

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTÉCNIA

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

“CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA (*Salmonella spp*) EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINAS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL SISTEMA MICROGEN GN A EN LA PARROQUIA COTALÓ.”

“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista”

FABIÁN RODRIGO ACOSTA VARGAS

Tutora: Dra. Mg. MAYRA ANDREA MONTERO RECALDE

CEVALLOS – ECUADOR

2016

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El suscrito, Fabián Rodrigo Acosta Vargas, portador de la cédula de identidad número: 1804367637, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final Del proyecto de investigación titulado: “CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA (*Salmonella spp*) EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL SISTEMA MICROGEN GN A EN LA PARROQUIA COTALÓ” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

.....  
**Fabián Acosta**

## **DERECHOS DE AUTOR**

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA (*Salmonella spp*) EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL SISTEMA MICROGEN GN A EN LA PARROQUIA COTALÓ” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

.....  
**Fabián Acosta**

**“CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA (*Salmonella spp*) EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINAS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL SISTEMA MICROGEN GN A EN LA PARROQUIA COTALÓ”**

REVISADO POR:

-----  
Dra. Mg. Mayra Andrea Montero Recalde  
**TUTOR**

-----  
Dr. Mg. Marco Antonio Rosero Peñaherrera  
**ASESOR DE BIOMETRÍA**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

-----  
Dr. Mg. Hernán Zurita Vasquez  
**Presidente del tribunal**

-----  
FECHA

-----  
Dr. Mg. Gerardo Enrique Kelly Alvear  
**Miembro del tribunal**

-----  
FECHA

-----  
Dr. Mg. Marco Antonio Rosero Peñaherrera  
**Miembro del tribunal**

-----  
FECHA

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque día a día me brinda la oportunidad de superación personal y porque hizo realidad tan anhelado sueño,

A mis padres por su apoyo incondicional que permitieron cumplir con uno de mis sueños.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la prestigiosa Universidad Técnica de Ambato, por brindarme los conocimientos necesarios durante todo el proceso de mi formación académica.

A mi directora de tesis, Dra. Mayra Montero por su esfuerzo y dedicación, que sin escatimar ningún tipo de esfuerzo, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda culminar el presente trabajo de investigación.

De igual manera agradecer a mi Asesor de biometría, Dr. Mg. Marco Rosero, que me brindo sus conocimientos, guía, y tiempo necesario para la culminación del presente trabajo de investigación, Y por último a mi Asesor de redacción técnica, la B.Q.F. Cristina López por su importante ayuda.

Sin olvidar de agradecer a cada uno de mis amigos y compañeros de aula que día a día compartimos momentos muy agradables y de igual manera agradecerles por su amistad, consejos, apoyo y ánimo durante nuestro proceso de formación profesional.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por la fe y fuerza que me ha dado para luchar por alcanzar uno de mis sueños y ser mi guía durante todo el proceso de formación académica. A mis padres, y abuelita que son las personas más importantes de mi vida y un soporte importante e incondicional durante el transcurso de estos años de estudio.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	3
2.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL.....	9
CAPITULO III.....	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
3.1. HIPÓTESIS.....	22
3.2. OBJETIVOS.....	22
CAPITULO IV.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO.....	23
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR.....	23
4.3. EQUIPOS Y MATERIALES.....	24
4.4. FACTORES EN ESTUDIO.....	25
4.5. TRATAMIENTOS.....	27
4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
4.7. VARIABLES DE RESPUESTA.....	27
4.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	32
CAPITULO V.....	33
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	35
CAPITULO VI.....	36
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXOS.....	40
CAPITULO VII.....	43
PROPUESTA.....	43
7.1. DATOS INFORMATIVOS.....	43
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	43
7.3. JUSTIFICACIÓN.....	43
7.4. OBJETIVO.....	43

7.5.	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD .....	44
7.6.	FUNDAMENTACIÓN.....	44
7.7.	METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO .....	44
7.8.	ADMINISTRACIÓN.....	44



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla. N: 1** RESULTADOS OBSERVADOS DE PRESENCIA DE *Salmonella* EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA ..... 33

**Tabla. N: 2** RESULTADOS ESPERADOS DE PRESENCIA DE *Salmonella* EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA ..... 34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Imagen. 1</b>	Interpretación de especies presuntivas positivas de <i>Salmonella</i> spp.....	30
<b>Imagen. 2</b>	Ejemplo de hojas de resultado.....	32
<b>Imagen. 3</b>	Tabla a color de interpretación de resultados.....	32
<b>Imagen. 4</b>	Presencia de <i>Salmonella</i> Observados.....	33
<b>Imagen. 5</b>	Presencia de <i>Salmonella</i> Esperados. ....	34

## RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

### RESUMEN

En la presente investigación titulada “CARACTERIZACIÓN DE SALMONELLA (*Salmonella spp*) EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINAS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL SISTEMA MICROGEN GN A EN LA PARROQUIA COTALÓ”, tuvo como objetivo tipificar las serovariedades de *Salmonella* mediante la utilización del Sistema Microgen GN A en huevos frescos de gallina y de esta manera se aportó con datos muy relevantes del nivel de contaminación que presentan los huevos.

Se analizaron un total de 229 huevos del total de las granjas pertenecientes a la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua, las muestras se recolectaron en forma aleatoria y mediante una relación porcentual entre las unidades muestrales (producción diaria de cada granja) vs el universo de la muestra (producción diaria de Cotaló).

