Se encuentra agrupado el ganado ovino y bovino

GRÁFICO 8.23 Serovares de *Salmonella* aislados en HSST durante 1995



Los serovares representados corresponden al 90% del total

GRÁFICO 8.24 Serovares de *Salmonella* aislados en HST durante 1995



Los serovares representados corresponden al 90% del total

8.3.7.- RESULTADOS OBTENIDOS EN 1996.

TABLA 8.25 Resultados obtenidos en 1996 por áreas geográficas

HSST/HST	ZONA	MUESTRAS NEGATIVAS	MUESTRAS POSITIVAS
HSST			
	H. SUR	88 (13,39%)	4 (15,38%)
	H. NORTE	83 (12,63 %)	16 (61,54%)
Total HSST		171 (26,03 %)	20 (76,92%)
HST			
	H. SUR	261 (39,73 %)	1 (3,85 %)
	H. NORTE	225 (34,25 %)	5 (19,23 %)
Total HST		486 (73,97 %)	6 (23,08 %)
Suma total		657	26

GRÁFICO 8.25 Presencia de *Salmonella* en 1996. Áreas geográficas

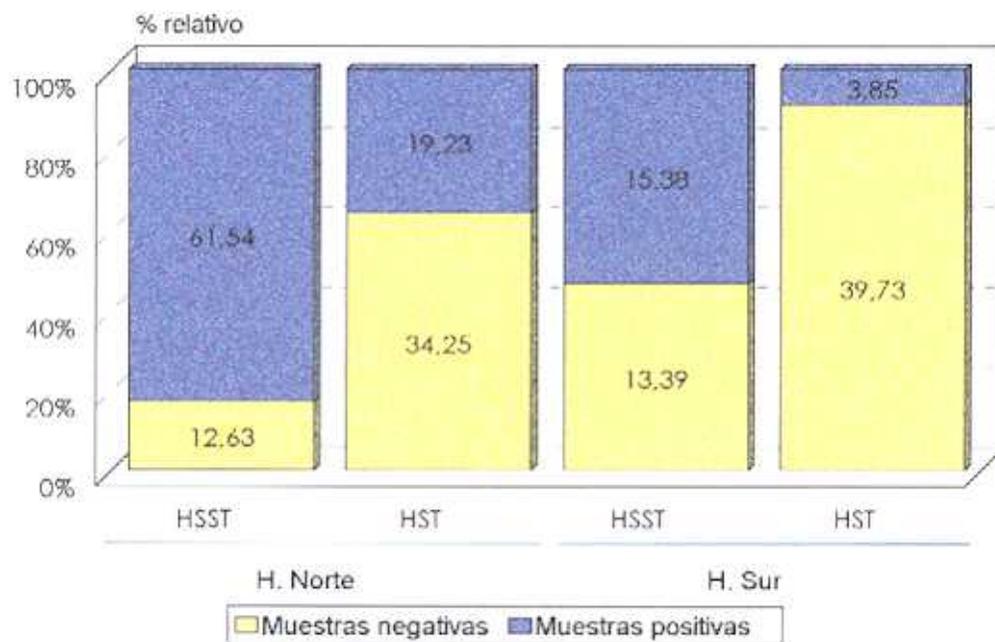


TABLA 8.26 Resultados obtenidos en 1996 por meses

HSST/HST	MES	MUESTRAS NEGATIVAS ^(a)	MUESTRAS POSITIVAS ^(a)
HSST	ENE	14 (2,13 %)	5 (19,23 %)
	FEB	17 (2,59 %)	1 (3,85 %)
	MAR	15 (2,28 %)	5 (19,23 %)
	ABR	13 (1,98 %)	0 (0,00 %)
	MAY	22 (3,35 %)	1 (3,85 %)
	JUN	20 (3,04 %)	1 (3,85 %)
	JUL	12 (1,83 %)	1 (3,85 %)
	AGO	14 (2,13 %)	1 (3,85 %)
	SEP	4 (0,61 %)	1 (3,85 %)
	OCT	11 (1,67 %)	2 (7,69 %)
	NOV	16 (2,44 %)	1 (3,85 %)
	DIC	13 (1,98 %)	1 (3,85 %)
Total de HSST		81 (15,73 %)	20 (76,92 %)
HST	ENE	36 (5,48 %)	1 (3,85 %)
	FEB	45 (6,85 %)	1 (3,85 %)
	MAR	38 (5,78 %)	0 (0,00 %)
	ABR	42 (6,39 %)	1 (3,85 %)
	MAY	37 (5,63 %)	0 (0,00 %)
	JUN	59 (8,98 %)	0 (0,00 %)
	JUL	26 (3,96 %)	0 (0,00 %)
	AGO	38 (5,78 %)	0 (0,00 %)
	SEP	38 (5,78 %)	0 (0,00 %)
	OCT	55 (8,37 %)	0 (0,00 %)
	NOV	43 (6,54 %)	3 (11,54 %)
	DIC	29 (4,41 %)	0 (0,00 %)
Totales de HST		486 (73,97 %)	6 (23,08 %)
Suma total :		657	26

^(a) Frecuencias absolutas.

GRÁFICO 8.26 Datos obtenidos en 1996. (Producto/Mes de aislamiento)

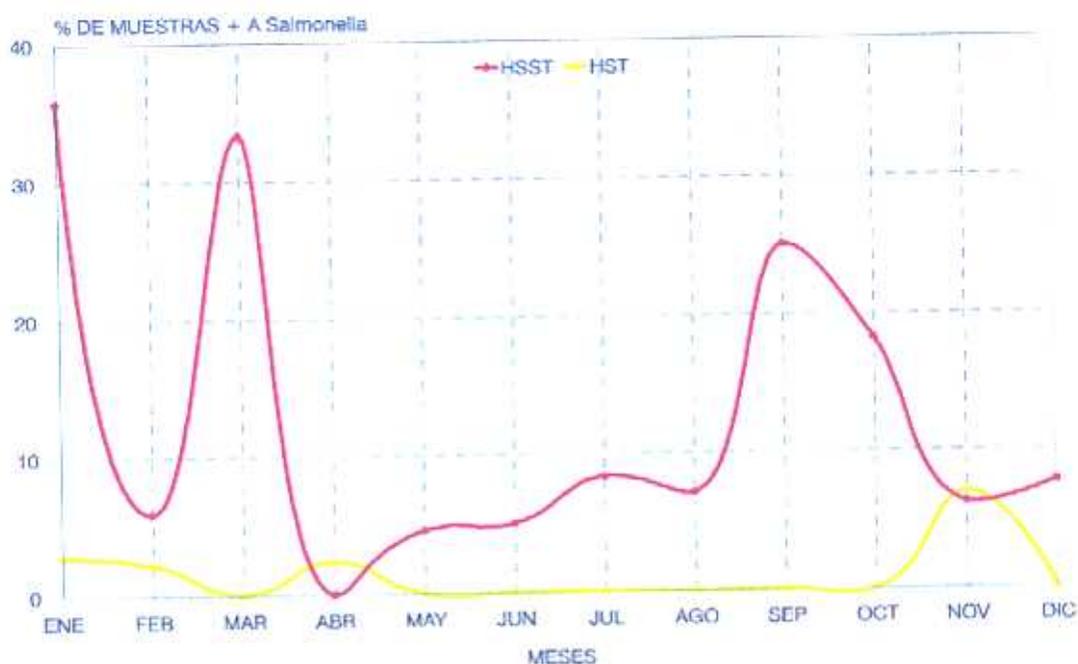


TABLA 8.27 Serotipos de *Salmonella* aislados de animal enfermo (1996)^a
Departamento de Bacteriología del Centro Nacional de referencia de Salmonelosis
Animal de Aljete (Madrid).

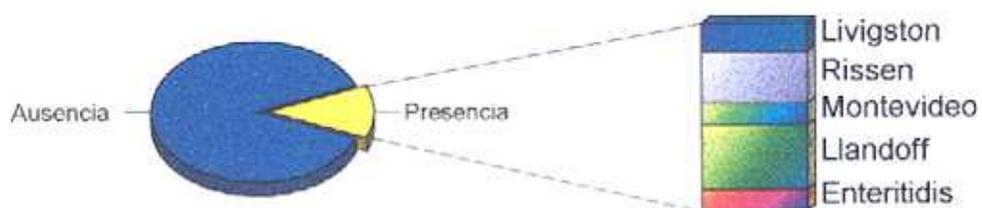
SEROTIPO	Aviar	Vacuno ³	Porcino	Cunicultura	Soja ²
Agona					1,9
Enteritidis	31,2			16,7	2,8
Kentucky					1,9
Livigston					3,7
Llandoff					8,3
Montevideo					2,8
Riesen					6,5

^a Se han tomado como patrón los serovares presentes en harinas de soja. Aproximadamente el 90% de los serotipos mayoritarios. Los datos están en %.

² Harinas de soja.

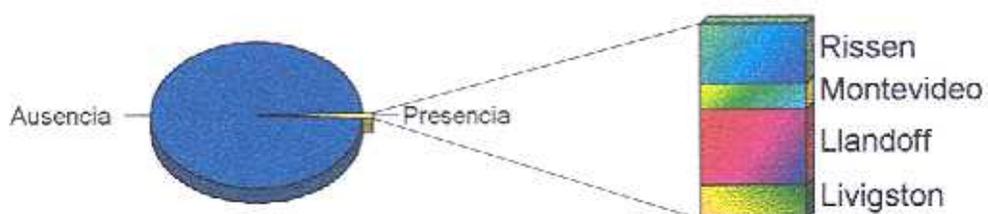
³ Se encuentra agrupado el ganado ovino y bovino

GRÁFICO 8.27 Serovares de *Salmonella* aislados en HSST durante 1996



Los serovars representados corresponden al 90% del total.

GRÁFICO 8.28 Serovares de *Salmonella* aislados en HST durante 1996



Los serovars representados corresponden al 90% del total.

CAPITULO 9.

CONCLUSIONES.

PRIMERA:

- 1 . A) El método descrito por Rappaport Vassiliadis, cuando lo utilizamos para la detección de *Salmonella* a partir de harinas de soja, tiene menor sensibilidad que la descrita por otros autores para otros productos.
- 1 . B) El límite de detección de la técnica propuesta por nosotros, utilizando Xilosa Lisina Dextrosa Agar en placa, es de 10 ufc/g.
- 1 . C) El agar Salmonella - Shigella, ha resultado el medio de aislamiento más sensible para la recuperación de *Salmonella* a partir de harinas de soja.
- 1 . D) El medio Agar Verde Brillante se mostró como el menos sensible de los utilizados

SEGUNDA:

Para la detección de *Salmonella* a partir de harinas de soja proponemos la siguiente metodología:

- 2 . A) Puede suprimirse el preenriquecimiento. Dado que la metodología propuesta resulta suficientemente sensible
- 2 . B) Realización de un sólo enriquecimiento en Selenito Verde Brillante.

