



Revista Cubana de Salud Pública

ISSN: 0864-3466

ecimed@infomed.sld.cu

Sociedad Cubana de Administración de Salud  
Cuba

Leyva, Virginia; Ruiz, Heidi; Machín, Mayrín; Tejedor, René; Martino, Tamara K.; Ferrer, Yaumara

Primer estudio de Enterobacter sakazakii en alimentos en Cuba

Revista Cubana de Salud Pública, vol. 34, núm. 4, diciembre, 2008, pp. 1-9

Sociedad Cubana de Administración de Salud

La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=21419854008>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en [redalyc.org](http://redalyc.org)

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## Primer estudio de *Enterobacter sakazakii* en alimentos en Cuba

### First study on *Enterobacter sakazakii* in foodstuffs in Cuba

**Virginia Leyva<sup>I</sup>; Heidi Ruiz<sup>II</sup>; Mayrín Machín<sup>III</sup>; René Tejedor<sup>IV</sup>; Tamara K. Martino<sup>V</sup>; Yaumara Ferrer<sup>VI</sup>**

<sup>I</sup>Licenciada en Bioquímica. Investigadora Auxiliar. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba.

<sup>II</sup>Licenciada en Ciencias de los Alimentos. Oficina Nacional de Normalización (ONN). La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Licenciada en Ciencias de los Alimentos. Aspirante a Investigadora. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba.

<sup>IV</sup>Doctor en Ciencias de los Alimentos. Profesor Titular. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

<sup>V</sup>Máster en Microbiología. Agregado. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba.

<sup>VI</sup>Técnica A en Procesos Biológicos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba.

### RESUMEN

**Introducción** *Enterobacter sakazakii* es uno de los microorganismos patógenos emergentes que han hecho su aparición en los últimos años, fundamentalmente como contaminante ocasional de las fórmulas infantiles en polvo. En países en vías de desarrollo no existen suficientes investigaciones sobre este microorganismo, en Cuba este constituye el primer estudio realizado.

**Objetivos** Conocer la presencia de *E. sakazakii* en muestras de leche en polvo de importación.

**Métodos** Se analizaron 60 muestras de leche en polvo, entera y descremada, provenientes de nueve países, se siguió la técnica recomendada por autoridades reguladoras de EE.UU., con la inclusión de pruebas bioquímicas convencionales como alternativa antes de aplicar el sistema de identificación API 20E. Se empleó el agar hierro Kligler y el agar citrato de Simmons; en aquellas cepas con imagen sugestiva de *Enterobacter* se comprobó la obtención de triptofano a partir de indol, reacción de Voges Proskauer y rojo de metilo, descarboxilación de lisina y ornitina,

dihidrólisis de la arginina, producción de ácido de sacarosa, dulcitol, adonitol, rafinosa y sorbitol.

**Resultados** Se obtuvo crecimiento de enterobacterias en 26 muestras. Una sola cepa dio resultado presuntivo de *E. sakazakii* por pruebas bioquímicas, la misma se confirmó por API 20E para 1,6 % de positividad.

**Conclusiones** En general la calidad microbiológica de las muestras de leche estudiadas fue buena. La técnica empleada para determinar *E. sakazakii* en muestras de leche en polvo, con la inclusión de pruebas bioquímicas convencionales, es factible de realizar en Cuba, para minimizar los costos asociados a la utilización de API 20E. Sería importante continuar estos estudios en áreas hospitalarias, especialmente aquellas donde se preparan fórmulas lácteas para recién nacidos.

**Palabras clave:** *Enterobacter sakazakii*, enterobacterias, leche en polvo, Cuba.

---

## ABSTRACT

**Introduction** *Enterobacter sakazakii* is an emerging pathogen that has been isolated in milk powder preparations for infant in the last few years. Practically there is no research works about this microorganism in developing countries; in Cuba this is the first study.

