

Inmunomagnetismo

NUEVO METODO DE DETECCION DE SALMONELAS EN HARINAS DE ORIGEN ANIMAL

Por: Vicente Gómez-Calcerrada López*

El método oficial de aislamiento de Salmonelas no resulta eficaz

La inmunoseparación por magnetismo presenta ventajas frente a otros métodos

Se necesitan métodos más rápidos para la detección de Salmonelas en harinas de pescado



INTRODUCCION

Dentro de la copiosa información técnico-comercial que se recibe, a veces aparecen unas notas publicitarias que surten el efecto deseado por la firma anunciante. En unas ocasiones, al leer este tipo de información, las virtudes del producto promocionado producen una sensación de perplejidad; en otros casos, lo anunciado causa curiosidad por el ingenio empleado en llevar a término la idea que ha originado el descubrimiento de una técnica o método. Este ha sido el motivo que ha ocasionado la realización de este trabajo.

El género *Salmonella* (Fernández-Crehuet, Pinedo, 1990), según la Subdirección General de Vigilancia Epidemiológica, fue el causante en el año 1985 del 71,00% de los brotes de infecciones o intoxicaciones humanas de origen alimentario que se declaran en ese período; en la misma fuente informativa, el número de afectados por salmonelas representaba

un 80,25%. La mayor parte de estas infecciones tienen un origen animal, carnes de todo tipo y huevos principalmente, teniendo una gran incidencia en la iniciación de las cadenas epidemiológicas las harinas de procedencia animal que se emplean como materias primas en la fabricación de piensos compuestos.

El método que se va a comparar, en este trabajo, con otros más utilizados, se basa en poner en contacto unas partículas metálicas (la firma productora las llama "beads" que en español se puede traducir por granos o mostacilla) recubiertas con una capa de anticuerpos anti-Salmonella con un medio de pre-enriquecimiento inoculado con el producto sospechoso sometido a investigación. Una pequeña cantidad del medio sospechoso se pone en contacto con un campo magnético, y después de un lavado con un tampón-fosfato, se elimina el sobrenadante y las partículas atraídas por el magnetismo se siembran en medios selectivos corrientes (Vermunt et al., 1992).

MATERIAL Y METODOS

Las muestras de harinas de pescado o carne elegidas para su estudio tenían una

procedencia muy heterogénea, una se habían fabricado en Canarias, otras eran originarias de la España peninsular o del extranjero.

En unos tubos de vidrio con cierre prácticamente hermético y estériles se depositaron, en cada uno, 75 g de harina. Después se numeraron del 1 al 46 (ambos inclusive).

Con la harina de cada tubo se seguían dos vías analíticas:

- Utilización de la harina en estado natural.
- Utilización de la harina después de un pre-enriquecimiento en agua de peptona tamponada.

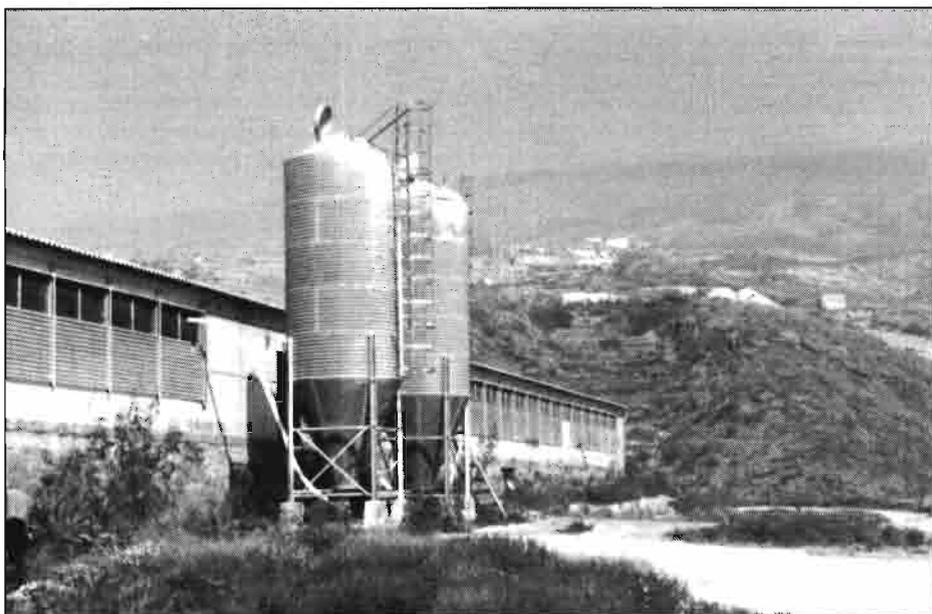
Los materiales que se han usado, independientemente de los específicos que se citarán posteriormente, son los corrientes en un laboratorio de bacteriología (matraces, autoclaves, estufas de cultivo, pipetas, placas de Petri, etc.).