- 2 . C) Recomendamos la utilización de tres medios de aislamiento: agar Salmonella - Shigella, agar xilosa lisina dextrosa y agar verde brillante.

TERCERA:

Ha sido frecuente encontrar más de una serovariedad de Salmonella por muestra analizada, lo que implica que las fuentes de contaminación de las harinas de soja son muy variadas, por lo tanto sería conveniente investigar más de una colonia por muestra, ya que el aislamiento de serovariedades poco patógenas, no implica que no se encuentren otras potencialmente más peligrosas como S. Enteritidis o S. Typhimurium.

CUARTA:

Las Salmonella resultan extremadamente lábiles a temperaturas de congelación superiores a -30°C, por tanto:

- 4 . A) Cuando una muestra ha de procesarse para investigar Salmonella, no debe conservarse a temperaturas superiores a -40°C.
- 4 . B) Si la muestra se ha de procesar en un tiempo inferior a 24 horas, debe mantenerse en refrigeración a 4°C.
- 4 . C) Si se prevé que el tiempo va a ser superior y puede producirse alteración, se debe congelar a temperaturas iguales o inferiores a -40°C.
- 4 . D) Antes de realizar un análisis bacteriológico, nunca han de congelarse las muestras a -18° C (congeladores caseros).

QUINTA:

A pesar de la creencia generalizada de que la salmonelosis se contrae por el consumo de productos de origen animal, se puede concluir que la harina de soja es un producto altamente contaminado por *Salmonella*, según se ha demostrado en el trabajo que hemos realizado a lo largo de los últimos 7 años. Por tanto resulta imprescindible el exhaustivo control microbiológico de esta materia prima, antes de incorporarla a los alimentos, tanto para el consumo humano como animal.

SEXTA:

La presencia de *Salmonella* en harinas de soja tratadas es significativamente menor que en las harinas de soja sin tratar. En ambos casos se observaron variaciones estacionales, siendo el otoño y sobre todo el invierno las estaciones donde el porcentaje de aislamientos ha sido mayor.

SEPTIMA:

No se ha relacionado la menor prevalencia de *Salmonella* en harinas de soja sin tratar con la presencia de inhibidores en estos productos.

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES.

AGAR NUTRITIVO.....	156
AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA	156
AGAR VERDE BRILLANTE	157
AGAR XILOSA, LISINA, DEXTROSA	157
AGUA PEPTONADA	158
AGUA PEPTONADA TAMPONADA	158
ANTISUERO DE SALMONELLA O POLY A-I Y Vi.	158
CALDO BASE CON TETRATIONATO (TT)	158
CALDO CON LACTOSA (CL)	159
CALDO CON SELENITO Y CISTINA (SC) (Difco)	159
CARBONATO-BICARBONATO, TAMPÓN	163
ENTEROTUBE II.	159
GRAM NEGATIVOS (GN).....	160
INFUSION DE CEREBRO Y CORAZON BHI	160
MEDIO DE CONGELACION.....	160
MEDIO DE CONGELACION.....	161
PBS.....	163
PBS - T	163
PBS SALINO AL 1%	163
PBS-TWEEN	164
PÚRPURA DE BROMO - CRESOL AL 0,04%	164
RAPAPPORT VASSILIADIS	161
REACTIVO DE KOVACS	164
SELENITO VERDE BRILLANTE	166
SOLUCION DE METILCELULOSA	165
SOLUCION DE YODO	165
SOLUCION GLICEROL SALINO	164

SOLUCION RINGER, DILUIDA AL CUARTO..... 165

VOGUES PROSKAUER REACTIVO A..... 165

VOGUES PROSKAUER REACTIVO B..... 165

MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES.

◆ AGAR NUTRITIVO (Difco)

Extracto de carne.....	3 g
Peptona.....	5 g
Agar.....	15 g

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C.

pH final 6,8 ± 0,2 a 25° C.

◆ AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA. (Difco)

Extracto de carne.....	5,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares número 3	8,5 g
Citrato sódico	8,5 g
Tiosulfato sódico.....	8,5 g
Citrato férrico	1,0 g
Agar agar	13,5 g
Rojo neutro	0,025 g
Verde brillante.....	0,33 g

Rehidratar 60 g con 1000 ml de agua destilada o desionizada y caliente hasta la ebullición. Hervir durante 2 ó 3 minutos evitando el calentamiento excesivo. No debe autoclavarse. Dejar enfriar hasta 56-60° C y dispensar en placa Petri estériles.

pH final 7,0 ± 0,2 a 25° C.

◆ AGAR VERDE BRILLANTE (Difco)

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Cloruro sódico.....	5,0 g
Agar agar	20,0 g
Rojo fenol	0,08 g
Verde brillante	0,0125 g

Rehidratar 58 g con 1000 ml de agua destilada o desionizada hasta una total homogeneización. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Evitar el sobre calentamiento. Dejar enfriar hasta los 55 - 60°C y dispensar en placa Petri estériles.

pH final 6,9 ± 0,2 a 25° C.

◆ AGAR XILOSA, LISINA, DEXTROSA (Becton Dickinson)

Xilosa.....	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
L-lisina	5,0 g
Cloruro sódico.....	5,0 g
Desoxicolato sódico.....	2,5 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 ml
Agar agar	13,5 g
Rojo fenol	0,08 g
Tiosulfato de sodio.....	6,8 g
Citrato de amonio férrico	0,8 g

Mezclar con 1000 ml de agua destilada estéril hasta una total homogeneización. Calentar en baño de agua hasta su total disolución. ¡No puede autoclavarse!.

pH final 7,4 ± 0,2 a 25° C.

◆ AGUA PEPTONADA (Difco)

Peptona	10 g
Cloruro sódico.....	5 g

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH final 7,2 ± 0,2 a 25° C.

◆ AGUA PEPTONADA TAMPONADA (Oxoid)

Peptona	10 g
Cloruro sódico.....	5 g
Fosfato Disódico	3,5 g
Fosfato Monopotásico.....	1,5 g

Añadir 20 g a un litro de agua destilada. Mezclar y distribuir en recipientes finales. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH final 7,2 ± 0,2 a 25° C.

◆ ANTISUERO DE SALMONELLA O POLY A-I Y Vi. (Difco)

Rehidratar añadiendo 3 ml de una solución de NaCl 0,85%. Agitar hasta su total disolución.

◆ CALDO BASE CON TETRACIONATO (TT) (Difco)

Peptona	5 g
Sales biliares	1 g
Tiosulfato sódico.....	30 g
Carbonato sódico	10 g

Suspender 4,6 g en 100 ml de agua destilada o desionizada y calentar hasta la ebullición. Enfriar por debajo de 60° C. Añadir 2 ml de solución de yodo al medio. No calentar el medio después de añadir el yodo. Dispensar cantidades de 10-12 ml en tubos de ensayo estériles. Utilizar el medio el mismo día en que se prepare.

CALDO CON LACTOSA (CL) (Difco)

Ingredientes por litro:

Extracto de carne.....	3 g
Peptona	5 g
Lactosa	5 g

Suspender 13 g en 1 litro de agua destilada o desionizada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo. Dispensar en tubos. Colocar un vial de fermentación invertido en cada tubo. Tapar los tubos y esterilizarlos en el autoclave durante 15 minutos a 121° C.

pH final 6,9 ± 0,2 a 25° C.

◆ CALDO CON SELENITO Y CISTINA (SC) (Difco)

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

Suspender 23 g en 1 litro de agua destilada o desionizada. Calentar hasta la ebullición para disolver. Dispensar en tubos estériles o botellas a una profundidad de al menos 60 mm. Si se desea, calentar durante 10 minutos en flujo de vapor. ¡No puede autoclavarse!. El sobrecalentamiento destruirá las propiedades selectivas. El medio no es estéril y se debe emplear el mismo día de su preparación.

pH final 7,0 ± 0,2 a 25° C.

◆ ENTEROTUBE II. (BBL)

Enterotube II, es un sistema de identificación de Enterobacterias que utiliza 15 pruebas bioquímicas.

◆ GRAM NEGATIVOS (GN) (Difco)

Triptosa	20 g
Dextrosa	1g
Manitol -D	2 g
Citrato sódico	5 g
Desoxicolato sódico.....	0,5 g
Fosfato dipotásico.....	4 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Cloruro sódico.....	5 g

Para rehidratar, disolver 39 g en 1 litro de agua destilada o desionizada. Dispensar en tubos y esterilizar en el autoclave durante 15 minutos a 116 ó a 121° C. Evitar un calentamiento excesivo del medio.

pH final 7,0 ± 0,2 a 25° C

◆ INFUSION DE CEREBRO Y CORAZON BHI (Difco)

Infusión de cerebros de ternera	200 g
Infusión de corazón de vacuno.....	250 g
Peptona	10 g
Dextrosa	2 g
Cloruro sódico.....	5 g
Fosfato disódico.....	2,5 g

Disolver 37 gramos en 1 litro de agua destilada o desionizada. Dispensar según se desee. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C

pH final 7,4 ± 0,2 a 25° C

◆ MEDIO DE CONGELACION

Triptona	10 g
Leche desnatada.....	20 g
Glicerina.....	80 ml
Agua destilada	320 ml

Pesar la triptona y la leche. Disolver en el agua y añadir la glicerina. Precalear el autoclave y esterilizar a 110° C durante 10 minutos. Enfriar rápido y dispensar en tubos estériles (3 - 4 ml).

◆ MEDIO DE CONGELACION (Diez, P. y col. 1994)

Cloruro sodico.....	10 g
Glicerina.....	15 ml
Agua destilada.....	85 ml

Pesar la triptona y la leche. Disolver en el agua y añadir la glicerina. Precalear el autoclave y esterilizar a 110°C durante 10 minutos. Enfriar rápido y dispensar en tubos estériles (3 - 4 ml).

◆ RAPAPPORT VASSILIADIS (Oxoid)

Peptona de soja.....	5,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato dipotásico	2,65 g
Fosfato monopotásico	1,6 g
Cloruro de magnesio 6 H ₂ O	40,0 g
Verde malaquita.....	0,04 g

Mezclar 30,0 g con 1000 ml de agua destilada o desionizada. Calentar, suavemente, hasta una total homogeneización. Repartir en volúmenes de 10 ml en tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 115°C durante 15 minutos.

pH final 5,2 ± 0,2 a 25° C.