**Objectives** To detect the presence of *E. sakazakii* in imported milk powder samples.

**Methods** Sixty samples of whole and skimmed powdered milk imported from 9 countries were analyzed. Before applying API 20E Kit, the recommended technique by US regulatory bodies including conventional biochemical tests was used. Kligler´s iron agar and Simmons´s citrate agar were employed; other tests such as obtaining of triptophane from indole, Voges Proskauer reaction, methyl red, lysine and ornitine decarboxylation, arginine dihydrolysis, production of sucrose acid, dulcitol, adonit, raffinose and sorbitol were performed in presumptive *Enterobacter* strains.

**Results** Enterobacteria were isolated in 26 samples. Just one strain was classified as *E. sakazakii* using the traditional biochemical tests and further confirmed by API 20E for 1.6 % positivity of the sample.

**Conclusions** Generally speaking, the microbiological quality of powdered milk samples was good. The technique used to determine *E. sakazakii* in powdered milk samples, including conventional biochemical tests, is feasible to be performed in Cuba in order to reduce costs inherent to the use of API 20E. It is important to conduct these studies in hospital settings, particularly in those areas where milk formulae for neonates are prepared.

**Key words:** *Enterobacter sakazakii*, enterobacteria, powdered milk, Cuba.

---

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años la frecuencia y el número de casos y brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) se han incrementado notablemente.<sup>1</sup> Una nueva

bacteria denominada *Enterobacter sakazakii*, se ha aislado en casos esporádicos y brotes epidémicos.<sup>2</sup> Aunque esta bacteria ha causado enfermedades en todos los grupos de edades, está bien reconocido, en la actualidad, que los neonatos y los lactantes son un grupo con un riesgo particular.<sup>3</sup>

*E. sakazakii* es uno de los gérmenes oportunistas que actualmente ocupa la atención del personal de salud, y empresas elaboradoras de productos lácteos desecados, por su vinculación a procesos infecciosos invasivos, con alta tasa de morbilidad y mortalidad y que dejan en algunos casos, importantes secuelas neurológicas teniendo la particularidad de estar relacionado directamente al consumo de fórmulas a base de leche en polvo, preparadas para niños lactantes.<sup>4</sup> Parece tener una predisposición para infectar al sistema nervioso central, ha sido asociado con una variedad de enfermedades severas tales como sepsis generalizadas, meningitis, cerebritis, y enterocolitis necrosante.<sup>5</sup>

Aunque no está claro si la fórmula en polvo para lactantes es la única fuente de infección por *E. sakazakii* en lactantes, la OMS advirtió sobre el riesgo de infecciones en bebés a causa de la posible presencia de la bacteria en leches maternizadas.<sup>5</sup> En Cuba se preconiza la lactancia materna, sin embargo se conoce que existen madres que utilizan las fórmulas infantiles a base de leche en polvo o leche fresca reconstituida pasteurizada, la cual incluye entre sus ingredientes la leche en polvo. Según Linnecar,<sup>6</sup> en países en vías de desarrollo, no existen suficientes datos sobre investigaciones realizadas de *E. sakazakii*; en Cuba este estudio constituye el primero realizado sobre este microorganismo en alimentos.

Dado los antecedentes expuestos, y teniendo en cuenta el riesgo para la salud que puede representar la presencia de esta bacteria, se propone como objetivo del trabajo, evaluar la presencia de *E. sakazakii* en leches en polvo de importación.

## MÉTODOS

### Muestras analizadas

Se analizaron 60 muestras de leche en polvo procedentes de nueve países, 42 muestras correspondieron a leche entera y las restantes a leche descremada en polvo.

### Método de detección

Se utilizó la técnica de presencia/ausencia recomendada por Heuvelink y otros, pero sustituyendo el agua de peptona buferada por agua destilada estéril en el medio de preenriquecimiento, según lo sugerido por la FDA-CFSAN,<sup>7</sup> y tomando un inóculo de 100 g de la muestra en 900 mL de agua destilada estéril. Se incluyeron, además, pruebas bioquímicas convencionales, antes de confirmar las cepas aisladas por el sistema de identificación API 20E.