Después de los procedimientos microbiológicos mediante la utilización de las pruebas cualitativas de confirmación bioquímica para *Salmonella* (Lisina, Ornitina, H<sub>2</sub>S, Glucosa, Manitol, xilosa, ONPG, Indol, Ureasa, Voges Proskauer, Citrato, Triptófano desaminasa.), se detectó la presencia de seis muestras positivas a *Salmonella spp.*, el cual representa el 7,9 % del porcentaje de muestreo y con la ayuda del Sistema Microgen GN A fueron identificados dos serotipos de *Salmonella* las mismas que fueron *Salmonella pullorum* con una presencia de 6,58% y *Salmonella species* con una presencia de 1,32%.

Palabras clave: Contaminación, Huevos, Microbiológico, *Salmonella*, Serovariedades.

## SUMARY

In this research entitled " CHARACTERIZATION OF SALMONELLA (Salmonella spp) IN FRESH EGGS POULTRY By using Microgen GN A IN THE Cotaló PARISH ", aimed to establish serovars of Salmonella using System Microgen GN A eggs fresh chicken and thus provide very relevant data on the level of pollution caused by eggs.

A total of 229 eggs total farms belonging to the Cotaló Parish of the province of Tungurahua were analyzed , samples were collected randomly and by a percentage ratio between sample units ( daily production of each farm ) vs the universe the sample ( daily production of Cotaló ) , after microbiological processes using qualitative tests of biochemical confirmation for *Salmonella* ( lysine, ornithine , H<sub>2</sub>S , glucose, mannitol , xylose , ONPG , indole, urease , Voges Proskauer , citrate , tryptophan deaminase . ) , the presence of six positive samples detected *Salmonella spp* . , Which represents 7.9% of the sampling rate and using the system Microgen GN A were identified two serotypes of Salmonella were the same as *Salmonella pullorum* with a presence of 6.58 % and Salmonella species with the presence of 1,32 %

Keywords: Pollution, Eggs, Microbiology, *Salmonella*, Serovars.

## **CAPITULO I.**

### **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 existe actualmente 142 mil casos de salmonelosis, 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.

Una de las funciones más relevantes que cumple el Médico Veterinario es garantizar la inocuidad alimentaria y la Salud Pública, la cual engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos enfocados a empresas y explotaciones avícolas que forman parte de la cadena de producción alimentaria.

A nivel nacional existe más de 1.600 productores dedicados a la explotación de huevos comerciales los mismos que incluyen la participación de pequeñas, medianas y grandes empresas, (Aconda, 2013). En nuestro país hay alrededor de 9.5 millones de gallinas ponedoras en producción, la misma que podría llegar alcanzar 2.826 millones de huevos al año; de este total, la provincia de Tungurahua tiene 55% de participación, Cotopaxi alcanza el 16%, Manabí el 15%, Pichincha alcanza el 12% y Guayas tiene apenas 2% de aporte en la producción nacional. (CONAVE, 2013)

Dentro de las explotaciones avícolas una de las principales enfermedades zoonóticas y que afecta a las aves es la salmonelosis, la cual tiene dos vías de transmisión, una lateral, horizontal y vertical, convirtiéndose la primera de contagio directo al consumirse este producto. Considerando que el huevo es un producto de consumo

humano masivo por sus grandes propiedades nutricionales tiene un impacto directo sobre la Inocuidad Alimentaria y Salud Pública que forma parte del proyecto del Buen Vivir en nuestro país. Por lo que la presente investigación tiene como objetivo principal, caracterizar las subespecies de *Salmonella* en huevos frescos de gallina mediante la utilización del Sistema Microgen GN A en la Parroquia Cotaló, aportando de esta manera con datos reales y valores estadísticos, al analizar el nivel de contaminación existente en la Parroquia Cotaló.

## CAPITULO II.

### REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Rincón, D; Ramírez et al. (2001) menciona que, “La detección de *Salmonella* sp. en aves de corral y sus productos derivados se realiza utilizando métodos convencionales como cultivos microbiológicos, los cuales presentan limitaciones importantes para la detección eficaz de dicha contaminación ya que los métodos clásicos de diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* sp. son laboriosos, requieren tiempo y no todas las cepas aisladas pueden ser plenamente identificadas, por lo cual la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones. La detección temprana de estos microorganismos prevendría la aparición de brotes y permitiría implementar controles previos a la ocurrencia de la enfermedad, por ello es importante la aplicación de métodos más rápidos y eficaces basados en biología molecular, que faciliten la identificación y por ende el control de la salmonelosis y en general de las enfermedades transmitidas por alimentos”.

En el trabajo de Investigación “Estudio sobre la contaminación de *Salmonella* tradicionalmente producidos los huevos de aves de corral comestibles”. Realizado por (Badouei, M. A., Ghalejooghi et. al. 2012) menciona que, “Uno de los temas importantes de la higiene de los alimentos es la *Salmonella* contaminación de los huevos que pueden causar infecciones transmitidas por los alimentos y las enfermedades en los seres humanos. El objetivo de este estudio fue investigar la *Salmonella* contaminación de los huevos de aves de corral producidos tradicionalmente en Teherán. La contaminación de los huevos a otro *Enterobacteriaceae* también se investigó. Para este propósito, incluyendo 200 huevos, 131 muestras de huevos de pollos y 69 de codornices, gansos y patos (23 muestras de cada especie) fueron investigados. Después de los procedimientos de aislamiento convencionales, *Salmonella* se detectó contaminación en cinco huevos de gallina. Las pruebas serológicas revelaron que todos los géneros aislado pertenecían a serogrupo D y PCR multiplex mostraron que todas las cepas llevados *pv* y *SEFA* genes y secuencia también aleatorio (específica para el género *Salmonella*); por lo tanto, todas las cepas confirmadas como *Salmonella* enteritidis. Prueba de susceptibilidad

antimicrobiana reveló la sensibilidad de todos *Salmonella* aíslos al florfenicol, ceftriaxona, trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol, y oxitetraciclina. Además, excepto los huevos de codorniz, 29 bacterias entéricas se aislaron a partir de huevos, incluyendo 21 *Enterobacter* spp., 4 *Klebsiella* spp., 3 *Escherichiacoli*, y 1 *Proteus* spp. Este estudio indicó que los huevos de aves de corral producidos tradicionalmente estaban altamente contaminados por *enterobacterias*. Por otra parte, los huevos de gallina fueron contaminados por *Salmonella* enteritidis; Por lo tanto, los huevos de gallina no comerciales pueden ser considerados como una amenaza importante para la salud pública.”