◆ Selenito Verde Brillante (DIFCO)

Bacto peptona	5,0 g
Extracto de Levadura	5,0 g
D-Manitol	5,0 g
Selenito sódico	4,0 g
Fosfato Dipotásico.....	2,65 g
Fosfato Monopotásico.....	1,02 g
Verde brillante	0,005 g

Mezclar 23,70 g con 1000 ml de agua destilada o desionizada estéril hasta una total homogeneización. Calentar en baño de agua hasta su total disolución, a unos 70°C durante aproximadamente 10 minutos. ¡No puede autoclavarse!. Dejar enfriar hasta los 30 - 35° C antes de utilizar.

pH final 7,2 ± 0,2 a 25° C.

REACTIVOS:

◆ CARBONATO-BICARBONATO, TAMPÓN.

Bicarbonato sódico	1,59 g
Carbonato sódico	2,93 g
Agua destilada	1 l

Se ajusta el pH a 9,6

◆ PBS

Fosfato potásico monobásico	4,08 g
Fosfato potásico dibásico	12,18 g
Cloruro sódico.....	8,5 g
Agua destilada	1 l

Se ajusta el pH a 7,2

◆ PBS SALINO AL 1% (Saco, M. y col. 1986; Tschape, H., 1996)

Cloruro sódico.....	14,400 g
Fosfato sódico dibásico.....	7,466 g
Fosfato potásico monobásico	1,160 g
Agua destilada	2000 ml

Se ajusta el pH a 7,2 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

◆ PBS - T (Minnich, S.A. y col. 1982)

Cloruro sódico.....	3,0 g
Fosfato potásico monobásico	0,20 g
Fosfato sódico dibásico.....	2,90 g
Cloruro sódico.....	0,20 g
Nitrato sódico	0,20 g
Agua destilada	1l

Se ajusta el pH a 7,2.

Añadir Tween 20 al 0,05%

◆ PBS-TWEEN (Minnich, S.A. y col. 1982)

Fosfato potásico monobásico	4,08 g
Fosfato potásico dibásico	12,18 g
Cloruro sódico.....	8,5 g
Agua destilada.....	1 l

Se ajusta el pH a 7,2

Añadir Tween 20 al 0,05%

◆ PÚRPURA DE BROMO CRESOL AL 0,04% (Difco):

Hidroxido sódico	18,5 ml
Púrpura de Bromo Cresol.....	0,1 g
Agua destilada.....	250 ml

Se ajusta el pH entre 5,2 y 6,8.

● REACTIVO DE KOVACS (Difco)

Alcohol amílico.....	75 ml
Ácido etílico 95%	25 ml
p-dimetilaminobenzaldehido	5 g

◆ SOLUCION GLICEROL SALINO

Añadir 85 ml de Cloruro sódico en 1% en agua destilada y 15 ml de glicerol.

Esterilizar durante 20 minutos a 121° C.

◆ SOLUCION DE METILCELULOSA

Añadir 1,2 g de Sulfato de Magnesio a 100 ml de agua destilada. Disolver con agitación y calor. Sin dejar de agitar, añadir 1 g de metilcelulosa (15 centipoises) y hervir de 5 a 19 minutos hasta que se empiecen a formar agregados. Esterilizar a 121° C durante 15 minutos. Una vez fría la solución, la metilcelulosa se redisuelve.

◆ SOLUCION RINGER, DILUIDA AL CUARTO (Wilson G.S., 1935; Harrigan, W.F. y McCance, M.E., 1979))

Cloruro sódico.....	0,9 g
Cloruro potásico.....	0,042 g
Cloruro cálcico	0,048 g
Bicarbonato sódico.....	0,02 g
Agua destilada.....	400,00 ml

Se disuelven las sales en agua, se distribuyen de la forma requerida y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

◆ SOLUCION DE YODO (Difco)

Cristales de yodo	6 g
Yoduro potásico.....	5 g
Agua destilada o desionizada	20 ml

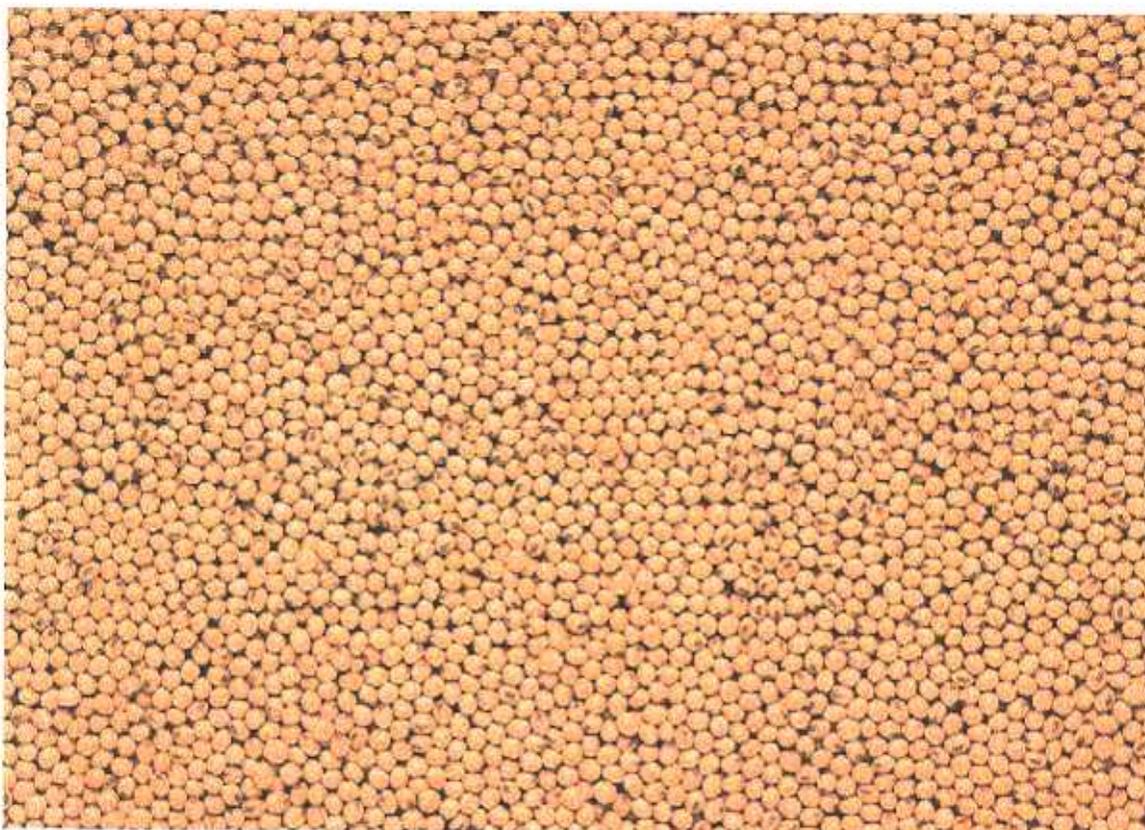
◆ VOGUES PROSKAUER REACTIVO A (Baritt, M.M. 1936)

Alfa-naftol	50 g
Etanol absoluto.....	1000 ml

• VOGUES PROSKAUER REACTIVO B (Baritt, M.M. 1936)

Hidroxido potásico	40 g
Agua destilada.....	100 ml

**ANEXO III
FOTOGRAFÍAS.**



Fotografía 1.- Haba de soja



Fotografía 2.- Descarga y almacenamiento de harina de soja.



Fotografía 3.- Descarga y almacenamiento de harina de soja.



Fotografía 4.- Carga de camión automática (almacenamiento en silos).



Fotografía 5.- Almacenes de soja en el puerto. Gaviotas sobre el tejado.



Fotografía 6.- Almacenes de soja en el puerto. Vuelo de gaviotas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA.

AABO, S. y BAGGESEN, D.L. (1997). Growth of Salmonella Newport in naturally contaminated alfalfa sprouts and estimation of infections dose in a Danish Salmonella Newport outbreak due to alfalfa sprouts. *Salmonella and Salmonellosis* 1, 425-426.

ABURUWAIDA, A.S., SAWAYA, W.N., DASHTI, B.H., BAROON, Z.H. y ALOTHMAN, H.A. (1996). Microbiological shelf-life and quality of frozen broiler chickens stored under simulated market temperatures. *Fleischwirtschaft*. 76, 827-830.

AIROLDI, A.A. y ZOTTOLA, E.A. (1989). The survival of Salmonella Typhimurium in propylene glycol/water mixtures. *Journal of Food Protection*. 52(4), 256-258.

ALLEN, G., BRUCE, V.R., ANDREWS, W.H., SATCHELL, F.B. y STEPHENSON, P. (1991). Recovery of Salmonella from frozen shrimp: evaluation of short- term selective enrichment, selective media, postenrichment, and a rapid immunodiffusion method. *Journal of Food Protection*. 54(1), 22-27.

ALLEN, G., BRUCE, V.R., STEPHENSON, P., SATCHELL, F.B. y ANDREWS, W.H. (1954). Recovery of Salmonella from high-moisture foods by abbreviated selective enrichment. *Journal of Food Protection*. 54(7), 492-495.

ALLEN, G., SATCHELL, F.B., ANDREWS, W.H. y BRUCE, V.R. (1989). Abbreviated selective enrichment, post enrichment and a rapid immunodiffusion method for recovery of Salmonella from instant nonfat dry milk. *Journal of Food Protection*. 52(2), 350-355.

AMEJEIRAS, R., DOMÍNGUEZ, L., FERNÁNDEZ GARAIZABAL, J.F. y MORENO GARCÍA, B. (1994). Valoración de diferentes técnicas para la detección de Salmonella en harinas de soja (Glicine Max L). *Sociedad Española de Microbiología (SEM)* 90-90.

AMEJEIRAS, R., DOMÍNGUEZ, L., MORENO GARCÍA, B. y FERNÁNDEZ GARAIZABAL, J.F. (1993). Prevalencia de Salmonella en derivados de sojas comerciales de distintos orígenes. *SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA (SEM)* 231-231.

AMEJEIRAS, R., DOMÍNGUEZ, L., MORENO GARCÍA, B. y FERNÁNDEZ GARAIZABAL, J.F. (1993). Supervivencia de Salmonella en harina de soja conservadas a distintas temperaturas. Su implicación legal en los análisis contradictorios. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOLOGÍA (SEM) 231-231.

ANDERSON, E.S. (1964). The phage typing of Salmonellae other than S. Typhi. The world problem of salmonellosis. Junk The Hague. 84-110.

ANDREWS, W.H. y RAY, B. (1989). Importance and regulatory implications of the recovery of injured microorganisms from foods and water. Injured index and pathogenic bacteria. 217-223.

ANGEN, O., SKOV, M.N., CHRIEL, M., AGGER, J.F. y BISGAARD, M. (1996). A retrospective study on Salmonella infection in Danish broiler flocks. Preventive veterinary medicine. 26, 223-237.

ANONIMO (1984). Official methods of analytical manual. Journal of AOAC.

ANONIMO (1985). SAS Introductory guide for personal computer. SAS Institute Inc.

