

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

Determinación de *Salmonella* sp. en la parte interna y externa
de huevos de gallina procedentes de granjas reproductoras

Informe de Tesis

Presentado por

Lesbia Janette Galiano Gramajo

Previo a optar el título de

Química Bióloga

Guatemala, febrero de 2005

INDICE

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
IV.	Justificación	23
V.	Objetivos	24
VI.	Hipótesis	25
VII.	Materiales y Métodos	26
	A. Universo de trabajo	26
	B. Recursos Humanos	26
	C. Materiales	26
1.	Equipo, cristalería y materiales	26
2.	Reactivos	27
	D. Metodología	28
1.	Pre-enriquecimiento	28
2.	Enriquecimiento selectivo	28
3.	Aislamiento de la bacteria	28
4.	Identificación	29
	a. Pruebas Bioquímicas	29
	b. Test serológicos	30

E. Diseño Investigación	30
VIII. Resultados	32
IX. Discusión de resultados	34
X. Conclusiones	36
XI. Recomendaciones	37
XII. Referencias	38
XIII. Anexos	43

I. RESUMEN

La producción de huevos para consumo humano en Guatemala, puede provenir de dos fuentes: el 98% son provenientes de granjas especializadas para la producción de huevo comercial, el resto proviene de granjas reproductoras, los cuales son huevos no aptos para la incubación.

El acceso a granjas reproductoras en Guatemala, está muy restringido debido a las normas de bioseguridad que ellas tienen implementadas, en la producción de huevos aptos para la incubación, es por eso que según literatura revisada, éste es el primer estudio de esta naturaleza.

En la presente investigación se analizaron un total de treinta y seis muestras por el método microbiológico publicado en el Compendio de Métodos para Análisis de Alimentos (APHA).

Las muestras fueron obtenidas directamente de los nidos de seis granjas reproductoras pertenecientes a una empresa avícola nacional.

Todas las muestras presentaron ausencia de la bacteria *Salmonella* sp. relacionando estos resultados con las estrictas normas de bioseguridad y los estándares que deben de cumplir estas granjas para producir huevos aptos para la incubación.

Con respecto a la hipótesis planteada de que los huevos obtenidos de granjas reproductoras avícolas pueden estar contaminados tanto internamente como externamente por enterobacterias, de las cuales el 0.5% pertenece al género

Salmonella sp., se hubiese esperado que de los 360 huevos analizados, 2 huevos presentaran la bacteria *Salmonella* sp. lo cual refleja que si se cumplen las normas de bioseguridad para este tipo de granjas.

Otros estudios (13) reporta que los huevos a partir de lotes de aves contaminadas con la bacteria *Salmonella enteritidis* dieron cifras menores de 0.1% de muestras positivas para el análisis de esta bacteria, si se compara este estudio con el anterior mencionado se esperaría encontrar aproximadamente una muestra positiva, del total de las muestra analizadas.

Otro punto importante de mencionar es que según las normas del USDA (United State Departament of Agriculture) y los reglamentos de Mercosur, los huevos para el consumo humano no deben de presentar *Salmonella* sp. en 25 gramos de muestra analizada, por lo que en este estudio los resultados obtenidos llenarían los requerimientos, si los huevos fuesen consumidos por la población humana.

II. INTRODUCCION

Los huevos de gallina recién puestos no suelen estar contaminados, si bien algunos microorganismos pueden ganar acceso a éstos a través del oviducto. Los microorganismos presentes en el interior del huevo proceden principalmente del tracto intestinal de las aves, el ponedero, el polvo, las cajas de embalaje y del almacenamiento (1).

El huevo es uno de los alimentos de origen animal más apreciado por todos los países del mundo, es una fuente excelente de proteínas de alta calidad con todos los aminoácidos indispensables, contiene doce minerales y trece vitaminas (2).

Entre los microorganismos productores de infecciones alimentarias que pueden estar presentes en el huevo se encuentra *Salmonella* sp. y otras enterobacterias.

En los últimos años en algunos países se han incrementado los casos de infecciones alimentarias por el consumo de huevo contaminado con *Salmonella* sp. en España a partir de 1,978 se incrementaron las infecciones debidas a *Salmonella enteritidis* asociada con huevos o con productos elaborados a base de huevo como lo es la mayonesa. Entre 1,976-1,986 en los Estados Unidos, huevos de gallina infectados fueron responsables de varios informes de infecciones en el humano por *Salmonella enteritidis*, y en Inglaterra también han sido implicadas la *Salmonella enteritidis* PT4 y la *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium* en brotes por medio del huevo (3).

En la presente investigación se evaluó el grado de contaminación por la bacteria *Salmonella* sp. en huevos de gallina que no son utilizados para consumo

alimenticio, para el efecto se recolectaron un total de 360 huevos procedentes de granjas reproductoras de una empresa avícola nacional. La muestra de cada granja fue representativa a la producción del día y se tomó directamente de los ponederos de las granjas.

Las muestras recolectadas se analizaron en el Laboratorio de Control de Calidad de la Empresa Avícola, determinando la presencia de *Salmonella* sp. por medio de los métodos microbiológicos editados en el Compendio de Métodos para el Análisis Microbiológico de Alimentos (APHA) American Public Health Association y (BAM) Bacteriological Analytical Manual.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades:

La *Salmonella*, género de bacterias patógenas descubiertas por el veterinario americano Daniel Elmer Salmon en 1,885. La bacteria llega a los alimentos por contaminación del animal que produce el alimento, los alimentos más comunes comprometidos son: la carne, productos cárnicos como salchichas y carnes curadas, aves, huevos, leche y productos lácteos. Si los alimentos se cocinan de forma apropiada, la bacteria morirá y no habrá ningún problema, pero muchos de estos productos se comen sin cocinar o parcialmente cocinados. Se han analizado cepas de salmonela que ocasionan gastroenteritis transmitida por los alimentos en los productos hechos con huevos crudos como natillas, pasteles de crema, merengues, tarta y ponche de huevo. Los alimentos previamente cocinados que han sido calentados y conservados sin refrigeración, o los alimentos enlatados un tiempo después de abrir la lata, presentan el desarrollo de salmonela si han sido contaminados a través del manipuleo (1,2).

