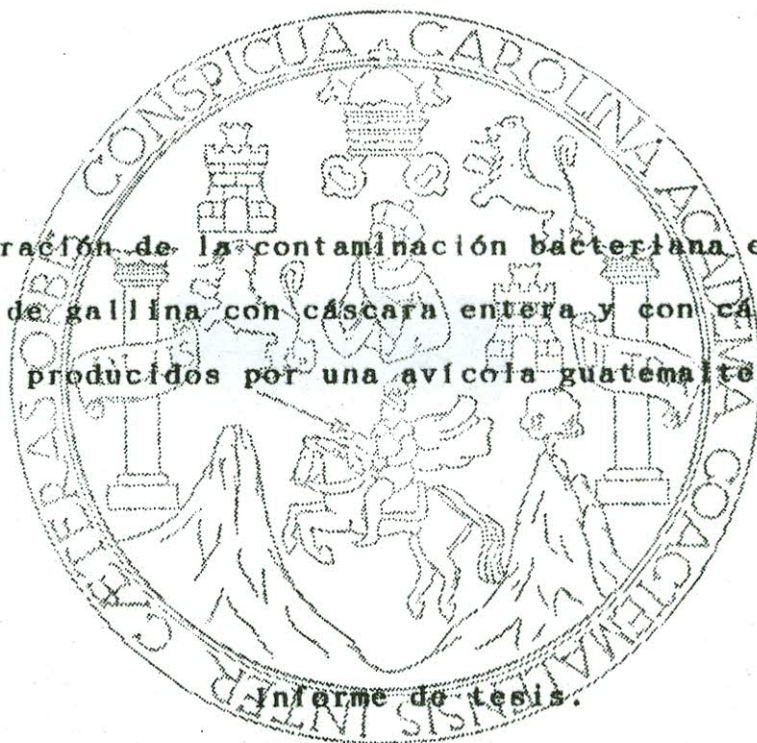


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Comparación de la contaminación bacteriana en huevos
frescos de gallina con cáscara entera y con cáscara rota,
producidos por una avícola guatemalteca.



PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Presentado por
Xiomara Lizeth Arévalo Rosales.
Para optar al título de
Químico Biólogo.

Guatemala, octubre de 1995.

DL
06
+(1672)

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Decano:	LIC.	JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
Secretario:	LICDA.	ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
Vocal I:	LIC.	MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
Vocal II:	LIC.	GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
Vocal III:	LIC.	MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
Vocal IV:	BR.	ANA MARIA RODAS CARDONA
Vocal V:	BR.	HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

DEDICO ESTA TESIS

A Dios, a su hijo Jesucristo y a la Santísima Virgen María,
por todas sus bendiciones.

A mi patria Guatemala.

A mis padres Hugo Roberto Arévalo Lone y Elena Alicia
Rosales de Arévalo, por su apoyo y dedicación constantes.

A mi esposo, Julio César Rafael Flores Ordóñez.

A mi hijo, Julio César de Jesús.

A mis hermanos Hugo Roberto, Marvin Alberto y Mildred
Mireya.

A mis abuelos Ramiro Rosales Gonzáles (QEPD), Elena Arriola
de Rosales (QEPD), Adrián Arévalo Tobar y Luz América Lone
de Arévalo.

A mis tíos, cuñadas y sobrinos.

A mi suegra, Flor de María Ordóñez.

AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Teresita Aguilar de Miranda.

Al Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM).

Al Personal del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de LUCAM.

A la Avícola Huevos del Campo S. A.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	4
4. Justificaciones	16
5. Objetivos	17
6. Hipótesis	18
7. Materiales y métodos	19
8. Resultados	23
9. Discusión de resultados	24
10. Conclusiones	25
11. Recomendaciones	26
12. Referencias	27
13. Anexos	30
13.1. Tablas	21
13.2. Diagramas	35

1. RESUMEN

La naturaleza ha dotado a los huevos de varias barreras defensivas contra los microorganismos, las cuales se ven disminuidas debido a la manipulación a la que se ven expuestos desde su postura hasta su preparación para el consumo, aumentándose el riesgo de contaminaciones con patógenos (1-3). Esto es especialmente preocupante en la industria alimenticia, donde se utilizan huevos con cáscara rota para la elaboración de sus productos.

Debido a lo anterior, se realizó un estudio comparativo entre los recuentos totales de bacterias aeróbicas en huevos con cáscara entera y con cáscara rota, para determinar si la ruptura de la misma influye en la capacidad microbiana de contaminar el interior del huevo.

Al mismo tiempo, se investigó la prevalencia de Salmonella sp. y de coliformes totales y fecales, en ambos tipos de muestras y se determinó su comportamiento en los casos en que la integridad de la cáscara se ha perdido.

Para ésto se analizaron 385 huevos con cáscara entera y 311 huevos con cáscara rota (procedentes de una misma avícola guatemalteca), sometiendo los resultados obtenidos a una prueba de z.

Se encontró una contaminación en el interior de los huevos del 10.4 por ciento, en los que tenían la cáscara entera y del 62.7 por ciento en los que tenían la cáscara rota, por lo que se concluyó que la integridad de la cáscara afecta a la capacidad del huevo para repeler los ataques microbianos.

2. INTRODUCCION

La contaminación bacteriana de los alimentos es un problema tanto económico como de salud. Un porcentaje no determinado de las enfermedades producidas por Salmonella sp., Campylobacter sp., Yersinia sp. y Escherichia coli, se atribuye al consumo de carne de aves, huevos y productos alimenticios a base de huevo, con una cauda mundial anual de entre ocho y diez millones de personas con enfermedad entérica (1-4).

Debido a su alto nivel nutricional y a su bajo costo, los huevos de gallina son parte de la dieta básica de muchas personas alrededor del mundo. A pesar de poseer varias barreras defensivas contra los microorganismos, la manipulación y las condiciones de almacenamiento hacen que de cada 10,000 huevos, al menos uno se encuentre contaminado (1).

Este riesgo se incrementa en la industria alimenticia, donde debido a su costo se utilizan grandes cantidades de huevos con cáscara rota en productos listos para su consumo como mezclas, alimentos horneados, pastas, mayonesa, aderezos de ensaladas, dulces, helados cremosos, alimentos para mascotas, etc. (3).