ANONIMO (1988). Salmonella Enteritidis phage type 4: chicken and egg. Lancet. 720-722.

ANONIMO (1989). Full-fat soybeans in poultry diets. Poultry International. 64-65.

ANONIMO (1992). WHO consultation on national and local schemes of Salmonella control in poultry. WHO WHO/CDS/VOH/92.110

ANONIMO (1992). International, official methods of analysis. Journal of AOAC.

ANONIMO (1992). EPA test methods for evaluating solid waste (SW-846). Method 8280 and EPA test methods for organic chemical analysis, method 613. EPA

ANONIMO (1993). General guidance on methods for the detection of Salmonella. ISO 6579:1993. ISO 6579.

ANONIMO (1994). Pesticide analytical manual. Food and Drug Administration. 2

ANONIMO (1994). World Health Organization. Guidelines on cleaning, disinfection and vector control in Salmonella infected poultry flocks with particular reference to S. Enteritidis. WHO WHO/Zoon/94.172.

ANONIMO (1994). WHO. Report of a WHO consultation on strategies for detection and monitoring of Salmonella infected poultry flocks. WHO WHO/Zoon/94.173

ANONIMO (1994). WHO-FEDESAFEP workshop on competitive exclusion, vaccination and antimicrobials in Salmonella control in poultry. WHO WHO/CDS/VPH/94.134

ANONIMO (1994). Pesticide analytical manual. Food and Drug Administration. 1.

ANONIMO (1996). Salmonellosis associated with dead seals. Veterinary record. 138, 533-535.

ANONIMO (1996). Multiresistant Salmonella in cats. Veterinary record. 139, 174-175.

ANONIMO (1996). Tolerance enforcement methods. EPA

ANONIMO (1996). Salmonellosis associated with dead seals. Veterinary record. 138, 533.

ARSCOTT, G.H. (1975). Effect of soybean meal, extruded soybeans and ground raw soybean on the performance of White Leghorn layer. Oregon State University. 448

AUMAITRE, A. (1985). L'utilisation de la graine de soja extrudée dans l'alimentation du porcelet sevré précocement. III Congrès National des producteurs de soja. 4

BAGGESEN, D.L., WEGENER, H.C., BAGER, F., STEGE, H. y CHRISTENSEN, J. (1996). Herd prevalence of Salmonella enterica infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. Preventive veterinary medicine. 26, 201-213.

BAILEY, J.S., CHIU, J.Y., COX, N.A. y JOHNSTON, R.W. (1988). Improved selective procedure for detection of Salmonellae from poultry and sausage products. Journal of Food Protection. 51(5), 391-396.

BAILEY, J.S., COX, N.A. y BLANKENSHIP, L.C. (1991). A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring Salmonellae from processed broiler carcasses. Journal of Food Protection. 54(5), 354-356.

BAKER, R.C., QURESHI, R.A. y HOTCHKISS, J.H. (1986). Effect of an elevated level of carbon dioxide containing atmosphere on the growth of spoilage and pathogenic bacteria at 2, 7, and 13 C. Poultry Science. 65, 729-737.

BALLANTYNE, B., SLESINSKI, R.S. y MYERS, R.C. (1988). The acute toxicity and mutagenic potential of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Toxicology and Industrial Health* . 4, 23-37.

BANKS, W., CLAPPERTON, J.L., KELLY, A.G., WILSON, A.G. y CRAWFOR, R.J. (1980). The yield, fatty acid composition and physical properties of milk fat obtained by feeding soya oil to diary cows. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 31, 368.

BARANSKI, B., INDULSKI, J., JANIK SPIECHOWICZ, E. y PALUS, J. (1989). Mutagenicity of airborne particulates in the rubber industry. *Journal Applied Toxicology*. 9, 389-393.

BARRELL, R.A. (1988). The survival and recovery of Salmonella Typhimurium phage type U285 in frozen meats and tryptone soya yeast extract broth. *International Journal of Food Microbiology*. 6(4), 309-316.

BARRITT (1936). M.M. *Journal of Pathogenic Bacteriology*. 42, 441.

BAUER, J. y HORMANSDORFER, S. (1996). Salmonellosis in farm animals. *Fleischwirtschaft*. 76, 726-728.

BECKERS, J.H., TIPS, P.D., DELFGOU VAN, ASCH.E.H. y PETERS, R. (1986). Evaluation of an enzyme immunoassay technique for the detection of Salmonellas in minced meat. *Letters in Applied Microbiology*. 2, 53-56.

BERRANG, M.E., COX, N.A., BAILEY, J.S. y BLANKENSHIP, L.C. (1991). Methods for inoculation and recovery of Salmonella from chicken eggs. *Poultry Science*. 70(11), 2267-2270.

BLASER, M.J. y NEWMAN, L.S. (1982). A review of human Salmonellosis. Infective dose. *Revue Infection Disease*. 4, 1096.

BOARD, R.G., CLAG, C.H.E. y LOCK, J.L. (1989). The behaviour of Salmonella in egg contents and raw egg products. *Society for Applied Bacteriology*. 7.

BOE 28 de julio de 1976. Decreto 2 julio 1976. Alimentos, cervezas y bebidas refrescantes. Modifica diversos artículos y epígrafes de varias reglamentaciones técnico-sanitarias y normas alimentarias específicas.

BOE 10 de marzo de 1977. Orden 21 febrero 1977. Alimentos. Normas higiénico-sanitarias para la instalación y funcionamiento de industrias dedicadas a la preparación y distribución de comidas para consumo de colectividades y medios de transporte.

BOE 11 y 12 de julio de 1977. Orden 21 junio 1977. Embutidos. Normas de calidad para chorizo, salchichón y lomo embuchado.

BOE 12 de octubre de 1978. Decreto 19 mayo 1978. Confiterías y pastelerías. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio de productos de confitería, pastelería, bollería y repostería.

BOE 12 de octubre de 1978. Decreto 2 junio 1978. Conservas. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de los vegetales.

BOE 1 de julio de 1982. Orden 30 Abril 1982. Galletas. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio de galletas.

BOE 24 de noviembre de 1982. Orden 12 noviembre 1982. Grasas. Modifica la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio de las comestibles, margarinas, minarinas y preparados grasos.

BOE 27 de mayo de 1983. Orden 27 abril 1983. Te. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio del té.

BOE 1 de junio de 1983. Orden 27 abril 1983. Sal. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio de la sal y salmuera.

BOE 5 de julio de 1983. Orden 29 junio 1983, por la que se aprueban normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón y fiambre de paleta y magro de cerdo y fiambre de magro de cerdo.

BOE 15 de julio de 1983. Real Decreto 22 junio 1983, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidos y de la producción agro-alimentaria.

BOE 20 de julio de 1983. Orden 12 julio 1983, por la que se aprueban las normas generales de calidad para la nata y nata en polvo con destino al mercado interior.

BOE 13 de agosto de 1983. Orden 5 agosto 1983, por la que se aprueba la norma de calidad para la miel destinada al mercado interior.

BOE 11 de noviembre de 1983. Real Decreto 13 octubre 1983, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de los comedores colectivos. Modificada por Real Decreto 1333/1984, de 6 de junio.

BOE 3 de enero de 1984. Resolución 26 diciembre 1983, de la Subsecretaria, por la que se modifica la Orden de la Presidencia del Gobierno, de 29 de junio de 1963, por la que se aprueban normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón y fiambre de paleta y magro de cerdo y fiambre de magro de cerdo.

BOE 27 de febrero de 1984. Real Decreto 25 enero 1984, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de jarabes.

BOE 17 de marzo de 1984. Real Decreto 12 marzo 1984. Gelatina. Norma de calidad para las gelatinas comestibles destinadas al mercado interior.

BOE 9 de abril de 1984. Orden 6 abril 1984, por la que se aprueban las normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón y fiambre de paleta y magro de cerdo y fiambre de magro de cerdo, destinados al mercado interior.

BOE 10 de mayo de 1984. Real Decreto 28 marzo 1984, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de salsas de mesas.

BOE 6 de julio de 1984. Orden 23 mayo 1984. harina y sémola. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio de las harinas y sémolas de trigo.

BOE 22 de diciembre 1984. Real Decreto 2242/1984 de 26 de septiembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de condimentos y especias.

BOE 5 de enero de 1985. Orden 21 diciembre 1984, por la que se ratifica el reglamento de la denominación de origen "Queso Manchego" y de su Consejo Regulador.

BOE 22 de octubre de 1985. Orden 15 octubre 1985. Moluscos. Norma de calidad para los mejillones cocidos y congelados. Rectificación 7 de febrero de 1986

BOE 6 de diciembre de 1985. Orden 29 noviembre 1985, por la que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos destinados al mercado interior.

BOE 20 de febrero de 1987. Real Decreto 11 febrero 1987. Leche condensada. Modifica la norma de calidad para la leche condensada destinada al mercado interior.

BOE 20 de febrero de 1987. Real Decreto 11 febrero 1987. Leche esterilizada. Modifica la norma de calidad para la leche esterilizada destinada al mercado interior.

BOE 20 de febrero de 1987. Real Decreto 11 febrero 1987. Leche concentrada. Modifica la norma de calidad para la leche concentrada destinada al mercado interior.

BOE 20 de febrero de 1987. Real Decreto 11 febrero 1987. Leche en polvo. Modifica la norma de calidad para la leche en polvo destinada al mercado interior.

BOE 20 de febrero de 1987. Real Decreto 11 febrero 1987. Leche evaporada. Modifica la norma de calidad para la leche evaporada destinada al mercado interior.

BOE 20 de febrero de 1987. Real Decreto 11 febrero 1987. Leche UHT. Modifica la norma de calidad para la leche UHT destinada al mercado interior.

BOE 20 de febrero de 1987. Real Decreto 11 febrero 1987. Leche pasteurizada. Modifica la norma de calidad para la leche pasteurizada destinada al mercado interior.

BOE 10 de marzo de 1987. Real Decreto 30 enero 1987. Helados. Modifica la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio.

BOE 28 de marzo de 1987. Real Decreto 20 febrero 1987, sobre las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales.

BOE 12 de mayo de 1987. Orden 8 mayo 1987. Cuajada. Modifica la norma de calidad en el mercado interior.

BOE 13 de mayo de 1987. Corrección de errores del Real Decreto 20 febrero 1987, sobre las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales

BOE 3 de julio de 1987. Orden 1 julio 1987. Yogur. Norma de calidad para el destinado al mercado interior.

BOE 3 de julio de 1987. Real Decreto 30 abril 1987. Yogur. Deroga el Real Decreto 5 de marzo 1976, por el que se aprueba la norma específica.

BOE 8 de septiembre de 1987. Real Decreto 26 junio 1987. Cereales. Reglamentación técnico-sanitaria para elaboración, circulación y comercio de cereales en copos o expandidos.