En la actualidad, en Estados Unidos, se reconocen tres especies: *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, el análisis antigénico de *Salmonella enteritidis* refleja más de 2,000 serotipos (2).

Prácticamente todas las especies de salmonela son patógenas para el hombre, *Salmonella typhi*, causa la enfermedad seria llamada fiebre tifoidea, otras especies causan gastroenteritis transmitida por los alimentos (2).

Salmonella enteritidis variedad *typhimurium*, produce gastroenteritis (salmonelosis), la cual es una intoxicación alimentaria que produce dolor

abdominal, fiebre, náuseas, vómitos y diarrea, éste es el único serotipo que por sí sólo es la causa más frecuente de gastroenteritis, bacteremia y portador asintomático de salmonela en todo el mundo (2,3).

Salmonella choleraesuis esta altamente adaptada al cerdo y puede producir también infección en el hombre, esta se presenta frecuentemente como una infección focal sin manifestaciones gastrointestinales obvias, en personas con anemia de células falciformes (2,3).

El período de incubación varía entre ocho y cuarenta y ocho horas, y la duración de los síntomas oscila entre tres y siete días. Durante los primeros siete a diez días de infección, los individuos se encuentran generalmente asintomáticos y los bacilos tifoideos desaparecen de las heces.

En la fiebre tifoidea grave hay cambios hiperplásicos de las placas de Peyer y de los folículos linfoides solitarios del ciego durante este período (3).

Se infectan también el hígado y el árbol biliar, lo que supone una reinvasión del tracto intestinal. En el abdomen se observa roséola (lesiones maculopapulares eritematosas de 2-4 mm) y se palpa esplenomegalia (abdomen tifoideo).

Las manifestaciones sistémicas de la fiebre tifoidea incluyen la infección purulenta y no purulenta de varios sistemas orgánicos. Las complicaciones más frecuentes son la hemorragia y la perforación intestinal, habitualmente el íleon.

La mejoría clínica de los enfermos no tratados comienza por lo general a la tercera semana tras la infección, lo que coincide con el desarrollo de la inmunidad humoral y especialmente de la inmunidad celular (3).

La fiebre tifoidea es una enfermedad grave. Cuando evoluciona sin tratamiento, se manifiesta con un período de unos treinta días de fiebre, durante el

cual muere alrededor de un 20% de los enfermos, otro 10% adicional sufre recaída de fiebre o de hemorragia intestinal o peritonitis. Afortunadamente, la fiebre tifoidea puede por lo general controlarse de forma eficaz por los antibióticos (3).

B. Tratamiento y prevención:

En la gastroenteritis no complicada por salmonela, como cualquier otra diarrea, se debe vigilar el equilibrio hidroelectrolítico del enfermo.

Los casos leves se tratan con dieta y limonada alcalina (preparado rehidratante y reponedor de las pérdidas de electrolitos); no se debe usar antidiarreicos porque pueden transformar al enfermo en portador crónico de salmonela (4).

Los casos graves deben hospitalizarse y tratarse con rehidratación intravenosa y con antibióticos, tales como ampicilina, gentamicina, trimethoprim/sulfametoxazole, o ciprofloxacina. El tratamiento antimicrobiano no reduce la duración ni la gravedad de los síntomas y, de hecho, puede prolongar la convalecencia y el estado de portador intestinal del microorganismo infectante (5). Para la prevención de estas infecciones se debe tomar en cuenta la higiene, la limpieza cuidadosa, el tiempo y la temperatura en la preparación culinaria de los alimentos (5).

C. Etiología:

Salmonella sp. es un microorganismo Gram negativo, bacilo no esporogénico serológicamente relacionado. Mide de 0.4-0.6 x 1.3 μm ., pero ocasionalmente forma filamentos cortos. Es normalmente móvil por flagelos

peritricos, pero variante no móvil con o sin flagelos podría ser encontrado bajo condiciones naturales (5).

D. Patogenicidad:

En el hombre se dan tres formas de salmonelosis clínicamente diferentes: fiebres entéricas, septicemias y gastroenteritis agudas.

El prototipo de la fiebre entérica es la producida por *Salmonella typhi*, contraída por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, suele empezar de modo insidioso, tras un período de incubación de siete a catorce días, con malestar, anorexia y cefalea, seguidas de fiebre, ésta última aumenta a menudo gradualmente y se acompaña de bradicardia relativa. Especialmente durante la primera semana, la postración puede ser importante, y aunque en general no hay diarrea, son frecuentes la distensión y el dolor abdominal sordo. Las propiedades patógenas de las salmonelas son debidas definitivamente a endotoxinas asociadas con la porción somática del organismo (antígeno O) (6).

Los estudios realizados con voluntarios demuestran que, para la producción de la enfermedad, es necesario ingerir de 100,000 bacilos. La enfermedad experimental humana ha resultado también útil para establecer el papel de la endotoxina en la patogenia del proceso (6).

Las fiebres entéricas producidas por otras salmonelas (fiebres paratifoideas) son generalmente menos graves, y poseen un período de incubación más corto (1 a 10 días). En las fases iniciales se produce una bacteremia, la fiebre dura de una a tres semanas y la manifestación de manchas rosadas es poco frecuente. Las fiebres entéricas pueden ser producidas por casi la totalidad de las salmonelas, pero los agentes más frecuentes reportados en Estados Unidos son: *S. paratyphi* B (*S.*

schottmulleri) y *S. typhimurium* (6). Casi la mitad de las personas infectadas continúan excretando salmonelas un mes después de la desaparición de los síntomas y una de cada veinte todavía lo hace hasta cinco meses después. Los individuos que continúan excretando el organismo después de un año se consideran portadores (3).

Más de un total de 18,000 hospitalizaciones y 500 muertes se relacionan cada año con esta enfermedad (3).

E. Epizootiología:

En los años 80, los funcionarios de la Salud en Europa y las Américas observaron un aumento considerable de la enfermedad producida por los alimentos humanos causada por *Salmonella enteritidis*, un patógeno encontrado en los canales del pollo, los huevos y los productos del huevo. Se ha sugerido que la aparición de *Salmonella enteritidis* como problema de salud pública puede ser el resultado del manejo no satisfactorio de prácticas de bioseguridad en la avicultura moderna, y de una declinación en la diversidad genética de las aves domésticas.