Los casos de intoxicación alimenticia producidos por la ingesta de huevos o productos a base de huevo, han motivado a que varios organismos internacionales regulen la producción de las

avícolas; esta iniciativa se ha seguido en muchos países y ya ha logrado buenos resultados (1-3).

Por lo anterior, se puede suponer que existe mayor contaminación en los huevos frescos de gallina con cáscara rota, que en aquellos con cáscara entera.

3. ANTECEDENTES

3.1. Producción y consumo de huevos de gallina en Guatemala.

En nuestro país la avicultura proporciona alimentos altamente nutritivos y económicos, al tiempo que es fuente de trabajo para miles de personas. En 1992 la Asociación Nacional de Avicultores (ANAVI), junto con el Banco de Guatemala y el Departamento de Fomento Avícola, reportaron una producción total de 157 millones de libras de carne de ave (entre pollo y gallina), lo que equivale a un consumo anual proporcional de 16.11 lbs de carne de ave por habitante. Así mismo, reportan una producción total de 126,562,500 docenas de huevos de gallina, que equivale a un consumo anual proporcional de 13 docenas de huevos de gallina por habitante (datos no publicados pero a disposición del interesado en ANAVI y calculados para una población estimada de 9.7 millones de habitantes).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

3.2. Defensas del huevo.

El huevo de gallina es un producto no perecedero que posee numerosas barreras defensivas, debido a que su objetivo principal es la reproducción, por lo que puede ser consumido hasta dos meses después de puesto (5,6).

3.2.1. Defensas físicas

La yema es un medio apropiado para el crecimiento y multiplicación bacteriano, por lo que las defensas físicas buscan evi-

tar en forma conjunta, el paso de los microorganismos al interior del huevo.

3.2.1.1. Cutícula:

Es una cubierta protéica que envuelve al huevo y actúa como la primera barrera defensiva contra los microorganismos, interfiriendo con la invasión bacteriana al cerrar los poros de la cáscara, disminuyendo así la permeabilidad de la misma (5,6).

3.2.1.2. Cáscara:

Posee entre 7,000 y 17,000 poros en su superficie, concentrándose la mayoría en el extremo ancho del huevo; el diámetro de éstos varía entre 6 y 13 μm , debido principalmente a malformaciones (5-7). Los cambios de espesor en la cáscara, se deben en su mayoría a factores nutricionales, ambientales y hereditarios, que repercuten en su calidad y habilidad para evitar la penetración (5-8). La cáscara es permeable a la penetración de Escherichia coli, Salmonella paratyphi, Serratia marcescens y Pseudomonas aeruginosa (5).

3.2.1.3. Membranas:

Directamente bajo la cáscara se encuentra la membrana externa, mientras que la interna se sitúa sobre la clara. La membrana interna brinda mayor protección antibacteriana que la externa (debido a su alto contenido de lisozima) (5,6).

Ambas se encuentran firmemente unidas entre sí (excepto en el extremo ancho del huevo, donde se separan para formar una bolsa de aire); están compuestas por una matriz de fibras entrelazadas, donde solamente las bacterias muy activas logran pasar, por lo que actúan como filtros bacterianos y su efecto protector conjunto es mayor que el de la cáscara (5-9).

3.2.1.4. Clara:

Es una capa densa formada por varios elementos, como lo son albúmina (el principal), lisozima, conalbúmina y ovidina, entre otros (6).

3.2.1.5. Capa calazífera:

Se forma de los mismos componentes que la clara, pero en mayores concentraciones, por lo que es más viscosa. Forma los cordones calazíferos, cuya función es mantener a la yema en el centro del huevo, evitando así que la cercanía de ésta con la cáscara facilite su contaminación (si la yema se mezcla con la clara, destruye sus propiedades antibacterianas) (6).

3.2.1.6. Membrana vitelina:

Rodea a la yema, regulando el paso de sustancias entre el exterior y el interior (6).

3.2.2. Defensas químicas:

Debido a su acción bactericida o por secuestrar ciertos nutrientes, evitan la invasión a la yema cuando las defensas físicas fallan. La mayoría se encuentran en la clara y la capa calazífera (5).

3.2.2.1. pH de la albúmina:

Tiene efecto germicida. Al momento de la postura varía entre 7.6 y 7.9, aumentando gradualmente hasta llegar a 9.6, luego de la primera semana de almacenamiento (7,9).

3.2.2.2. Conalbúmina:

También conocida como ovotransferrina, es una enzima transportadora del hierro, dependiente del pH; forma un quelato con el Fe^{2+} , evitando su utilización por las bacterias. Representa el diez por ciento de los sólidos en el huevo blanco (5,7,10,11).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

3.2.2.3. Lizosima:

Enzima que ayuda a la floculación y posee acción lítica sobre las paredes de las bacterias gram positivo, sin embargo Staphylococcus aureus y Clostridium tyrobutyricum, son resistentes a ella. Es tan efectiva que, usada entre niveles de 0.3 y 0.5 por ciento, sirve como preservante de alimentos (5,7,10,11).

3.2.2.4. Ovomucina:

También conocida como ovomucoide, es una enzima con acción antitriptica, que produce proteólisis o hidrólisis alcalina, lo que conlleva a precipitaciones (11).

3.2.2.5. Ovidina:

También conocida como avidina, es un polipéptido que se-
cuestra a la biotina, evitando así su utilización por las bacterias (7,11).

3.2.2.6. Otros:

En la clara del huevo pueden producirse ciertos fenómenos que en determinadas circunstancias, actúan como defensas químicas, como la baja en la concentración del nitrógeno protéico y la combinación de la riboflavina con proteínas no caracterizadas; en ambos casos las bacterias se ven privadas de estos (10).

3.3. Fuentes de contaminación:

Dependen de muchos factores, siendo los principales la cantidad de bacterias en el inóculo y el tiempo de contacto (5).

La contracción simultánea de la cloaca y el oviducto durante la postura, facilita el paso bacteriano entre ellas, por lo que pueden encontrarse desde los genitales hasta los ovarios de las gallinas (esta forma de contaminación aumenta en casos de inseminación artificial). Dentro de las bacterias con capacidad de transmisión interovárica se encuentran Streptococcus sp.,

Staphylococcus aureus, Micrococcus sp., Pseudomonas haemolyticum, Salmonella sp. y coliformes aeróbicos (1,5,6,8,12).