### Desarrollo del método

El medio de preenriquecimiento se incubó a 37 °C de 18 a 24 h. A continuación se sembraron 10 mL de este medio en caldo EE (medio de enriquecimiento), y se incubó a 37 °C de 18 a 24 h. El aislamiento a partir del caldo EE se obtuvo, por duplicado, en placas de agar rojo violeta bilis con glucosa (VRBG), por siembra en superficie, por estría, de 10 µL con asa calibrada de 3 mm, las mismas se incubaron

a 37 °C de 18 a 24 h. Se seleccionaron al menos 5 colonias de color rojo púrpura de las placas de VRBG, y se pasó cada una a medio agar hierro Kligler y a agar citrato de Simmons, la incubación se realizó a 37 °C de 18 a 24 h para el primero y hasta 5 días para el segundo.

Seguidamente se comprobó la producción de pigmento amarillo en placas de agar triptona soya (ATS) que se incubaron a 25°C de 48 a 72 h y luego se realizó la prueba de la oxidasa.

Las pruebas bioquímicas convencionales incluidas para la identificación de la especie fueron: obtención de triptofano a partir de indol (I), reacción de Voges Proskauer (VP) y de rojo de metilo (RM), descarboxilación de ornitina y lisina, dihidrólisis de arginina, producción de ácido de sacarosa (Sac), dulcitol (Dulc), adonitol (Adon), rafinosa (Raf) y sorbitol (Sorb). A aquellas cepas presuntivas de *E. sakazakii* se le realizó la identificación por API 20E.<sup>8</sup>

## RESULTADOS

Como se aprecia en la [tabla 1](#), en 26 de las muestras analizadas, se obtuvo crecimiento de colonias fermentadoras de glucosa en agar VRBG, presuntivas *Enterobacteriaceae*. De agar hierro Kligler se seleccionaron las cepas que ofrecieron una imagen caracterizada por producción de ácido y gas de glucosa y lactosa sin producción de sulfídrico. A aquellas que utilizaron el citrato y que crecieron con pigmentación amarilla en ATS, se les realizó la prueba de la oxidasa, acorde a lo establecido en la metodología empleada,<sup>8</sup> en todos los casos dio resultados negativos.

Los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales realizadas para la identificación de la especie,<sup>8</sup> aparecen en la [tabla 2](#). Sólo la cepa, cuyos resultados se encuentran resaltados en dicha tabla, pudo clasificar como *E. sakazakii*, lo que fue confirmado, también, por el API 20E. El código obtenido fue 3305173.

## DISCUSIÓN

El 56,7 % de las muestras analizadas fue negativa a *Enterobacteriaceae*, lo cual es un aval a favor de la buena calidad microbiológica de las muestras estudiadas para este indicador.

En la identificación presuntiva de las cepas aisladas, se adicionó la utilización del medio Kligler al método empleado,<sup>7</sup> ya que se conoce que las especies correspondientes al género *Enterobacter*, pertenecen al grupo coliformes, indicador empleado para evaluar la calidad sanitaria de los alimentos.<sup>9</sup> A las cepas con imagen sugestiva de coliformes se les realizó, también la prueba de citrato pues el 99 % de las cepas de *E. sakazakii* son capaces de emplearlo como única fuente de carbono.<sup>8</sup>

El método original, propone realizar directamente la siembra en ATS a partir de las colonias seleccionadas en agar VRBG.<sup>7</sup> La pigmentación amarilla en ATS es típica de *E. sakazakii*, aunque *Farmer* y *Kelly*,<sup>8</sup> señalan que el 75 % de las cepas de *Enterobacter agglomerans* también pueden desarrollar este pigmento, aunque su

respuesta a la prueba del citrato es positiva en el 50 %, de ahí que se requieren pruebas adicionales para la confirmación definitiva.