Las técnicas empleadas han sido las siguientes:

A) Harina natural.

1º) Caldo de tetracionato.-Se añaden 0,200 ml de solución yodo-yodurada a 10 ml de caldo y se sembraban 2 g de harina.

(*) Director del laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Canarias



Las harinas de origen animal son imprescindibles en la explotación ganadera.

Después de una incubación de 24 y 48 horas se sembraba una placa de agar verde-brillante y otra de agar Hektoen de cada tubo inoculado y en cada período; es decir, 4 placas por cada tubo.

2º) Caldo de tetrionato de Müller-Kauffmann.-Se calentaba el caldo a ebullición y se dejaba enfriar hasta unos 45°C aproximadamente. Después, se agregaban dos soluciones: una yodo-yodurada (19 ml/litro) y otra de verde brillante (9,5 ml/litro). Se sembraban 10 g de harina en 100 ml de caldo, y después de unas incubaciones de 24 y 48 horas a 43°C, se continuaba como en el método anterior.

B) *Harina pre-enriquecida en agua de peptona tamponada.*-A 225 ml de agua de peptona se añadían 25 g de harina y se incubaban a 37°C durante 18 ó 20 horas. De este medio se partía para desarrollar los métodos siguientes.

1º) Caldo de tetrionato.-La preparación era igual que en el apartado A-1º, la única diferencia consistía en que en este caso se usaban 2 ml de la siembra en agua de peptona. La incubación y las siembras en medios de identificación eran, también, iguales.

2º) Caldo de tetrionato de Müller-Kauffmann.-La única diferencia con respecto al método similar con harina natural consistía en que en este procedimiento a los matraces con 100 ml de caldo se les añadían 10 ml del cultivo en agua de peptona.

3º) Separación inmunomagnética.-En un vial Eppendorf que contenía 20 λ de las partículas recubiertas con los anticuerpos anti-Salmonella se ponía 1 ml del cultivo en agua de peptona, se incubaba durante

10 minutos a temperatura ambiente. Luego el vial se sometía a la acción del campo magnético y se dejaba en esa situación durante 3 minutos, el sobrenadante se descargaba seguidamente. El vial era retirado del campo magnético y el residuo se suspendía con 1 ml de tampón-fosfato (PBS) con el 0,05% de Tween. El vial se sometía, otra vez, al magnetismo y se tenía en esa posición otros 3 minutos, sin retirarlo del campo magnético se eliminaba el sobrenadante. El residuo se resuspendía en 50 λ de PBS y se sembraba en dos placas de Petri: agar Hektoen y agar verde-brillante. Las placas se incubaban a 37°C durante 18 ó 24 horas.

Como se ha venido escribiendo, para el aislamiento se usaban en todos los métodos placas con agar Hektoen y agar verde-brillante. En la identificación bioquímica se han utilizado galerías comerciales para 12 ó 21 pruebas. En comprobaciones inmunológicas se han realizado aglutinaciones de las colonias sospechosas con antisueros polivalentes (O/A-I y Vi).