Se han encontrado bacterias en el tracto digestivo, hígado, yema, ovario, cloaca y sangre de gallinas que han bebido agua o consumido alimentos con altas concentraciones de Lactobacillus sp., Micrococcus sp. o Salmonella sp. Del total de los huevos contaminados, el diez por ciento presenta problemas bacterianos causadas en alguna de las formas anteriores (1,5,6,8,12).

Luego de puesto el huevo, la cáscara se contamina con las heces de la gallina, la suciedad del suelo y del ambiente o por el roce, aumentando la cantidad de bacterias e incluso disminuyendo la concentración del agua en el interior (2,4,5,13).

3.4. Mecanismos de penetración bacteriana:

Los huevos se encuentran cálidos y húmedos al momento de la postura, por lo que al entrar en contacto con la tierra y la suciedad del suelo, se crea un ambiente favorable para el crecimiento fúngico. Los hongos al crecer forman micelio, el cual rompe la cutícula, penetrando y abriendo los poros. Estas mismas condiciones hacen que cuando se produce un descenso brusco de la temperatura (como al lavar los huevos con agua fría), se de una fuerza de succión capaz de hacer ingresar a las bacterias. Los largos periodos de almacenamiento a altas temperaturas y en ambientes húmedos (como los que se producen durante la incubación), también facilitan la penetración (1,2,5,6,8,12).

Los cambios en el grosor o en el diámetro de los poros de la cáscara afectan la penetración microbiana, éstos pueden deberse a los tratamientos a los que se someten los huevos, o por el roce durante la manipulación (que causa el desprendimiento de fracciones de cutícula). Por otro lado el cambio de textura (rugosa o lisa) no afecta dicha penetración (2,4,5,13).

Después de la penetración, las bacterias avanzan hacia la membrana interna donde se establecen gracias a la acción de enzimas hidrolíticas; se multiplican a temperaturas adecuadas (15-30°C), utilizando los componentes de la membrana como nutrientes, cambiándole la permeabilidad (6,9).

La variación de la temperatura ayuda a la penetración bacteriana de tres maneras: favorece la multiplicación en la membrana interna, el principio del ataque a la yema, al tiempo que afecta la acción coordinada de los efectos antimicrobianos (11).

La mayoría de las bacterias de la cáscara son gram positivo provenientes del suelo y de las heces, mientras que las condiciones internas favorecen el crecimiento de bacterias gram negativo; aunque en determinadas circunstancias (huevos rotos), se producen infecciones mixtas (5,6,14,15) (anexo 13.1.1.).

3.5.1. Microbiota patógena:

3.5.1.1. Escherichia coli:

Es un bacilo gram negativo de origen fecal, que debido a sus requerimientos nutricionales y a su capacidad de desarrollarse a temperaturas relativamente bajas, se reproduce bien en el

interior del huevo; además la cáscara es permeable a ella, por lo que su penetración se ve facilitada (5,15).

3.5.1.2. Staphylococcus aureus:

Debido a que es una bacteria gram positivo, es difícil encontrarla en el interior del huevo, excepto cuando se ha dañado la cáscara o en productos a base de huevo; en estos casos puede causar infecciones a corto plazo, debido a que su periodo de incubación es incluso menor que el de Salmonella sp. (6,15).

3.5.1.3. Clostridium perfringens:

Bacilo gram positivo, también conocido como C. welchii; casi no penetra la cáscara, siendo más común encontrarlo en productos a base de huevo o en casos de mala refrigeración. Sólo algunas cepas son patógenas y su patogenicidad es baja (6).

3.5.1.4. Salmonella sp:

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Bacilo gram negativo, cuya penetración depende de la calidad de la cáscara y de la especie que ataca; estudios indican que menos del uno por ciento de los huevos tienen Salmonella sp. en su cáscara, esta incidencia disminuye hasta un 0.21 por ciento, luego de ser lavados (8,13). Es la causa más importante de intoxicación alimenticia, pudiendo encontrarse en el agua y los alimentos; solamente contaminan la yema si el ovario está infectado (4,13,14).

3.5.1.3.1. Salmonella pullorum:

Antiguamente casi todas las gallinas ponedoras padecían enfermedad de pullorum (infección ovárica y septicemia), pero en la actualidad su aislamiento es eventual. Junto con Salmonella gallinarum, son las que más infectan los ovarios de las gallinas, contaminando la yema (1,5,12,13,16).

3.5.1.3.2. Salmonella typhimurium:

Es la más aislada en las intoxicaciones por consumo de huevos contaminados o sus productos en humanos. Su penetración es facilitada al existir poros muy grandes en la cáscara (4).

3.5.1.3.3. Salmonella enteritidis:

Es la que más se aísla en los casos de contaminación de ovarios y huevos; produce infección sistémica en gallinas y salmonelosis en humanos, pero no crece en climas fríos (1,4,12).

3.5.2. Microbiota no patógena:

3.5.2.1. Arizona sp.:

Bacilo gram negativo, penetra con mayor facilidad en los huevos infértiles que han sufrido cambios en la cáscara (8).

3.5.2.2. Alcaligenes sp.:

Bacilo gram negativo, que se encuentra generalmente en el agua de lavado y en la cáscara (6,15).

3.5.2.3. Pseudomonas sp.:

Bacilo gram negativo, es el principal causante de que se descomponga el huevo; P. fluorescens penetra en los huevos con cáscara débil, mientras que P. haemolyticum se transmite interováricamente (6).

3.6. Patología:

Las intoxicaciones alimenticias causadas en humanos por bacterias patógenas que contaminan a los huevos o sus productos, se han conocido desde hace muchos años, pero desde que la Food and Drug Administration (FDA) comenzó a reglamentarlos, la calidad de dichos productos ha mejorado mucho (2,3,5,10) (anexo 13.1.2.).

Estas intoxicaciones afectan principalmente a personas inmunocomprometidas, desnutridas, embarazadas, ancianos y niños. Entre 2 y 36 horas después de ingerir el alimento, se presenta diarrea, vómitos, dolor abdominal, cefalea, fiebre y escalofríos (1,5,16).