A las cepas obtenidas con pigmento amarillo, correspondientes a 12 muestras (tabla 1), se le realizó la prueba de la oxidasa, que permitió confirmar la condición de *Enterobacteriaceae* pues todos los miembros de esta familia son oxidasa negativa.<sup>10</sup>

La técnica empleada para la determinación de *E. sakazakii* en muestras de leche en polvo, es factible de realizar en Cuba, con la inclusión de pruebas bioquímicas convencionales, para minimizar los costos asociados a la utilización del sistema de identificación API 20E. La confirmación de la especie demostró que sólo el 1,7 % de las muestras analizadas resultó positiva a *E. sakazakii*, este porcentaje se encuentra por debajo de lo informado por otros investigadores.<sup>11-13</sup>

Desde la década de los 80 del siglo xx hasta la fecha se han ensayado diferentes medios de cultivo para el aislamiento de *E. sakazakii*, tanto de muestras clínicas como de alimentos, ya que existe preocupación por parte de los investigadores por la sensibilidad de los métodos utilizados.<sup>14-16</sup> Se sugiere que la dificultad para el aislamiento de este microorganismo del producto deshidratado, podría deberse a su distribución desigual en el producto o a la baja concentración existente, por lo que pudiera no ser detectado por los métodos convencionales.<sup>15</sup>

En el estudio de un brote de meningitis neonatal, ocurrido en Islandia entre 1986 y 1987, se aisló *E. sakazakii* en 5 de 7 lotes diferentes de fórmula infantil para lactantes en envases cerrados. En este caso se utilizó la cantidad de agua estéril recomendada por el fabricante para 500 y 1 000 g de la fórmula y se dividió la suspensión en porciones de 100 mL. Posteriormente, se incubó la muestra 4 h a 37 °C, y se realizaron aislamientos en placas de agar sangre y agar MacConkey. No se realizaron estudios cuantitativos. Los aislamientos se confirmaron por el sistema API 20E, seguido por biotipificación, determinación del perfil plasmídico y antibiograma.<sup>17</sup>

En 1989 se utilizó un método similar para el aislamiento de *E. sakazakii* en fórmulas de leche en polvo asociadas con un brote, en una unidad de cuidados intensivos localizada en Tennessee, Memphis.<sup>18</sup> En este estudio se utilizaron inóculos de 50, 10 y 1 g de las muestras de la fórmula infantil implicada que se disolvieron en 450, 90 y 9 mL de agua peptonada buferada respectivamente. Las colonias sospechosas en agar MacConkey, se confirmaron por el sistema API 20E; el nivel de *E. sakazakii* obtenido en las muestras fue un estimado de 8 UFC/g.

En Canadá, *Nazarowec-White y Farber*,<sup>11</sup> emplearon el método de *Muytjens* y otros,<sup>15</sup> en fórmulas infantiles, con una pequeña modificación. El polvo fue suspendido en agua estéril. La sensibilidad de este método fue la misma que la del método original. *E. sakazakii* se aisló en 8 de 120 envases con un nivel de 0,36 UFC/100 g.

*E. sakazakii* se aisló también en un estudio de brote,<sup>12</sup> sembrando directamente la fórmula láctea líquida en placas de ATS suplementadas con 5 % de sangre de carnero y en agar MacConkey. Los resultados del control de la calidad de la fábrica, para el lote de la producción implicada de la fórmula de leche deshidratada fueron que de 5 sub-muestras, 1 contenía 20 colonias de coliformes/g y las 4 sub-unidades restantes contenían menos de 1 coliforme/g.

Estos resultados avalan la hipótesis de la distribución heterogénea de la microbiota en este tipo de muestra. Por lo que *Van Acker* y otros,<sup>12</sup> señalan que si la

distribución es heterogénea (específicamente la de *E. sakazakii*) en los lotes de la fórmula en polvo; es sumamente importante analizar sub-muestras para incrementar la probabilidad de aceptabilidad correcta del lote.