RESULTADOS

En el Cuadro nº 1 se han reflejado los resultados obtenidos. Mediante la simple observación se puede comprobar que los

Especie	Subespecie	Serotipo	Número
Salmonella enterica		Agona 4,12:fgs:-	10
" "		Derby 4,12:fg:-	3
" "		Mbandahá 6,7:z10 en z15	1
" "		Enteritidis 9,12:gm:-	1

métodos en los que se han empleado harinas naturales (caldo de tetrionato y caldo de tetrionato de Müller-Kauffmann) no se ha conseguido ni un sólo aislamiento de salmonelas.

El inmunomagnetismo se ha mostrado como el procedimiento más eficaz, con él se han logrado aislar *Salmonella* spp. en 27 muestras de las 46 investigadas; de estos aislamientos 25 se obtuvieron en ambas placas de agar (Hektoen y verde-brillante) y 2 en las de agar Hektoen solamente. Partiendo de un pre-enriquecimiento en agua de peptona, con el caldo de tetrionato se han conseguido colonias de salmonelas en 15 muestras y solamente en 1 aparecieron las colonias exclusivamente en agar Hektoen. Con el caldo de Müller-Kauffmann sembrado a partir del agua de peptona tamponada, se ha detectado la presencia de salmonelas en 22 muestras; las colonias sospechosas aparecieron igualmente en agar verde-brillante y agar Hektoen.

La resiembra de los cultivos a las 48 horas solamente ha presentado incidencias en el Müller-Kauffmann: en una de las muestras había colonias a las 24 horas y a las 48 no se obtuvo crecimiento, en otra muestra ocurrió lo contrario.

La prueba de χ^2 de Pearson nos muestra que existen diferencias significativas entre los métodos empleados ($P < 0,05$). Prescindiendo de los métodos que han derivado de harinas naturales por los malísimos resultados obtenidos, las proporciones y porcentajes de los aislamientos han sido:

	Proporciones	%
Inmunomagnetismo	0,58	58,69
Caldo de Müller-Kauffmann	0,47	47,82
Caldo de tetrionato	0,32	32,60

Las diferencias entre las proporciones halladas en los tres procedimientos son significativas ($P < 0,05$), el inmunomagnetismo con el Müller-Kauffmann y el tetrionato, y el Müller-Kauffmann frente al tetrionato.

Para el tipaje de las cepas, se enviaron algunas colonias al Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda, las especies y serotipos hallados fueron los siguientes:

GANADERIA EXTENSIVA

DISCUSION

En el B.O.E. de 23 de abril de 1964 se publica una resolución de la Dirección General de Ganadería en la que se incluye una técnica para el aislamiento de salmonelas en harinas de pescado, hasta la fecha no existe o, al menos, no tenemos noticias de la publicación oficial de una norma analítica más moderna. El método publicado parte de una siembra de harina de pescado en tetrationato sin haberse realizado un pre-enriquecimiento; por los resultados que se han obtenido en este estudio, puede asegurarse que ese método no es eficaz y debería ser sustituido oficialmente por otros procedimientos más adecuados.

En el inmunomagnetismo normalmente se parte de un pre-enriquecimiento, sin embargo algunos autores (Olsvik et al., 1990) han obtenido buenos resultados sin recurrir a esa fase, lo cual supondría acortar en 24 horas la emisión de los resultados analíticos. Estos investigadores, aparte de comentar la reducción de plazos, consideran que con el inmunomagnetismo se consiguen los mismos resultados que con los sistemas de aislamiento tradicionales. En este trabajo el inmunomagnetismo ha dado, incluso, mejores resultados que los otros métodos con los que se ha comparado.

Vermunt et al. (1992) afirman que en la detección de salmonelas en carne picada por inmunomagnetismo se reducen las proporciones de colonias no sospechosas, los resultados obtenidos en este trabajo con las harinas de origen animal corroboran lo indicado por los autores citados.

