



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROYECTO DE TESIS

TEMA:

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS DE GALLINA DE TRASPATIO COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE LOJA”

TESIS DE GRADO PREVIA A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

AUTOR:

César Armando Chumbi Zumba

DIRECTOR:

Dr. Galo Vinicio Escudero Sánchez Mg Sc.

LOJA – ECUADOR

2017

CERTIFICACIÓN

Loja, 05 Enero de 2017

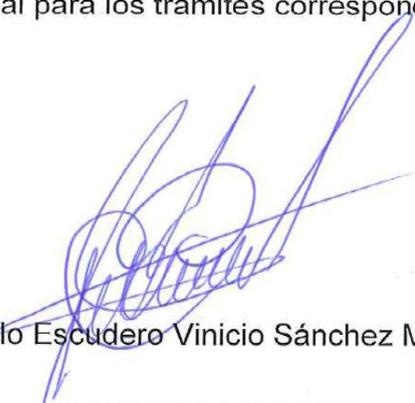
Dr. Galo Escudero Vinicio Sánchez Mg. Sc

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación "**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS DE GALLINA DE TRASPATIO COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE LOJA**", realizado por el egresado César Armando Chumbi Zumba, previo a la obtención del título de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**, ha sido minuciosamente revisado, por lo tanto, se autoriza su presentación final para los trámites correspondientes.

Atentamente:



Dr. Galo Escudero Vinicio Sánchez Mg. Sc

DIRECTOR DE TESIS

Certifica:

Que la investigación de tesis titulada “**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS DE GALLINA DE TRASPATIO**

CERTIFICACIÓN

CERTIFICACIÓN

LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Certifica:

Que la investigación de tesis titulada “**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS DE GALLINA DE TRASPATIO COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE LOJA**” realizado por el egresado, César Armando Chumbi Zumba, previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, ha incluido las correcciones e incorporado las observaciones realizadas por el Tribunal en el trabajo, y continuar con los trámites de graduación.

Loja, 17 marzo de 2017

**Dr. Rolando Sisalima Jara Mg. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**Dr. Segundo Barragán Fierro Mg. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

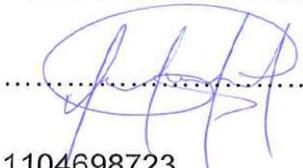
**Dr. Efrén Sánchez Sánchez Mg. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

AUTORÍA

Yo, **César Armando Chumbi Zumba**, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido del mismo.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional – Biblioteca Virtual.

Autor: **César Armando Chumbi Zumba**

Firma: .....

Cédula: 1104698723

Fecha: Loja, Marzo de 2017

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.

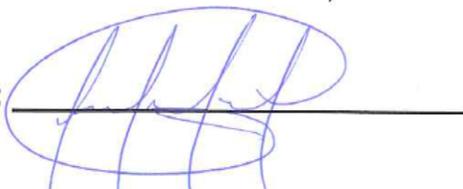
Yo, **César Armando Chumbi Zumba**, declaro ser autor de la tesis titulada: **“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS DE GALLINA DE TRASPATIO COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE LOJA”**, como requisito para optar el título de: **Médico Veterinario Zootecnista**; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos demuestre al mundo la producción intelectual de la universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el repositorio digital institucional:

Los usuarios podrán consultar el contenido de este trabajo en el repositorio digital institucional (RDI), en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los veinte días del mes de marzo del dos mil diecisiete, firma el autor.

Firma:



Autor: César Armando Chumbi Zumba

Número de cédula: 1104698723

Dirección: Av. Eugenio Espejo

Correo electrónico: armando24chumbi@hotmail.com

Celular: 0988915529

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis: Dr. Galo Escudero Vinicio Sánchez Mg. Sc.

Tribunal de grado: Dr. Rolando Sisalima Jara Mg. Sc.(PRESIDENTE)

Dr. Segundo Barragán Fierro Mg. Sc. (VOCAL)

Dr. Efrén Sánchez Sánchez Mg. Sc. (VOCAL)

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios y a la Virgen Santísima del Cisne por ser mi fortaleza, mi guía, y regalarme la bendición de haber podido llegar a estas instancias de mi carrera. A cada uno de los miembros de mi familia a mi Padre, mi Madre, mis Hermanos y mis sobrinos, que de una forma u otra gracias a su apoyo a su amor me han dado la fuerza y ánimos para culminar mi carrera. Por último y no menos importante a mis amigos por su incondicional amistad y a mi director de tesis quién me ayudó en todo momento, Dr. Galo Escudero. Quien conjuntamente con el personal del Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la Universidad Nacional de Loja, me abrieron las aperturas y me brindaron su apoyo para el procesamiento de las muestras recolectadas.

¡Muchas gracias!

DEDICATORIA

A Dios, por la fe y fuerza que me ha dado para luchar por alcanzar uno de mis sueños y ser mi guía siempre. A mi familia ya que son las personas más importantes de mi vida, gracias por su soporte, cariño y paciencia incondicional durante el transcurso de estos años de estudio ya que con sus impulsos y su ayuda culmino esta carrera que tanto me gusta.

César Armando.

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN	II
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	III
AUTORÍA	IV
CARTA DE AUTORIZACIÓN	V
AGRADECIMIENTO	VI
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE	VIII
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. LA AVICULTURA DE TRASPATIO	3
2.2. EL HUEVO Y SU CÁSCARA	4
2.2.1. Calidad de la Cáscara	4
2.2.2. Constitución de la Cáscara del Huevo	5
2.3. FACTORES QUE PERMITEN LA PROLIFERACIÓN BACTERIANA	6
2.3.1. Factores Externos que Influyen en la Proliferación Bacteriana en la Superficie de la Cáscara	8
2.3.2. Factores Internos que Influyen en la Proliferación Bacteriana en la Superficie de la Cáscara	9
2.4. EFECTOS DE LA TEMPERATURA RESPECTO A LA INVASIÓN BACTERIANA	10
2.5. SALMONELLA ENTERITIDIS (SE)	10
2.5.1. Generalidades (Salmonelosis)	11
2.5.2. Etiología	11

2.5.3.	Clasificación Taxonómica de Salmonella.....	11
2.5.4.	Patogenia.....	12
2.5.5.	Mecanismos de Contaminación de los Huevos con Salmonella.....	12
2.6.	DIAGNÓSTICO DE SALMONELLA.....	13
2.6.1.	Identificación Bioquímica	13
2.6.2.	Serotipificación por PCR.....	14
2.7.	SISTEMA 3M PETRIFILM SALMONELLA EXPRESS	15
2.7.1.	Descripción	15
2.7.2.	Beneficios.....	15
2.7.3.	Procedimiento.....	16
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1.	MATERIALES	21
3.1.1.	Materiales de Campo	21
3.1.2.	Materiales de Laboratorio	21
3.1.3.	Materiales de Oficina	22
3.2.	MÉTODOS	23
3.2.1.	Ubicación del Ensayo.....	23
3.2.2.	Delimitación del Área	23
3.2.2.1.	Ferias Libres de la Ciudad de Loja.....	23
3.2.3.	Tamaño de la Muestra.	23
3.2.3.1.	Toma, envío y procesamiento de muestras según la norma inen 2013.....	24
3.2.3.2.	Técnicas para la toma de muestras	24
3.2.4.	Variables de Estudio	26
3.2.5.	Toma de Muestras en las Ferias Libres de la Ciudad de Loja	26
3.2.6.	Análisis de Laboratorio.....	27
4.	RESULTADOS	30

4.1.	PRESENCIA DE SALMONELLA EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS	30
4.2.	PREVALENCIA DE SALMONELLA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS	31
4.3.	PROCEDENCIA DE LOS HUEVOS.....	32
4.4.	LIMPIEZA DE LOS HUEVOS.....	33
4.5.	MANERA DE ALMACENAMIENTO DE LOS HUEVOS	34
4.6.	PESO DE LOS HUEVOS	35
4.7.	GROSOR DE LA CASCARA	36
4.8.	DETERMINACIÓN DE LA ESPECIE MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y GENOTIPIFICACIÓN.....	37
5.	DISCUSIÓN	38
5.1.	DETECCIÓN DE SALMONELLA.....	38
5.2.	CONDICIONES DE MANEJO HIGIENICO SANITARIO.....	38
5.3.	PESO DE LOS HUEVOS	39
5.4.	GROSOR DE LA CASCARA	39
6.	CONCLUSIONES	41
7.	RECOMENDACIONES	42
8.	BIBLIOGRAFÍA	43
9.	ANEXOS	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades Bioquímicas Diferenciales de las Subespecies de Salmonella spp.....	14
Cuadro 2. Tiempo de trabajo y cantidad de muestra	27
Cuadro 3. Presencia de Salmonella spp, en las muestras analizadas.....	30
Cuadro 4. Prevalencia de Salmonella spp, en las ferias libres de Loja	31
Cuadro 5. Procedencia de los huevos que se expenden en las ferias libres de Loja.....	32
Cuadro 6. Limpieza de los huevos, valores mínimos y máximos para cada feria libre.....	33
Cuadro 7. Almacenamiento de los huevos que se comercializan en las ferias libres en Loja	34
Cuadro 8. Peso promedio huevos valores mín y máx para cada feria libre de Loja.....	35
Cuadro 9. Grosor de cáscara (mm), datos por Feria Libre	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secciones de la cáscara del huevo observadas a través de microscopia electrónica	6
Figura 2. Presencia de Salmonella spp, en las muestras analizadas.....	30
Figura 3. Resultados negativos y presuntos positivos de Salmonella.....	31
Figura 4. Procedencia de los huevos que se expenden en las ferias libres de Loja.....	32
Figura 5. Clasificación de las muestras según la limpieza de su cáscara	33
Figura 6. Almacenamiento de los huevos que se comercializan en las ferias libres en Loja	34
Figura 7. Porcentaje de huevos que se comercializan en Loja según su peso	35
Figura 8. Proporción de muestras dentro de los valores normales.....	36
Figura 9. Recolección y sellado de las muestras.....	50
Figura 10. Pesaje en gr de los medios a utilizar.....	50
Figura 11. Preparación del medio de enriquecimiento.....	51
Figura 12. Lavado de los huevos en el medio de enriquecimiento..	51
Figura 13. Incubación de las muestras	52
Figura 14. Identificación de colonias sospechosas	52

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS DE GALLINA DE TRASPATIO COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE LOJA”

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el propósito de determinar la presencia de *Salmonella spp.* en huevos provenientes de gallinas de traspatio, comercializados en las principales ferias libres de la ciudad Loja, a través del Sistema “3M Petrifilm *Salmonella Express*”, En total se analizaron 216 huevos aleatoriamente agrupados en 72 muestras (cada muestra constituida por tres huevos). Para determinar prevalencias y sus intervalos de confianza al 95% se utilizó el paquete EpiR del programa estadístico Sas University Edition 2016, obteniéndose una prevalencia de 0%, e intervalo de confianza (IC) de 0 a 6,02 % por cada 18 muestras analizadas y de 0%, e IC de 0 a 1,65% en 72 muestras, a pesar del manejo sanitario deficiente de los nidales, almacenamiento, manipulación, transporte y venta de los huevos resultando perjudicial en la calidad de los mismos e incluso producir problemas en salud pública (causa suficiente), y al no existir la causa necesaria esto es la presencia del agente etiológico, se llegó a la conclusión que en ninguna de las muestras analizadas existía la presencia de *Salmonella spp.* Sin embargo este estudio no descarta la presencia de *Salmonella spp.* en huevos comercializados en la ciudad de Loja por lo que se recomienda continuar monitoreando debido a las condiciones higiénico-sanitarias en las que se comercializan.

Palabras Clave: *Salmonella spp.*, huevos, traspatio, mercados, bacteriología.

ABSTRACT

The present research was developed with the purpose of determining the presence of *Salmonella spp.* In eggs from backyard hens, marketed at the main free trade shows in Loja, through the "3M Petrifilm *Salmonella* Express" System. A total of 216 eggs randomly grouped in 72 samples (each sample consisting of three eggs) were analyzed. To determine prevalences and their 95% confidence intervals, the EpiR package of the statistical program Sas University Edition 2016 was used, obtaining a prevalence of 0%, and a confidence interval (CI) of 0 to 6.02% for each 18 analyzed samples. And 0%, and IC from 0 to 1.65% in 72 samples, despite poor sanitary management of the nests, storage, handling, transport and sale of eggs resulting in detrimental quality and even problems in public health (sufficient cause), and because there is no necessary cause this is the presence of the etiological agent, it was concluded that in none of the analyzed samples existed the presence of *Salmonella spp.* However, this study does not rule out the presence of *Salmonella spp.* In eggs marketed in the city of Loja so it is recommended to continue monitoring due to the hygienic-sanitary conditions in which they are marketed.

Key words: *Salmonella*, eggs, backyard, markets, bacteriology.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos, es el principal problema de salud pública a nivel mundial; las mismas que se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados. En el Ecuador las enfermedades transmitidas por agua y alimentos (ETAs) están entre las dos primeras enfermedades de notificación obligatoria, siendo la salmonelosis una de las más importantes (MSP, 2009).