En el estudio titulado “Prevalencia y características de *Salmonella* spp aisladas de granjas de ponedoras comerciales en Corea”. Es el trabajo efectuado en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Kyungpook. ( Im MC; Jeonget.al. 2015) menciona que, ”La *salmonelosis* es una de las enfermedades transmitidas por los alimentos más comunes. El brote de esta enfermedad se asocia a menudo con los huevos. En este estudio, la prevalencia y características de *Salmonella* se encuestaron en granjas de ponedoras en Corea. Además, los factores de riesgo que afectan a la prevalencia de *Salmonella* también se evaluaron en estas granjas. De las 32 granjas y 67 rebaños examinados, 19 granjas (59.3%) y 34 rebaños (50,7%) se observaron a ser positivo para *Salmonella* contaminación. *Salmonella* se detectó en el medio ambiente circundante, como heces (41,8%), polvo (40,3% ), cáscaras de huevo (17,2%), así como los contenidos de los huevos internos (5,2%). La incidencia de *Salmonella* positivos se tendió a aumentar cuando el tamaño del rebaño es mayor ( $p = 0,021$ ). Las diferencias en las provincias también afectaron *Salmonella* prevalencia ( $P < 0,001$ ). Los más frecuentemente observadas *Salmonella* serotipos en los rebaños eran *Salmonella* Bareilly (41,2%), *Salmonella* Mbandaka (32,4%) y *Salmonella* Rissen (17,6%). Veinte de los rebaños reveló contaminación multi-serovar, con el aislamiento de 2 a 4 serovares”.

“Como la salmonelosis humana se ha correlacionado varias veces para el consumo de productos de aves de corral en todo el mundo, se requieren estudios continuos para minimizar efectivamente la *Salmonella* en las granjas de la contaminación de la capa y ovoproductos”.



En el trabajo de Investigación “Determinación de *Salmonella* y *Enterobacterias* totales en huevos frescos de gallina”. Realizado por (Castillo, L; Ameyet.al.1995) menciona que: “Se realizó determinación de *Salmonella* y de *Enterobacterias* totales a 330 muestras de huevos de gallina de producción nacional. Se estudió la cáscara y el interior del huevo. En las primeras 180 muestras se analizaron las yemas junto con la claras y en las 150 muestras restantes se analizaron por separado. Se aisló *Salmonella* en 2 (0,60 %) y *Enterobacterias* en 58 (17,57 %) muestras de cáscara. No se aisló *Salmonella* en ninguna de las muestras del interior del huevo. Se obtuvo crecimiento de *Enterobacterias* en 1 (0,3 %) muestra de clara y yema juntas. El estudio de yema y clara por separado se llevó a cabo por la posibilidad de que la alcalinidad de la clara pudiera inhibir cualquier crecimiento microbiano que hubiera en la yema. En ninguna de estas muestras se aisló *Salmonella*, ni tampoco en las muestras de clara creció *Enterobacterias* y en 13 (8,6 %) de las muestras de yema se aisló *Enterobacterias*. La calidad sanitaria de los huevos analizados fue satisfactoria tanto por la determinación de *Enterobacterias* totales como el aislamiento de *Salmonella*”.

En el trabajo de Investigación “Identificación de *Salmonella Enteritidis* en huevo para consumo en la ciudad de México”. Realizado por (Martínez, A; Navarrete et.al.2005) menciona que, “Se muestrearon 400 huevos de 10 marcas comerciales. Se obtuvieron 131 aislamientos considerados en 12 diferentes géneros bacterianos: *Acinetobacter sp.*, *Alcaligene ssp.*, *Bacillu ssp.*, *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. Veinte aislamientos no pudieron ser clasificados. Se obtuvo un huevo contaminado por *Salmonella enteritidis*, el cual en porcentaje del muestreo representó el 0.25 %; sin embargo se encontraron además 11 géneros bacterianos contaminantes que pudieran representar un riesgo para la producción avícola y la salud pública”.

En el estudio titulado “Determinación de *Salmonella spp.* en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la Ciudad de Quito”. Trabajo efectuado en la FMVZ de la Universidad Central del Ecuador (Estrada, J; Valencia B. 2012) menciona que, “No se evidenció la presencia de *Salmonella spp.* En huevos frescos de gallina de 47 expendios encontrados en 15 mercados de la Ciudad de Quito. En los análisis microbiológicos de muestras sospechosas, se confirmó la presencia de otras especies

bacterianas como: *Pseudomona spp.*, *Enterobactercloacae*, *Pantoea spp.*, *Providenciarettgeri*, *Proteusmirabilis*, *Aeromona spp.* Y *Burkholderiacepacia*”.