Pero ésta hipótesis no explica porqué el número de los seres humanos infectados con otros serotipos de salmonela, tales como *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium* no ha aumentado constantemente desde los años 60, mientras que la incidencia de la infección por *Salmonella enteritidis* se podría deber a la expansión clonal de un aislamiento muy virulento de *Salmonella enteritidis*. Sin embargo, la observación de los casos de salmonela en humanos en Europa y los Estados Unidos asociados a diversos aislamientos de *Salmonella enteritidis* no soporta esta noción (8,9).

La frecuencia de aislamiento de salmonela y el extremadamente amplio rango de especies de animales e insectos infectados por muchos trabajos en amplias

áreas separadas del mundo, sugieren que la paratifoidea no es discriminativa y sólo requiere el acceso del organismo.

Ratas y ratones son frecuentemente transportadores intestinales de organismos de la paratifoidea, particularmente *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium*. Cuando *Salmonella enteritidis* es encontrada en aves, es lógico sospechar de estos roedores como posibles fuentes de la infección. *Salmonella* sp. ha sido aislada de varios insectos incluyendo moscas, pulgas, escarabajos y cucarachas (9).

Es conocido que *Salmonella enteritidis* pueda ser transmitida a través del ciclo completo de vida de las moscas y que la infección puede continuar tan largo como cuatro semanas dentro de las moscas (9).

En los Estados Unidos aproximadamente 40,000 casos de salmonelosis son reportados anualmente al Centro para el Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, en un estimado de dos millones de casos, dos mil cursan con muerte. Las estadísticas del CDC desde 1,973 a 1,984, mostraron que el pollo estuvo implicado en solamente 5% de brotes de salmonelosis, carne de ternero estuvo en un 19%, cerdo 7%, productos lácteos 6% y pavos 9%. Hay varias revisiones de salmonelosis humana y la importancia de los animales (incluyendo las aves) como una fuente de infección. Reportes recientes de enfermedades en humanos causado por *Salmonella enteritidis* ha implicado a productos de huevo como un vehículo para *Salmonella* sp. (10).

El incremento mundial en los aislamientos de *Salmonella enteritidis* en humanos esta fuera de duda, los datos del seguimiento de la OMS para salmonela

durante el período de 1,979 a 1,987 así lo indican. Durante este período el incremento se produjo en 24/35 (69%) de los países activos (11).

Mientras que en 1,979 *Salmonella enteritidis* era el serotipo más aislado de 2/21 (10%) de los países, la cifra subió a 9/21 (43%) en 1,987. Así mismo, se constata una relación directa con el consumo de aves, huevos y sus derivados, aunque se desconocen las razones de esta pandemia (12).

La mayor importancia a los brotes de salmonela se atribuyen al uso de huevos y especialmente sus derivados. La incidencia de huevos contaminados con salmonela es muy baja. En estudios de huevos a partir de lotes de aves contaminados con *Salmonella enteritidis* dan cifras menores a 0.1%, y no sólo la incidencia de infección en el huevo es importante, sino también su localización (cascara o interior del huevo) (13).

Diversos estudios han demostrado que en general el número de bacterias presentes en el contenido del huevo es muy bajo, normalmente menor de veinte por huevo. Sin embargo, un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente permite su multiplicación hasta llegar a ser millares (14).

Un factor de máxima importancia en la incidencia de *Salmonella enteritidis* es su transmisión vertical, ya definida así en los estudios realizados en el marco del programa FLAIR-COST (14). La transmisión vertical normalmente implica la transmisión transovarica de un organismo, y este mecanismo existe para *Salmonella enteritidis*. El organismo es invasivo y puede localizarse en el ovario de las aves (14, 15).

En 1,991, el Ministerio de Sanidad y consumo español publicó unas pautas sobre salmonelosis y huevos, recomendando el uso de huevos pasteurizados en la

elaboración de alimentos. También se han publicado pautas sobre higiene de alimentos para la población general (16, 17).

F. El huevo como vehículo de *Salmonella* sp.

La contaminación fecal del huevo durante la postura, nidos contaminados, pisos o manos de los trabajadores son la principal fuente de difusión de la enfermedad. Portadores intestinales del microorganismo son comunes. Schalm demostró que *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium* en materia fecal presente en la superficie de huevos fue capaz de penetrar el cascarón y multiplicarse dentro del huevo. Siendo la cáscara una de las partes más importantes del huevo, pues actúa como barrera física que aísla el contenido del huevo de los agentes externos que puedan provocar su deterioro, es rica en minerales, calcio, magnesio y fósforo, contiene numerosos poros con forma de embudo (7,000 – 17,000/huevo), a través de los cuales se produce un intercambio de gases entre el ambiente y el huevo (17).

Durante el almacenamiento, y debido a la pérdida de agua y dióxido de carbono a través de los poros de la cáscara, la clara pierde la estructura de gel que la caracteriza, y con éste, uno de los atributos de calidad del huevo, esto es, la consistencia o viscosidad de la clara. Como consecuencia, la yema que está habitualmente centrada en el huevo, asciende, se aplana y la membrana que la envuelve se rompe con facilidad, generando el llamado sabor viejo. Cuanto más baja es la temperatura de almacenamiento, menores son las pérdidas de agua y CO₂, por lo que la calidad del huevo se mantiene durante más tiempo. De ahí que el almacenamiento deba realizarse entre 0 – 1.5 °C y con una humedad relativa del 85-

90%. En estas condiciones pueden conservarse de seis a nueve meses, con unas pérdidas mínimas de peso (3 – 6.5 %) (18).

Desde el punto de vista microbiológico, es importante tener en cuenta que la mayor parte de los huevos recién puestos son estériles, al menos interiormente. Sin embargo, la cáscara se contamina rápidamente con la materia fecal, con los nidales, el agua del lavado (en caso de que se sometan a esta operación) y hasta con el material con el que se manipulan y transportan (18).

Los ovoproductos tienen una serie de peligros de contaminación añadidos: la mezcla de un huevo contaminado con millares de huevos sanos, insuficiente limpieza y desinfección del material, manipuladores portadores de organismos y el retraso en la protección de extremar las precauciones (19).

En términos generales, los microorganismos llegan al interior del huevo a través de los poros de la cáscara, sobre todo cuando las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el almacenamiento son elevadas, y pueden producirse alteraciones que constituyen, en la mayoría de los casos, un riesgo sanitario (18).