*Forsythe*<sup>13</sup> halló *E. sakazakii* en 4 de 102 muestras de fórmulas infantiles a base de leche en polvo, en 5 de 49 alimentos para consumo infantil en polvo, en 3 de 72 muestras de leche deshidratada, en 2 de 62 muestras de quesos y en 40 de 122 alimentos deshidratados varios. Al comparar el método convencional de la FDA,<sup>7</sup> con el uso de un nuevo medio cromogénico, agar Druggan-Forsythe-Iversen (DFI), el cual distingue *E. sakazakii* de especies estrechamente relacionadas, se apreció que el segundo ofrecía mejores resultados y con dos días de antelación que el método convencional. *E. sakazakii* fue aislado de 69 muestras usando el medio DFI, y por el método convencional sólo se aislaron en 19 muestras, esta gran diferencia se obtuvo principalmente en los productos deshidratados varios.<sup>13</sup>

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en todos estos trabajos, en los cuales se han utilizado diferentes métodos de ensayo, con variaciones en los medios e inóculos así como los tipos de muestras analizadas; el bajo aislamiento encontrado en el presente estudio (1,7 %) puede deberse a varias causas, entre ellas, (1) el inóculo inicial de la muestra; (2) la selectividad del medio utilizado para el aislamiento y (3) las propias características de las muestras investigadas, que no necesariamente tenían que estar contaminadas con *E. sakazakii*.

Sólo en pocos países desarrollados se han encontrado casos de ETAs por *E. sakazakii*. Es probable que en todos los países exista una cantidad importante de ETAs por este patógeno que no son informadas o reconocidas. La ausencia de informes se debe probablemente más a la carencia de conocimiento del problema, que a la ausencia de la enfermedad. En general, las limitaciones de los actuales sistemas de vigilancia en la mayoría de los países se suman a la explicación de la carencia de casos divulgados.<sup>19</sup>

En Cuba no existen informes clínicos publicados sobre esta bacteria, por lo que sería importante continuar estos estudios en áreas hospitalarias, especialmente aquellas relacionadas con la preparación de fórmulas lácteas para recién nacidos, así como en la investigación de las enfermedades neonatales.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen expresamente al Laboratorio de Cuba Control, por todo el apoyo ofrecido para la realización de este trabajo.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Almeida C, Schutch D, Gelli D, Cuéllar J, Diez A, Escamilla J. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública. Washington: OPS,OMS; 1996.
2. Lai K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Med Baltimore. 2001;80:113-22.

3. Comité Ejecutivo de la Comisión del Codex Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes. Informe de la Quintoagésima quinta reunión. [serie en Internet]. 2005 [citado 22 Ago 2007]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/es\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/es_sp.pdf)
4. Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol*. 2003;95:967.
5. Comité Ejecutivo de la Comisión del Codex Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comisión del Codex sobre la Higiene de los Alimentos Trigésima sexta reunión. Perfil de riesgos de *Enterobacter sakazakii* y otros microorganismos en los preparados en polvo para lactantes. Washington, D.C: Comité Ejecutivo;2004.
6. Linnecar A. *Enterobacter sakazakii* y otros tres microorganismos toxigénicos en la fórmula infantil en polvo. EnRedDados [serie en Internet]. [citado 22 Ago 2007]. Disponible en: [http://www.lacmat.org.ar/enred/bol\\_27/main.htm](http://www.lacmat.org.ar/enred/bol_27/main.htm) [IBFAN-GIFA, 2003, n° 36].
7. FDA. Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula, 2002. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/mmesakaz.html>
8. Farmer JJ, Kelly MT. *Enterobacteriaceae*. In: Ballows A, Hausler W, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy HJ, editors. *Manual Clinical Microbiology*. 5th ed., Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1999.p.360-83.
9. Fernández E. Inocuidad de los alimentos. Querétaro: Universidad Autónoma de México; 2000.
10. Koneman E, Allen S, Dowell V, Jonda W, Sommers H, Winn W. Diagnóstico microbiológico. *Enterobacteriaceae*. 3ra ed. México,D.F.: Editorial Médica Panamericana; 1998.
11. Nazarowec-White M, Farber J. Isolation, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J Food Prot*. 1997;60:226-30.
12. Van Acker J, de Smeet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol*. 2001;39:293-7.
13. Forsythe S. Isolation of *E. sakazakii*, *Enterobacteriaceae* and other microbial contaminants from powdered infant formula milk and related products. Louisiana: American Society for Microbiology; 2004. [104th General Meeting of the American Society for Microbiology].
14. Muytjens H, Zanen H, Sonderkamp H, Kolle L, Wachsmuth I, Farmer J. Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J Clin Microbiol*. 1983;18:115-20.
15. Muytjens H, Roelofs-Willemse H, Jaspar G. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 1988;26:743-6.