“Efectuar muestreos directamente en las granjas avícolas industriales a nivel cama; materiales de recolección y lugares de almacenamiento del huevo, realizando estudios comparativos a la presencia de *Salmonella* en otros alimentos de origen animal, como Carne de aves, cerdo y bovino. Del mismo modo se recomienda realizar los estudios en huevos de aves de traspatio”.

En el estudio titulado “*Salmonella enteritidis* en huevos de gallina comercializados en Tunja (Colombia)”. Realizado por (Ramírez, R; Rincón et al. 2015) menciona que, “Se colectaron 230 huevos provenientes de cinco avícolas de diferentes zonas de la ciudad de Tunja y un vendedor independiente ubicado en la plaza de mercado del sur, sin tener en cuenta la fecha de postura ni la forma de almacenamiento del producto. El número de muestras se estimó por conveniencia teniendo en cuenta estudios hechos anteriormente como el de Mancera y colaboradores, donde se procesaron 400 huevos que representaban la producción de huevos en Ciudad de México para el 2005, año en el cual su población era de 8,7 millones de habitantes. Los huevos recolectados de cada uno de los puntos de venta en forma independiente, fueron transportados al laboratorio en un tiempo no mayor una hora dentro un contenedor refrigerado y previamente desinfectado. Las muestras de cascarón se tomaron de la parte externa el mismo, frotando un hisopo estéril sobre la superficie del huevo, seguidamente éstos fueron sometidos a un proceso de desinfección externa del cascarón mediante agua jabonosa y baño en alcohol al 70% durante diez minutos. Las muestras de yema y clara se obtuvieron tomando 3 mL de cada una, empleando jeringas estériles (14). Cada una de las muestras se adicionó en 27 mL de agua peptonada tamponada (medio de pre-enriquecimiento) y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego, 0,1 mL del medio de pre-enriquecimiento fue transferido a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis y 1 mL a caldo selenito cistina (medio de enriquecimiento), incubándose a 42 y 37°C respectivamente durante 24 horas. A partir de los caldos de enriquecimiento selectivo se realizó siembra por agotamiento en medio XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato) y medio SS (*Salmonella-Shigella*). Todo el protocolo para la detección de *Salmonella sp* se realizó por triplicado para cada huevo; y adicionalmente se sembraron muestras directas de cáscara, clara y yema en agar sangre con el fin de recuperar otros géneros bacterianos distintos a *Salmonella sp*.

Los aislamientos obtenidos en los medios de cultivo en placa fueron identificados mediante pruebas bioquímicas convencionales, mientras que para los microorganismos que no pudieron ser identificados a través de este método se identificaron mediante la técnica comercial BBL CRYSTAL Enteric/Nonfermenter ID System® (BecktonDickinson). Para confirmar los aislamientos de *Salmonella* se empleó el sistema MicroScan®, por el cual se obtuvo una identificación presuntiva del serotipo con base en pruebas bioquímicas. Finalmente se realizó confirmación de los serotipos empleando antisueros polivalentes somáticos (O) del grupo D1 (1,9 y 12) y antisueros individuales de los factores 9 y 12, así como el factor 46 del grupo D2”.

En el estudio titulado “Evaluación sanitaria (físico, químico, bacteriológico) del huevo de gallina de traspatio, en expendios del Mercado de la terminal, zona 4 de la Ciudad de Guatemala”. Trabajo efectuado en la FMVZ de la Universidad de San Carlos de Guatemala (Cosano, L. 2003) menciona que, “ Para el examen bacteriológico se procedió a sumergir el huevo en solución salina peptonada dentro de una bolsa plástica estéril , se dejó reposar este durante 10 minutos realizando un lavado al frotarlo, luego se va a procedió a transferir 1 ml de la suspensión a un tubo de ensayo conteniendo 8 ml de caldo de Tetrionato y se incubó durante 24 hrs. a 42 grados centígrados; por último se procedió a recolectar y realizar una nueva siembra en cajas de Petri pequeñas que contengan el Agar Rambach para incubación durante 24 hrs. a 37 grados centígrados. Después de que se realizó este procedimiento se llevó a cabo la lectura e identificación de presencia de *Salmonella spp.* El mismo procedimiento se hizo, pero con un preparado de la mezcla del contenido interno del huevo (clara y yema), del cual se extrajo 1 ml de esta mezcla y se agregó a 8 ml de caldo Tetrionato en tubo, se dejó incubar durante 24 hrs. a 42 grados centígrados, luego se realizó una siembra de este en las placas de Petri con agar Rambach, se incubo durante 24 horas. a 37 grados centígrados, después se realizó una lectura e identificación de la presencia de *Salmonella spp.* En los casos sospechosos se realizaron pruebas bioquímicas como TSI e Urea y siembra en Agar Verde Brillante, los cuales fueron todos negativos Todo el procedimiento de laboratorio, se realizó por el método ISO (Global Salm-Surv) para aislamiento de *Salmonella* de alimentos y heces, bajo las Normas USDA actualizadas.”