La reducción de los períodos de tiempo es comentada por Mansfield y Forsythe (1993), y, también, trabajando con varios alimentos o condimentos demuestran las ventajas de la inmunoseparación por magnetismo frente al enriquecimiento en caldo de tetrationato de Müller-Kauffmann, frente a 63 aislamientos y 1 falso negativo obtienen 58 y 61 aislamientos y 6 y 3 falsos negativos a las 24 y 48 horas respectivamente. Esos resultados, en cuanto a aislamientos positivos, concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

En un estudio facilitado por la empresa comercializadora, y no publicado, Forsythe trabajando con leche en polvo desnatada encuentra 14 muestras con salmonelas de 25 examinadas por medio de la inmunoseparación magnética; en estas mismas muestras enriqueciendo con caldo de tetrationato sólo se obtuvieron 9 casos positivos. Los porcentajes de los aislamientos son muy aproximados a los hallados en este estudio: 58,69 y 32,60% frente a 56,00 y 36,00% obtenidos por Forsythe para el inmunomagnetismo y el caldo de tetrationato, respectivamente.

CONCLUSIONES

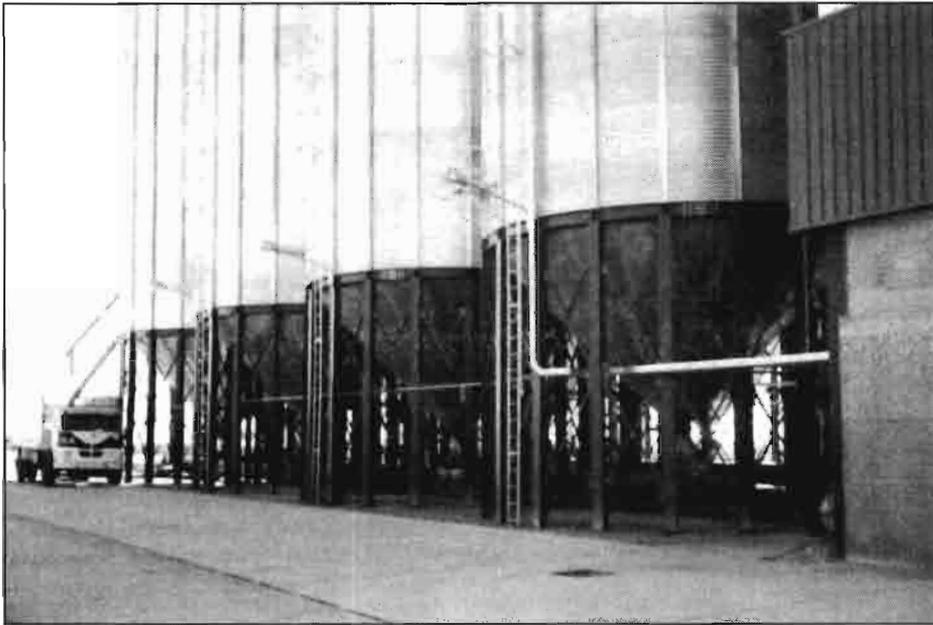
- La inmunoseparación magnética aplicada al aislamiento de Salmonella spp. ha dado en este estudio unos resultados muy esperanzadores en comparación con

otros métodos más tradicionales (enriquecimiento en caldo de tetrationato o en caldo de tetrationato de Müller-Kauffmann).

- Las siembras con harinas en estado natural, sin pre-enriquecimiento, han proporcionado unos resultados totalmente

Cuadro 3
AISLAMIENTO DE SALMONELLAS

AISLAMIENTO DE SALMONELLA												CUADRO nº 1
MUESTRA	METODO MODERNO		CALDO DE TETRATONATO				CALDO DE MÜLLER-KAUFFMANN					
	AGUA DE PEPTONA		HARINA NATURAL		AGUA DE PEPTONA		HARINA NATURAL		AGUA DE PEPTONA			
	Verde brillante	Hektoon	Verde brillante	Hektoon	Verde brillante	Hektoon	Verde brillante	Hektoon	Verde brillante	Hektoon		
1	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
3	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
5	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
6	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+		
7	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
8	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+		
9	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
10	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
11	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+		
12	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
13	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
14	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
15	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
16	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
17	Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
18	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+		
19	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
20	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
21	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
22	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
23	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
24	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+		
25	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
26	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
27	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+		
28	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
29	Neg.	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
30	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
31	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	+	Neg.	Neg.	+	+		
32	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	+	+		
33	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
34	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
35	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
36	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
37	+	+	Neg.	Neg.	+	+	Neg.	Neg.	+	+		
38	+	+	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
39	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
40	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
41	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
42	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
43	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
44	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
45	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		
46	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.		