Garcés (2015) menciona que en los Estados Unidos, se estima que existen actualmente 142 mil casos de salmonelosis (37 casos por 100000 personas), debido al consumo de huevos contaminados, lo cual representa un problema significativo para la salud pública. En la Unión Europea, la salmonelosis es la segunda infección alimentaria más frecuente, y la principal causa de dichos brotes está vinculada al consumo de huevos y productos fabricados a base de huevos. En el Ecuador en el año 1990 se reportaron 9908 casos de salmonelosis; en el 2001 esta cifra aumentó bruscamente a 18772, periodo desde el cual el número ha ido disminuyendo paulatinamente con 3286 casos en el 2008. En Loja no existen cifras precisas sobre la cantidad de infectados de salmonelosis, probablemente debido a que esta infección, en la mayoría de los casos, no requiere hospitalización, otros son atendidos en la consulta privada y los que se automedican, generalmente no son reportados.

La Salmonelosis es una causa predominante de enfermedad transmitida por los alimentos siendo importantes vehículos de transmisión los huevos y las aves de corral (De Reu *et al.*, 2006). En los últimos dos decenios la *Salmonella enteritidis* ha llegado a ser una variante sérica causante de infecciones en seres humanos, siendo la fuente principal del patógeno los huevos de las gallinas. En muchos países, se atribuyó la aparición de *Salmonella enteritidis* como causa principal de la salmonelosis en seres humanos a la capacidad excepcional de esta variante sérica de colonizar el tejido ovárico de las gallinas y estar presente en el contenido de los huevos con cáscara intacta (FAO/OMS, 2002).

A nivel local, las ferias libres son los lugares donde la mayoría de agricultores y campesinos realizan su venta de huevos, ofreciendo su producto sin tener en cuenta las normas mínimas sanitarias que deben cumplir para su producción y comercialización.

Para realizar la presente investigación se tomó en cuenta los siguientes objetivos:

Determinar la presencia de *Salmonella spp.* en huevos de gallinas criollas que se comercializan en las ferias libres de Loja.

Determinar la procedencia de los huevos que son comercializados en las ferias libres de Loja.

Diagnosticar las condiciones higiénico-sanitarias de los huevos de gallinas criadas en traspatio.

Genotipificación de *Salmonella spp.*

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA AVICULTURA DE TRASPATIO

La avicultura rural es una actividad de importancia, por constituirse en una fuente de alimento de las familias campesinas, por su aporte a la economía familiar y por ser un importante recurso zoogenético del país (Villacís, Escudero, Cueva, & Luzuriaga, 2014).

Se trata de un sistema tradicional de producción pecuaria que realiza la familia campesina en el patio de sus viviendas o alrededor de las mismas, y consiste en criar un número relativamente pequeño de aves, alimentadas con insumos producidos por los propios campesinos: grano, desechos de la cocina y residuos de la cosecha (Gutiérrez-Triay, *et al.*, 2007).

Este tipo de producción se caracteriza por la baja inversión requerida y por la facilidad para efectuarla. Las especies más utilizadas son las gallinas criollas, dado que se adaptan a las condiciones adversas para su crianza, proporcionando productos de alto valor nutritivo como carne y huevo.

También se distingue por su escaso uso de la tecnología pecuaria disponible; por lo regular, las aves no tienen un alojamiento propio o se alojan en instalaciones rústicas, carecen de un control sanitario y su alimentación tiene como base diversos productos o subproductos generados en su mayoría en la misma unidad de producción (Molina, 2013). Estas aves conviven juntas en el mismo gallinero de noche, y de día pastorean libremente en el traspatio, consumiendo hierbas, insectos, larvas y desperdicios de cocina (Vargas, García, Palma, & Librado, 2005). De manera adicional, este sistema representa una alternativa productiva en el medio rural para mejorar los niveles de alimentación y nutrición ya que aporta niveles importantes de proteína a bajo costo, mediante el consumo de huevo, y carne de las aves (Molina, 2013). Dichos productos son ofertados para consumo humano, los cuales se venden en ferias o mercados informales no cumpliendo con los requisitos sanitarios específicos para la producción. Pero, el principal riesgo para la salud humana que presenta el huevo es la posible contaminación con salmonela, si la cáscara está contaminada, la bacteria puede pasar al contenido del huevo y así contaminar los alimentos (Neira, 2004).

2.2. EL HUEVO Y SU CÁSCARA

El huevo es un alimento conformado por la cáscara, que supone entre 9 y 12 % del peso total del huevo. La cáscara posee un alto porcentaje de Carbonato de Calcio (94 %), con pequeñas cantidades de Carbonato de Magnesio, Fosfato de Calcio y materiales orgánicos incluyendo proteínas. Se encuentra protegido de la contaminación exterior gracias a su cáscara, sirviendo de compartimiento, para la mantención y desarrollo del embrión en las aves (Hunton, 2005).

La cáscara del huevo de las aves es una estructura compuesta de matriz y de minerales orgánicos (carbonato de calcio), la cual se fabrica rápidamente y secuencialmente en el oviducto en un lapsus menor a 24 horas (Hunton, 2005).

La cáscara está constituida por cerca de 8.000 poros microscópicos lo cual favorece un óptimo intercambio gaseoso, permitiendo que el huevo se conserve por más tiempo y además permite el desarrollo de un posible embrión (Fernández & Arias, 2000). Estos poros son como tubos simples que atraviesan la cáscara permitiendo la difusión gaseosa (Board & Scott, 1980).

Además, su capa externa mucosa y proteica llamada cutícula le otorga la cualidad de proteger el contenido interno del huevo contra la penetración de bacterias a través de la cáscara (Koelkebeck, 1999). Sin embargo, puede existir una gran diversidad de microorganismos patógenos, sobre la superficie externa de la cáscara los cuales reducen la vida útil del huevo y por lo tanto existe un deterioro en la calidad del producto (Fernández & Arias, 2000).

2.2.1. Calidad de la Cáscara

La calidad de la cáscara depende de muchos factores, dentro de ellos se destacan los nutricionales especialmente la composición de calcio en la ración que influye en la resistencia de la cáscara, cuando la cáscara es débil existen grandes posibilidades de agrietarse (Hunton, 2005). Además, se ha observado en aves criollas de traspatio un alto porcentaje de excesiva porosidad del cascarón lo cual se debe mayoritariamente a las deficiencias en la alimentación, principalmente calcio, otro factor que condiciona la porosidad del cascarón es la edad de las gallinas (Juárez & Ortiz, 2001). Pero también se ha determinado que la calidad de la cáscara es dependiente de un factor

hereditario que se puede manipular a través de selección genética (Jones & Musgrove, 2005).

2.2.2. Constitución de la Cáscara del Huevo

La cáscara del huevo avícola es un notable ejemplo de mineralización biológica, químicamente está compuesta de 1.6% de agua, 95.1% de minerales, de los cuales 93.6% corresponden a carbonato de calcio en forma de calcita, 0.8% de carbonato de magnesio, 0.73% de fosfato tricálcico (Hunton, 2005), y finalmente 3.3% de materia orgánica o pigmentos de la cáscara, además, de 8.000 poros microscópicos que atraviesan la cáscara (Koelkebeck, 1999).

Además, posee cuatro diferentes capas que le brindan protección contra diversos agentes. Estas son: cutícula, empalizada, zona mamilar, membranas de la cáscara interna y externa (Arias, Fernández, & Caplan, 1991).

a) La capa cuticular o cutícula

Corresponde a la capa más exterior del huevo que recubre por completo la porción calcificada de la cáscara y tiene un espesor promedio de 10 μm , cubren la apertura de los poros en forma de tapones, su principal constitución es mucina, es decir, glicoproteínas de alto peso molecular asociadas a moléculas de carbohidratos. Aunque su presencia parece proteger al huevo de invasiones bacterianas, posiblemente debido a mecanismos de reconocimiento y ligamiento de bacterias a través de los residuos de carbohidratos como los que han sido descritos para diferentes glicoproteínas (Paredes, 2007).

b) Capa de empalizada o esponjosa

Corresponde a una capa calcificada que empieza por sobre los botones mamilares y termina en la cutícula. Corresponde a la capa de mayor espesor (200 μm) y está compuesta de una parte inorgánica (carbonato de calcio) y una parte orgánica llamada matriz de la cáscara (Dennis, *et al.*, 1999).

c) Capa mamilar

Corresponde a una capa de 100 μm de espesor, caracterizada por la presencia de acumulaciones discretas de materia orgánica que se entremezclan con el material fibrilar de la subcapa exterior de las membranas de la cáscara. Sus botones o mamilas corresponden a los sitios donde se inicia la formación de cristales de la cáscara. Los botones mamilares son ricos en mucopolisacaridos neutros (Cook *et al.*, 2003).

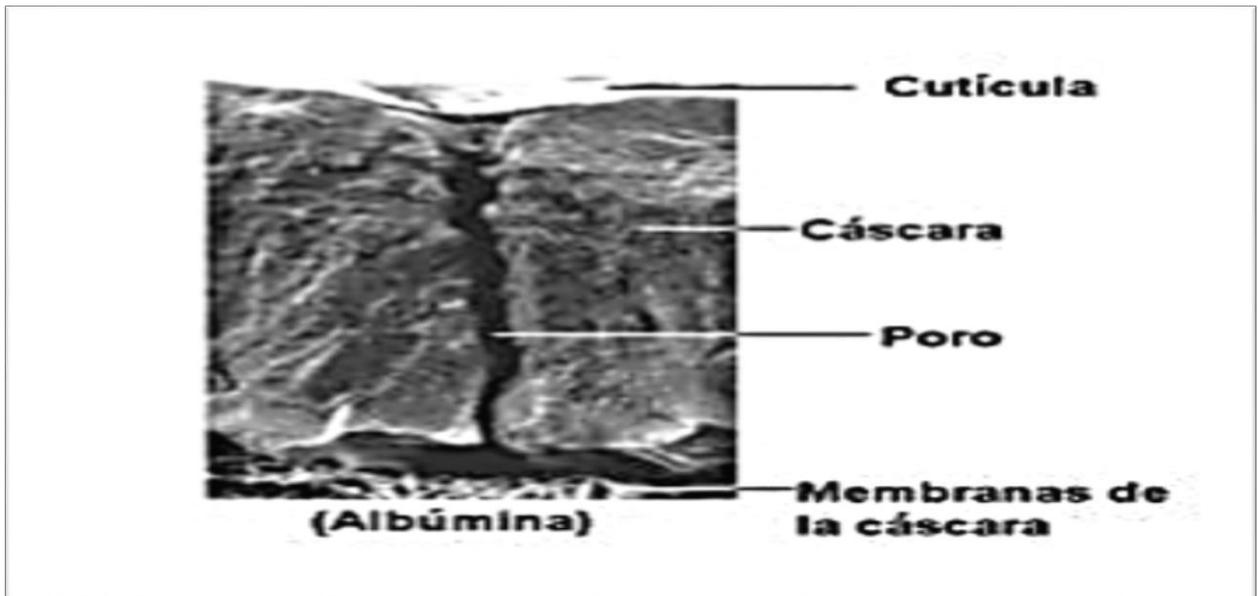


Figura 1. Secciones de la cáscara del huevo observadas a través de microscopía electrónica

Fuente: (Paredes, 2007).

d) Capas de la membrana de la cáscara

Corresponde a la capa más interior de la cáscara del huevo. Mide 70 μm de espesor y está compuesta de dos láminas o subcapas fibrilares llamadas “externa” e “interna”. Estas dos laminas o subcapas están fuertemente adheridas entre sí en la mayor parte de la superficie interior de la cáscara salvo en la porción del huevo donde se encuentra la cámara de aire en donde ambas capas están separadas (Bellairs & Boyd, 1969).

2.3. FACTORES QUE PERMITEN LA PROLIFERACIÓN BACTERIANA

Existen múltiples factores externos e internos que influyen en la proliferación bacteriana, dentro de los factores externos se destacan limpieza de la cáscara al contaminarse con heces (Koelkebeck, 1999), condiciones climáticas, período de exposición que influyen fuertemente en la reducción de la viabilidad del huevo (Cook *et al.*, 2003) y los factores internos como: integridad de la cáscara, textura de la

cáscara, forma de la cáscara (Koelkebeck, 1999) y la calidad de composición de la cáscara de huevo (Cook *et al.*, 2003).

Se han encontrado diferencias significativas de poblaciones bacterianas en la superficie externa de la cáscara (aerobios y anaerobios) influidas por la cantidad de tiempo transcurrido en su almacenaje. La mayor contaminación anaeróbica del huevo se ha presentado en la semana 8 del almacenaje y el más bajo en las semanas 0 y 1 de almacenaje. La contaminación más alta de la cáscara con las bacterias aerobias en los huevos lavados se ha encontrado en la semana 0 del almacenaje y el más bajo en la semana 7 (Jones *et al.*, 2004).