En el estudio titulado “Control bacteriológico de huevos provenientes de crianza artesanal, a la venta en el Mercado Municipal de Chillán.”. Realizado por (Fernández, k. 2005).menciona que, “En el procedimiento de homogenización, se quitó la cáscara del huevo y se depositó el contenido interno completo, en una bolsa estéril, luego se adicionó 450 mL de Agua Peptonada Tamponada como diluyente. Se procedió a homogenizar completamente el huevo, para de este modo obtener la dilución  $10^{-1}$ , que fue utilizada para realizar la incubación de *Staphylococcus spp.* y de *Enterobacterias*. El remanente completo de la bolsa estéril (muestra homogenizada) fue utilizado para la detección de *Salmonella spp.*”. “El aislamiento de *Salmonella spp.*, se llevó a cabo según el procedimiento de la FDA/AOAC/BAM modificado (Post, 1997). • Pre enriquecimiento: El remanente de la bolsa estéril con Agua Peptonada Tamponada como medio de pre enriquecimiento, se mantuvo en incubación por 24 + 2 horas a 37°C. • Enriquecimiento selectivo: Se mezclaron en tubos de ensayo, previamente esterilizados 1 mL de cultivo + 10 mL de Caldo Tetracionato. Se mantuvo en incubación 24 + 2 horas a 37°C y se realizó el aislamiento diagnóstico selectivo en placas de Agar Xylosa Lisina Desoxycolato (XLD), las que fueron incubadas por 24 + 2 horas a 37°C (48 horas si era necesario). • Confirmación bioquímica: Se eligieron dos o más colonias sospechosas (colonias de color negro, con halo transparente) desde cada placa de Agar XLD. Se inoculó cada una de las colonias en TSI, LIA y SIM, se incubaron los tres medios a 37°C por 24 horas (48 horas en el caso que LIA no presentara una reacción muy definida).”

En el estudio titulado “Determinación de la Prevalencia de *Enterobacterias* del género *Salmonella spp.* en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la Provincia de Tungurahua”. Trabajo efectuado en la FMVZ de la Universidad Central del Ecuador (Sánchez, M. 2013) menciona que,” De las 50 granjas analizadas, luego de la división por etapas, se obtuvieron 150 muestras en total. De las 150 muestras, se encontró que al cultivo bacteriológico, en caldo de cultivo, crecieron 2 colonias con características de *Salmonella*. Los resultados obtenidos en esta investigación, luego de los estudios de serotipificación e identificación, permite determinar la prevalencia de *Salmonella spp.* existente en huevos frescos en granjas avícolas de la provincia de Tungurahua, siendo del 0.0133% (2/150). De las muestras positivas a la presencia de *Salmonella spp.* 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”.

“El diagnóstico de *Salmonella spp.* dentro de granjas avícolas de la provincia de Tungurahua, alcanzó una prevalencia de 0.0133%, mediante la aplicación de cultivos bacterianos, pruebas bioquímicas y serotipificación. Adicionalmente, se determinó que la *Salmonella* presente en el área de estudio fue *Salmonella entérica subespecie entérica serovar Enteritidis*, misma que, está directamente relacionado con la transmisión y el desarrollo de la salmonelosis en humanos; consecuentemente, la presencia de *Salmonella* en huevos de una de las regiones de mayor producción, podría convertirse en un riesgo para la Salud Pública”.

## **2.2.CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1. Variable independiente:**

#### **Prueba cualitativa de confirmación bioquímica para *Salmonella*.**

En la industria de alimentos generalmente, el aislamiento y la identificación de *Salmonella* se realizan mediante métodos de cultivo tradicionales, que consisten en una serie de etapas tales como: pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo; enriquecimiento en medios líquidos selectivos; aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos; confirmación bioquímica de las colonias sospechosas; y confirmación serológica de dichas colonias, lo que hace que la técnica sea demorada, requiera demasiada mano de obra y puede generar una gran incertidumbre respecto a los resultados obtenidos. Con más de 25 años de experiencia global en la industria de alimentos y bebidas, 3M Food Safety es consciente que la seguridad de alimentos no puede esperar, además, que la industria de alimentos requiere realizar toma de decisiones de forma rápida y confiable, por lo que el desarrollo de métodos de detección rápidos y efectivos son importantes como base de las estrategias de control de *Salmonella*.

Por tal razón, 3M Food Safety ha creado una solución innovadora para la evaluación de microorganismos patógenos basado en la tecnología de las Placas Petrifilm permitiendo realizar una detección cualitativa, seguida de una confirmación bioquímica de *Salmonella spp* en muestras enriquecidas de alimentos y de origen

ambiental de las plantas de alimentos en tan solo 44 horas y sin necesidad de ningún equipo especial.

BENEFICIOS del Sistema 3M Petrifilm *Salmonella* Express encontramos:

- Ahorro de tiempo y dinero: al permitir una confirmación bioquímica de varias colonias presuntivas positivas simultáneamente. Las pruebas se realizan directamente en su laboratorio, sin necesidad de transferir las colonias a ninguna otra placa de agar o realizar la confirmación con otra tecnología o enviarlas a un laboratorio de referencia.
- Mayor Consistencia: Si la comparamos contra la variabilidad asociada a la preparación de agar, la fórmula estandarizada de 3M mejora la consistencia entre los técnicos, los turnos y las plantas.
- Mayor vida útil del producto: Las placas 3M Petrifilm *Salmonella* Express tienen una fecha de vencimiento significativamente más larga que las placas de agar, las que con gran frecuencia deben ser descartadas sin siquiera haber sido usadas.
- Menos espacio: Como son tan compactas, ocupan un 85% menos de espacio que las placas de agar, lo que libera un área valiosa en las incubadoras, las mesas de trabajo, los refrigeradores, y reduce significativamente el volumen de desperdicios. Todas las características anteriormente descritas y ampliamente reconocidas a nivel mundial de las Placas 3M Petrifilm le permitirán sentirse seguro, al incrementar la productividad, garantizar la confiabilidad y sobre, todo mejorar la eficiencia en su laboratorio.