BOE 9 de septiembre de 1987. Real Decreto 10 julio 1987. Sal y salmuera. Modifica el art. 17 de la Reglamentación técnico-sanitaria para obtención, circulación y venta de los comestibles.

BOE 17 de febrero de 1988. Orden 15 febrero 1988. Ganadería. Especificaciones bacteriológicas para los productos destinados a la alimentación de animales.

BOE 10 de noviembre de 1988. Real Decreto 28 octubre 1988. Horchata. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de la chufa.

BOE 8 de febrero de 1989. Real Decreto 3 febrero 1989. Patatas fritas y aperitivos. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercialización de productos de aperitivo.

BOE 22 de mayo de 1989. Orden 12 mayo 1989. Piensos. Métodos oficiales de tomas de muestras de alimentos para animales.

BOE 26 de octubre de 1989. Real Decreto 20 octubre 1989. Plan Nacional de Investigación de Residuos en los Animales y en las Carnes Frescas.

BOE 20 de septiembre de 1990. Real Decreto 14 septiembre 1990. Aguas. Reglamentación técnico-sanitaria para el abastecimiento y control de las aguas potables de consumo público.

BOE 26 de septiembre de 1990. Real Decreto 21 septiembre 1990. Turrón y mazapán. Modifica la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercio, aprobada por el Real Decreto 1787/1982 de 14 de mayo de 1982.

BOE 26 de julio de 1991. Real Decreto 22 julio 1991. Aguas. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercio de las bebidas envasadas.

BOE 15 de agosto de 1991. Orden 2 agosto 1991. Pescado. Normas microbiológicas, límites de contenido en metales pesados y métodos analíticos para su determinación en los productos de la pesca y acuicultura con destino al consumo humano.

BOE 4 de octubre de 1991. Real Decreto 27 septiembre 1991. Horchata. Modifica la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de las de chufa, aprobadas por Real Decreto 1338/1988 de 28 octubre (R. 1988, 2258 y R. 1989,776).

BOE 25 de diciembre de 1991. Real Decreto 12 diciembre 1991. Caramelos, chicles, confites y golosinas. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercio.

BOE 5 de diciembre de 1992. Real Decreto 30 octubre 1992, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros.

BOE 5 de diciembre de 1992. Real Decreto 6 noviembre 1992. Huevos. Reglamentación técnico-sanitaria para la producción y comercialización de los ovoproductos.

BOE 27 de marzo de 1993. Real Decreto 5 marzo 1993, por el que se establecen las normas de calidad de las aguas y de la producción de los moluscos y otros invertebrados marinos vivos

BOE 30 de marzo de 1993. Real Decreto 26 febrero 1993, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la comercialización de moluscos bivalvos vivos.

BOE 23 de noviembre de 1993. Orden 19 noviembre 1993. Piensos. Modifica la orden 11 de octubre de 1988, relativa a sustancias y productos indeseables en alimentación animal.

BOE 19 de enero de 1994. Real Decreto 17 diciembre 1993, sobre normas sanitarias de eliminación y transformación de animales muertos y desperdicios de origen animal y protección frente a agentes patógenos en piensos de origen animal.

BOE 26 de mayo de 1994. Real Decreto 19 noviembre 1993, por el que se establece los controles veterinarios aplicables a los productos que se introducen en territorio nacional procedentes de países no pertenecientes a la Comunidad Europea.

BOE 24 de septiembre de 1994. Real Decreto 22 julio 1994, por el que se establece las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de leche cruda, leche tratada térmicamente y productos lácteos.

BOE 18 de enero de 1995. Real Decreto 23 diciembre 1995. Sanidad animal. Establece medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis, procedentes de los animales y productos de origen animal, a fin de evitar las infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos.

BOE 10 de febrero de 1995. Real Decreto 29 diciembre 1995. Establece las condiciones de sanidad animal y sanitarias aplicables a los intercambios e importaciones de productos no sometidos, con respecto a estas condiciones, a las normas específicas establecidas en el capítulo I del Real Decreto 49/1993, de 15-1-1993 (RCL 1993/716 y 1566), y, por lo que se refiere a los patógenos, en el Real Decreto 1316/1992, de 30-10-1992 (RCL 1992/2547).

BOE 2 de marzo de 1995. Real Decreto 25 noviembre 1995, por el que se aprueba los métodos oficiales de análisis de piensos o alimentos para animales y sus primeras materias.

BOE 3 de enero de 1997. Real Decreto 2459/1996, de 2 diciembre, por el que se establece la lista de enfermedades de animales de declaración obligatoria y se da la normativa para su notificación.

BOE 13 de enero de 1998. Real Decreto 19 diciembre 1997. Carne. Establece las condiciones sanitarias aplicables a la producción y comercialización de la carne picada y preparados de carne.

BOE 21 de mayo de 1998. Real Decreto 30 Abril 1998. Aguas. Modifica el Real Decreto 1164/1991, de 22 julio de 1991 que aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de las bebidas envasadas.

BOLTON, K.J., DODD, C.E.R., GOULD, G.W. y WAITES, W.M. (1996). Survival of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin A in glassy and rubbery states of gelatin. *Journal of Applied Bacteriology*. 81, 191-194.

BONBIANTE, M. (1987). The effects of including fullfat soya in dairy and beef feeds. *Asociacion Americana de la Soja*. 29-52.

BOUVET, P. y GRIMONT, P.A.D. (1996). Augmentation de l'incidence des infections ... *Salmonella* serotype Hadar en France. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*. 139-140.

BREWER, D.G., MARTIN, S.E. y ORDALL, Z.J. (1977). Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most probable number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology. 34, 797.

BRYAN, F.L. y DOYLE, M.P. (1995). Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. Journal of Food Protection. 58, 326-344.

CAFFER, M.I. y EIGUER, T. (1994). *Salmonella* Enteritidis in Argentina. International Journal of Food Microbiology. 21, 15-19.

CALDWELL, M.E. y RYERSON, D.C. (1939). Salmonellosis in certain reptiles. Journal Infection Diseases. 65, 242-245.

CAMPABADAL, H.C. y LEDESMA, R. (1982). Nutrient digestibility of starter swine diets containing different levels of FFSBM obtained by extrusion. International Pig Veterinary Society Congress. México

CHALKER, R.B. y BLASER, M.J. (1988). A review of human salmonellosis: III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. Review Infection Diseases. 10, 111-124.

CHALUPA, W., RICHABAUGH, B., KROFELD, D.S. y SKLAN, D. (1984). Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. Journal of Dairy Science. 67, 1439.

CHAO, W.L., DING, R.J. y CHEN, R.S. (1987). Survival of pathogenic bacteria in environmental microcosms. Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih. 20, 339-348.

CHEEKE, P.R. (1987). Utilization of soybean products in rabbit feeding. Asociacion Americana de la Soja. 53-65.

CHEEKE, P.R. (1988). Rabbit feeding: the utilisation of protein. Feed International. 3

CHEEKE, P.R. y AMBERG, K.W. (1972). Protein nutrition of the rabbit. Nutrition Research. 5, 259-266.

CHERNOSHCHEKOV, K.A. (1989). A method for studying the effect of the geomagnetic field on the vital activities of microorganisms in the enteric family. Zh.Mikrobiologiya Epidemiology Immunobiology. 9, 28-34.

CHOWDHURY, R., SAHU, G.K. y DAS, J. (1996). Stress response in pathogenic bacteria. *Journal of Biosciences*. 21, 149-160.

CHUNG, K.T. y YU, F.P. (1990). Survival of *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli* in aquatic environments. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih*. 23, 181-188.

COX, N.A., BAILEY, J.S. y THOMSON, J.E. (1983). Effect of various media and incubation conditions on recovery of inoculated *Salmonella* from poultry feed. *Poultry Science*. 62, 947.

CRAIGIE, J. y YEN, C.H. (1938). The demonstration of types of *B.typhosus* by means of preparation of type II Vi phage. *Canadian Journal Public Health*. 29, 448-496.

D'AOUST, J.Y. (1991). Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. 13, 207-215.

D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. y BOVILLE, A. (1983). Rapid cultural methods for detection of *Salmonella* in feeds and feed ingredients. *Journal of Food Protection*. 46, 851.

D'AOUST, J.Y., SEWELL, A.M. y JEAN, A. (1992). Efficacy of prolonged (48 h) selective enrichment for the detection of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. 15, 121-130.

DAVIES, R.H. y WRAY, C. (1996). Determination of an effective sampling regime to detect *Salmonella* Enteritidis in the environment of poultry units. *Veterinary Microbiology*. 50, 117-127.

DAVIES, R.H. y WRAY, C. (1996). Persistence of *Salmonella* Enteritidis in poultry units and poultry food. *British Poultry Science*. 37, 589-596.

DAVIES, R.H. y WRAY, C. (1996). Seasonal variations in the isolation of *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from environmental samples. *Journal of Veterinary Medicine. Series B. Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 43, 119-127.

DE LA HIGUERA (1987). Protein and energy from soya in fish nutrition. *Asociacion Americana de la Soja*. 66-82.

DEBLAS, J.C., PEREZ, E., FRAGA, M.J., RODRIGUEZ, J.M. y GALVEZ, J.F. (1981). Effects of diet of feed intake and grown of rabbits from weaning to slaughter and different ages and weights. *Journal animal science*. 52:1225-1232.

DEBLAS, J.C., FRAGA, M.J., RODRIGUEZ, J.M. y MENDEZ, J. (1984). The nutritive value of feeds for growing-fattening rabbits. 2 Protein evaluation. *Journal Applied Rabbit Research*. 7, 97-100.

DECLUDT, B., HAEGHEBAERT, S., GRIMONT, P.A.D. y BOUVET, P. (1997). Epidemie de salmonellose *Salmonella* serotype Hadar. *Bulletin Epidemiologique Hebdomaire*. 140, 141.

DENTON, J.H. (1991). Improving hygiene in the handling of eggs. *World's Poultry Science Journal*. 7 N:8, 13-15.

DESENCLOS, J.C, BOUVET, P., BRISABOIS, A., FREMY, S., LAHELLEC, C. y GRIMONT, P.A.D. (1996). Epidemiologie des infections ... *Salmonella*: tendances recentes en France et en Europe. *Bulletin de la Societe Francaise de Microbiologie* 11, 209-215.

DESENCLOS, J.C., REBIŠRE, I., BOUVET, P. y Col. (1996). Bilan de l'investigation de 5 epidemies communautaires de salmonellose, France, 1993-1994. *Bulletin Epidemiologique Hebdomaire*. 39-43.

DEVI, S.J.N. y MURRAY, C.J. (1991). Cockroaches (*Blatta* and *Periplaneta* species) as reservoirs of drug-resistant *Salmonella*. *Epidemiology and Infection*. 107(2), 357-361.

DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. Primera Directiva de la Comisión de 1 de marzo de 1976 sobre determinación de modos comunitarios de toma de muestras para el control oficial de la alimentación animal.

DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. Directiva 92/117/CEE del Consejo de 17 de diciembre de 1992 relativa a las medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos.

DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. Directiva 97/22/CEE del Consejo, de 22 de abril de 1997, por la se modifica la Directiva 92/117/CEE relativa a las medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos.

DICKSON, J.S. y ANDERSON, M.E. (1991). Control of *Salmonella* on beef tissue surfaces in a model system by pre- and post-evisceration washing and sanitizing, with and without spray chilling. Journal of Food Protection. 54(7), 514-518.

DIEZ, P. y CALDERÓN, V. (1992). Congelación de suspensiones bacterianas para determinación de residuos antibióticos. PNIR C. Laboratorio n. 7.

DIEZ, P., CALDERÓN, V., BERENQUER, J.A, y URUBURU, F. (1994). Preservation of cultures of vegetative cells for use in antibiotic residue assays. Food Microbiology.11, 1-4.

DIJK, H.J.VAN, O'DELL, G.D., PERRY, P.R. y GRIMES, L.W. (1983). Extruded versus raw ground soybean for dairy cows in early lactation. Journal of Dairy Science. 66, 2521.

DOCARMO, L.S., VIEIRA, A.C., DOSREIS, J.D.P. y Col. (1996). *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis present in food implicated in food poisoning. Revista de Microbiologia. 27, 122-125.

ECKNER, K.F. y ZOTTOLA, E.A. (1989). Behavioral response of spoilage and pathogenic microorganisms inoculated into reconstituted skim milk concentrated by ultrafiltration. Milchwissenschaft. 44, 208-210.

EDEL, W. y KAMPELMACHER, E.H. (1974). Comparative studies on *Salmonella* isolation from feeds in ten laboratories. Bull W.H.O. 50, 421.

ELLISON, A., PERRY, S.F. y STEWART, G.S.A.B. (1991). Bioluminescence as a real-time monitor of injury and recovery in *Salmonella* Typhimurium. International Journal of Food Microbiology.12(4), 323-332.

EMSWILER-ROSE, B., GEHLE, W.D., JOHNSON, R.W., OKREND, A., MORAN, A. y BENNETT, B. (1984). An enzyme immunoassay technique for detection of *Salmonellae* in meat and poultry products. Journal Food Science. 49, 1018-1020.

ENTIS, P. (1996). Validation of the ISO-GRID(R) 2-day rapid screening method for detection of *Salmonella* spp in egg products. Journal of Food Protection. 59, 555-558.

EWING, W.H. (1966). Enterobacteriaceae:taxonomy and nomenclature. Monograph Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia.

- FELIX, A. y CALLOW, B.R. (1943). Typhing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. *Journal Britanical Medical*. 2, 127.
- FENG, P. (1996). Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. *Journal of Journal of AOAC international*. 79, 809-812.
- FIERENS, H. y HUYGHEBAERT, A. (1996). Screening of *Salmonella* in naturally contaminated feeds with rapid methods. *International. Journal of Food Microbiology*. 31, 301-309.
- FINLAY, B.B., GUMBINER, B. y FALKOW, S. (1988). Penetration of Salmonella through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. *Journal of Cell Biology*. 107, 221-230.
- FLOWERS, R.S., KLATT, M.J., ROBISON, B.J. y MATTINGLY, J.A. (1988). Evaluation of abbreviated enzyme immunoassay method for detection of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of the Association of Official Analytical*. 71(2), 341-343.
- GAHAN, C.G.M., ODRISCOLL, B. y HILL, C. (1996). Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 3128-3132.
- GALITSKI, T. y ROTH, J.R. (1996). A search for a general phenomenon of adaptive mutability. *Genetics*. 143, 645-659.
- GARCIA RODRIGUEZ, J.A y PICAZO, J.J. (1996). *Microbiología médica general*. Ed. Mosby.
- GARLICH, J.D. (1988). Calidad de la soja. Disponibilidad de aminoácidos y su relación con el procesado, el índice de urea y los inhibidores de tripsina. *Asociacion Americana de la Soja*.
- GERICHTER, C.B. y SECHTER, I. (1966). Comparasion of methods for the isolation of *Salmonella* from bone meal. *Applied Microbiology* 14, 711.
- GLOSNIKA, R., KUNIKOWSKA, D., DZIADZIUZKO, H. y TOKARSKA-KUNEJKO, E. (1990). Distribution of *Salmonella* Enteritidis phage-types in Poland in 1981-1990. *Bulletin of the Institute of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia*. 41, 1-4.
- GOEKTAN, D. y TUNCEL, G. (1988). Effect of ingredients on recovery of *Salmonella* in raw meat balls. *Meat Science*. 22(2), 155-160.

GRANCHAROV, K., GORNEVA, G., MLADENOVA, J., NORPOTH, K. y GOLOVINSKY, E. (1986). Lack of genotoxic and cytotoxic effects of the herbicide lenacil on mouse tumor cells and on some *Salmonella* Typhimurium strains. *Arzneimittelforschung*. 36, 1660-1663.

GREENWOOD, D.E., SWAMINATHAN, B. y MORSE, E.V. (1980). Two selective enrichment media for the isolation of *Salmonella* from mechanically deboned poultry meat. *Journal Food Science*. 45, 1131-1135.

HAMMERSTRAND, G.E., BLACK, L.T. y GLOVER, J.D. (1981). Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemist*. 58:42-45.

HANAI, K., SATAKE, M., NAKANISHI, H. y VENKATESWARAN, K. (1997). Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strains in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 775-778.

HANRAHAM, T. (1987). Antinutritional factors in feed ingredients. *Pig International*. 3.

HARPER, J.H. (1986). Extrusion texturization of foods. *Feed Technology*. 3.

HARRIGAN, W.F. y MCCANCE, M.E. (1979). Métodos de laboratorio de microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia.

HAYASHI, M., SHIMAZAKI, Y., KAMATA, S. y KAKIICHI, N. (1991). Effects of sodium chloride on destruction of microorganisms by microwave heating in potatoes. *Nippon Kosho Eisei Zasshi*. 38, 431-437.

HERKELMAN, K.L. y CROMWELL, G.L. (1990). Utilization of full-fat soybeans by swine reviewed. *Feedstuffs*.

HERNANDEZ HABA, J y DUBON PEREZ, F. (1992). Sistemática bacteriana. Ed. Copión, S.L.

HILL, L.R. (1966). An index to desoxyribonucleic acid base compositions of bacterial species. *Journal of General Microbiology*. 44, 419-437.

HINTON, M. (1988). *Salmonella* infection in chicks following the consumption of artificially contaminated feed. *Epidemiology and Infection*. 100(2), 247-256.

HOLLEY, R.A. y PROULX, M. (1986). Use of egg washwater pH to prevent survival of *Salmonella* at moderate temperatures. Poultry Science. 65, 922-928.

HOLMES, B. (1987). Quality control of raw material and finished product in fullfat soya production. Asociacion Americana de la Soja. 96-112.

HORANI, F.G (1987). The use of fullfat soya in poultry feeds. Asociacion Americana de la Soja. 4-14.

HORWITZ, W Y OTROS (1980). Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. Journal of AOAC. International. 63-6, 1344-1354.

HUMPHREY, T.J. (1989). The influence of heat and/or acid on the growth and survival of *Salmonella* in eggs. Society for Applied Bacteriology. 7

HUMPHREY, T.J., GREENWOOD, M., GILBERT, R.J., ROWE, B. y CHAPMAN, P.A. (1989). The survival of *Salmonellæ* in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. Epidemiology and Infection. 103, 35-45.

INTVELD, P.H., VANSTRIJPLOCKEFEER, N.G.W.M., HAVELAAR, A.H. y MAIER, E.A. (1996). The certification of a reference material for the evaluation of the ISO method for the detection of *Salmonella*. Journal of Applied Bacteriology. 80, 496-504.

IZAT, A.L., DRIGGERS, C.D., COLBERG, M., REIBER, M.A. y ADAMS, M.H. (1989). Comparison of the DNA probe to culture methods for the detection of *Salmonella* on poultry carcasses and processing waters. Journal of Food Protection. 52(8), 564-570.

JACQMAIN, E. y DARAS, G. (1987). Detection of *Salmonella* in powdered foods. Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology. 42(3), 75-77.

JAQUETTE, C.B., BEUCHAT, L.R. y MAHON, B.E. (1996). Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella stanley* inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. Applied and Environmental Microbiology. 62, 2212-2215.

JETTON, J.P., BILGILI, S.F., CONNER, D.E., KOTROLA, J.S. y REIBER, M.A. (1992). Recovery of *Salmonellæ* from chilled broiler carcasses as affected by rinse media and enumeration method. Journal of Food Protection. 55, 329-332.

- JUNE, G.A., SHERROD, P.S., HAMMACK, T.S., AMAGUANA, R.M. y ANDREWS, W.H. (1996). Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for recovery of *Salmonella* spp from raw flesh, highly contaminated foods, and poultry feed: Collaborative study. *Journal of AOAC international*. 79, 1307-1323.
- KAFEL, S. (1981). Effects of preenrichment media and their incubation conditions on isolating *Salmonellæ* from fish meal. *Journal of Food Protection*. 44, 268.
- KAFEL, S. y POGORZELSKA, E. (1987). Transfer volume-dependent recovery of *Salmonella* from minced meat. *Journal of Food Protection*. 50(7), 584-586.
- KAFEL, S. y POGORZELSKA, E. (1987). Improvement of *Salmonella* recovery from frozen ground meat by transfer of small volumes of pre-enriched samples. *International Journal of Food Microbiology*.5(1), 81-85.
- KAUFFMANN, F. (1966). Das *Salmonella* Sub-genus IV. *Annual Immunology Hung*. 9, 77-80.
- KAUFFMANN, F. (1966). The bacteriology of Enterobacteriaceae. Williams and Wilkins. Co Baltimore.
- KAUFFMANN, F. (1966). The bacteriology of Enterobacteriaceae. E. Munksgaard, Copenhage.
- KAUFFMANN, F. (1978). Das Fundament. E. Munksgaard, Copenhagen.
- KAUFFMANN, F. y EDWARDS, P.R. (1952). Cassification and nomenclature of Enterobacteriaceae. *Ins. Bulletin Bacteriological Nomenclature Taxonomy*. 2, 2-8.
- KIRBY, R.M. y DAVIES, R. (1990). Survival of dehydrated cells of *Salmonella* Typhimurium LT2 at high temperatures. *Journal Applied Bacteriology*. 68(3), 241-246.
- KOLMAN, A., KLEMAN, M., BOHUSOVA, T., GUSTAFSSON, J.A. y OVERVIK, E. (1992). Mutagenic and cytotoxic action of heated pork meat extracts in human diploid fibroblasts. *Mutagenesis*. 7, 141-144.
- KOUL, K. Y PANHOTRA, B.R. (1989). Isolation, survival & transfer of R-plasmid of *Salmonella* Typhimurium in Dal Lake of Kashmir (India). *Indian Journal Medical Research*. 89, 138-143.