Muchas enterobacterias que se ubican y multiplican en el intestino son eliminadas a través de las heces en forma intermitente, contaminando todo el ambiente que rodea al animal (cama, polvo, plumas, cáscara de huevos, bebederos, comederos, etc.) y de esta manera a otras aves (transmisión horizontal). Con el ambiente contaminado, es muy fácil que la bacteria se disemine hacia sitios cercanos mediante vectores (gorriones, personal, perros, gatos, etc.), además, de roedores que son reservorios de salmonela (Borie & Sánchez, 1998).

No se ha determinado una correlación directa entre el nivel de la contaminación bacteriana y de la contaminación visual de la cáscara del huevo. Una correlación positiva fue encontrada entre la contaminación bacteriana inicial de la cáscara de huevo y la concentración de bacterias en el ambiente de los nidos de las aves de corral. Se comprobó que nidales puestos en ambientes húmedos favorecían el crecimiento microbiano comparado con nidales que se encontraban en lugares donde existía mayor temperatura y mayor ventilación (Cook *et al.*, 2003).

Un ave de postura infectada con fagotipo invasor de *Salmonella spp.* es capaz de atravesar el oviducto y contaminar los óvulos liberados, pero no siempre la totalidad de sus huevos son contaminados con la bacteria. Es decir, ocurre lo mismo que con la colonización intestinal, la eliminación es temporal e intermitente. En los huevos contaminados, la cantidad de bacterias que sobrevive a la acción de sustancias inhibitoras propias del huevo es escasa, y lo más probable es que no alcance a la dosis mínima requerida para enfermar a una persona. Sin embargo, si este huevo es mantenido a temperatura ambiente (sin refrigeración), la bacteria comienza a

multiplicarse tan rápidamente que las sustancias inhibidoras no logran frenar el proceso, obteniendo un crecimiento bacteriano exponencial (Borie & Sánchez, 1998).

Los microorganismos atraviesan el interior del huevo a través de aquellos poros que no están cubiertos por la cutícula. Esta invasión interna es favorecida por la presencia de humedad en la superficie de la cáscara ya que promueve las condiciones requeridas para el crecimiento microbiano. Cuando existe suficiente agua en la superficie de la cáscara, ciertas especies microbianas pueden digerir la cutícula y aumentar drásticamente el número de poros disponibles para la penetración (Cook *et al.*, 2003).

2.3.1. Factores Externos que Influyen en la Proliferación Bacteriana en la Superficie de la Cáscara

A pesar que los huevos poseen mecanismos físicos y químicos de defensa contra la invasión microbiana (Jones *et al.*, 2004), la eficacia de esta defensa dependerá de múltiples factores como las condiciones ambientales y las posibilidades de invasión de los microorganismos. (Cook *et al.*, 2003).

Los porcentajes de huevos rotos, fracturados y sucios, que representan más del 14%, se atribuyen a las condiciones y tipo de nidos, donde varias gallinas se disputan el espacio, lo que ocasiona daños a la estructura del cascarón. Los huevos sucios principalmente por excretas, se atribuyen a las mismas causas, lo que los convierte en huevos no aptos para incubar por el riesgo de contaminación del resto de los huevos en la incubadora (Juárez & Ortiz, 2001).

La contaminación de la cáscara con excretas es una de las mayores causas de huevos sucios. La contaminación microbiológica en la cáscara de los huevos aumenta el riesgo de producir intoxicación alimentaria ya que esta colonización incrementa el riesgo de contaminar el contenido interno del huevo (Smith, 2000). Éste último factor está altamente relacionado al aporte dietario de algunas sales minerales como por ejemplo Na⁺ y que puede ser conducente a las ya mencionadas proliferaciones microbiológicas (Grizzle *et al.*, 1992).

El diseño de las jaulas es otro factor que afecta en la obtención de huevos sucios y por ende contaminados, ya que al existir hacinamiento existen mayores probabilidades de diseminar los huevos en el ambiente contaminado (Smith, 2000).

La contaminación de huevos con cualquier tipo de microorganismo, por ejemplo Salmonela, puede ocurrir bajo distintas estrategias de colonización, la cáscara del huevo puede ser contaminado con heces, es decir transmisión horizontal, procedimientos de limpieza de la superficie del huevo de manera inapropiadas, el interior del huevo se puede contaminar al estar la cáscara agrietada o bien, por la presencia de una cutícula inmadura (Miyamoto *et al.*, 1998), en donde se evidenciaría una estrategia facilitada de colonización. También puede existir una contaminación transoviductual en donde el huevo se contamina en el interior del tracto reproductivo aviar, específicamente en el oviducto, antes de la formación de la cáscara es decir transmisión vertical (Ching-Lee *et al.*, 1991).

La refrigeración prolongada reduce la carga bacteriana presente en la superficie de la cáscara de los huevos que se encuentran relativamente limpios, pero no se ha observado disminución de cargas bacterianas en huevos con cáscara sucia (Baker *et al.*, 1985).

2.3.2. Factores Internos que Influyen en la Proliferación Bacteriana en la Superficie de la Cáscara

Los huevos de gallina recién puestos no suelen estar contaminados, sí bien algunos microorganismos pueden tener acceso a éstos a través del oviducto. Los microorganismos presentes en el huevo proceden principalmente del tracto intestinal de las aves, del lugar de postura, el polvo, las cajas de embalaje y almacenamiento, etc. Estos pueden penetrar a través de los poros del cascarón si éste se encuentra caliente y se contamina con materia fecal fría, entonces los microorganismos pasan al interior (Castillo *et al.*, 1996).

Las bacterias que poseen mayor facilidad para penetrar al interior del huevo son bacterias Gram negativas móviles y no móviles, encontrándose frecuentemente *Pseudomonas* sp. en un 60%, *Alcaligenes* sp. (58%) y en un 43% *Salmonella enteritidis* (De Reu *et al.*, 2006).

Entre los microorganismos productores de infecciones alimentarias que pueden estar presente en el huevo se encuentran *Salmonella spp.* y otras Enterobacterias (Castillo *et al.*, 1996).

2.4. EFECTOS DE LA TEMPERATURA RESPECTO A LA INVASIÓN BACTERIANA

La probabilidad de que ocurra la infección microbiana depende, además de múltiples factores como las condiciones climáticas, período de exposición y composición de la cáscara del huevo (Cook *et al.*, 2003). Se ha determinado que temperaturas elevadas superiores a 32°C producen una reducción perceptible de la calidad de la cáscara del huevo (Grizzle *et al.*, 1992), ya que, la exposición al calor da lugar a disminución del intercambio de oxígeno a través de la cáscara del huevo haciéndolo más susceptible a fracturas, esto se ve potenciado en aquellos huevos de cáscara más delgada (Lin *et al.*, 2004). Se ha observado que la refrigeración temporal por 9 días o más da lugar a una disminución de la carga bacteriana de la cáscara (De Reu *et al.*, 2006).

A su vez, estudios han demostrado una tendencia a la variación estacional de la contaminación de la cáscara del huevo determinándose una disminución bacteriana en los meses de invierno (De Reu *et al.*, 2006). También se ha demostrado que la infección microbiana y la temperatura ambiente actúan independientemente para reducir la viabilidad del huevo considerablemente (Cook *et al.*, 2003).

2.5. SALMONELLA ENTERITIDIS (SE)

Es uno de los principales agentes bacterianos causantes de intoxicación alimentaria provocando un cuadro de enterocolitis, caracterizado por diarrea, fiebre y dolor abdominal. Su periodo de incubación no supera los tres días. Su duración es autolimitada alcanzando en promedio 8 días. Se atribuye principalmente a la ingesta de carnes de ave contaminada, insuficientemente cocida y a alimentos preparados a partir de huevo.

La producción de huevos contaminados proviene generalmente de aves asintomáticas, a lo que se suma la contaminación transovárica del huevo. La bacteria puede estar sobre la cáscara, debido a que este sale de la gallina por el mismo paso que el excremento. La bacteria también puede estar dentro del huevo entero, esta

contaminación puede ser debido a que la bacteria está dentro del ovario de la gallina o el oviducto antes de que se forme la cáscara alrededor de la yema y la clara. Es también posible que los huevos se infecten con SE por contaminación fecal por los poros de las cáscaras después de que ellos son puestos. Se debería consumir huevos cocidos y evitar productos que lleven huevo crudo, sea conteniendo yema o clara. La infección por *Salmonella spp.* parece ocurrir con mayor frecuencia en el verano. Temperaturas altas proporcionan un ambiente en el cual *Salmonella spp.* puede crecer durante los procesos de producción, transporte y almacenaje (ISP, 2009) .

2.5.1. Generalidades (Salmonelosis)

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa que afecta a personas y animales, las personas pueden contaminarse al ingerir alimentos con *Salmonella spp.* como carne, huevos, leche, frutas y verduras, estos microorganismos son causantes de infecciones intestinales y sistémicas. La salmonelosis humana es una de las enfermedades zoonóticas más frecuentes y de mayor impacto económico en todo el mundo. Al parecer se presenta con mayor frecuencia en áreas de producción animal intensiva, esencialmente de cerdos, de terneros y aves criadas en cautiverio (OIE, 2008).

2.5.2. Etiología

El género *Salmonella spp.* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, generalmente móviles con excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. No esporulantes, mesófilas y tiene su crecimiento óptimo a temperaturas entre 35 y 37 °C, pero en general su rango de crecimiento es de 5 a 46 °C. Mueren a temperatura de pasteurización, son sensibles a un pH bajo (4.5 o menos). Las células sobreviven largos periodos en estado de congelación y deshidratación (Ray, 2010). El principal antígeno de la pared celular es el antígeno somático O. También posee otros antígenos: A, H y K (Murray, 2009).

2.5.3. Clasificación Taxonómica de Salmonella

El género *Salmonella spp.* incluye solo dos especies importantes: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. se divide en seis subespecies que son: *entérica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (OIE, 2008). *Salmonella bongori* es específica de reptiles, rara vez se encuentra en las infecciones humanas

(NCBI, 2012). Se han descrito más de 2500 serotipos de la *Salmonella entérica* (Quinn, 2011).

2.5.4. Patogenia

Las salmonelas al ser ingeridos con los alimentos contaminados se unen a la mucosa del intestino delgado e infiltran las células M (micropliegues) localizadas en las placas de Peyer y los enterocitos. Las bacterias se quedan dentro de una vacuola endocítica, donde se replican, también se pueden transportar a través del citoplasma y liberarse hacia la sangre o la circulación linfática. En la mayor parte de las infecciones la respuesta inflamatoria la deja limitada al aparato digestivo, mediante la liberación de prostaglandinas y estimula la AMPc y la secreción activa de líquidos (Murray, 2009). Al contrario de lo que ocurre en otras infecciones por *Salmonella*, las bacterias responsables de la fiebre entérica pasan a través de las células que tapizan el intestino y son engullidas por los macrófagos. Se replican después de ser transportadas al hígado, bazo y médula ósea (Murray, 2009).

2.5.5. Mecanismos de Contaminación de los Huevos con Salmonella

Los huevos pueden estar contaminados en la superficie de la cáscara externa (contaminación horizontal) y/o internamente (contaminación vertical) (Keller *et al.*, 1995).

- a)** La *Salmonella spp.* ingresa por vía oral y entra en el tracto intestinal de la gallina. Las bacterias colonizan el lumen intestinal donde son capaces de invadir las células epiteliales intestinales. Consecuentemente las células inmunes son atraídas al sitio de la invasión y encierran la bacteria. Estos macrófagos infectados emigran a los órganos internos, tales como los órganos reproductivos, ovario, infundíbulo, etc, (contaminación vertical) (Gantois *et al.*, 2009).

- b)** Una vía posible de contaminación de los huevos es por la penetración de *Salmonella spp.* a través de la cáscara del huevo y de sus membranas después de la contaminación de la cáscara exterior. La contaminación superficial puede ser el resultado de una infección de la cloaca o de la contaminación fecal (Gantois *et al.*, 2009).