El sistema fácil de usar consiste de:

- **3M™ Base para Enriquecimiento de Salmonella y 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella*:** Medios exclusivos de enriquecimiento para la recuperación y el desarrollo de las especies de *Salmonella*.
- **Placa 3M Petrifilm *Salmonella* Express:** Un medio de cultivo cromogénico listo para el muestreo que es selectivo y diferencial para *Salmonella*, y que provee un resultado presuntivo.
- **3M Petrifilm *Salmonella* Express Disco Confirmatorio:** Contiene un sustrato que facilita la confirmación bioquímica de todas las especies de *Salmonella*.

Las placas 3M Petrifilm son la marca número uno en pruebas de indicadores de alimentos. Noventa de las cien empresas estadounidenses más importantes de procesamiento de los alimentos usan las placas 3M Petrifilm para sus pruebas. (Food Safety, 2013)

#### **A. Sistema Microgen GN A**

El sistema Microgen GN A utiliza 12 sustratos bioquímicos estandarizados (Lisina, Ornitina, H<sub>2</sub>S, Glucosa, Manitol, xilosa, ONPG, Indol, Ureasa, Voges Proskauer, Citrato, TDA. Triptófano desaminasa) en pocillos para identificar la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos no-exigentes Gram negativos (oxidasa negativos y positivos).

#### **Principio del test**

El sistema Microgen GN A comprende una tira de micropocillos que contiene 12 sustratos bioquímicos estandarizados que han sido seleccionados en función de un análisis informático muy extenso de las bases de datos publicadas para la identificación de la familia Enterobacteriaceae y los microorganismos Gram negativos oxidasa positivos y negativos no exigentes más comunes. Los sustratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una suspensión salina del organismo a identificar. Si los sustratos son metabolizados por el organismo, se observará un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos. La permutación de los sustratos metabolizados se puede interpretar usando el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el organismo analizado. Las tiras de GN A han sido diseñadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivas que incluyen los géneros más comunes de la familia Enterobacteriaceae. (Microgen Bioproducts limited, 2014)

#### **2.2.1 Variable dependiente:**

##### **A. *Salmonella*.**

- **Generalidades**

La *Salmonella*, en el ámbito mundial, está asociada con mucha frecuencia a las enfermedades diarreicas, las cuales continúan siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad, (Parra, M; Durango *et. al.* 2002). La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y los animales causada por

microorganismos de dos especies de *Salmonella* (*Salmonella enterica* y *S. bongori*). Aunque fundamentalmente son bacterias intestinales, *Salmonella* está muy distribuida en el ambiente y se encuentran con frecuencia en vertidos de granjas, en las aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal.

Los agentes de *Salmonella* se pueden encontrar también en los alimentos y originando el transporte gastrointestinal asintomático o enfermedades infecciosas en los animales, particularmente en aves y en cerdos. (OIE, 2010)

- **Biología**

Las Salmonelas tienen su localización habitual en el intestino de los vertebrados (de sangre caliente o sangre fría), y son eliminados al exterior por las heces, contaminando el medio ambiente. En el caso de las aves la localización preferente son los ciegos, aunque *S. enteritidis* se ha descrito también en los ovarios y ocasionalmente en el corazón (pericarditis).

Las salmonelas se consideran patógenos intracelulares facultativos, con capacidad invasiva. El contagio, que se suele producir por vía oral (ingestión de alimentos contaminados), no excluye otras vías, principalmente a través de mucosas (principalmente, por inhalación) o aprovechando soluciones de continuidad en determinadas condiciones. En el intestino penetran a través de las células M y por transcitosis alcanzan la submucosa, donde son captadas por los macrófagos, en los que sobreviven, y células dendríticas, que las trasladan a lugares alejados de su punto de entrada. (OIE, 2010)

Desde un punto de vista práctico, que tiene en cuenta la preferencia de hospedador, se diferencian en *salmonelas* específicas, las que únicamente mantienen un hospedador (ej., *S. Typhi*, *S. Abortus ovis*,...), e inespecíficas, las que comparten varios, incluyendo al hombre. Estas últimas son especialmente importantes como causa de gastroenteritis y a ellas nos referimos aquí, por su interés en Salud Pública (ej., *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, etc.) y porque cuantitativamente representan a la inmensa mayoría de los serotipos de *S. entérica* subespecie entérica. (OIE, 2010)



- **Estabilidad**

Son bacterias muy estables en el medio ambiente, pese a carecer de estructuras específicas de resistencia; en condiciones adecuadas de temperatura, humedad relativa y materia orgánica, pueden sobrevivir semanas o meses e incluso llegan a multiplicarse.

Su rango de crecimiento se produce entre 5 y 46 °C (algunos serotipos crecen por debajo de 7 °C y por encima de 49 °C), siendo óptimos valores de entre 37-43 °C. Son, sin embargo, lábiles térmicamente y las temperaturas de pasteurización las destruyen sin dificultad, siendo raras las cepas termo resistentes aunque la adaptación a condiciones ácidas, aumenta su termo resistencia, igual que lo hace los valores de baja actividad de agua. (Rodríguez E, 2014)

- **Etiología**

El género *Salmonella* está constituido por bacilos cortos gramnegativos no esporoformadores, anaerobios facultativos, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* a la que pertenecen. Con la excepción de la serovariedad Gallinarum-Pollorum, son móviles gracias a sus flagelos peritricos.