3.7. Limpieza y conservación del huevo:

3.7.1. Lavado:

Disminuye los recuentos bacterianos de la cáscara, pero el roce puede provocar el desprendimiento de fracciones de la cutícula o incluso romper el huevo; la maquinaria y el equipo que no se conserven limpios facilitan tanto la contaminación como la penetración (3,14).

3.7.2. Formaldehído:

Se utiliza para fumigar los huevos, pero reacciona con las proteínas de la cutícula, pudiendo causar el desprendimiento de partes de la misma (5,11).

3.7.3. Pasteurización:

Disminuye sensiblemente los conteos de bacterias aeróbicas, mohos y levaduras, no así el de E. coli o esporoformadores mesófilos aeróbicos. Los huevos deben refrigerarse de inmediato para evitar su contaminación, debido a que hasta el uno por ciento de la microbiota de la cáscara, resiste el proceso (Alcaligenes sp., Flavobacterium sp., Bacillus sp., Proteus sp., Pseudomonas sp., Escherichia sp., Staphylococcus sp. y coliformes) (3,5,14).

3.7.4. Congelación:

Este es uno de los principales métodos de conservación utilizado en Estados Unidos, donde anualmente se congelan más de 320 millones de libras de huevos. Aunque logra aumentar la vida de estantería de los huevos, causa cambios poco deseables en los mismos, como gelatinización de la magma, aumento de viscosidad, cambios de color y separación de líquidos y sólidos en los huevos al ser descongelados; además debe dejarse el tiempo necesario para su descongelación y debe consumirse lo antes posible (3).

3.7.5. Refrigeración:

Es el método más accesible, económico y eficaz de conservación a corto plazo, sin alterar significativamente las propiedades químicas y físicas del huevo. Generalmente se usa luego de la pasteurización (3).

3.7.6. Huevos líquidos:

Este término se refiere a los huevos que se comercializan sin su cáscara. A estos se les debe agregar un diez por ciento de sal o acidificarse a pH 5.0, antes de refrigerarse (3,14).

3.7.7. Otros:

La ultrapasteurización seguida de empacado aséptico y refrigeración, podría ser el mejor método de conservación, pero deben de hacerse estudios más extensos sobre su aplicación.

La deshidratación también puede ser de utilidad, pero al igual que los métodos con excesivo calor, tiende a desnaturalizar las proteínas, alterando las propiedades físicas de los huevos.

Los almacenamientos prolongados, secan y encogen las cutículas, causando que se expongan los poros (3,5,14).

4. JUSTIFICACIONES

La industria alimenticia utiliza los huevos de gallina en diferentes procesos, debido tanto a sus propiedades físicas y nutricionales, como a su bajo costo; pero la contaminación a la que están propensos, puede producir intoxicaciones alimenticias en los consumidores. Estos casos se han reducido gracias al control de los productos alimenticios a base de huevo, aunque recientemente se han reportado algunos.

En Yugoslavia, Inglaterra, Irlanda y Noruega, se registran más del millón de casos anuales de intoxicación alimenticia con cientos de defunciones. En 1983 se detectaron en Puerto Rico 49 casos, con 1628 intoxicados y 13 muertos; entre 1985 y 1989 se detectaron en Estados Unidos de Norte América, 189 casos con 6604 intoxicados por consumo de alimentos elaborados a base de huevos poco cocidos o crudos. Más de la mitad de casos se producen por contaminación de la cáscara con Salmonella sp. (1,3,16).

En Guatemala se han reportado aislamientos esporádicos de Salmonella sp. en carne de aves y en alimentos elaborados a base de pollo (datos no publicados pero a disposición del interesado en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos -LUCAM-), pero son pocos los estudios al respecto (17,18).

Además, la creciente utilización de huevos con cáscara rota por la industria alimenticia, plantea la posibilidad de que en estos casos, la susceptibilidad a la contaminación aumente en relación a los huevos con cáscara entera.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

5. OBJETIVOS

- 5.1. Comparar los recuentos aeróbicos totales entre los huevos con cáscara entera y los huevos con cáscara rota, en una muestra obtenida de la producción comercial de una avícola guatemalteca.
- 5.2. Comparar la prevalencia de Salmonella sp. entre los huevos con cáscara entera y los huevos con cáscara rota, en la misma muestra.
- 5.3. Comparar la prevalencia de coliformes (tanto totales como fecales) entre los huevos con cáscara entera y los huevos con cáscara rota, en la misma muestra.
- 5.4. Inferir en base a los resultados de las pruebas estadísticas, el comportamiento de la contaminación bacteriana en los huevos con cáscara entera y en los huevos con cáscara rota.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

6. HIPOTESIS

Los huevos de gallina con cáscara rota, producidos por la avícola estudiada, presentan mayor contaminación (evidenciada por un recuento aeróbico total más elevado, así como una mayor prevalencia de Salmonella sp., coliformes totales y fecales), que los huevos con cáscara entera.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo de trabajo:

Huevos frescos de gallina con cáscara entera y con cáscara rota, ambos producidos en la avícola "Huevos del Campo S.A.".

7.2. Medios.

7.2.1. Recursos Humanos:

Tesista: Br. Xiomara Lizeth Arevalo Rosales.

Asesora: Licda. Teresita Aguilar de Miranda.

Personal del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de LUCAM.

7.2.2. Recursos materiales:

Agua peptonada (AP).

Agar para métodos estándar (SM).

Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD).

Agar Salmonella-Shigella (SS).

Agar Verde Brillante (AVB).

Agar tres azúcares y hierro (TSI).

Agar Lisina-Arginina-Hierro (LIA).

Agar Citrato (AC).

Agar Movilidad-Indol-Ornitina (MIO).

Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB).

Caldo lactosado doble (CLD).

Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MRVP).

Caldo E. coli (CEC).

Caldo Verde Brillante (CVB).

Caldo Selenito-Cistina (CSC).

Caldo Tetracionato (CTT).

Reactivo de Kovacks (indol).

Antisueros para Salmonella sp.

Material y equipo de uso común en el laboratorio de microbiología.