2.6. DIAGNÓSTICO DE SALMONELLA

Para realizar la detección de *Salmonella*, se manejó los medios de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, siembra en placa y confirmación de *Salmonella spp.* utilizando lo siguiente;

Enriquecimiento Base para *Salmonella*

Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella*

Rappaport Vassiliadis Médium

Placa 3M Petrifilm *Salmonella* Express

Discos de confirmación 3M Petrifilm *Salmonella* Express

2.6.1. Identificación Bioquímica

La identificación final de *Salmonella spp.* las colonias sospechosas observadas en el medio de cultivo diferencial se someten a pruebas de reacción bioquímica con el fin de confirmar la presencia de la bacteria que se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Propiedades Bioquímicas Diferenciales de las Subespecies de *Salmonella spp.*

Pruebas Bioquímicas	S.	S.	S.	S.	S.	S.	S.
	<i>entérica a</i> Subsp. <i>Entérica a</i> (I)	<i>entérica a</i> Subsp. <i>salama e</i> (II)	<i>entérica</i> Subsp. <i>arizona e</i> (IIIa)	<i>entérica</i> Subsp. <i>diarizona e</i> (IIIb)	<i>entérica</i> Subsp. <i>houtena e</i> (IV)	<i>entérica a</i> Subsp. <i>indica</i> (VI)	<i>S. bongori</i> (V)
Dulcita	+	+	-	-	-	D	+
ONPG	-	-	+	+	-	D	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	-70%	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	D	-
Lactosa	-	-	(-)75%	(+)75%	-	-	-

(+) 90% o más de los resultados positivos; (-)90% o más de los resultados negativos; d: diferentes reacciones

Fuente: (Stanchi, 2007)

2.6.2. Serotipificación por PCR

Clásicamente, los aislamientos de *Salmonella spp.* se clasifican e identifican mediante métodos fenotípicos, tales como perfiles bioquímicos, serotipificación y fagotipificación. La serotipificación es un método usado y es la base de la actual clasificación de las serovariedades de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Wattiau et al., 2011).

La técnica de PCR ofrece un método rápido y confiable para la detección de *Salmonella spp.* y ha sido usada exitosamente para el diagnóstico de la presencia de bacterias patógenas en muestras ambientales de agua, clínicas y de alimento (Mogamedi et al., 2007).

Desde el punto de vista genético, el género *Salmonella spp.* constituye una sola especie siendo el grupo más complejo de la familia, está serotipificada de acuerdo a sus antígenos somáticos de superficie (LPS, antígenos O), antígenos flagelares (proteínas, antígenos H) y antígeno capsular (Vi) (Terragno *et al.*, 2003). Los antígenos se identifican con anticuerpos monovalentes y polivalentes disponibles comercialmente, mediante pruebas de aglutinación en lámina. Para identificar los antígenos O, se hace una prueba con antisueros contra los grupos del O1 (A) al O67, luego se prueba el antisuero Vi para antígeno capsular, y por último se incluyen los antisueros contra los antígenos flagelares H (Farmer, 2003).

2.7. SISTEMA 3M PETRIFILM SALMONELLA EXPRESS

2.7.1. Descripción

En la industria de alimentos generalmente, el aislamiento y la identificación de *Salmonella spp.* se realizan mediante métodos de cultivo tradicionales, que consisten en una serie de etapas lo que hace que la técnica sea demorada, requiera demasiada mano de obra y puede generar una gran incertidumbre respecto a los resultados obtenidos (3M Petrifilm 2013). 3M Petrifilm *Salmonella* Express System (SALX) es utilizado como prueba cualitativa para la rápida detección y confirmación bioquímica de *Salmonella spp.* en alimentos reemplazando la metodología tradicional; está compuesto por el 3M™ Enriquecimiento Base para *Salmonella* (Mezcla de nutrientes, mezcla selectiva), el 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* (Agentes selectivos), Medio Rappaport Vassiliadis (Cloruro de magnesio, cloruro de sodio, caseína peptona, fosfato de monopotasio, verde malaquita, agua desmineralizada), la Placa 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express (bilis rojo violeta y un agente gelificante soluble en agua fría) y el Disco de Confirmación 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express (Citrato, TSI, Urea, Fenilalanina, lisina, arginina y ornitina).

2.7.2. Beneficios

Medio Listo para Usar

Fácil de Usar

No se requiere de equipos especiales

Permite gran uniformidad de resultados vs agares deshidratados

Vida de anaquel más larga comparada con los platos de agar

Plato Compacto/ apilable & disco reducen los desechos

Todo en solo un método: provee resultados presuntivos y resultados bioquímicos confirmativos

Un solo proceso de enriquecimiento para alimentos procesados con baja carga microbiana

Más rápido para resultados bioquímicos confirmados (44-52 hrs)

Colonias Confirmadas todas en un plato

2.7.3. Procedimiento

Pese asépticamente la cantidad apropiado del 3M Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella*.

Agregue de manera aséptica el 3M Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* a la cantidad apropiada de 3M Enriquecimiento Base para *Salmonella*, preparado y esterilizado en el autoclave.

Prepare la dilución del producto alimenticio. Pese o agregue con pipeta el producto alimenticio dentro de un contenedor estéril, tal como una bolsa de homogeneizador u otro contenedor.

Agregue una cantidad apropiada de la combinación de 3M Enriquecimiento Base para *Salmonella* el 3M Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* a la bolsa o contenedor de la muestra.

Mezcle u homogenice la muestra según el procedimiento actual.

Incube las muestra enriquecidas a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante de 18 a 24 horas.

Solo para muestras con niveles altos de contaminación microbiológica ($>10^4$ CFU/g). Después de la incubación del enriquecimiento, transfiera 0,1 ml a 10 ml de R-V R10.

Incube el caldo R-V R10 a $41, 5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 8 a 24 horas. Vaya al paso 13b después de realizar primero los pasos de 9 a 12.

Coloque la placa 3M Petrifilm SALX sobre una superficie nivelada y plana. Con la pipeta perpendicular a la placa, coloque 2,0 ml de diluyente estéril sobre el centro de la película interior.

Deje caer suavemente la película superior sobre el diluyente para evitar atrapar burbujas de aire.

Coloque el Difusor Plato 3M Petrifilm en el centro de la placa. Presione ligeramente el centro del difusor para distribuir el diluyente de manera uniforme. Distribuya el diluyente en toda el área de desarrollo de la placa 3M Petrifilm SALX antes de que se forme el gel. No deslice el difusor a través de la película.

Coloque la Placa 3M Petrifilm SALX en una superficie plana durante al menos 1 hora a temperatura ambiente ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$), protegida de la luz, para que se forme el gel.

Para las muestras con niveles bajos de contaminación microbológica, use un asa estéril de 10 ul y retire el volumen completo del asa. Utilice una asa suave (una que no tenga bordes dentados y que no esté deformada) para evitar que la superficie del gel se resquebraje. (b) para las muestras con niveles bajo de contaminación microbológica, use un asa estéril de 10 ul y retire un volumen completo de muestra a fin de sembrar por estriado en placa.

Realice una sola siembra por estriado, desde la parte superior hasta la parte inferior de la placa, para obtener colonias aisladas.

Baje la película superior para cerrar la placa 3M Petrifilm SALX. Asegúrese de que usa guantes (emplear las buenas prácticas de laboratorio para evitar contaminación cruzada o el contacto directo con la placa), aplicar un movimiento suave de presión constante sobre la película superior para retirar todas las burbujas de aire del área de inoculación.

Incube las placas a $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas en posición horizontal con el lado coloreado hacia arriba en pilas de no más de 20 placas.

En la película superior de la Placa 3M Petrifilm SALX, marque con círculo las colonias aisladas presuntivas positivas de *Salmonella spp.* usando un marcador permanente de punta fina. Confirme bioquímicamente todos los resultados presuntivos positivos de *Salmonella spp.* mediante el uso de Disco de Confirmación 3M Petrifilm SALX.

Retire de su bolsa un Disco de Confirmación 3M Petrifilm SALX empacado individualmente y permita que llegue a temperatura ambiente. Abra el paquete para exponer la lengüeta del disco, jale la y retire el disco. Levante la película superior (con las colonias presuntivas de *Salmonella spp.* ya marcadas) de la Placa 3m Petrifilm SALX e inserte el disco sobre el gel en forma tal que se evite atrapar burbujas de aire. Cierre la placa.

Asegúrese de que usa guantes y deslice suavemente sus dedos con un movimiento de barrido a una presión constante sobre la película superior para retirar todas las burbujas de aire del área de inoculación, y asegure un buen contacto entre el gel y el Disco de Confirmación 3M Petrifilm SALX.

Incube el 3m Petrifilm *Salmonella* Express (placa y disco) a $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 4 a 5 horas.

Retire el sistema 3M Petrifilm *Salmonella* Express de la incubadora y proceda a leer los resultados. Mire solo las colonias marcadas con un círculo (3M Petrifilm 2013).

2.8. OTROS TRABAJOS RELACIONADOS

Estrada & Valencia (2012) realizaron la “DETERMINACIÓN DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE QUITO”. En ninguna de las muestras se confirmó la presencia de *Salmonella spp.* pero se evidenciaron bacterias entéricas y ambientales como: *Pseudomona spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea spp.*, *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Aeromona spp.* y *Burkholderia cepacia*.

Sánchez (2013) realizó la “DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ENTEROBACTERIAS DEL GÉNERO *Salmonella spp.* EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA DE EMPRESAS AVÍCOLAS DE LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA” de las 50 granjas analizadas, luego de la división por etapas, se obtuvieron 150 muestras en

total. De las 150 muestras, se logró aislar *Salmonella spp.* existente en huevos frescos en granjas avícolas de la provincia de Tungurahua, siendo del 0.0133% (2/150), la primera pertenecía a la etapa de producción inicial y la segunda muestra positiva correspondía a la etapa de producción intermedia de huevos; no se evidenciaron crecimiento en ninguna de las muestras tomadas en la fase final de producción de huevos.

Clerc (2005) realizó la “DETECCIÓN DE *Salmonella spp.* EN HUEVOS DE GALLINA COMERCIALIZADOS EN FERIAS DE LA CIUDAD DE VALDIVIA”, se realizó una selección no aleatoria, de 45 muestras, compuestas por 3 huevos de gallinas de campo cada una, comercializados en dos ferias libres de la ciudad de Valdivia, con el objetivo de determinar la existencia de *Salmonella spp.* por medio del análisis de la cáscara y de la yema de huevo. Se logró aislar *Salmonella spp.* en siete muestras de cáscara, pero no se aisló en ninguna de las muestras de yema. El porcentaje de muestras contaminadas con *Salmonella spp.* encontrado, fue de 15,6%.

Ramírez & Rodríguez (2013) realizaron la “DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS EN HUEVOS PROCEDENTES DE 5 GRANJAS AVÍCOLAS EN OCCIDENTE DE NICARAGUA” Al realizar el aislamiento de Enterobacterias en 66 muestras de huevo procedentes de 5 granjas avícolas del occidente de Nicaragua, se encontró que el cascaron presentaba un 78.8% de contaminación bacteriana y clara/yema 39.4 %. Respecto al aislamiento de Enterobacterias en cascaron, se encontró *E. coli* en un 40.7%, *Enterobacter spp* 24.1%, *Klebsiella spp* 11.1 %, *Proteus spp* y *Acinetobacter spp* en 5.6%, *Salmonella spp*, *Citrobacter spp* y *Shiguela spp* 3.7%, *Serratia spp* 1.9 %.

Soria (2012) en su trabajo sobre la “PRESENCIA DE *Salmonella* Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE HUEVOS DESTINADOS A CONSUMO HUMANO” para determinar la presencia de *Salmonella spp.* y las características físicas y pH del huevo para consumo humano y evaluar la sensibilidad de los aislamientos obtenidos frente a diferentes antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria. La prevalencia de *Salmonella spp.* fue del 1,8 % (29/1.643 muestras), encontrándose 8 serovariedades de *Salmonella spp.* las cuales fueron sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacinaa e imipenem que serían de elección en la terapia de infecciones causadas por este patógeno.

Mancera *et al.* (2005) realizaron la “IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella enteritidis* EN HUEVO PARA CONSUMO EN LA CIUDAD DE MÉXICO”. Se obtuvieron 131 aislamientos considerados en 12 diferentes géneros bacterianos: *Acinetobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Bacillus sp.*, *Branhamella sp.*, *Edwardsiella sp.*, *Hafnia sp.*, *Klebsiella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Yersinia sp.* y obteniendo una cepa de *Salmonella Enteritidis*, la cual se clasificó como no tipificable. Se obtuvo un huevo contaminado por *Salmonella Enteritidis*, el cual en porcentaje del muestreo representó el 0.25 %.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Materiales de Campo

216 Huevos de aves de traspatio recogidos en ferias libres de la ciudad de Loja

Boleta de encuesta

Hoja con tabla de control y registro

Marcadores

Mandil

3.1.2. Materiales de Laboratorio

Muestras: Huevos de aves de traspatio

Autoclave

Estufa

Balanza

Mechero de bunsen

Tubos de ensayo con tapón

Vaso de precipitación

Pipetas

Espátula

Gradilla

Guantes

Hoja con tabla de control y registro

Agua destilada

Sistema 3M Petrifilm *Salmonella* Express

Caldo Rappaport Vasidilis

Dulcita

ONPG

Malonato

Gelatina

Sorbita

KCN

Mucato

Salicina

Lactosa

Antisueros diagnóstico O y H

Solución salina al 2%

Solución fisiológica formolada al 1%

3.1.3. Materiales de Oficina

Computadora

Internet

Calculadoras

Lápiz

Cuaderno

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ubicación del Ensayo

La toma de muestras se efectuó en las principales Ferias Libres de la ciudad de Loja y los análisis se realizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la Universidad Nacional de Loja. La ciudad de Loja se encuentra en las siguientes coordenadas meteorológicas:

Altitud: 2060 msnm

Latitud: 04° 03' S

Longitud: 79° 20' W

Temperatura promedio: 16 – 18°C

Fuente: INAMHI: Centro de meteorología de la Argelia (UNL) 2010

3.2.2. Delimitación del Área

El trabajo se realizó en los sitios de expendios a nivel de las principales ferias libres de la ciudad de Loja.