El tiempo preciso para que las bacterias penetren a través de la membrana varía con la temperatura y el tipo de microorganismo, pero puede prolongarse durante varias semanas cuando está a temperatura de refrigeración. Por ello, los huevos destinados a un consumo directo deben almacenarse a temperaturas próximas a los 0 °C (18,20).

Por otro lado, los microorganismos que están en la cáscara acceden a la yema o a la clara de forma inevitable en el momento del rompimiento previo a su utilización y consumo. Por ello, es muy importante mantener la superficie del huevo

lo más limpia posible mediante limpiezas en seco por ejemplo, con corrientes de arena que desprendan la suciedad. También es efectivo el lavado y desinfección en máquinas con detergentes, desinfectantes o mezclas de ellos a temperaturas que varían entre los 35 – 60 °C. A veces, se realiza un recubrimiento del huevo con aceite o parafina para crear una cubierta que impida el paso de los microorganismos a través de los poros. Varios trabajos han concluido que la contaminación del cascarón del huevo con subsecuente penetración puede estar involucrada en la transmisión de salmonela (18).

Los organismos que han logrado entrar al huevo son capaces de multiplicarse rápidamente en la yema y subsecuentemente infectar el embrión en desarrollo, el cual puede morir o nacer y servir de fuente de infección para otras aves jóvenes. La albúmina de huevo tiene muy poco efecto inhibitorio de *Salmonella* sp. cuando ésta penetra en el cascarón. Estos estudios experimentales de penetración de salmonela en huevos fue presentado por Williams et al. en 1,985 (20).

El mito de la peligrosidad del huevo como vehículo de salmonela nace de la posibilidad de transmisión vertical a través del ovario y esto es falso a la luz del conocimiento actual.

De hecho en los huevos en que se encuentra la salmonela, esta localizada en la parte inferior de la cascara y membranas envolventes internas, muy pocas veces en la clara y excepcionalmente en la yema, lo que revela una contaminación externa (21).

Teniendo en cuenta que el verano es una época especialmente peligrosa, el instituto de estudios del huevo recuerda una serie de normas de especial interés para el consumidor (22):

- a. Comprar siempre huevos con la cáscara intacta y limpia.
- b. Respetar la fecha de consumo que esta impresa en el empaque del huevo (23).
- c. No lavar los huevos antes de meterlos al refrigerador para su conservación.
- d. Preparar y conservar la mayonesa con la máxima higiene, cualquier mayonesa casera o industrial debe mantenerse en el refrigerador una vez iniciado su consumo (24).
- e. No separar la clara de las yemas con la propia cáscara del huevo (25).
- f. No dejar los huevos, ni los alimentos que los contengan, más de dos horas a temperatura ambiente (26).
- g. Conservar siempre en el refrigerador los pasteles, natillas, salsas, etc. Y consumirlos en las 24 horas siguientes a su elaboración (27).

G. Hallazgos asociados al huevo:

Gordon y Tucker encontraron *Salmonella enteritidis* variedad *menston* en el cascarón, membranas, albúmina y yemas de huevos de pollas alimentadas con el microorganismo (28).

Williams et al. encontraron que *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium*. penetró todas las estructuras de huevos de pollo después de seis minutos de incubación a 37.2 °C.

Defectos en la estructura del cascarón, incluyendo rupturas, grosor del cascarón y la humedad facilitan que *Salmonella* sp. penetre dentro del huevo (28).

Los huevos de pollo fueron más resistentes a la penetración por el cascarón de *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium* cuando tomó su lugar el desarrollo embrionario (27,28).

Gauger y Graves recuperaron *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium* de cascarón y de contenido de huevo de pavos infectados experimentalmente. La penetración en huevos de pavo puede ocurrir dentro de pocas horas y continuar por días. Williams y Dillard demostraron que cascarones de huevo de pavo sin pigmentación tuvieron más aberturas y fueron más delgados que huevos manchados y fueron más probables de ser penetrados por *Salmonella enteritidis* variedad *typhimurium* (28).

Simmons et al. reportaron que la *Salmonella* sp. sobrevive mejor en la superficie de huevos a bajas temperaturas, pero la penetración del cascarón es menor. Una humedad relativa alta contribuye al crecimiento de microorganismos en el cascarón. Sauter y Peterson reportaron progresiva penetración de *Salmonella* sp. en huevos con deficiente calidad de cascarón (28).

Salmonella enteritidis presenta diferencias en la penetración del huevo, sobrevivencia en la albúmina y migración de la albúmina a yema (28).

H. Factores Epidemiológicos:

Durante los últimos años, los estudios epidemiológicos de salmonelosis han empleado no solamente serotipificación, sino también susceptibilidad a los antibióticos (28).

La Salmonelosis es una zoonosis de importancia económica a nivel mundial; ha tenido una repercusión económica dentro de la avicultura desde principios de la década de 1,950; ha causado pérdidas a la industria del pavo, pollo de engorde y huevo, ya que da lugar a brotes de alta morbilidad y mortalidad, provocando además productos finales contaminados capaces de producir salmonelosis en los seres humanos (28).

En México, existe una campaña de control y erradicación de la salmonelosis aviar a cargo de la Dirección General de Salud Animal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural; es importante mencionar esto debido a que los alimentos contaminados ingeridos por las aves, pueden dar lugar a brotes en reproductoras, ocasionando graves pérdidas económicas a la avicultura (29).

Se estima que la fuente principal de las salmonelosis humanas son los alimentos de origen animal, y en particular la carne de aves de corral y los productos sin pasteurizar preparados a partir de huevos. Las salmonelas no suelen modificar el olor o el aspecto de los huevos, por lo que un huevo que contenga millones de salmonelas puede pasar la inspección y contaminar un lote entero de huevos licuados (30).

En Canadá se demostró que la difusión de la salmonelosis registrada en 1,960 se debía a los huevos tratados, en esas fechas se reportaron importantes brotes de toxi-infecciones y en 1,962 se promulgó una reglamentación que prohibía la venta de huevo tratado por contaminación con salmonela (31).

En 1,963 se publicaron varios brotes de intoxicaciones alimentarias en Gran Bretaña, atribuibles a productos líquidos y congelados a partir de huevos, por lo

que en ese año se introdujeron reglamentos que obligan a la pasteurización de huevos líquidos que vayan a ser usados para consumo humano (32).