7.2.3. Recursos institucionales:

Laboratorio de Microbiología de Alimentos de LUCAM, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

7.3. Procedimiento:

7.3.1. Recuento aeróbico total (RAT):

Desinfectar la cáscara de los huevos con alcohol, homogenizar y diluir 25 g. del interior con 225 ml de AP. A partir de esta dilución, plaquear en agar SM (por duplicado) e incubar. Luego proceder a realizar el recuento de colonias, utilizando para ello un contador Quebec (19) (anexo 13.2.1.).

7.3.2. Determinación de Salmonella sp.:

A 25 ml del homogenizado añadir 225 ml de CLD e incubar durante 24 horas. Luego realizar otro enriquecimiento en tubos con CTT y CSC e incubarlos otras 24 horas. Plaques en AVB, XLD y SS a partir de ambos caldos e incubar 24 horas. Sembrar las

colonias sospechosas en la batería bioquímica (la que incluye TSI, LIA, MIO y AC) e incubar 24 horas. Al obtener una imagen que concuerde con Salmonella sp., determinar el serotipo mediante el uso de antisueros. Repetir el proceso a las 48 horas a partir de los caldos (19,20) (anexo 13.2.2.).

7.3.3. Determinación de coliformes:

Utilizar el método del número más probable (NMP).

De las diluciones con AP utilizadas en el RAT, sembrar por triplicado en tubos con CLS y campana de Durham invertida e incubar durante 24 horas. De los tubos que presenten gas, tomar una alícuota y sembrar en tubos con AP + NaCl y en tubos con CVB y CEC con campana de Durham, incubar otras 24 horas. El gas en los tubos con CEC, junto con la coloración guinda que se produce en los tubos con AP + NaCl al agregar el reactivo de Kovacks, es índice de la presencia de coliformes fecales. A partir de los tubos con CEC plaquear en Agar EMB y a las colonia sospechosas hacerles pruebas bioquímicas (TSI, LIA, MIO y MRVP), para la determinación de E. coli (19) (anexo 13.2.3.).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

7.4. Diseño estadístico:

Por razones prácticas, se decidió recolectar la muestra solamente en una avícola guatemalteca, la cual tiene una producción diaria de 600 cajas de huevos. Debido a las limitaciones de material, medios de cultivo, tiempo y espacio, sólo pueden trabajarse un máximo de dos cartones por semana (uno de cáscara rota y uno

de cáscara entera); éstos fueron proporcionados por la avícola durante 12 semanas (escogidos al azar por el personal de la empresa), para un total de 311 huevos por grupo.

Se determinó el RAT, la prevalencia de Salmonella sp. y de coliformes (totales y fecales), en huevos con cáscara entera y con cáscara rota. Con los porcentajes de positividad se procedió a realizar una prueba de Z para proporciones de una cola, con la que se busca comparar la contaminación bacteriana en el interior del huevo, como efecto de la ruptura de la cáscara.

Planteamiento estadístico:

$H_0: Pr < Pe$

H_0 = hipótesis nula.

$H_a: Pr > Pe$

H_a = hipótesis alterna.

$$Z_c = \frac{Pr - Pe}{\sqrt{\frac{Prqr}{nr} + \frac{Peqe}{ne}}}$$

Pr = proporción de huevos positivos con cáscara rota.

Pe = proporción de huevos positivos con cáscara entera.

$Z_c > Z_a$ = se rechaza H_0 .

Z_c = z calculada.

Z_a = z alpha a 0.05 (1.645).

$q = 1 - p$

nr = No. de huevos cáscara rota.

ne = No. de huevos cáscara entera.

8. RESULTADOS

Inicialmente se planificó el análisis de 311 huevos de cada tipo, pero por disponibilidad de la avícola, se aumentó el número de huevos con cáscara entera analizados a 385.

Se encontró un mayor porcentaje de contaminación en huevos con cáscara rota (62.7%), que en huevos con cáscara entera (10.4%), tendencia que se mantiene en los recuentos de bacterias totales y de coliformes totales y fecales. En ningún caso se detectó la presencia de Salmonella sp. (anexo 13.1.3).

Todos los resultados se comprobaron estadísticamente por medio de la prueba de z para proporciones de una cola, la que confirmó la tendencia de los huevos con cáscara rota a ser más susceptibles a la contaminación microbiana que los huevos con cáscara entera ($p < 0.005$) (anexo 13.1.4).

A las muestras que reportaron coliformes fecales positivos, se les detectó la presencia de E. coli. Aunque la tendencia se mantiene (0.96 % en huevos con cáscara rota y 0.30 % en huevos con cáscara entera), no es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (anexos 13.1.3 y 13.1.4).

También se logró aislar Enterobacter sp., Citrobacter sp y bacterias no fermentadoras (las cuales, por no ser objetivos del estudio, simplemente se agruparon como "otras bacterias Gram negativo") y que mantienen la tendencia general, ya que se encontraron en el 61.1 por ciento de los huevos con cáscara rota y en el 6.5 por ciento de los huevos con cáscara entera (anexo 13.1.3).

9. DISCUSION DE RESULTADOS

La comparación de los resultados obtenidos en los recuentos de bacterias totales, coliformes totales y coliformes fecales, entre los huevos con cáscara entera y los huevos con cáscara rota, indica que la contaminación es significativamente mayor en los segundos, lo que se confirma al considerar el total de huevos contaminados de cada tipo (anexo 13.1.3.).

En ningún caso se aisló Salmonella sp., por lo que se deduce que su prevalencia es baja (anexos 13.1.3.).

La tendencia de contaminación en los huevos encontrada, se debe a la disminución física de las defensas del huevo, ya que al perderse la integridad de la cáscara, se facilita el ingreso de los microorganismos. Esto se comprobó estadísticamente al aplicarles a los resultados la prueba de z para proporciones de una cola (anexo 13.1.4.).

Las otras bacterias Gram negativo aisladas, se comportan de manera similar al resto de recuentos, por lo que se deduce que también se benefician de la ruptura de la integridad de la cáscara para prosperar en el interior del huevo (anexo 13.1.3.).

Los aislamientos de E. coli fueron esporádicos, e incluso las diferencias entre los resultados de huevos con cáscara entera y rota, no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo debe de considerarse que la tendencia parece mantenerse (anexos 13.1.3 y 13.1.4).