3.2.2.1. Ferias Libres de la Ciudad de Loja

Las principales ferias libres de la ciudad de Loja son: La Tebaida, San Sebastián, Las Pitas y El Mayorista.

3.2.3. Tamaño de la Muestra.

Número de ferias libres: Se escogieron 4 ferias libres ubicadas dentro de la ciudad de Loja.

Número de expendios de huevos: Se tomaron muestras de todos los expendios de huevos de las ferias libres seleccionadas.

Número de salidas de campo: Se realizaron dos tomas de muestras en los expendios de huevos los días sábados y domingos.

Número de huevos: De cada expendio se colectaron tres huevos.

Número de muestras para el análisis microbiológico: Cada muestra estuvo conformada por un grupo de 3 huevos.

3.2.3.1. Toma, envió y procesamiento de muestras según la norma inen 2013

Esta norma según la naturaleza del producto, establece los procedimientos generales para la toma de muestras de alimentos, el envío al laboratorio y su preparación en el laboratorio.

3.2.3.2. Técnicas para la toma de muestras

Generalidades

Tomar las muestras en condiciones asépticas, con rapidez pero cuidadosamente, y de tal manera, para que la muestra sea representativa del producto que se quiere analizar.

Limpiar el recipiente apropiadamente con agua tibia y jabón y pasar alcohol al 70% sin flamear.

Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), asépticamente tomar primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. Para conservar estas muestras no se deben utilizar preservantes.

Registrar la temperatura de almacenamiento y colocar la muestra dentro del recipiente.

El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 gr, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote.

3.2.3.3. Recepción y Almacenamiento de las Muestras en el Laboratorio

Chequeo de las condiciones de las muestras. Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

Etiquetado e informe.

Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras.

Las muestras frescas perecederas deben colocarse a una temperatura entre 0° C a 5°C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de luz solar directa o de otras fuentes de calor.

Productos congelados, a -20°C, máximo hasta siete días.

Productos perecederos no congelados, entre 0°C y 5°C, por no más de 24 horas.

3.2.3.4. Envío de las muestras al laboratorio

Enviar las muestras al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

Manipular y empacar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda acerca de su identidad.

Los productos perecederos no congelados se enfrían hasta 0 a 5°C, sea en un refrigerador o más rápidamente en un baño de hielo (en fundas plásticas) y se los envía en recipientes isotérmicos, cubiertos con una bandeja que contenga suficientes fundas plásticas con hielo picado o una mezcla de polialcoholes congelados, para mantener la temperatura de 0 a 5°C hasta su llegada al laboratorio.

No utilizar hielo suelto ya que si el envase se revienta o tiene fugas puede contaminar el producto. Si se utiliza hielo seco, acondicionar la muestra de manera que no entre en contacto con el hielo para evitar su congelamiento

Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma de muestras.

3.2.3.5. Procedimiento para preparación de la muestra para el análisis

Para la detección de Salmonella, en general, preparar la suspensión inicial con una unidad de muestra de 25 g (cm³) y 225 cm³ del diluyente indicado en la NTE INEN

1529-15. Si la unidad de muestra prescrita difiere de 25 g, utilizar la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución de aproximadamente 1/10 (masa/volumen).

Para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de la temperatura; la temperatura de los diluyentes debe ser aproximadamente la misma de la muestra, a menos que haya otra indicación.

3.2.4. Variables de Estudio

Detención de *Salmonella spp*

Prevalencia de *Salmonella spp*

Procedencia de los huevos

Limpieza de los huevos

Almacenamiento de los huevos

Peso de los huevos

Grosor de la cascara

Genotipificación

3.2.5. Toma de Muestras en las Ferias Libres de la Ciudad de Loja

La toma de muestras se ejecutó en los diferentes días de la semana en los horarios de 09H00 a 12H00 en las ferias libres de la ciudad de Loja una vez a la semana por feria libre.

Para obtener la muestra para realizar el trabajo se procedió a recolectar en los sitios de venta previamente identificados, eligiéndolos al azar, al mismo tiempo que se realizó una encuesta a los vendedores con el objetivo de recolectar datos acerca de la procedencia de los huevos, almacenamiento, manejo de nidales etc., posteriormente se colocaron en bolsas tipo Ziploc para ser llevados al laboratorio donde se observaron las características externas y las pruebas microbiológicas para la detección de *Salmonella*.

Cuadro 2. Tiempo de trabajo y cantidad de muestra

SEMANA	MUESTRA				TOTAL MUESTRAS
San Sebastián					
1	3	3	3	3	12
2	3	3	3	3	12
3	3	3	3	3	12
4	3	3	3	3	12
5	3	3	3	3	12
6	3	3	3	3	12
TOTAL	18	18	18	18	72

Fuente: Investigación autor

3.2.6. Análisis de Laboratorio

Los análisis correspondientes se realizaron en el laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Loja.

a) Análisis Físico del Huevo

Estando las muestras dentro de las bolsas Ziploc se realizó la toma de las medidas de los huevos utilizando un micrómetro o pie de rey, registrando las medidas del diámetro mayor (DMa) y menor (DMe) que se utilizaron para determinar el coeficiente para la superficie (Ks), siguiendo la metodología de expresión: (Uña *et. al* 2012).

$$Ks = 3,155 - 0,0136 * (DMa) + 0,0115 *(DMe)$$

El cálculo para la superficie (S) se realizó por la expresión:

$$S = Ks * (DMa) * (DMe)$$

Se realizó el pesaje de las muestras para lo cual se utilizó una balanza electrónica y se clasificó a los huevos según su peso en gramos como lo indica la norma INEN-1973 (2011) de la siguiente manera:

INICIAL (Peso hasta 46g) **PEQUEÑO**

Peso entre 46 y 50g **MEDIANO** Peso

entre 50 y 58g **GRANDE** Peso entre

58 y 64g **EXTRAGRANDE** Peso entre

64 y 70g **GIGANTE** Peso entre 70 y

76g

De igual manera los huevos se clasificaron de acuerdo a las características de limpieza de la cáscara como lo realiza Paredes (2008) en: (0) limpios, (1) ligeramente manchado, (2) moderadamente manchados y (3) sucios.

Para obtener las medidas de grosor de la cáscara se procedió a tomar un trozo de cáscara de la zona ecuatorial del huevo y con el tornillo micrómetro se midió el espesor de la cáscara, siguiendo el procedimiento dado por la Norma INEN 1973 (2011).

b) Detección de *Salmonella*.

Para la detección de *Salmonella spp.* se utilizó el sistema 3M™ P tri i™

Salmonella Express

Procedimiento:

Se pesó 37g de Enriquecimiento Base de *Salmonella* una balanza electrónica.

Se diluyo 37g de Enriquecimiento Base de *Salmonella* en 1000ml de agua destilada, se homogenizo hasta desaparecer los grumos.

Se pesó 0,508mg de Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* y se agregó en los 1000ml de Enriquecimiento Base para *Salmonella*, preparado y esterilizado en autoclave.

Agregamos una cantidad apropiada de la combinación de 3M Enriquecimiento base para *Salmonella* más el 3M Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* a la bolsa de la muestra. Se agito por 10 min para introducir los medios en el interior del huevo

y lograr el desprendimiento de partículas de la cáscara de los huevos y se procederá a incubar 18 horas a 41,5°C.

Para el R-V R10 se pesó 26,8 gramos de polvo y se dispersó en 1 litro de agua desionizada. Se dejó en remojo durante 10 minutos, remolinar para mezclar, se disolvió en 10 ml de volúmenes en botellas taponadas. Esterilizo en autoclave a 115 °C durante 15 minutos.

Luego de la incubación del enriquecimiento se transfirió 0,1 ml a 10 ml de caldo R-V R10. Se incubó 8 horas a 41,5°C.

Colocamos la Placa 3M Petrifilm sobre una superficie nivelada, con la pipeta colocamos 2 ml de agua destilada estéril sobre el centro de la película inferior, dejando caer la película superior sobre el agua destilada para evitar atrapar burbujas de aire.

Colocamos el difusor en el centro de la placa presionamos ligeramente y retiramos el difusor y colocamos la placa durante 1 hora a temperatura ambiente (20-25 ° C) protegida de la luz.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a sembrar por estriado la muestra, utilizando un Asa en las placas Petrifilm previamente preparadas. Incube 24 ± 2 horas a 41,5 °C.

Posteriormente se procedió a la lectura y comparación de colonias marcando con un círculo los presuntos positivos en la película superior.

Para la confirmación bioquímica de las colonias sospechosas se añadió el disco de confirmación 3M a la placa e incubó 4 horas a 41,5 °C.

4. RESULTADOS

Terminado el trabajo de investigación se procedió a la tabulación de los datos utilizando el programa EXCEL 2013 y Sas University Edition 2016.

4.1. PRESENCIA DE SALMONELLA EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Cuadro 3. Presencia de *Salmonella spp.* en las muestras analizadas

Feria libre	Muestras analizadas	Muestras sospechosas	Muestras confirmadas positivas
Tebaida	18	2	0
San Sebastián	18	2	0
Pitas	18	4	0
Mayorista	18	3	0
Total	72	11	0

Fuente: Investigación autor

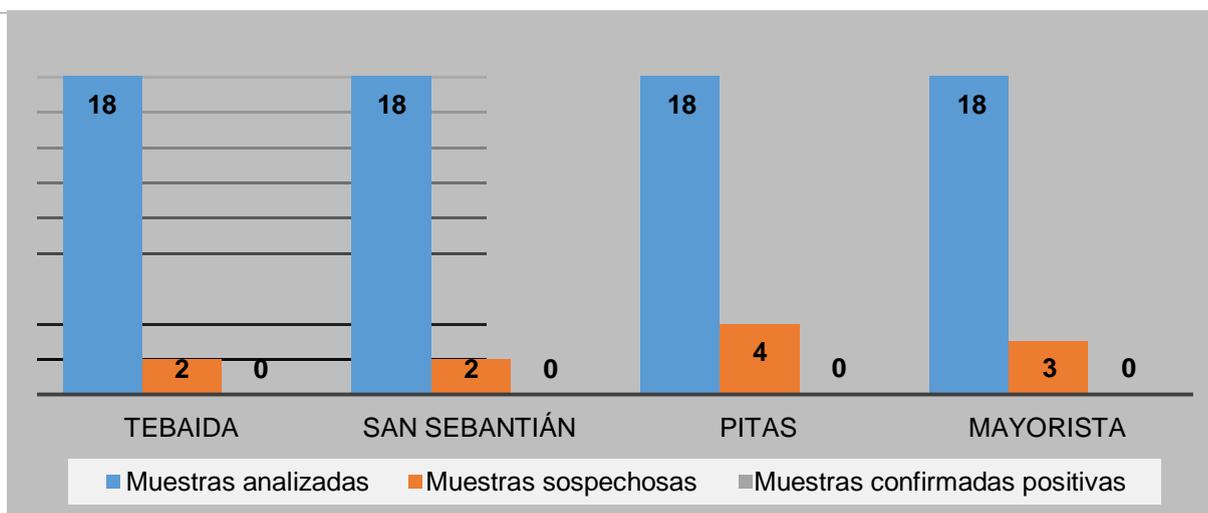


Figura 2. Presencia de *Salmonella spp.* en las muestras analizadas

Se encontraron 11 muestras sospechosas, de las cuales 4 pertenecen a la Feria libre de las Pitas, 3 al Mayorista, 2 a las San Sebastián y 2 a la Tebaida. Ninguna de ellas resultó positiva al disco de confirmación 3M Petrifilm *Salmonella Express*.