En Argentina y Uruguay en el último cuarto de siglo se han registrado veintidos grandes epidemias de salmonelosis humana de origen alimentario y solamente en dos casos se estimó el origen del contagio a través del huevo, siendo un vehículo de infección competitivamente más frecuente, por ejemplo la leche natural y sus derivados (33).

En los Estados Unidos, la pasteurización se hizo obligatoria a principios de 1,966 pero su control no fue eficaz hasta 1,971 (34).

La Comisión del Codex Alimentarius de la Organización Internacional para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1,976 recomendaron buenas prácticas operativas y requisitos de producción para los productores de huevos y señalaron que el huevo entero líquido crudo, se pasteurice por un procedimiento aprobado de exposición térmica a una temperatura suficientemente elevada y durante un tiempo prolongado para asegurar la destrucción de salmonelas.

Las fallas de éste proceso podrían determinar la supervivencia de las salmonelas y de otros microorganismos en los alimentos (34).

En México el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios y la Norma Oficial Mexicana para huevo entero líquido, refrigerado o congelado (SECOFI, 1,979 y SSA, 1,980), establecen las especificaciones y condiciones sanitarias que deben guardar los derivados del huevo y exigen la pasteurización de éstos (34).

En los Estados Unidos de América, el año de 1,990 se realizó un estudio de tres brotes de *Salmonella enteritidis* ocurridos en humanos y los relacionaron con la ingestión de clara de huevo contaminada. Se estimó que el 0.1% de las claras de huevo contenían *Salmonella enteritidis*, por consiguientes las comidas que contienen huevos crudos o deficientemente cocinados poseen el riesgo de infección por esta bacteria (35).

I. Métodos de Conservación

En la mayoría de las empresas avícolas se tiene un alto grado de adelanto en lo que se refiere a técnicas de producción y uno de los retos más grandes que actualmente están enfrentando, es la integración hacia la comercialización incluyendo el empaque, la calidad, la distribución y la industrialización (35).

El acelerado estilo de vida del consumidor actual consciente de su salud, ejerce influencia sobre la forma que se comercializan los huevos. Una gran variedad de huevo líquido refrigerado, congelado y deshidratado, así como otros productos a base de huevo, se encuentran disponibles para el consumidor (35).

El huevo tiene una estructura biológica que hace difícil su contaminación y la penetración de bacterias desde el exterior, no es fácil mientras conserve la película de mucina superficial que lo recubre, la membrana interna íntegra y las propiedades bacteriolíticas de la clara. Ambas defensas desaparecen en 48 horas y la cáscara se hace permeable especialmente en condiciones de temperatura y humedad elevadas (36).

El Centro de Control de las Enfermedades sugiere precaución sobre el consumo de huevos y recomienda que se deben hervir por lo menos seis a siete minutos antes de servirse (37).

Entre los métodos de conservación de los derivados del huevo se encuentran los procesos térmicos como: la pasteurización, la refrigeración y la congelación (37).

Entre las consideraciones generales en cada etapa del ciclo de producción y cadena alimenticia del huevo y sus derivados, están (38):

- a. El control de la contaminación biológica, química y física en el huevo y sus derivados, deberá de acompañarse de acciones correctivas en caso de que ocurra una contaminación potencial (38).
- b. Para reducir los riesgos de contaminación en el huevo y sus derivados, los productores industriales deberán de implementar buenas prácticas de higiene y sanidad en las áreas que requieran dicho control (38).
- c. Todo aquello que este en contacto con los productos tiene el potencial de contaminarlo (38).
- d. La mayor fuente de contaminación con microorganismos patógenos está asociada con heces de humanos, animales, operadores enfermos o con malos hábitos de higiene personal que manipulan el huevo o sus derivados (39).
- e. Cualquiera que sea la fuente de abastecimiento de agua, deberá de analizarse a fin de garantizar una calidad adecuada de tal forma que no existan riesgos por contaminación en los procesos correspondientes (39).
- f. Es importante entender y seguir las leyes locales, estatales y federales relativas a las prácticas pecuarias en las unidades avícolas y aquellas relacionadas con el manejo higiénico del huevo y sus derivados (39).

- g. Establecer un sistema de responsabilidades en todos los niveles del entorno industrial: instalaciones, plantas procesadoras como pasteurizadoras de huevo entero, líquido, pasteurizado, congelado, yema líquida o clara líquida y productos a base de huevos deshidratados (39).
- h. Un exitoso programa de inocuidad y calidad del huevo y sus derivados deberá incluir personal calificado, vigilancia frecuente, eficaz y el adecuado mantenimiento de todos los elementos del programa para que funcione correctamente (40).

De las ocho consideraciones generales mencionadas anteriormente se generan metas que deben lograrse para garantizar la inocuidad y calidad del huevo y sus derivados, las cuales se mencionan a continuación (40):

- Determinar los riesgos de los peligros biológicos, químicos y físicos, asociados con cada etapa de la cadena alimentaria y recomendar buenas prácticas de higiene y sanidad con bases científicas para reducir la contaminación en el huevo y sus derivados para consumo humano (41).
- Proponer medidas preventivas específicas para evitar, eliminar o minimizar los riesgos evaluados (41).
- Fortalecer el Control de Puntos Críticos (HACCP) mediante Procedimientos de operación estandarizados de sanitización (PEOS) (41).
- Promover la formación de recursos humanos, la capacitación y actualización de profesionales ejerciendo dentro del sistema de la producción y comercialización del huevo (40, 41).

- Realizar análisis periódicos con el propósito de hacer interpretaciones epidemiológicas en las diferentes regiones del país y tomar las acciones preventivas y correctivas a corto, mediano y largo plazo (40, 41).