SILOS. Campo de Criptana (Ciudad Real).

negativos. Quizá la causa haya sido motivada a llevar algunas muestras bastante tiempo fabricadas o a contener las muestras ligeras cargas bacterianas.

- Para el aislamiento en placas de Petri se han usado agar verde-brillante y agar Hektoen con unos resultados prácticamente iguales; por tanto, se puede usar una sola placa, y en este trabajo, las placas de agar Hektoen se han mostrado ligeramente superiores.

- La detección de salmonelas en siembras procedentes de enriquecimientos en caldo de tetraciónato y caldo de Müller-Kauffmann a las 24 y 48 horas de incubación, únicamente han mostrado diferencias en sólo 2 casos de los 368 investigados: en uno había crecimiento sospechoso solamente a las 24 horas, en el otro ocurría lo contrario. El simple hecho de realizar un aislamiento a las 48 horas, que no se había detectado a las 24, obliga a continuar realizando siembras a las 48 horas de enriquecimiento.

- La experiencia que se tiene en el comercio de harinas de pescado (pedidos urgentes, llegadas imprevistas de barcos para cargar, fluctuaciones monetarias, etc.) exige, fundamentalmente, la realización rápida de las pruebas necesarias para comprobar la presencia o ausencia de salmonelas de un lote de harina determinado, con el inmunomagnetismo se pueden evacuar los dictámenes a las 48 horas en los casos negativos y a las 72 cuando se hayan detectado colonias sospechosas. En los métodos que utilizan harinas sin pre-enriquecer los resultados se pueden conocer a las 72 ó 96 horas, pero ya se comentó que con estas técnicas los re-

sultados que se han obtenido han sido francamente deplorables. En los procedimientos (caldo de tetraciónato y caldo de Müller-Kauffmann) que parten de harinas pre-enriquecidas en agua de peptona se precisan 120 horas en los casos negativos ó 144 en los positivos.

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda, y a Dña. Virginia Vigo López y a D. Luis Ortín

Trujillano del Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Canarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-Forsythe S.J. Comparison of Salmonella enrichment broths with Dynabeads at low levels of *S. enteritidis* in skimmed milk powder. (Trabajo no publicado en revistas).

-Mansfield L.P., Forsythe S.J., 1993. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for Salmonella detection. Letters in Applied Microbiology. 16, pp. 122-125.

-Manual Difco., 1984. 10ª Edición. Difco Laboratories Incorporated. Detroit. USA. 1.166 pp.

-Manual Oxoid., 1981. 4ª Edición. Oxoid Limited. Wade Road. England. 292 pp.

-Olsvik O, Popovic T., Skjerve E., Cudjoe K., Homes E., Ugelstad J., Uhlen M., 1994. Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. Clinical Microbiology Reviews. pp. 43-54.

-Pascual M.R., 1982. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. 311 pp.

-Piédrola G., Domínguez M., Cortina P., Gálvez R., Sierra A., Álvarez R., Sáenz M.C., Gómez L.I., Fernández-Crehuet J., Pinedo A., Salleras L., Cueto A., Gestal J.J., 1990. Medicina Preventiva. 8ª Edición. Salvat Editores S.A. Barcelona.

-Quesada V., Isidoro A., López L.A., 1988. 2ª Edición. Curso y ejercicios de estadística. Editorial Alhambra S.A. Madrid.

-Vermunt A.E.M., Franken A.A.J.M., Beumer R.R., 1992. Isolation of salmonellas by immunomagnetic separation. Journal of Applied Bacteriology. 72. pp. 112-118.

NOTA: El trabajo original fue presentado en el III Encuentro de Veterinarios de las Comunidades Autónomas de Madeira, Azores y Canarias. Lanzarote 1994.