4.2. PREVALENCIA DE SALMONELLA DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Cuadro 4. Prevalencia de *Salmonella spp.* en las ferias libres de Loja

Feria libre	Muestras analizadas	Prevalencia, %	Intervalo de confianza 95%
Tebaida	18	0	0 – 6,02
San Sebastián	18	0	0 – 6,02
Mayorista	18	0	0 – 6,02
Las Pitás	18	0	0 – 6,02
Total	72	0	0 - 1,65

Fuente: Investigación autor

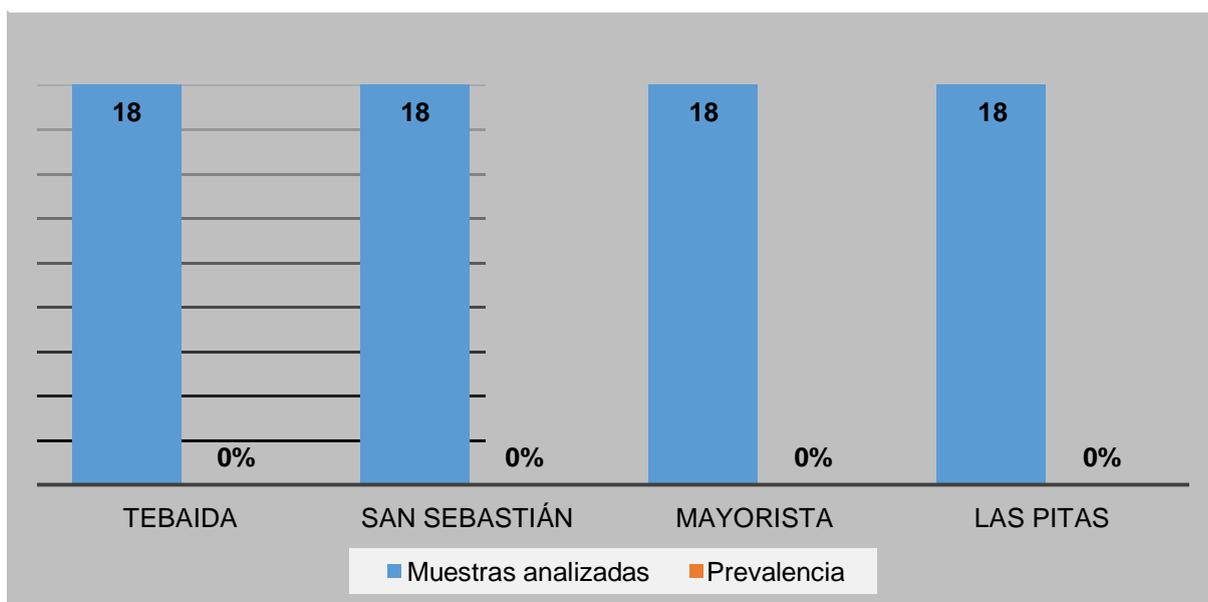


Figura 3. Resultados negativos y presuntos positivos de *Salmonella spp.*

Las 72 muestras analizadas resultaron negativas a la confirmación bioquímica 3M Petrifilm por lo cual se obtuvo una prevalencia del 0% con un intervalo de confianza 95%.

4.3. PROCEDENCIA DE LOS HUEVOS

Cuadro 5. Procedencia de los huevos que se expenden en las ferias libres de Loja

Procedencia	Encuestados
Loja	12
Chuquiribamba	11
Jimbilla	1
Saraguro	34
San Lucas	4
Ambato	4
Manu	1
Desconoce	3
N/R	2
Total	72

Fuente: Investigación autor

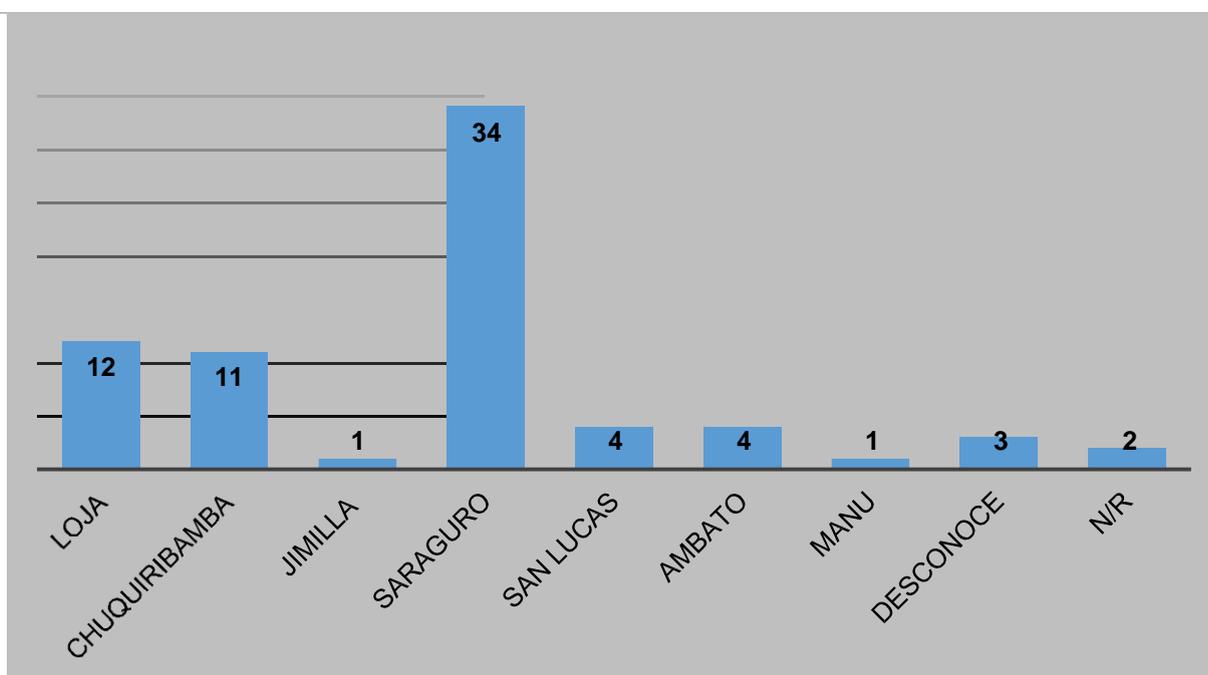


Figura 4. Procedencia de los huevos que se expenden en las ferias libres de Loja

La figura nos indica que la gran mayoría de los huevos y por ende las muestras son originarios de la parroquia Saraguro del Cantón Saraguro, seguida de Loja y Chuquiribamba.

4.4. LIMPIEZA DE LOS HUEVOS

Cuadro 6. Limpieza de los huevos, valores mínimos y máximos para cada feria libre

Procedencia	Media	IC 95%	MÍN.	MÁX.
Las Pitas	1,13	0,42	0,71	1,55
Mayorista	1,07	0,42	0,65	1,49
San Sebastián	1,19	0,42	0,77	1,61
Tebaida	1,10	0,42	0,68	1,52
EE¹	0,14			
P-valor	0,81			

Fuente: Investigación autor

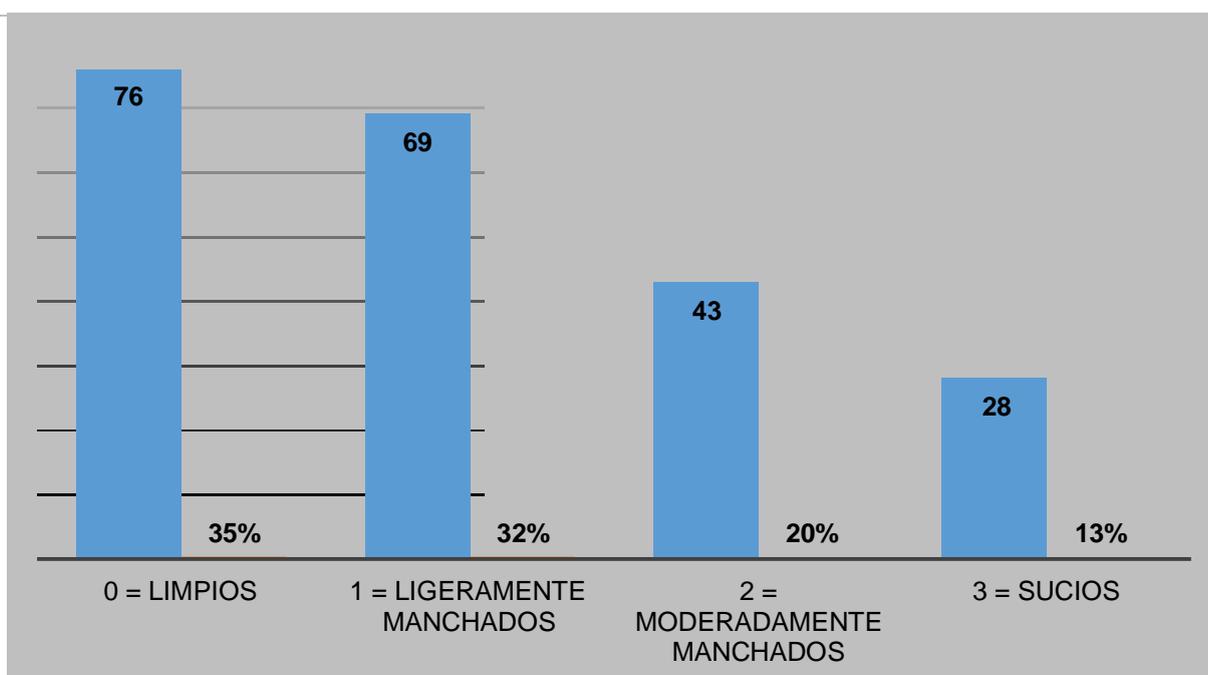


Figura 5. Clasificación de las muestras según la limpieza de su cáscara

En la limpieza externa de los huevos se obtuvo los siguientes resultados, el 35 % (76 huevos) de las muestras se clasificaron como grado “0” (limpios), el 32% (69 huevos) como grado de limpieza “1” (ligeramente manchados), así mismo el 20% (43 huevos) corresponde al grado “2” (moderadamente manchados) y únicamente el 13% (28 huevos) corresponde al grado “3” (sucios).

4.5. MANERA DE ALMACENAMIENTO DE LOS HUEVOS

Cuadro 7. Almacenamiento de los huevos que se comercializan en las ferias libres en Loja

Ferias libres	Almacenamiento de los huevos					
	Ambiente	Refrigeración	Canasta	Cubeta	Funda	N/R
Tebaida	2	0	10	6	0	0
San Sebastián	2	0	12	0	3	1
Las Pitas	0	6	8	0	4	0
Mayorista	0	3	6	0	0	9
Total	4	9	36	6	7	10

Fuente: Investigación autor

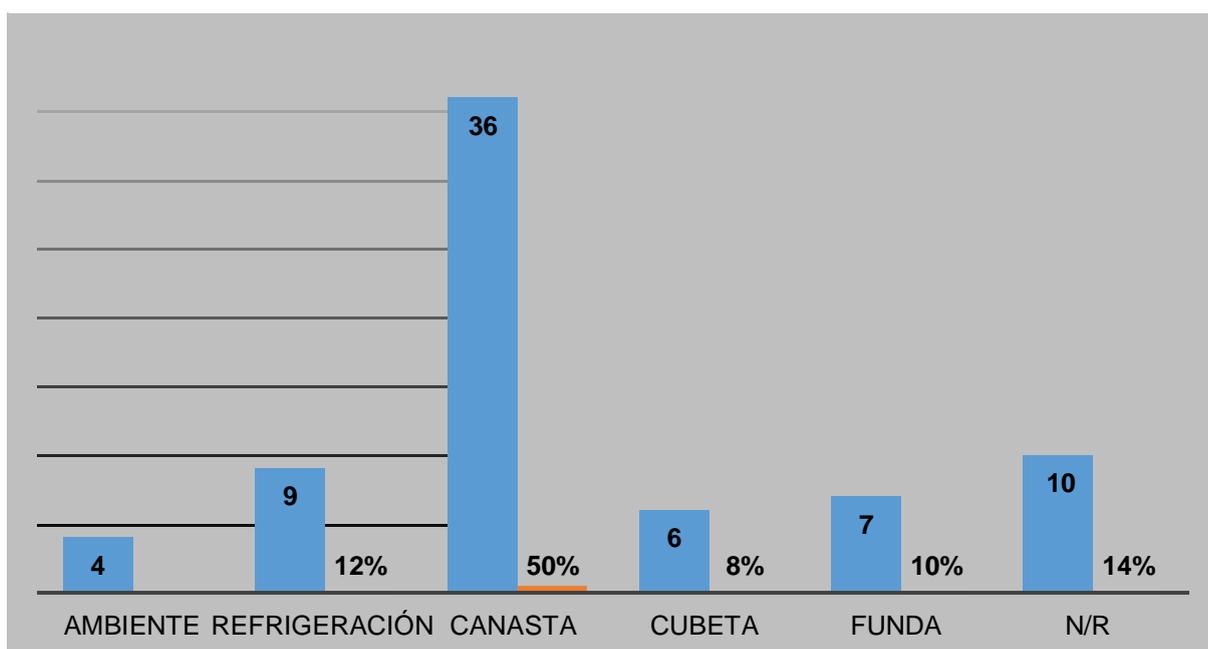


Figura 6. Almacenamiento de los huevos que se comercializan en las ferias libres en Loja

El 50% de los encuestados afirmaron en su totalidad, que los huevos son almacenados en canastas, el 12% los mantiene en refrigeración, el 14% no respondieron la pregunta, el 10% los colocan en fundas, el 8% los almacena en cubetas y el 6% los mantiene en el ambiente este último está expuesto al polvo factor que favorece la proliferación bacteriana en los productos.