J. Métodos de Muestreo:

Durante la extracción, preparación, almacenaje y manejo de las muestras se deben observar las precauciones siguientes (42):

- Las muestras deben tomarse en un lugar protegido y no expuesto a la lluvia, al aire húmedo, al polvo y al hollín (42).
- Proteger el producto que se está muestreando y los recipientes para guardar las muestras contra cualquier contaminación (43).
- Las muestras se deben colocar en recipientes de un material inerte, limpios, inodoros y secos, los cuales deben ser apropiados al tamaño de la muestra (44).
- Cada recipiente se debe cerrar bien después de llenado y luego debe rotularse con información completa sobre la muestra y el muestreo, debiendo incluir lo siguiente: fecha y lugar de muestreo, número de código o lote de producción, lugar de producción, nombre de la empresa y de la persona que efectúa el muestreo y cualquier otra información importante (45).
- Las muestras deben almacenarse protegidas de la luz a manera que su temperatura no varíe considerablemente con respecto a la temperatura del ambiente en donde fue tomada (46).

- Las muestras deberán procesarse por el organismo competente en un tiempo no mayor de 48 horas, después de su recolección (47).

K. Métodos de Prevención:

- Lavarse las manos antes, durante y después de preparar alimentos (48).
- Cocinar muy bien los alimentos de origen animal, especialmente pollo, carne y huevos (49).
- Después de preparar carne cruda, lave y enjuague muy bien los utensilios, ollas y tableros (50).
- No ingerir huevos crudos o medio cocidos, como el rompopo o el helado hecho en casa (51).
- Mantener las comidas a temperaturas apropiadas en el refrigerador (51).

12. Normas de Bioseguridad en una Empresa Avícola:

- Cerco perimetral
- Pediluvios para el ingreso de vehículos
- Baños con duchas provistas de agua caliente y ropa limpia y desinfectada para el personal.
- Integridad en paredes, techos, cortinas, etc.
- Laboratorio o lugar para el almacenamiento y preparación de vacunas.
- Cámara o depósito de huevos.
- Incinerador u horno o fosa para eliminación de aves muertas, descartes de huevos, cáscaras, etc.
- Ausencia de otras aves o animales dentro de las granjas.
- Circulación en la planta en un solo sentido.

- No exponer a las aves ni los huevos al contacto de heces, plumas, polvo y residuos orgánicos.
- “Zona Clara”, libre de vegetación alrededor de las granjas.
- Usar un calzado diferente para visitar cada galera.
- Desinfectar diariamente los bebederos y comederos.
- Eliminar a las aves muertas rápidamente de la granja, quemándolas o enterrándolas con cal viva.
- Un libro para control sanitario.
- Un profesional veterinario a cargo, como responsable sanitario de la planta. (57).

IV. JUSTIFICACION

Por ser la *Salmonella* sp. una bacteria causante de intoxicaciones producidas al ingerir huevos contaminados con ésta, se consideró importante efectuar el presente estudio, que brindará información actualizada, la cual servirá de apoyo a programas de control microbiológico en empresas avícolas minimizando así pérdidas producidas por este tipo de contaminación.

Esta investigación es de utilidad para los consumidores finales de huevos y productos a base de ellos, para tomar las prevenciones necesarias en la manipulación y preparación de los mismos, evitando de ésta forma infecciones graves o bien que sean portadores crónicos de la bacteria *Salmonella* sp.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL:

Determinar la presencia de la bacteria *Salmonella* sp. en la parte interna y externa de huevos de gallina.

B. ESPECIFICO:

Proporcionar información a las empresas reproductoras avícolas del país para manejar programas efectivos en el control microbiológico periódico de su producción.

VI. HIPOTESIS

Los huevos obtenidos en las granjas reproductoras avícolas pueden estar contaminados tanto interna como externamente por enterobacterias, de las cuales un 0.5 % pertenecen al género de la bacteria *Salmonella* sp.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo:

Universo: Huevos de las granjas reproductoras.

Muestra: Se recolectó un total de 360 huevos de 6 granjas reproductoras con seis galeras cada una, de una empresa avícola nacional, estas serán representativas del total de huevos producidos al día, el total de muestras que se analizaron fue de 72. Los huevos serán analizados por el método publicado en el libro Compendio de Métodos para el Análisis Microbiológico de Alimentos (APHA) (52).

B. Recursos Humanos:

Tesista: Br. Lesbia Janette Galiano Gramajo

Asesor: Licda. Franco

Colaboradores: Técnicos del área de Microbiología

C. Materiales:

1. Equipo, Cristalería y Materiales:

- Incubadora
- Licuadora Waring
- Autoclave
- Refrigeradora
- Balanza analítica digital
- Baño María

- Vortex
- Termómetro
- Mechero de Bunsen
- Cajas de Petri desechables
- Frascos de vidrio de boca ancha con tapadera
- Gradilla para tubos de ensayo
- Tubos de ensayo de 20 x 150
- Pipetas volumétricas de 1 mL. y 10 mL.
- Asas bacteriológicas de 3 mm. de diámetro
- Láminas portaobjetos
- Pinzas
- Tijeras

2. Reactivos

- Caldo lactosado estéril
- NaOH 1N
- HCl 1N
- Caldo Selenito
- Caldo de Tetrionato Verde Brillante
- Agar Bismuto Sulfito
- Agar Hecktoen
- Agar XLD
- Agar TSI
- Agar LIA

- Urea
- Agar MIO
- Tiras para Api 20-E
- Antisuero polivalente somático para *Salmonella* sp (52, 53).

D. Metodología:

1. Pre-enriquecimiento

- a. Llevar la muestra a temperatura ambiente, si la muestra esta congelada.
- b. Pese asépticamente 25 g. de muestra en un contenedor estéril.
- c. Agregue 225 mL. de caldo lactosado estéril y licúe por dos minutos.
- d. Transfiera el licuado asépticamente a otro contenedor estéril de boca ancha.
- e. Deje reposar a temperatura ambiente por 60 minutos.
- f. Mezcle y determine el pH si es necesario y ajústelo a pH 6.6-7.0 con NaOH ó HCl 1N.
- g. Cierre la tapa faltando un cuarto para llenar completamente, incube a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 horas.

2. Enriquecimiento Selectivo:

- a. Transfiera 1 mL. de caldo lactosado a un tubo con 10 mL. de caldo selenito.
- b. Transfiera 1 mL. de caldo lactosado a un tubo con 10 mL. de caldo de tetracionato verde brillante.
- c. Incube los tubos a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 horas.

d. Retire los tubos de los pasos de incubación y agítelos con movimiento vortex (53).