El género *Salmonella* está constituido por numerosas especies cuya clasificación y taxonomía ha sido objeto de varias modificaciones y cambios. Hasta hace pocos años la más utilizada fue la basada en la ser tipificación de Kauffmann y White, que tenía en cuenta los antígenos flagelares H y los antígenos O (polisacáridos de los lipopolisacáridos) e incluía más de 2.440 serotipos. Recientemente se ha propuesto una clasificación más simple, en 2 especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, ésta última a su vez dividida en varios subgrupos o subespecies (I, II, III, etc.), cada uno de ellos con numerosas serotipos. La *S. entérica* subgrupo I, reúne todas las *salmonellas* aisladas de seres humanos y animales de sangre caliente, incluida la *Salmonella typhi*. Los otros subgrupos reúnen los serotipos de animales de sangre fría o del medio ambiente. Los gérmenes anteriormente designados como *S. arizona*, ahora pertenecen a la *S. entérica subgrupo III*. La *S. bongori* parece ser la predecesora de la *S. entérica* pero le faltan en el genoma los SPI. Mientras se dispone de una clasificación definitiva y estable nos acogeremos a la de Kauffmann-White. (Uribe, C; Suárez, M 2006).

- **Patogenia**

La *Salmonella* presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunos serovars no tienen una estricta adaptación a un huésped, siendo capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies animales y en el hombre, otros serovars sí son específicos, como *S. Gallinarum* para las aves o *S. Typhi* en el caso del hombre.

Las *Salmonellosis* humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoideos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas. (OIE, 2010)

- **Identificación del agente**

El diagnóstico se basa en el aislamiento del microorganismo a partir de tejidos recogidos asépticamente en necropsias o de las heces, de frotis rectales o muestras ambientales, de productos alimenticios o de pienso; se puede diagnosticar también serológicamente la infección anterior o actual de animales por algunos serotipos. Cuando aparece infección en los órganos reproductores, en el embrión o en caso de aborto, es necesario cultivar el contenido del estómago fetal, de los frotis placentarios y también vaginales, en el caso de las aves, los huevos embrionados.

*Salmonella* puede aislarse utilizando varias técnicas, una de las cuales es un pre-enriquecimiento para recuperarlas con daño subletal, medios de enriquecimiento que contienen sustancias inhibidoras para evitar microorganismos competidores, y medios sólidos selectivos en placa para diferenciar *Salmonella* de otras *enterobacterias*.

Para obtener una confirmación definitiva de la cepa aislada, se pueden aplicar varias pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares a los cultivos puros. *Salmonella* posee antígenos llamados somáticos (O), flagelares (H) y de virulencia (Vi), que pueden identificarse mediante sueros específicos de tipo, y después puede determinarse el serotipo por referencia a la fórmula antigénica del esquema de Kauffman–White. Muchos laboratorios necesitan enviar los aislamientos a un laboratorio de referencia

para confirmar por completo la identidad serológica y determinar, cuando sea posible, el fagotipo y el genotipo de la cepa. (OIE, 2010)

- **Mecanismos de transmisión de *Salmonella* en el huevo**

El contenido interno de los huevos recién puestos es generalmente estéril. Al momento de la ovoposición, los huevos tienen cierto grado de contaminación en la superficie debido al paso a través de la cloaca de la gallina. No obstante, en un período de tiempo relativamente corto después de la puesta, en su exterior se pueden encontrar gran cantidad de microorganismos que, bajo condiciones apropiadas pueden penetrar en los huevos, crecer en su interior y alterarlos.

Entre las bacterias encontradas en los huevos existen representantes de géneros tales como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Staphylococcus*.

El riesgo de que un huevo de gallina se contamine por bacterias es mayor de lo que comúnmente podría pensarse. Existen tres posibles vías por las cuales los microorganismos pueden contaminar los huevos: transmisión vertical, horizontal y lateral. (Rincón, D; Ramírez et al. 2001)

#### **A) Transmisión vertical de *Salmonella***

Los huevos pueden contaminarse por transmisión vertical, desde los ovarios y oviductos infectados durante la formación del huevo. El concepto de transmisión vertical considera la contaminación de la superficie del cascarón al pasar el huevo por la vagina, contaminación de la yema en el ovario o contaminación durante el pasaje por el oviducto contaminado.

Se ha establecido claramente que *Salmonella* enteritidis se aloja de manera permanente en los tejidos reproductivos de las gallinas, donde el contenido del huevo puede ser infectado antes de que se forme el cascarón. Las gallinas ponedoras raramente presentan signos de la enfermedad cuando se infectan y continúan su postura y alimentación normalmente, de esta manera las infecciones en el ovario con *Salmonella* enteritidis resultan en la postura de huevos contaminados y en la eclosión de huevos infectados. (Rincón, D; Ramírez et al. 2001)

## **B) Transmisión horizontal de *Salmonella***

La transmisión horizontal, se lleva a cabo cuando *Salmonella* enteritidis u otros microorganismos penetran el cascarón que ha sido contaminado con las heces de la gallina depositadas en el exterior del huevo al pasar a través de la cloaca lo que se ha demostrado en estudios que presentan una correlación positiva entre heces contaminadas de manera artificial con *Salmonella* enteritidis y la presencia de la misma en el interior de los huevos. Adicionalmente, *Salmonella* enteritidis puede penetrar los poros del cascarón (si está presente en la superficie del huevo) a medida que este se va enfriando, antes de que se seque la cutícula. Después de que está formado el cascarón, *Salmonellas* p. se establece en el interior del huevo antes de que se desarrolle en la superficie la barrera de proteína que previene la invasión de bacterias, lo cual permite que este microorganismo colonice y sobreviva en el contenido interno del huevo.