10. CONCLUSIONES

- 10.1. Se encontró que los RAT están más elevados en los huevos con cáscara rota (16.1%) que en los huevos con cáscara entera (5.4%).
- 10.2. Los aislamientos de coliformes totales, son más frecuentes en huevos con cáscara rota (27.3%) que en huevos con cáscara entera (9.4 %).
- 10.3. Los aislamientos de coliformes fecales, son más frecuentes en huevos con cáscara rota (12.9%) que en huevos con cáscara entera (3.4 %).
- 10.4. En ningún caso se aisló Salmonella sp., por lo que se deduce que su prevalencia es muy baja.
- 10.5. Los huevos con cáscara rota se encuentran más propensos a la contaminación microbiana.
- 10.6. Además de las bacterias estudiadas, se identificaron otras bacterias gram negativo (como Enterobacter sp., Citrobacter sp y bacterias no fermentadoras), encontrándose en mayor porcentaje en huevos con cáscara rota (61.1 %), que en huevos con cáscara entera (6.5%).

11. RECOMENDACIONES

Es conveniente realizar un estudio bacteriológico más extenso, que abarque muestreos en los ovarios de las gallinas (para detectar presencia de Salmonella sp.) y en los huevos recién puestos, para compararse con los análisis en huevos lavados. El resultado permitirá determinar si existe contaminación, el momento exacto en que se produce y la manera de corregirla; además se logrará establecer la prevalencia real de Salmonella sp. y la microbiota de los huevos en el país.

Debe de instruirse a los manipuladores de alimentos, para que se laven las manos constantemente, utilicen guantes y eviten manipular los huevos cuando tengan heridas abiertas.

La refrigeración de los huevos, si no son consumidos de inmediato, el lavado de las manos antes de elaborar alimentos y la buena cocción de los mismos, pueden ayudar efectivamente a disminuir las enfermedades transmitidas por los alimentos.

Las industrias deben racionalizar el uso de huevos con cáscara rota, determinando el riesgo que implica para cada tipo de producto y la forma de corregir los problemas. Pueden usarse en alimentos adecuadamente precocidos o en aquellos que lleven un proceso que garantice la eliminación de contaminantes microbianos.

12. REFERENCIAS

- 12.1. Blumenthal D. Salmonella enteritidis; from the chicken to the egg. FDA Cons. 1990; 4:7-10.
- 12.2. March BE. Bacterial infection of washed and unwashed eggs with reference to Salmonellae. Appl Microbiol. 1989; 17(1):98-101.
- 12.3. Moore KJ, et al. Changes in bacterial cell and spore counts of reduced-fat egg products as influenced by pasteurization and spray drying. J Food Prot. 1988; 51: 565-568.
- 12.4. Kvenberg JE, Archer DL. Economic impact of colonization control on foodborne disease. Food Tech. 1987; 7:77-81.
- 12.5. Mayers FJ, Takeball MA. Microbial contamination of hen's egg: a review. J Food Prot. 1983; 46(12):1092-1098.
- 12.6. Baker RC. Microbiology of eggs. J Milk Food Tech. 1974; 37(5):265-268.
- 12.7. Yadav NK, Vadehra DV. Mechanism of egg white resistance to bacterial growth. J Food Sci. 1977; 42:97-99.
- 12.8. Sauter EA, et al. The effect of egg shell quality on penetration by various Salmonellae. Poult Sci. 1974; 53:2159-2162.
- 12.9. Wedral EM, Vadehra DV, Baker RC. Mechanism of bacterial penetration through the eggs of Gallus gallus: efect of penetration and growth on permeability of inner shell membrane. J Food Sci. 1971; 36:520-522.

- 12.10. Frazier MN. Situación de la salmonelosis en el mundo. Inf Av. 1992; 5(55):8-11.
- 12.11. Board RG, Ayres JC. Influence of temperature on bacterial infection of the hen's egg. Appl Microbiol. 1965; 13(3): 358-363.
- 12.12. Barnhart HM, et al. Prevalence of Salmonella enteritidis and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. J Food Prot. 1991; 54(7):488-491.
- 12.13. Baker RC, Goff JP, Timoney JF. Prevalence of Salmonellae on eggs from poultry farms in New York state. Poult Sci. 1980; 59:289-292.
- 12.14. Ball LC, et al. Functionality and microbial stability of ultrapasteurized aseptically packaged refrigerated whole egg. J Food Sci. 1987; 52(5):1212-1218.
- 12.15. Mosts WA. Classification of bacteria from commercial egg washers and washed and unwashed eggs. Appl Env Microbiol. 1980; 40(4):710-714.
- 12.16. WHO. WHO consultation on poultry an egg salmonellosis. Food Lab News. 1989; 16(5):52-54.
- 12.17. Cañas CB. Estudio de la salmonelosis aviar en Guatemala. Guatemala: USAC, (Tesis de graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia), 1972. 42p.
- 12.18. Yurrita E. Estudio de salmonelosis en tres rastros avícolas de la ciudad de Guatemala. Guatemala: USAC, (Tesis de graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia), 1980. 39p.

- 12.19. Miranda T. Manual de métodos de análisis del laboratorio de microbiología de alimentos. Guatemala: LUCAM, 1991. 65p.
- 12.20. Andrews WH. A review of culture methods and their relations to rapid methods for the detection of Salmonella in foods. Food Tech. 1985; 3:77-82.
- 12.21. Fleiss FA. Statistical methods for rates and proportions. 2nd ed. USA: Wiley, 1981. p.38-45.

13. ANEXOS

Anexos 13.1. Tablas.

- Anexo 13.1.1. Microbiota de los huevos de gallina.
- Anexo 13.1.2. Normas de la FDA para microorganismos en huevos de gallina.
- Anexo 13.1.3. Comparación entre los resultados obtenidos sobre la contaminación microbiana en huevos con cáscara entera y huevos con cáscara rota.
- Anexo 13.1.4. Resultados de las pruebas de z para proporciones de una cola.

Anexos 13.2. Diagramas.

- Anexo 13.2.1. Esquema del recuento aeróbico total.
- Anexo 13.2.2. Marcha bacteriológica para la determinación de Salmonella sp.
- Anexo 13.2.3. Marcha bacteriológica para la determinación de coliformes.