3. Aislamiento:

a. Con un asa de 3 mm de diámetro raye cajas con Agar Bismuto Sulfito, Hecktoen y XLD de los tubos de caldo Selenito y Tetracionato.

b. Incube las placas del paso anterior a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 horas (52, 53).

c. Examine las placas, las colonias sospechosas para *Salmonella* sp. presentan las siguientes características:

- Agar Bismuto Sulfito:

Las colonias típicas de *Salmonella* sp. son negras con o sin brillo metálico, al rededor de la colonia se forma un halo café o negro.

- Agar Hecktoen:

Las colonias típicas de *Salmonella* sp. son azul-verdosas con o sin puntos negros en el centro, las cepas con fuerte producción de H₂S pueden aparecer completamente negras (41).

- Agar XLD:

Las colonias típicas de *Salmonella* sp. son rosadas con o sin puntos negros, las cepas con fuerte producción de H₂S pueden aparecer completamente negras.

4. Identificación:

Pique las colonias características para *Salmonella* sp. de los agares selectivos y proceda a las siguientes pruebas:

- a. Pruebas Bioquímicas:
 - i. Inocule dos o más colonias sospechosas de las placas de los agares selectivos en TSI, LIA, UREA e INDOL.
 - ii. Incube los tubos del paso anterior a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 horas.
 - Las reacciones típicas de *Salmonella* sp. en TSI son alcalino/ácido, con o sin producción de gas, algunas colonias lactosa positiva pueden producir reacciones atípicas.
 - La reacción típica de *Salmonella* sp. en LIA es alcalino/alcalino con producción de gas.
 - La reacción típica de *Salmonella* sp. para UREA es negativa.
 - La reacción típica de *Salmonella* sp. para INDOL es negativa, pero algunas salmonelas pueden dar reacciones positivas (53).
 - iii. El API 20E bioMerieux puede ser utilizado para la identificación de cepas de *Salmonella* sp. (54).
- b. Test Serológicos:
 - i. En un portaobjetos con un lápiz de cera marque dos círculos de 2 cm cada uno.
 - ii. Tome una asada del cultivo de TSI y colóquelo en uno de los círculos.
 - iii. En el otro círculo coloque una gota de solución salina estéril (control negativo).
 - iv. Agregue una gota del antisuero polivalente somático (o) salmonela a los dos círculos.
 - iv. Emulsifique con un asa estéril los dos círculos independientemente.

v. La formación de grumos (aglutinación) en el círculo donde esta la muestra indica que la reacción es positiva (54, 55).

E. Diseño Investigación:

1. Muestreo por conveniencia.
2. Diseño de muestreo: 360 huevos seleccionados al azar de 6 granjas, tomando 10 huevos por galera y cada granja consta de 6 galeras. Se analizó la parte interna y externa de los huevos.

6 muestras x 2 (parte interna, externa) = 12 muestras por granja.

3. Análisis Descriptivo

- Se reportó ausencia o presencia de la bacteria en 25 gr. de muestra en la parte interna.
- Se reportó ausencia o presencia de la bacteria en 25 mL. del lavado de la parte externa.
- Se presentó en una tabla los resultados obtenidos en el estudio.

VIII. RESULTADOS

Se hizo un muestreo de 360 huevos, analizándose todos en su parte interna y externa para establecer la presencia de la bacteria patógena *Salmonella* sp. Se formaron seis grupos de diez huevos por cada granja para efectuar dicho análisis, haciendo un total de 72 análisis (36 parte interna y 36 parte externa).

Para que el estudio fuese representativo se tomaron muestras de 6 granjas reproductoras, de ubicación territorial diferente de una empresa avícola nacional, de cada granja se muestrearon 6 galeras diferentes, empleando la metodología para muestreo y análisis descrita en la sección IV. Materiales y Métodos.

De las 72 muestras analizadas no se aisló la bacteria *Salmonella* sp. eso significa que el 100% de las muestras analizadas fueron negativas.

De los resultados obtenidos podemos comprobar que las normas de bioseguridad implementadas en este tipo de granjas destinadas para producir huevos aptos para la incubación, son efectivas, asegurando así la calidad de la producción de huevos. En la tabla No. 1 se pueden observar los resultados obtenidos.

TABLA No. 1 RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANALISIS PARA LA BACTERIA *Salmonella* sp. EN HUEVOS DE SEIS GRANJAS REPRODUCTORAS DIFERENTES DE UNA EMPRESA AVICOLA NACIONAL

GRANJA REPRODUCTORA	RESULTADO DEL ANALISIS PARTE INTERNA 25 GRAMOS DE MUESTRA	RESULTADO DEL ANALISIS PARTE EXTERNA 25 ML. DE MUESTRA
1	AUSENTE	AUSENTE
2	AUSENTE	AUSENTE
3	AUSENTE	AUSENTE
4	AUSENTE	AUSENTE
5	AUSENTE	AUSENTE
6	AUSENTE	AUSENTE

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

El propósito de esta investigación fue determinar si la bacteria *Salmonella* sp. esta presente en huevos procedentes de granjas reproductoras avícolas nacionales.

Las muestras analizadas fueron representativas de seis granjas reproductoras diferentes, se analizaron un total de 360 huevos, tomándose cada uno directamente de los ponederos de las granjas.

El resultado obtenido fue ausencia de la bacteria *Salmonella* sp. en todas las muestras analizadas, con esto se comprueba que la incidencia de huevos contaminados con *Salmonella* sp. es muy baja, los estudios de huevos a partir de lotes de aves contaminadas dan cifras menores de 0.1 % de muestras positivas para dicha bacteria (13).

Diversos estudios han demostrado que en general el número de bacterias presentes en los huevos es muy bajo, sin embargo, un almacenamiento prolongado a temperatura ambiente permite la multiplicación de bacterias hasta conformar millares de las mismas (14).

Desde el punto de vista microbiológico, es importante tener en cuenta que la mayor parte de los huevos recién puestos son estériles, al menos interiormente, sin embargo la cáscara se contamina rápidamente con materias fecales, en los nidos, manipulación, transporte y una serie de peligros añadidos (18).

Por lo anterior, las granjas reproductoras toman medidas de bioseguridad, para evitar todos éstos inconvenientes que puedan interferir en la contaminación de los huevos.

Otro punto importante publicado en este tipo de estudios fue que los huevos que son destinados para incubación, para desarrollo embrionario, tal es el caso, son más resistentes a la penetración por el cascarón de *Salmonella enteritidis*, si está presente en el ambiente (27).