4.6. PESO DE LOS HUEVOS

Cuadro 8. Peso promedio huevos valores mín y máx para cada feria libre de Loja

Procedencia	Media	IC 95%	MÍN.	MÁX.
Las Pitas	56,6	2,94	53,66	59,54
Mayorista	57,1	2,94	54,16	60,04
San Sebastián	55,9	2,94	52,96	58,84
Tebaida	54,8	2,94	51,86	57,74
EE¹	0,98			
P-valor	0,38			

Fuente: Investigación autor

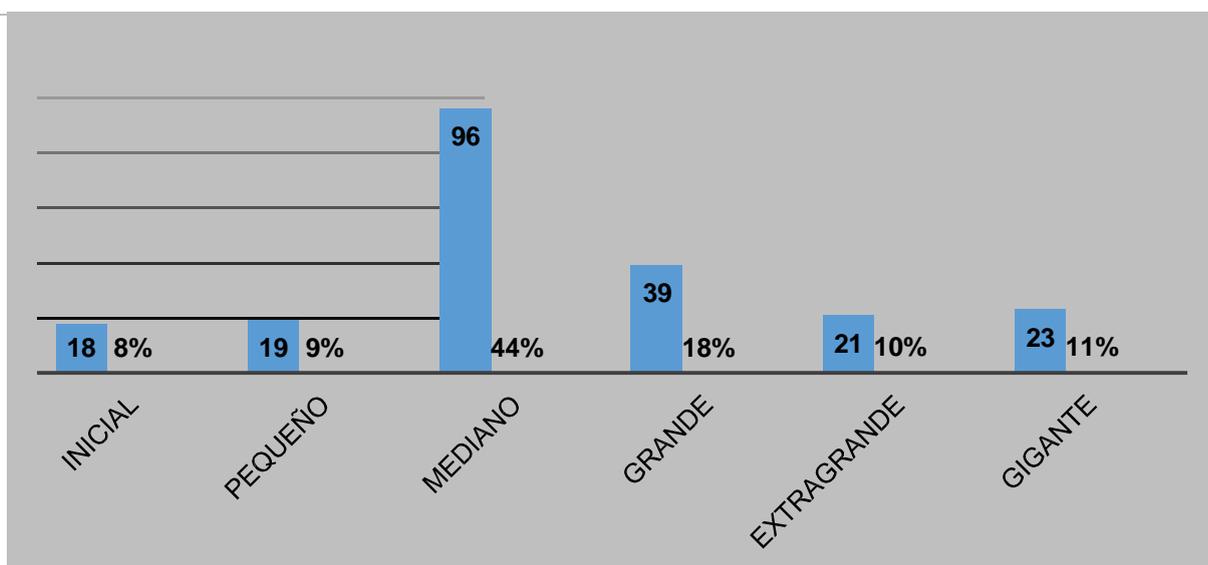


Figura 7. Porcentaje de huevos que se comercializan en Loja según su peso

La figura siete representa de mejor manera la clasificación de los huevos recolectados en las ferias libres de Loja según su peso, donde los huevos de clasificación “Mediano” son los más comunes conformando el 44% del total analizados, el peso promedio de las muestras esta entre 54,8g (Tebaida) y 57,1 (Mayorista). Valores que están comprendidos en la Clasificación de la Norma INEN como “Medianos”.

4.7. GROSOR DE LA CASCARA

Cuadro 9. Grosor de cáscara (mm), datos por Feria Libre

Procedencia	Media	IC 95%	MIN.	MÁX.
Las Pitas	0,25	0,015	0,235	0,265
Mayorista	0,25	0,015	0,235	0,265
San Sebastián	0,26	0,015	0,245	0,275
Tebaida	0,25	0,015	0,235	0,265
EE¹	0,005			
P-valor	0,67			

Fuente: Investigación autor

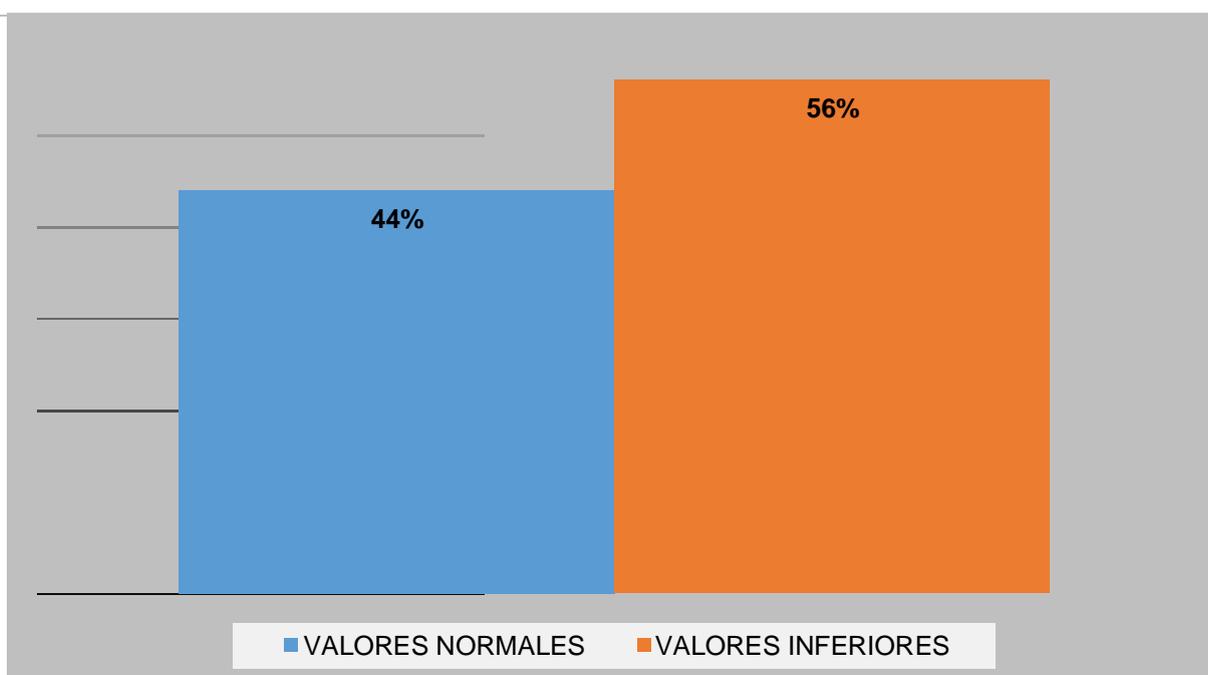


Figura 8. Proporción de muestras dentro de los valores normales

El 44% de las muestras analizadas están entre los límites normales (entre 0,28 y 0,37 mm) según la norma INEN 1973 (2011), mientras que el resto de muestras (56%) están por debajo de los valores normales. establecidos por la norma INEN

4.8. DETERMINACIÓN DE LA ESPECIE MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y GENOTIPIFICACIÓN

En virtud de que no dieron positivo a la presencia de *Salmonella ssp*, a nivel de laboratorio, en la pruebas de Petrifilm ninguna de las muestras colectadas en las ferias libres de Loja, no se pudo concretar los siguientes objetivos y sus variables, que se relacionaban con determinar la especie de *Salmonella spp.* y su genotipificación mediante biología molecular.

5. DISCUSIÓN

5.1. DETECCIÓN DE SALMONELLA

La investigación no demostró la presencia de *Salmonella spp.* en los huevos expendidos en las Ferias libres de la ciudad de Loja, pese a que las muestras fueron sometidas a protocolos microbiológicos que favorecen el desarrollo selectivo de *Salmonella spp.* a partir de muestras de alimentos, investigaciones llevadas a cabo por Sánchez (2013) reveló que la incidencia de *Salmonella spp.* en las granjas avícolas de la Provincia de Tungurahua, alcanzó una prevalencia de 0,0133%, otros estudios coinciden con los resultados obtenidos por Estrada & Valencia (2012), quienes tampoco detectaron *Salmonella spp.* en muestras de huevos analizadas en Mercados de la ciudad de Quito; de igual manera Mancera *et al.* (2005) obtuvieron un resultado 100 % negativo a *Salmonella spp.* en huevos de gallinas de traspatio. La presencia de *Salmonella spp.* en huevos y ovoproductos es muy variable y podría estar influenciada por el número de muestras analizadas, condiciones de transporte, almacenamiento, manipulación y procesamiento. En el Ecuador, hay escasos estudios de salmonelosis y menos aún estudios orientados a la detección de *Salmonella spp.* en huevos. La *Salmonella spp.* es una bacteria de difícil cultivo y compete con otros miembros de la familia Enterobacteriaceae provenientes del medioambiente, heces fecales y la manipulación, que dificultan su desarrollo en los medios de cultivo (INEN, 2009).

5.2. CONDICIONES DE MANEJO HIGIENICO SANITARIO.

Van Hoorebecke (2010) pronuncia que las medidas de limpieza son factores influye en la contaminación interna del huevo. Los encuestados afirman limpiar las impurezas con o un trapo húmedo. Begazo (2007) manifiesta que este tipo de labor puede perjudicar la calidad microbiológica del huevo al remover la cutícula de la cáscara y ser una puerta de entrada para que se contamine el huevo por el paso de microorganismos a través de las porosidades de la cáscara. Sánchez (2013) asevera en su trabajo realizado que durante la recolección de huevos y la toma de información en grajas, se pudo evidenciar ciertos problemas especialmente de tipo sanitario durante la recolección y almacenamiento de huevos. Probablemente, estas condiciones pueden generar contaminaciones cruzadas que podrían afectar a los

huevos con *Salmonella spp.* y otras bacterias. En nuestra investigación se obtuvo los siguientes datos: El 35 % de las muestras se clasificaron como grado "0" (limpios), el 32% como grado de limpieza "1" (ligeramente manchados), así mismo el 20% corresponde al grado "2" (moderadamente manchados) y únicamente el 13% corresponde al grado "3" (sucios). Valores que se asemejan a los mencionados por Paredes, (2008) que obtuvo mayor cantidad de huevos con aspecto limpio y ligeramente manchados representando 82%, Debiéndose la presencia de manchas al contacto de los huevos con heces en los nidales y demás superficies sucias; Oliveira (2011) revela que se deben efectuar por lo menos tres recolecciones diarias de huevos para disminuir la cantidad de huevos sucios.

5.3. PESO DE LOS HUEVOS

El peso promedio de los huevos muestreados fue del 56,1 g entrando en la clasificación GRANDE según la NORMA INEN 1973(2011). Juárez, A.; E. Gutiérrez; J. Segura & R. Santos (2010) obtuvieron un peso promedio de 50,7g en huevos de gallinas de traspatio. El promedio obtenido en esta investigación está por debajo de lo expuesto por el Instituto de Estudios del Huevo (2007) que menciona que el peso promedio del huevo es de 60g; de la misma manera Hy line (2001) establece un peso promedio del huevo a las 32 Semanas de 62.3 g pero estos son valores de sus gallinas ponedoras de alta genética. La medida del peso del huevo es muy variable y depende de muchos factores. North & Bell (1998) señalan que el peso del huevo depende principalmente de la edad del ave, del tamaño de la yema, de la variación individual entre gallinas y del medio ambiente de producción. Debemos considerar que nosotros desconocemos la edad, estado de salud y nutricional del ave pudiendo ser gallinas demasiado jóvenes o viejas que influyen en el promedio de peso de huevo obtenido.

5.4. GROSOR DE LA CASCARA

En la presente investigación se obtuvo como resultado la medida de Grosor de cáscara en promedio de 0,25 mm estando este valor por debajo del rango normal que establece la norma INEN 1973 (2011) establece el valor normal de grosor de la cáscara es de 0,28 y 0,38mm. Además Guerra, L.; F. Uña; F. González & J. Vargas. (2010) obtuvieron un promedio de 0,35mm superando al promedio obtenido en nuestra investigación. Este resultado se explica ya que el sistema de producción

avícola de traspatio recibe una dieta a base de grano (maíz o sorgo), con limitaciones de “calcio y fósforo, como minerales estructurales de la cáscara” (García *et al.*, 2001). Aparte de esta deficiencia nutricional, la edad de la gallina, ritmo de postura, tamaño del huevo, estado de salud de la parvada y problemas de manejo producen fragilidad de la cáscara (Estrada *et al.*, 2008).

6. CONCLUSIONES

En la presente investigación que se llevó a cabo en las principales ferias libres en la ciudad de Loja se puede determinar las siguientes conclusiones:

No se evidenció la presencia de *Salmonella spp.* en huevos de gallina criollas comercializados en las ferias libres de Loja. En los análisis microbiológicos de muestras sospechosas, se aplicó el disco de confirmación, siendo su resultado negativo.

Las prevalencias de *Salmonella spp.* en las ferias libres de Loja es del 0% con un intervalo de confianza 95%.

La gran mayoría de los huevos y por ende las muestras son originarias de la parroquia Saraguro del Cantón Saraguro, seguida de Loja y Chuquiribamba.

Se concluyó que 35 % (76 huevos) de las muestras se clasificaron como grado "0" (limpios), el 32% (69 huevos) como grado de limpieza "1" (ligeramente manchados), así mismo el 20% (43 huevos) corresponde al grado "2" (moderadamente manchados) y únicamente el 13% (28 huevos) corresponde al grado "3" (sucios).