Anexo 13.1.1.

Tabla No. 1:

Microbiota de los huevos de gallina.

microorganismo	incidencia cáscara entera	o	prevalencia cáscara rota
Micrococcus	+++		++
Achromobacter	++		++
Aerobacter	++		-
Alcaligenes	++		+++
Arthrobacter	++		+
Bacillus	++		+
Citophaga	++		+
Escherichia	++		***
Flavobacterium	++		+
Pseudomonas	++		+++
Staphylococcus	++		-
Aereomonas	+		++
Proteus	+		+++
Sarcina	+		-
Serratia	+		-
Streptococcus	+		+

- = no aisladas.
 + = escasas.
 ++ = regular cantidad.
 *** = abundantes.

Anexo 13.1.2.

Tabla No. 2:

Normas de la FDA para los microorganismos en huevos de gallina.

	FDA
Recuento aeróbico total	<25000 UFC*
Coliformes totales	< 40 /g
<u>E. coli</u>	< 10 /g
Levaduras	10 /g
Salmonella	0

* = Unidades formadoras de colonia/g.

Tomado de Moore KJ, et. al., 1988 y Ball, et. al., 1987.

Anexo 13.1.3.

Tabla No. 3:

Comparación entre los resultados obtenidos sobre la contaminación microbiana en huevos con cáscara entera y con cáscara rota.*

	enteros	%	rotos	%
Total de huevos	385	-----	311	-----
Huevos contaminados	40	10.4	195	62.7
Recuento aerobico total	20	5.2	50	16.1
<u>Salmonella</u> sp.	0	0.0	0	0.0
Coliformes totales	40**	9.4	85**	27.3
Coliformes fecales	13	3.4	40	12.9
<u>E. coli</u>	1	0.3	3	0.96
Otros gram negativos	25	6.5	190	61.1

* = No se diferencian contaminaciones mixtas.

Anexo 13.1.4.

Tabla No. 4:

Resultados de las pruebas de z para proporciones de una cola.

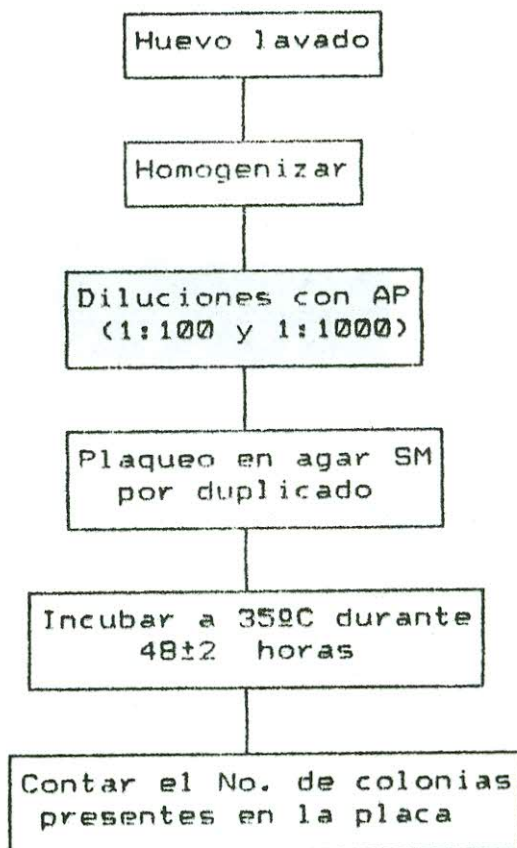
	z calculada	z teórica
Huevos contaminados	16.34*	1.645
Recuento aeróbico total	4.54*	1.645
<u>Salmonella</u> sp.	0	1.645
Coliformes totales	6.17*	1.645
Coliformes fecales	4.52*	1.645
<u>E. coli</u>	1.10*	1.645
Otras gram negativo	18.20*	1.645

* = $p < 0.05$

Anexo 13.2.1

Diagrama de flujo No. 1:

Esquema del Recuento Aeróbico Total:

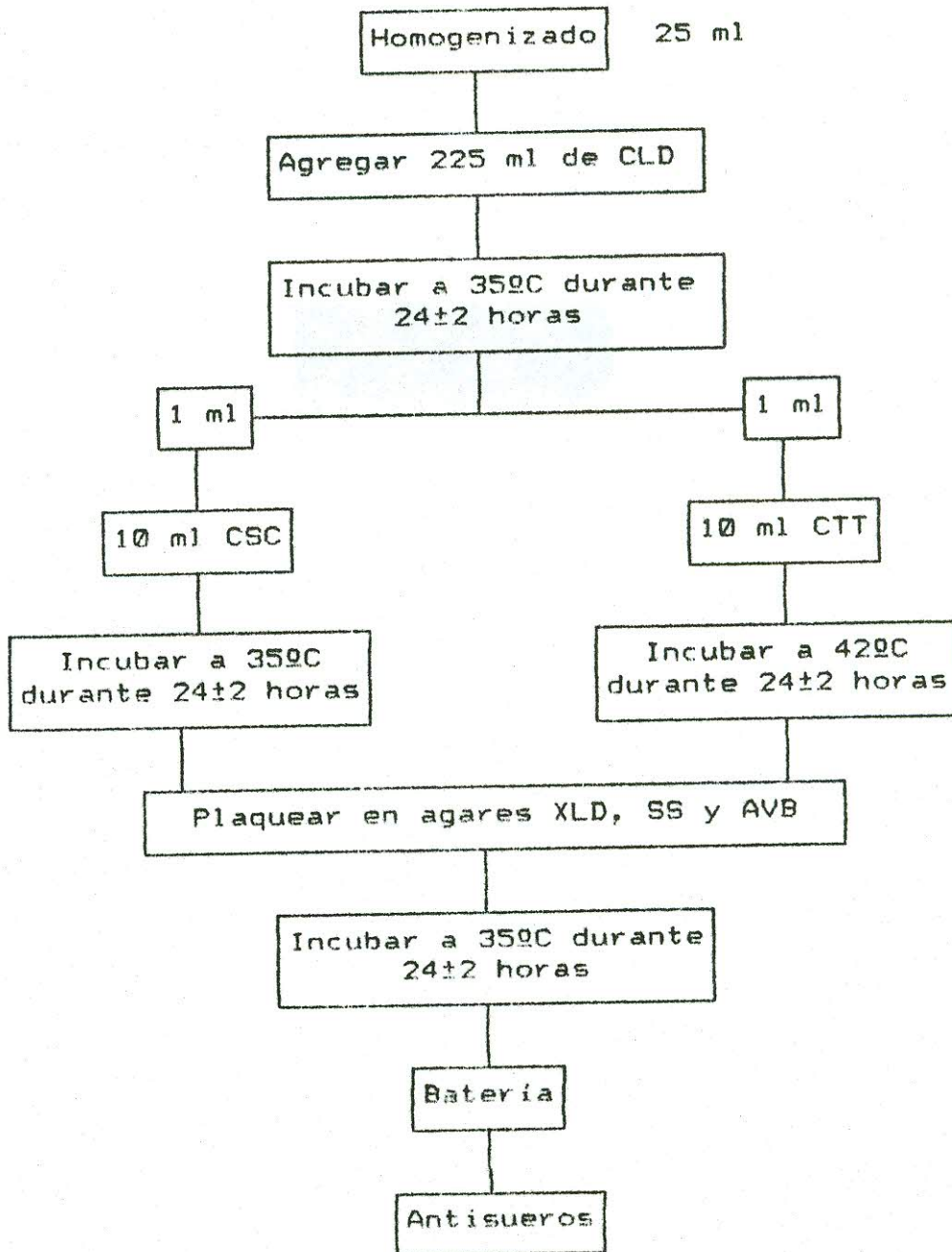


Tomado de Miranda T, 1991.

Anexo 13.2.2.

Diagrama de Flujo No. 2:

Marcha bacteriológica para la determinación de Salmonella sp.

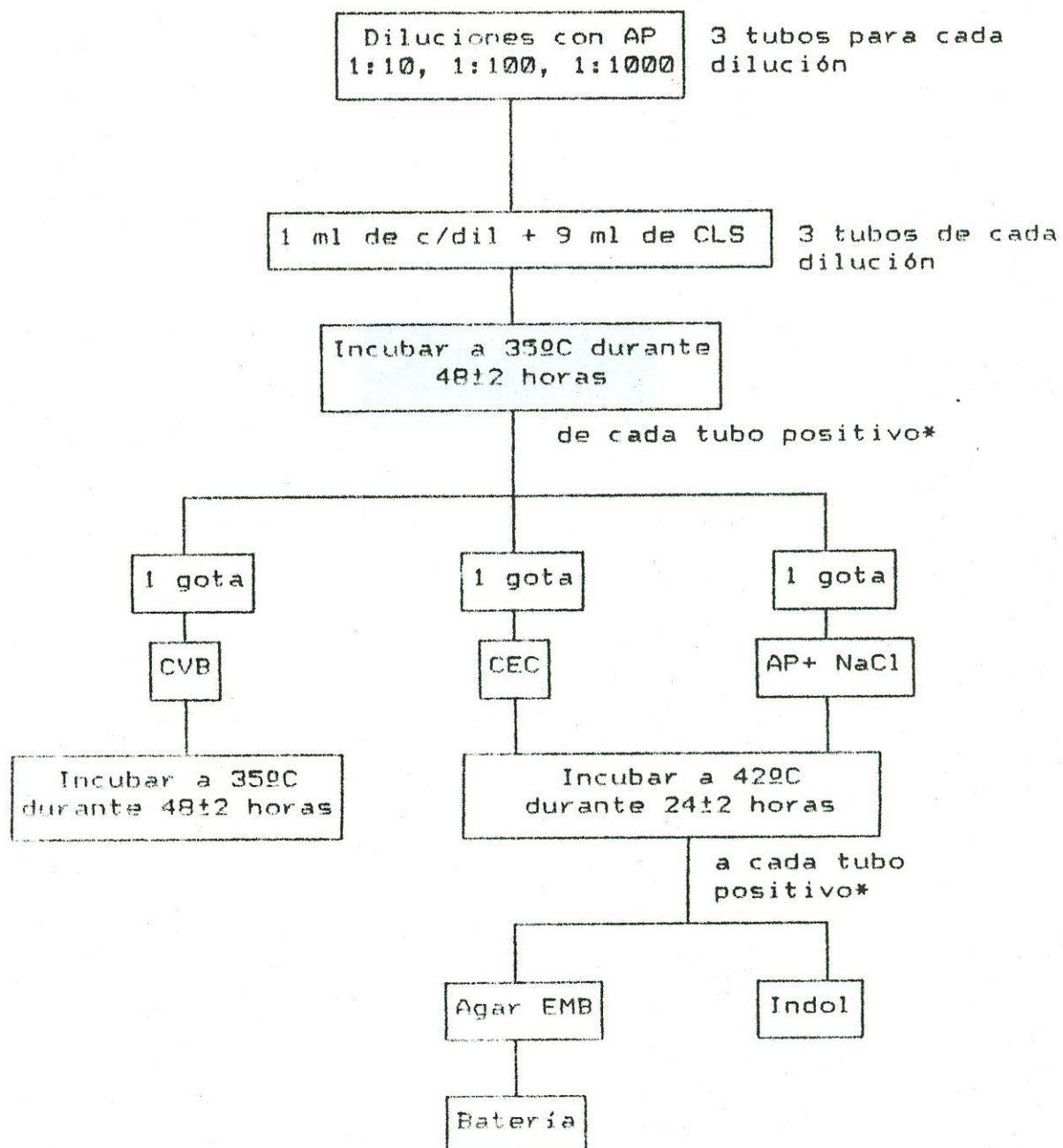


Tomado de Miranda T, 1991.

Anexo 13.2.3.


Diagrama de Flujo No. 3:

Marcha bacteriológica para la determinación de Coliformes.

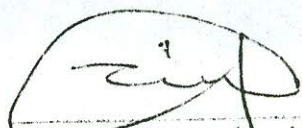



* = positivo al aparecer gas en la campanilla de Durham.

Tomado de Miranda T, 1991.


Xiomara Lizeth Arévalo Rosales.


Lic. Teresita Aguilar de Miranda.
Asesora.


Lic. Gerardo Arroyo.
Director.


Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar.
Decano.