- KRAFT, A.S., ADLER, V., HALL, P., PETTIT, G.R., BENJAMIN, W.H JR. y BRILES, D.E. (1992). In vivo administration of bryostatin 1, a protein kinase C activator, decreases murine resistance to *Salmonella* Typhimurium. *Cancer Research*. 52, 2143-2147.
- LALKO, J. (1977). *Salmonella* Enteritidis bacteriophage typing. *Bulletin of the Institute of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia* 28, 187-194.
- LASTHAW, J.D. y LAYTON, P.C. (1976). Raw and heated full-fat soybeans in laying hens. *Poultry Science*, 55:1268-1272.
- LASTHAW, J.D. (1974). Soybean processing and its effect on the laying hen. *Poultry Science*, 53:1342-1347.
- LE MINOR, L., ROHDE, R. y TAYLOR, J. (1970). Nomenclature des *Salmonella*. *Annual Institute Pasteur*. 119, 206-210.
- LEDESMA, D.V. y RENE, A. Uso de la soja integral en la alimentación del cerdo. *Asociación Americana de la Soja*.
- LEDESMA, R. (1987). Storage of soybeans and fullfat soya in hot climates. *Asociacion Americana de la Soja*. 151-157.
- LEE, M.B. y STYLIADIS, S. (1996). A survey of pH and water activity levels in processed salamis and sausages in Metro Toronto. *Journal of Food Protection*. 59, 1007-1010.
- LESCURE, M.T., GORSE, F., ATRACHE, V., BOUROUINA, F. y BEAUBOIS, P. (1997). Rapid *Salmonella* detection using an automated immuno-enrichment system. *Salmonella and Salmonellosis* 1, 93-96.
- LESSIRE, M., LECLERCQ, B. y CONAN, L. (1988). Variability de la valeur energetique de la graine de soja traitée pour les volailles. *Inra* 1, 265-270.
- LIN, C.M., FERNANDO, S.Y. y WEI, C.I. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* and *E.coli* O157:H7 in vegetable salads. *Food Control*. 7, 135-140.
- LINDQUIST, B.L., LEBENTHAL, E., LEE, P.C., STINSON, M.W. y MERRICK, J.M. (1987). Adherence of *Salmonella* Typhimurium to small-intestinal enterocytes of the rat. *Infection and Immunity*. 55, 3044-3050.

LIU, T.S., SNOEYENBOS, G.H. y CARLSON, V.L. (1969). The effect of moisture and storage temperature on a *Salmonella* Senftenberg 775W population in meat and bone meal. Poultry Science. 48, 1628-1633.

LO VERDE, P.T., AMENTO, C. y HIGASHI, G.I. (1980). Parasite interaction of *Salmonella* Typhimurium and Shistosoma. Journal Infection Diseases. 141, 177-185.

LUKASOVA, J. (1990). Antibacterial activity of milk-fermenting bacteria. Veterinary Microbiology. 35, 187-192.

LUKASOVA, J., RADOVA, P., SOJKOVA, M. y KRYSTOFOVA, J. (1990). The effect of milk cultures on the survival of *Salmonellae* in milk. Veterinary Medical. 35, 81-86.

MACKEY, B.M. y DERRICK, C.M. (1986). Elevation of the heat resistance of *Salmonella* Typhimurium by sublethal heat shock. Journal Applied Bacteriology. 61, 389-393.

MACKEY, S.M. y KERRIDGE, A.L. (1988). The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of *Salmonella* in minced beef. Journal of Food Microbiology. 6, 57-65.

MADDEN, R.H. (1996). Detection of *Salmonella* in poultry feeds and environmental samples. Letters in Applied Microbiology. 23, 204-204.

MADSEN, M. (1996). Prevalence and serovar distribution of *Salmonella* in fresh and frozen meat from captive Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). International Journal of Food Microbiology. 29, 111-118.

MADSEN, M., HALD, B. y OLSEN, A. (1997). The epidemiological role of better (*Typhea stercorea* L.) in the transmission of *Salmonella* in Danish poultry. *Salmonella* and Salmonellosis. 1, 371-373.

MARTIN, A. y KATZ, S.E. (1991). A resuscitation/selection system for rapid determination of *Salmonella* in foods. Journal of the Association of Official Analytical. 74(3), 522-525.

MATRAI, T. (1987). Experiences with high moisture corn and raw soybean. Asociacion Americana de la Soja. 123-132.

MCDERMID, A.S. y LEVER, M.S. (1996). Survival of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium Swindon in aerosols. Letters in Applied Microbiology. 23, 107-109.

METRICK, C., HOOVER, D.G. y FARKAS, D.F. (1989). Effects of high hydrostatic pressure on heat-resistant and heat-sensitive strains of *Salmonella*. *Journal Food Science*. 54(6), 1547-1549.

MIAN, A. y GARLICH, J.D. (1985). Tolerance of young turkeys to undercooked soybean meal. *Federation Proc.* 44:1524.

MIELKE, S.D. y SCHINGOETHE, D.J. (1981). Heat-treated soybeans for lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 64, 1579.

NASCIMIENTO, V.P., CRANSTOUN, S. y SOLOMON, S.E. (1992). Relationship between shell structure and movement of *Salmonella* Enteritidis across the eggshell wall. *British Poultry Science*. 33 N.1, 37-48.

NASTASI, A. y MAMMINA, C. (1996). Epidemiology of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis in southern Italy during the years 1980-1994. *Research in Microbiology*. 147, 393-403.

NAUCIEL, C., RONCO, E. y GUENET, J.L. (1988). Genetic control of *Salmonella* Typhimurium-induced depression of delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. *Infection and Immunity*. 56, 310-313.

NG, S.P., TSUI, C.O., ROBERTS, D., CHAU, P.Y. y NG, M.H. (1996). Detection and serogroup differentiation of *Salmonella* spp in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2294-2302.

NICOLS, D.A., AMES, D.R., HINES, R.H. y ALLEE, G.L. (1982). Effect of temperature on nutrient digestibility during heat stress and diet manipulation to reduce heat stress in finishing swine. *American Society of Animal Science*. 37.

NOTERMANS, S., SOENTORO, P.S. y DELFGOU VAN, ASCH.E.H. (1990). Survival of pathogenic microorganisms in an egg-nog-like product containing 7% ethanol. *International Journal of Food Microbiology*. 10, 209-217.

NURMI, E. y RANTALA, M. (1973). New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241, 210-211.

NYCHAS, G.J.E. y TASSOU, C.C. (1996). Growth/survival of *Salmonella* Enteritidis on fresh poultry and fish stored under vacuum or modified atmosphere. Letters in Applied Microbiology. 23, 115-119.

OLIVE, C., MANSUY, J.M., DESBOIS, N. y Col.I (1996). *Salmonella* Panama en Martinique, aspects Epidemiologiques et cliniques chez l'enfant hospitalis. Medicine et Maladies Infectieuses 26, 590-593.

OPARA, O.O., MALLINSON, E.T., TATE, C.R. y Col. (1992). The effect of exposure, storage times, and types of holding media on the drag-swab monitoring technique for *Salmonella*. Avian Disease. 36, 63-68.

OROS, J., RODRIGUEZ, J.L., HERRAEZ, P., SANTANA, P.y FERNANDEZ, A. (1996). Respiratory and digestive lesions caused by *Salmonella* Arizonae in two snakes. Journal of Comparative Pathology. 115, 185-189.

OSCROFT, C.A., ALCOCK, S.J. y CLAYDEN, J.A. (1987). Recovery of sub-lethally injured bacteria from frozen food. Food Microbiology.4, 257-268.

PALMQUIST, D.L.y JENKINS, T.C. (1980). Fat in lactation rations: A review. Journal of Dairy Science. 63, 1.

PATTERSON, M. (1988). Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmospheres. Letters in Applied Microbiology. 7(3), 55-58.

PERALES, I. y AUDICANA, A. (1989). Evaluation of semisolid Rappaport medium for detection of *Salmonellæ* in meat products. Journal of Food Protection. 52(2), 316-319.

PERALES, I. y AUDICANA, A. (1989). Evaluation of semisolid Rappaport medium for detection of *Salmonellæ* in meat product. Journal of Food Protection. 51, 316-319.

PERALES, I. y AUDICANA, A. (1989). The role of hen's eggs in outbreaks of salmonellosis in north Spain. International Journal of Food Microbiology. 8, 175-180.

PERALES, I. y ERKIAGA, E. (1991). Comparison between semisolid Rappaport and modified semisolid Rappaport-Vassiliadis media for the isolation of *Salmonella* spp. from foods and feeds. International Journal of Food Microbiology.14(1), 51-57.

PFEIFFER, D.G. y AXTELL, R.C. (1980). Coleoptera of poultry manure in caged layer houses in North Carolina. *Environmental Entomology*. 9, 21-28.

PICANDET, A.M., GIUGNO, S.M., CUETO RUA, M.M., CAFFER, M.I. y TERRAGNO, R. (1995). Serovariedades de *Salmonella* en infección hospitalaria en La Plata. VII Congreso argentino de Microbiología.

PICCIONI, M. (1971). Diccionario de alimentación animal. Acribia 3 ed., 663-673.

PIERRE, V., TCHAKAMIAN, S. y LE QUERRERC, F. (1994). Les toxi-infections alimentaires collectives en 1994. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*. 21, 93.

POKORNY, J. (1988). Survival and virulence of Salmonellae in water. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*. 32, 361-366.

RAY, B. (1989). Injured index and pathogenic bacteria: Occurrence and Detection in foods, water and feeds. CRC Press.

REINHARD, R.G., MCADAM, T.J., FLICK, G.J. y Col. (1996). Analysis of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* O157:H7 in fresh hand-picked blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. *Journal of Food Protection*. 59,803-807.

RHODES, M.W. y KATOR, H. (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 2902-2907.

RIGBY, C.E. (1984). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella* lipopolysaccharide in poultry specimens. *Applied and Environmental Microbiology*. 47, 1327-1330.

RIOS CASTRO, A. (1994). Interpretación estadística de los datos obtenidos en la intercomparación de laboratorios. Plan Nacional de Calidad. 1, 1-73.

ROBERTS, J.J. y ENGELBRECHT, A.M.M.A. (1988). Pasteurization of heat-treated rooibos tea and the recovery of *Salmonellae* from heat-treated tea after low temperature storage. (In Proceedings of the ninth biennial congress, Cape Town, September 7, 1987 see FSTA (1988) 20 8A5.) *Food Review*. 15, 26-27.