El 50% de los encuestados afirmaron en su totalidad, que los huevos son almacenados en canastas, el 12% los mantiene en refrigeración, el 14% no respondieron la pregunta, el 10% los colocan en fundas, el 8% los almacena en cubetas y el 6% los mantiene en el ambiente este último está expuesto al polvo factor que favorece la proliferación bacteriana en los productos.

Los huevos de clasificación "mediano" son los más comunes conformando el 44% del total analizados, el peso promedio de las muestras está entre 54,8g (Tebaida) y 57,1 (Mayorista).

El 44% de las muestras analizadas están entre los límites normales (entre 0,28 y 0,37 mm) según la norma INEN 1973 (2011).

No se realizó la genotipificación al resultar las muestras negativas al disco de confirmación.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda un manejo sanitario de los nidales para reducir la carga bacteriana existente.

Recolectar los huevos 3 veces al día para evitar la contaminación de heces por parte de las gallinas.

Efectuar muestreos directamente de los lugares de procedencia de las aves: de sus nidales; materiales de recolección y lugares de almacenamiento de los huevos.

Realizar estudios similares de carácter longitudinal con mayor número de muestras en huevos de aves de granja o de producción industrializada.

Evitar limpiar los huevos con trapos o franelas, pues esta práctica produce daños en la cutícula de la cáscara del huevo y favorece el ingreso de microorganismos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Arias, J., Fernández, M., & Caplan, A. (1991). Absence from avian eggshell membranes of epitopes recognized by antikeratin antibodies. *Poultry Science*. 70: 1647-1650.

Baker, R.C., R.A. Qureshi, T. S. Sandhu and J.F. Timoney. 1985. The frequency of *Salmonella* on duck eggs. *Poultry Science*. 64 (4):646 - 52.

Begazo, S. (2007). "Manejo Del Huevo Fértil: Efectos Sobre La Calidad Del Pollo Bb". *Memorias Del Congreso Nacional. AMEVEA*.

Bellairs, R., & Boyd, V. (1969). Scanning electron microscopy of the shell membranes of the hen's egg. *Z. Zellforsch*. 96:237-249.

Board, R., & Scott, V. (1980). Porosity of the avian eggshell. *American Zoologist*. 20 (2): 339-349.

Borie, P., y Ch. Sánchez. 1998. *Salmonella enteritidis*: un nuevo desafío. *Tecno Vet*. Año 4. Número 2.

Castillo, V., A. Valdés, E. Cisneros y O. Pérez. 1996. Determinación de salmonela y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. *Revista Cubana Alimen. Nutr*. 10 (2):215-218.

Ching - Lee, M. R., A. R. Katz, D. M. Sasaki, and H. P. Minette. 1991. *Salmonella* egg survey in Hawaii: evidence for routine bacterial surveillance. *Am. J. Public Health*. 81(6): 764-766.

Clerc, M. 2005 "Detección de *Salmonella* spp. en huevos de gallina comercializados en ferias de la ciudad de Valdivia." *Memoria de título, Méd. Vet. Universidad Austral, Fac. Cien. Vet. Valdivia, Chile*. 23 p.

Cook, M., Beissinger, S., Toranzos, G., Rodriguez, R., & y Arendt, W. (2003). Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation?. *Biological sciences*. 270 (1530): 2233-2240.

Dennis, J. E., Xiao, S., Agarwal, M., Fink, D., Heuer, A., & A., a. C. (1999). Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from White Leghorn chickens (*Gallus gallus*). *Journal of Morphology*. 228 (3): 287-306. Obtenido de http://labmicrovet.weebly.com/uploads/5/1/5/3/51532559/tesis__cecilia_paredes.pdf

De Reu, K., K. Grijspeerdt, M. Heyndrickx, M. Uyttendaele, J. Debevere and L. Herman. 2006b. Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens. *British Poultry Science*. 42(2): 163-172.

Estrada, & Valencia. (julio de 2012). Determinación de *Salmonella* spp. en Huevos Frescos de Gallina en los Principales Mercados de la Ciudad de Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/599/1/T-UCE-0014-20.pdf>

FAO/OMS. (2002). depósito de documentos de la fao. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/008/y1332s/y1332s05.htm>

FARMER, J.J. 2003. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: MURRAY, P. BARON, E., JORGENSEN, M. YOLLUN, R., (Eds). 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. 1. 8th ed. ASM Press. Washington, D.C.

Fernández, M., & Arias, J. (2000). La cáscara del huevo: un modelo de biomineralización. *Monografías Med. Vet.* 20 (2): 50-60. Obtenido de http://labmicrovet.weebly.com/uploads/5/1/5/3/51532559/tesis__cecilia_paredes.pdf

García, L. et.al, MSP (2009). *Guía Operativa Para la Investigación Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por agua y alimentos (ETA) (Casos, Brotes Y Epidemias)*. Quito: Ministerio De Salud Pública Del Ecuador. pp.

Garcés. 2015. Actividad Avípecuaria. La salmonella bajo control. El uso de prebióticos como herramienta adicional a la vacunación. Lima – Perú. . (en línea). Disponible en: <http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/la-salmonela-bajo-control-El-uso-de-Probioticos-como-herramienta-adicional-a-La-vacunacion.html>

Gantois et. Al (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. Review article. Gantoisl, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey T & Immerseel F. *Federation of European Microbiological Societies. FEMS Microbiol. Rev* 33. 718–738.

Guerra, L.; F. Uña; F. González y J. Vargas. (2010). Caracterización de huevos clasificados como no aptos por su peso y forma procedentes de reproductoras ligeras, semirrústicas y pesadas. Vol. 22 (1): pp. 44-48, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba.

Gutiérrez-Triay, M., J.C., S.-C., López- Burgos, L., Santos-Flores, J., Santos-Ricalde, R., SarmientoFranco, . . . y Molina-Canul, G. (2007). Características de la avicultura de traspatio en el municipio de Tetz, Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 7:217 - 224. Mexico.

Hunton, P. (2005). Research on eggshell structure and quality: an historical overview. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 7(2): 67-71.

INEN, (2009). Norma Técnica Ecuatoriana. NTE-INEN 1529-15:2009. Control Microbiológico De Los Alimentos. Salmonella. Método De Detección. Primera edición. Instituto Ecuatoriano de Normalización.

INEN, 2011. Norma Técnica Ecuatoriana NTE-INEN 1973:2011. Huevos comerciales y ovoproductos. Requisitos. Primera revisión. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito-Ecuador.

ISP. (2009). estudio de la prevalencia en huevos del bioterio del intituto de la salud publica de chile para produccion interna. Obtenido de <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/05/Salmonella%20en%20huevos%202009.pdf>

Jones, D. R., & Musgrove, M. T. (2005). Correlation of eggshell strength and Salmonella enteritidis contamination of commercial shell eggs. *J. Food Prot.* 68(10): 2035-2038.

Juárez, C., & Ortiz, A. (2001). Estudio de la incubabilidad y crianza en aves criollas de traspatio. *Vet. Mex.* 32 (1): 27-32.

Koelkebeck, K. (1999). What is Egg Quality and Conserving It. *ilini Poultry Net The Online Resource for the Poultry Industry*.

Mancera, A; J. Vázquez; M. Ontiveros; S. Durán; D. López y V. Tenorio (2005) Identificación de Salmonella enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México” Técnica Pecuaria en México, vol. 43, núm. 2, pp. 229-237 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Mérida, México. 10p.

Mogamedi, K.L.M., E.M.A. Goyvaerts, S.N. Venter y M.M. Sibara. 2007. Optimization of the PCR-invA primers for the detection of Salmonella in drinking and surface waters following a pre-cultivation step. Water S.A. 33:195-202.

Molina Martinez, P. (Julio de 2013). Comparación de dos sistemas de producción y de manejo sanitario de las aves criollas de traspatio en los municipios de Ignacio de la Llave y Teocelo, Veracruz. Obtenido de <http://www.uv.mx/veracruz/uvca366-agronegocios-sustentables/files/2013/12/Molina2013-Aves-de-traspatio-Tesis.pdf>

Moran, T., & Hale, H. (1936). Physics of the hen's eggs. I Membranes in the egg. J. Exp. Biol. 13: 35-40.

Murray, P. (2009). Microbiología médica. Patrick R. Murray, Ken S. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/599/1/T-UCE-0014-20.pdf>

NCBI. (2012). Taxonomía de Salmonella. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. USA.

Neira, M. (2004). Seguridad alimentaria en huevos y productos. Instituto de estudios del huevo 1° edición. Recuperado el 20 de Enero de 2016,

Oliveira 2011. Manejo de la producción de huevos de calidad; Disponible en: <http://www.elsitioavicola.com/articulos/1992/manejo-de-la-produccion-de-huevos-de-calidad/>

OIE. (2008). Trad. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/599/1/T-UCE-0014-20.pdf>

Paredes, A. M. (2007). Carga Bacteriana en la Superficie de Huevos Provenientes de Aves de Traspatio Comercializados en el Mercado Central de la Ciudad de Chillan.

Parsons, A. (1982). Structure of the eggshell. Poultry Science. 61: 2013-2021.

Quinn. (2011). Veterinary microbiology and microbial disease. 2da. Edición. P.J. Quinn, B.K. Markey, F.C. Leonard, E. S. FitzPatrick, S. Fanning, P.J. Hartigan. Blackwell Publishing Ltd. pp. 273,274.

Ray, B. (2010). Fundamentos de microbiología de los alimentos / Bibek Ray, Arun Bhunia. 4^o ed. México: McGraw-Hill. Cap. 25. pp. 202-207. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/599/1/T-UCE-0014-20.pdf>

Sánchez M. (abril de 2013). DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE ENTEROBACTERIAS DEL GÉNERO Salmonella spp. EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA DE EMPRESAS AVÍCOLAS DE LAPROVINCIA DE TUNGURAHUA. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1157/1/T-UCE-0014-36.pdf>

Segura Correa, J., Jerez Salas, M., Sarmiento Franco, L., & Santos Ricalde, R. (2007). Comparación de dos sistemas de producción y de manejo sanitario de las aves criollas de traspatio en los municipios de Ignacio de la Llave y Teocelo, Veracruz.

Terragno, R; Caffer, M; Bruna, S y Binsztein, N. 2003. Manual de Procedimientos. Salmonella: Parte I. Aislamiento, Identificación y Serotipificación.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Global Salm – Surv y CDC. Buenos Aires Argentina.

Vargas, S. L., García, M. A., Palma, G., & Librado, P. (2005). Integración de la lombricultura en la producción de aves de traspatio en Puebla, México. Fundación Cátedra Iberoamericana. México. Recuperado el 24 de junio, 2013.

Villacís, G., Escudero, G., Cueva, F., & Luzuriaga, A. (2014). Características Fenotípicas De Las Gallinas Criollas De Comunidades Rurales Del Sur Del Ecuador, Centro de Biotecnología, Vol. 3 Nro. 1.

Wattiau, P., C. Boland y S. Bertrand. 2011. Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica subtyping: gold standards and alternatives. Applied and Environmental Microbiology 77:7877-7885.

9. ANEXOS

ANEXO 1. Encuesta realizada a vendedores, en los sitios de muestreo

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
AREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Fecha: _____ Muestra #: _____

Buenos días estimados (a) comerciante; la presente encuesta se realiza con el único fin de recopilar datos necesarios para la realización del trabajo de investiga titulada: “Determinación de la presencia de *Salmonella spp.* en huevos de gallina de traspatio comercializados en la ciudad de Loja”

Por lo que solicito su participación, desde ya agradezco su valiosa colaboración al dignarse responder las siguientes preguntas:

ENCUESTA

1. Feria libre.....

2. Los huevos que vende son de su producción o compra a intermediarios.

.....
.....

3. Vende sus huevos:

Al por mayor Al por menor

4. Lugar de procedencia de los huevos

.....
.....

5. ¿Por cuánto tiempo almacena sus huevos para la venta?

_____días

6. ¿Cómo almacena los huevos?

Ambiente Refrigeración Canasta
Cubeta Funda Otros: _____

7. ¿Selecciona los huevos antes de la venta?

Si No
Por tamaño Por color
Elimina los rotos Elimina los defectuosos

8. ¿Limpia los huevos antes de la venta?

Si No
Con un trapo seco Con un trapo húmedo
Formol Cloro Otros

9. ¿Qué hace con los huevos defectuosos o dañados?

Los bota a la basura Los regala Da a los animales Consumo
Otros

10. ¿Realiza desinfecciones de los nidos de las gallinas?

Si No

11. ¿Vacuna a sus gallinas?

Si contra que enfermedades.....
No

12. Conoce enfermedades existentes en la zona de procedencia de los huevos

.....
.....

ANEXO 2. Fotografías



Figura 9. Recolección y sellado de las muestras



Figura 10. Pesaje en gr de los medios a utilizar



Figura 11. Preparación del medio de enriquecimiento



Figura 12. Lavado de los huevos en el medio de enriquecimiento



Figura 13. Incubación de las muestras



Figura 14. Identificación de colonias sospechosas