Este es el primer estudio, de esta naturaleza realizado en granjas reproductoras de huevos, destinados para la incubación, por lo anterior no da plena seguridad de que los resultados se mantengan siempre negativos, siendo necesario realizar periódicamente más análisis de este tipo, para poder tener registros y aplicar estadística que refleje la incidencia de esta bacteria en determinada región.

X. CONCLUSIONES

- A. Los huevos producidos en granjas reproductoras con normas de bioseguridad presentan ausencia de la bacteria *Salmonella* sp.
- B. Los resultados negativos reflejan el cumplimiento de las normas de bioseguridad que se emplean en granjas reproductoras en contraposición con las granjas específicas para producir huevo comercial.
- C. Los huevos de granjas reproductoras cumplen con las especificaciones del USDA y el Mercosur para los huevos de consumo humano, las cuales especifican que debe haber ausencia de la bacteria *Salmonella* sp.

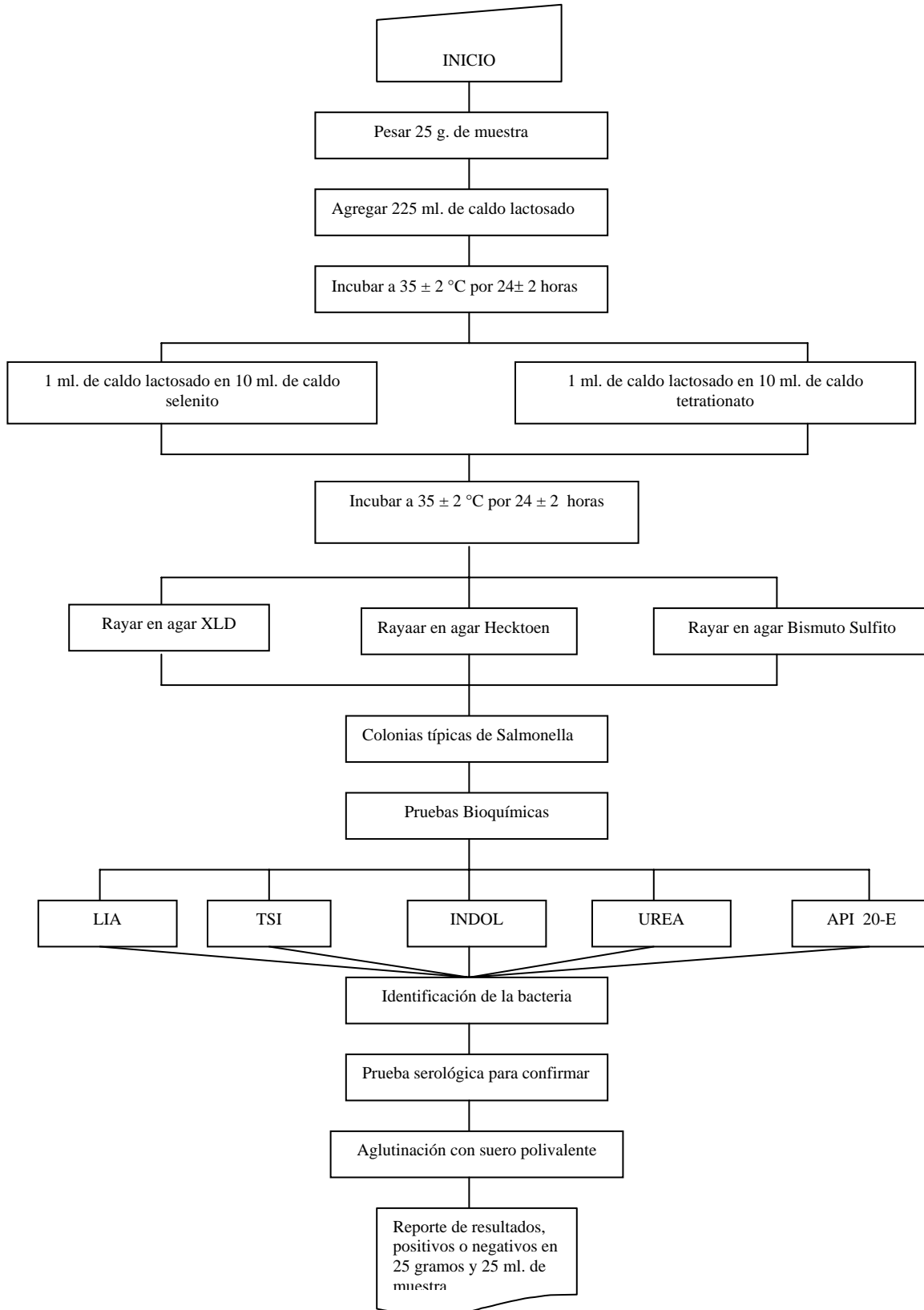
XI. RECOMENDACIONES

- A. Continuar haciendo este tipo de investigaciones, enfocadas a granjas avícolas dedicadas exclusivamente a la producción comercial de huevos, ya que este tipo de granjas abarca el más alto porcentaje en la producción para consumo humano.
- B. Realizar periódicamente más análisis de este tipo con el propósito de hacer interpretaciones epidemiológicas en las diferentes regiones del país.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1

DIAGRAMA DE FLUJO PARA ANALISIS



ANEXO 2
VALORES ACEPTADOS PARA LOS
PRODUCTOS DE HUEVO

Datos obtenidos de:

USDA (United States Department of Agriculture)

Todos los productos del huevo líquido, refrigerado o deshidratado, deben presentar las siguientes especificaciones:

Microorganismos

Conteo de placas aerobicas	<25,000 por gramo
Grupo de Coliformes	<10 por gramo
Hongos y levaduras	<10 por gramo
<i>Salmonella</i> sp	Ausente

Datos obtenidos de:

Reglamentos para Mercosur (Mercado Común del Sur)

Alimentos Microorganismos Tolerancia

Huevo íntegro crudo	<i>Salmonella</i> sp/25 g	Negativo
Yema, clara o mezclas pasteurizadas, refrigeradas o congeladas, con azúcar, sal y otros aditivos	Coliformes Estafilococos coag. Positivo/ml <i>Salmonella</i> sp/ml	<1 10 Ausente