ROEL-MULDER (1991). *Salmonella* contamination of eggs and meat products. *World's Poultry Science Journal*. 7 N:3, 12-13.

RUESGSEGGGER, G.J. y SCHULTZ, L.H. (1985). Response of high producing dairy cows in early lactation to the feeding of heat-treated whole soybean. *Journal of Dairy Science*. 68, 3272.

SACO GALVANY, M., DIAZ YUBERO, M.A. y SAN GABRIEL, A. (1986). *Microbiología de materias primas para piensos compuestos y otros alimentos animales*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

SANTOMA, G. y DEBLAS, J.C. (1987). The effects of different fats and their inclusion level in diets for growing rabbits. *Animal Production*. 45, 291-300.

SCOTT, m.l. (1973). Processed whole soybeans in commercial layer diets. *Feedstuffs*. 26-32.

SEN, A.C., WEI, C.I., FERNANDO, S.Y., TOTH, J., AHMED, E.M. y DUNAIF, G.E. (1988). Reduction of mutagenicity and toxicity of aflatoxin B1 by chlorine gas treatment. *Food and Chemical Toxicology*. 26, 745-752.

SHIMODA, K., MAEJIMA, K., KUHARA, T. y NAKAGAWA, M. (1991). Stability of pathogenic bacteria from laboratory animals in various transport media. *Laboratory Animal*. 25, 228-231.

SIEGEL, S. (1956). *Nonparametric statistic for the behavioral sciences*. McGraw-Hill.

SIERRA, M., GONZALEZFANDOS, M.E., GARCIALOPEZ, M.L., GARCIAFERNANDEZ, M.C. y MORENO, B. (1996). Evaluation of selective enrichment and plating media for detection of *Salmonella* and *Yersinia enterocolitica* on fresh dressed lamb carcasses. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*. 47, 62-64.

SIMS, G.R., GLENISTER, D.A., BROCKLEHURST, T.F. y LUND, B.M. (1989). Survival and growth of food poisoning bacteria following inoculation into cottage cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*. 9, 173-195.

SMALL, P.L., ISBERG, R.R. y FALKOW, S. (1987). Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within HEp-2 cells. *Infection and Immunity*. 55, 1674-1679.

SOLDIERER, W. y STRAUCH, D. (1991). Kinetics of the inactivation of *Salmonella* during thermal disinfection of liquid manure. *Zentralbl Veterinarmed*. 38, 561-574.

- SRAMOV, H. y BENES, E. (1994). Salmonellosis in the Czech Republic (1989-1993). *Epidemiology, Microbiology and Immunology* 43, 47-54.
- ST. LOUIS, M.E., MORSE, D.L., POTTER, M.E. y Col. (1988). The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella* Enteritidis infections. *Journal American Medicine Association*. 259, 2103-2107.
- STADELMAN, W.J., SINGH, R.K., MURIANA, P.M. y HOU, H. (1996). Pasteurization of eggs in the shell. *Poultry Science*. 75, 1122-1125.
- STEPHENSON, P., SATCHELL, F.B., ALLEN, G. y ANDREWS, W.H. (1991). Recovery of *Salmonella* from shell eggs. *Journal of the Association of Official Analytical*. 74(5), 821-826.
- STOKES y OSBORNE (1955). SBG enrichment. *Applied Microbiology*. 3, 217-219.
- STOLLE, F.A. (1987). *Salmonella* contamination of equipment and beef carcasses in the Berlin (west) slaughterhouse evaluated by various enrichment procedures. *Journal Food Safety*. 8(4), 211-218.
- STRANTZ, A.A. y ZOTTOLA, E.A. (1989). A modified plating technique for the recovery and enumeration of stressed *Salmonella* Typhimurium Hf. *Journal of Food Protection*. 52(10), 712-714.
- STRUIJK, C.B. (1996). Guidelines for method validation techniques used in the microbiological examination of food samples. *Food Control*. 7, 53-58.
- TEO, Y.L., RAYNOR, T.J., ELLAJOSYULA, K.R. y KNABEL, S.J. (1996). Synergistic effect of high temperature and high pH on the destruction of *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*. 59, 1023-1030.
- THAYER, D.W. y BOYD, G. (1991). Survival of *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 on the surface of chicken legs or in mechanically deboned chicken meat gamma irradiated in air or vacuum at temperatures of -20 to +20 C. *Poultry Science*. 70, 1026-1033.
- THAYER, D.W. y BOYD, G. (1991). Effect of ionizing radiation dose, temperature, and atmosphere on the survival of *Salmonella* Typhimurium in sterile, mechanically deboned chicken meat. *Poultry Science*. 70, 381-388.

THAYER, D.W., MULLER, W.S., BUCHANAN, R.L. y PHILLIPS, J.G. (1987). Effect of NaCl, pH, temperature, and atmosphere on growth of *Salmonella* Typhimurium in glucose-mineral salts medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 53, 1311-1315.

THOMASON, D. (1987). Review of processing systems for fullfat soy in the USA. *Asociacion Americana de la Soja*. 113-122.

TING, W.T. (1987). Studies on the death, injury, repair of injury, and the detection of *Salmonella* subjected to freezing and thawing. *Dissertation Abstracts International*. 47(7), 2702.

TRUEMAN, K.F., THOMAS, R.J., MACKENZIE, A.R., EAVES, L.E. y DUFFY, P.F. (1996). *Salmonella* Dublin infection in Queensland dairy cattle. *Australian Veterinary Journal*. 74, 367-369.

TRUSCOTT, R.B. y LAMMERDING, A.M. (1987). Millipore filtration and use of RV medium for isolation of *Salmonella* from preenrichment broths. *Journal of Food Protection*. 50(10), 815-819.

TSCHAPE, H. (1996). Prevalence of drug resistance among environmental bacteria with particular reference to *Salmonellæ*. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 103, 273-277.

USERA, M.A., DIEZ, R. y ECHEITA, A. (1996). Análisis de los serotipos de *Salmonella* sp. aisladas en España en el año 1995. *Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias*. 4, 121-128.

USERA, M.A. y ECHEITA, A. (1993). Estudio de las cepas de *Salmonella* recibidas en el Laboratorio de Referencia al servicio de bacteriología del C.N.M.V.I.S durante el año 1992. *Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias*. 1, 145-168.

USERA, M.A., ECHEITA, A., and ALADUEÑA, A. (1991). Estudio de las cepas de *Salmonella* recibidas en el laboratorio de Referencia del Servicio de Bacteriología del C.N.M.V.I.S. durante el año 1990. *Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias*.

USERA, M.A., ECHEITA, A. y DIEZ, R. (1994). An lisis de los serotipos de *Salmonella* sp. aislados en España en el año 1993. *Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias*. 2, 165-188.

USERA, M.A., ECHEITA, A. y DIEZ, R. (1995). An lisis de los serotipos de *Salmonella* sp. aislados en España en el año 1994. Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias. 3, 165-172.

VAN DE GIESSEN, A.W., NAUTA, M.J., NOTERMANS, S.H.W. y HENKEN, A.M. (1997). Surveillance and intervention strategies for *Salmonella* in poultry: a modelling approach. *Salmonella* and Salmonellosis 1, 613-620.

VANDEPITTE, J.J., COLAERT, J., LAMOTTE-LEGRAND, C. y PERRIN, F. (1953). Les osteites a *Salmonella* chez les sicklanemiques: a propos de 5 observations. Ann. Society Belge Medical Tropical. 33, 511-522.

VELTMANN, J.R., HANSEN, B.C., TANKSLEY, T.D, KNABE, D. y LINTON, S.S. (1986). Comparison of the Nutritive value of different heat-treated commercial soybean meals: utilization by chicks in practical type rations. Poultry Science. 65, 1561-1570.

VENKATESWARAN, K., TAKAI, T., NAVARRO, I.M., NAKANO, H., HASHIMOTO, H. y SIEBELING, R.J. (1989). Ecology of *Vibrio cholerae* non-O1 and *Salmonella* spp. and role of zooplankton in their seasonal distribution in Fukuyama coastal waters, Japan. Applied and Environmental Microbiology. 55, 1591-1598.

VIELTIZ, E., HAHN, I., CONRAD, C. y VOFL, M. (1995). Further experiences in application of *Salmonella* vaccination programs. Protection of Poultry from Foodborne Pathogens. 37-41.

VOHRA, P. y KRATZER, F.H. (1991). Evaluation of soybean meal determines adequacy of heat treatment. Feedstuffs. 22-28.

WAAIJENBERG (1987). Feed formulation with fullfat soya. The economics of its use. Asociacion Americana de la Soja. 133-152.

WALDROUP, P.W. y HAZEN, K.R. (1978). An evaluation of roasted, extruded and raw unextracted soybeans in the diet of laying hens. Nutrition Reproduction International. 18:99-103.

WALDROUP, P.W. (1985). Le soja graine entiere dans les aliments pour volaille. La nutrition soya actualites. Asociacion Americana de la Soja. 10.

WATIER, L., RICHARDSON, S. y HUBERT, B. (1993). Elaboration d'un seuil d'alerte épidémique. L'exemple des infections ... *Salmonella* Bovismorbificans. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire. 3, 10-11.

WEGENER, H.C. y BAGGESEN, D. (1996). Investigation of an outbreak of human salmonellosis caused by *Salmonella* enterica ssp enterica serovar Infantis by use of pulsed field gel electrophoresis. International Journal of Food Microbiology. 32, 125-131.

WILSON, C.R., ANDREWS, W.H., POELMA, P.L. y BRUCE, V.R. (1988). Recovery of *Salmonella* from fluid milk. Journal of Food Protection. 51(5), 409-411.

WILSON, G.S. (1935). The bacteriological grading of milk. Medical Research Council. 206.

WISEMAN, J. (1984). El haba de soja integral en dietas para aves. Asociacion Americana de la Soja.

WISEMAN, J. (1987). The nutritive value of fullfat soybeans, fats and oils in diets for pigs. Asociacion Americana de la Soja. 15-28.

WIT DE, M.A.S., HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A.M.M., GOOSEN, E.S.M., SPRENGER, M.J.W. y BORG DORFF, M.W. (1996). Een bevolkingsonderzoek in vier regio's in gastro-enteritis en van *Campylobacter* en *Salmonella*-infectie. National Institute of Public Health and Environmental Protection. RIVM 14941-4114.

WOERFEL, J.B. (1992). Proceso de transformaciòn de la soja. Asociacion Americana de la Soja.

ZAMORANO, J. (1987). Supply and demand of soybeans and fullfat soya in the Mediterranean region, middle east and eastern Europe. Asociacion Americana de la Soja. 83-95.



ABRIR TOMO II