16. Muytjens H, Kolle L. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? *Ped Infect Dis*. 1990; 9: 372-3.
17. Biering G, Karlsson S, Clark N, Jonsdottir K, Ludvigsson P, Steingrimsson O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J Clin Microbiol*. 1989; 27: 2054-6.
18. Simmons B, Gelfand M, Haas M, Metts L, Fergusson J. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Cont Hosp Epidemiol*. 1989; 10: 398-401.
19. Universidad de Wageningen, Holanda. ¿El riesgo de *Enterobacter sakazakii* es similar en todas las regiones y países? [serie en Internet]. [citado 16 May 2008]. Disponible en: <http://www.food-info.net/es/>

Recibido: 10 de septiembre de 2007.

Aprobado: 27 de mayo de 2008.

*Virginia Leyva*. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Dpto. Microbiología de los Alimentos. Infanta 1158 e/ Llinás y Clavel. Centro Habana. La Habana, Cuba.  
Teléf.: 8-700911. E mail: [virginia.leyva@infomed.sld.cu](mailto:virginia.leyva@infomed.sld.cu)

Tabla 1. Caracterización de los aislamientos obtenidos

|   | Muestras involucradas |          |            |
|---|-----------------------|----------|------------|
|   |                       | Cantidad | Porcentaje |
| No. cepas presuntivas de <i>Enterobacteriaceae</i> en agar VRBG | 295                   | 26       | 43,3       |
| No. cepas con imagen de Kligler típica de coliformes            | 90                    | 15       | 25,0       |
| No. cepas citrato positivas                                     | 37                    | 11       | 18,3       |
| No. cepas con pigmento amarillo en ATS                          | 23                    | 12       | 20,0       |

Tabla 2. Perfil de los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales para identificación de especie

| Cant. cepas | I | RM | VP | Lisina | Arginina | Ornitina | Producción de ácido de |       |       |      |       |
|-------------|---|----|----|--------|----------|----------|------------------------|-------|-------|------|-------|
|             |   |    |    |        |          |          | Sac.                   | Dulc. | Adon. | Raf. | Sorb. |
| <b>1</b>    | - | -  | +  | -      | +        | +        | +                      | -     | -     | +    | -     |
| 2           | - | +  | -  | -      | +        | -        | -                      | +     | -     | +    | -     |
| 8           | - | +  | -  | -      | +        | -        | -                      | +     | -     | +    | +     |
| 1           | + | +  | -  | -      | +        | +        | -                      | +     | -     | -    | +     |
| 1           | + | -  | -  | -      | +        | +        | +                      | -     | -     | -    | -     |
| 1           | + | -  | +  | -      | +        | +        | +                      | -     | -     | +    | +     |
| 1           | + | +  | -  | -      | -        | +        | -                      | +     | -     | -    | -     |
| 2           | + | +  | -  | -      | -        | -        | +                      | -     | -     | +    | +     |
| 1           | + | +  | -  | -      | -        | +        | +                      | -     | +     | +    | +     |
| 2           | + | +  | -  | -      | -        | +        | +                      | -     | -     | +    | -     |
| 2           | + | +  | -  | -      | +        | +        | +                      | -     | -     | +    | -     |

I: indol, RM: rojo de metilo, VP: Voges Proskauer, sac.: Sacarosa, Dulc.: dulcitol, Adon.: adonitol, Raf.: rafinosa, Sorb.: sorbitol, +/-: positivo/negativo.