## **C) Transmisión lateral de *Salmonella***

Es una ruta de infección que ocurre por contaminación a través del alimento, agua, e instalaciones o vectores, como por ejemplo, aves silvestres, roedores, animales domésticos y humanos. La penetración al interior del huevo por *Salmonella* y otras bacterias aumenta con la duración del contacto con material contaminado, especialmente durante el almacenamiento a altas temperaturas y alta humedad relativa. La presencia de *Salmonella* enteritidis en el ambiente de las granjas de gallinas ponedoras generalmente es aceptada como una indicación sensitiva y relevante de los huevos contaminados que pueden producirse. El potencial de la circulación del aire para diseminar patógenos en ranchos avícolas es un factor importante en la contaminación de los huevos, esto se ha demostrado en algunos estudios que reportan la presencia de *Salmonella* enteritidis en el aire.

En general, cuando *Salmonella* sp. está presente en el exterior de los huevos muere rápidamente, pero la sobrevivencia puede ser posible por una alta humedad relativa y adecuada temperatura, dejando claro que *Salmonella* enteritidis puede persistir largos períodos de tiempo en huevos almacenados a temperatura ambiente. (Rincón, D; Ramírez et al. 2001)

## 2.2.2 Unidad de análisis

### A. Huevos frescos de gallina.

El huevo es el gameto (célula reproductiva) que aporta el miembro femenino en la reproducción sexual. Es un cuerpo unicelular, de forma esférica o más o menos elíptica (que se denomina ovoide). Tras la fecundación, aloja al embrión durante su desarrollo, proporcionándole los compuestos nutritivos que necesita y la protección necesaria (en el caso de los huevos de reptiles, aves y monotremas, mediante la cáscara, también llamada cascarón). En Biología se denomina también huevo (o cigoto) a la célula resultante de la unión del gameto masculino con el femenino en la reproducción sexual de los animales y de las plantas. El huevo de gallina (*Gallus gallus*) es desde la antigüedad un alimento muy importante para el hombre y su consumo es casi generalizado en todo el mundo en la actualidad, lo que ha dado lugar a una actividad de carácter económico, y sus operadores conforman un sector específico en el conjunto de la producción ganadera y la industria alimentaria. (Instituto de Estudios del Huevo, 2009)

- **Estructura**

El huevo tiene una estructura diseñada por la naturaleza con el fin de proteger y mantener el futuro embrión hasta su eclosión y dar lugar a un pollito. Por ello su contenido es de gran valor nutritivo, capaz por sí mismo de dar origen a un nuevo ser vivo. Por esta razón, el huevo se encuentra protegido de la contaminación exterior por la barrera física que le proporcionan su cáscara y membranas y por la barrera química que le proporcionan los componentes antibacterianos presentes en su contenido.

El corte transversal de un huevo permite diferenciar nítidamente sus partes: la cáscara, la clara o albumen y la yema, separadas entre sí por medio de membranas que mantienen su integridad. Es importante tener en cuenta la estructura del huevo para comprender cómo debe ser manipulado con el fin de garantizar la máxima calidad y seguridad de este alimento. El peso medio de un huevo está en torno a los 60 g, de los cuales aproximadamente la clara representa el 60%, la yema el 30% y la cáscara, junto a las membranas, el 10% del total. (Instituto de Estudios del Huevo, 2009)

- **CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTES DEL HUEVO**

- A. **Cáscara**

La cáscara es la cubierta exterior del huevo y tiene gran importancia, ya que mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Está constituida, en su mayor parte, por una matriz cálcica con un entramado orgánico, en el que el calcio es el elemento más abundante y de mayor importancia. También se encuentran en su composición otros minerales como sodio, magnesio, zinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro, en menores concentraciones.

La cáscara está atravesada por numerosos poros que forman túneles entre los cristales minerales y permiten el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior. Su número varía entre 7 000 y 15 000. Son especialmente numerosos en la zona del polo ancho del huevo, donde aparece la cámara de aire.

El color de la cáscara, que puede ser blanco o marrón según la raza de la gallina, depende de la concentración de pigmentos, denominados porfirinas, depositados en la matriz cálcica y no afecta a la calidad, ni a las propiedades nutritivas del huevo. Los diferentes niveles de coloración dependen del estado individual de la gallina. La alimentación o el sistema de cría no influyen en el color de la cáscara (blanco o moreno) y tampoco en su intensidad (si se trata de un huevo de color).

La calidad o resistencia de la cáscara depende principalmente del metabolismo mineral de la gallina y, a su vez, de una adecuada alimentación. Otros factores que influyen sobre la calidad de la cáscara son la genética, el estado sanitario y la temperatura ambiente.

Toda la superficie de la cáscara, incluso los mismos poros, se encuentra recubierta por una cutícula orgánica que está formada principalmente por proteínas (90%) y pequeñas cantidades de lípidos y carbohidratos. La principal función de esta película de mucina consiste en cerrar los poros, formando una barrera física contra la penetración de microorganismos. También evita la pérdida de agua y da un aspecto brillante al huevo. Tras la puesta se presenta en forma húmeda, luego se seca y se va deteriorando y, entre los dos y cuatro días desde la puesta, desaparece. Si el huevo se lava o se frota, puede desaparecer antes. (Instituto de Estudios del Huevo, 2009)

Las membranas que recubren el interior de la cáscara son dos: membrana testácea interna y externa. Ambas rodean el albumen y proporcionan protección contra la penetración bacteriana. Las membranas testáceas se encuentran fuertemente pegadas entre sí cuando el huevo es puesto por la gallina. Poco tiempo después de la puesta, debido a la contracción del volumen del contenido del interior del huevo al enfriarse (la temperatura corporal de la gallina es de 39 °C, la misma del huevo recién puesto) penetra aire en el polo grueso, por su mayor concentración de poros, y se separan en esta zona las membranas para constituir la cámara de aire.

La membrana interna tiene una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas y la presencia de lisozima en la matriz albuminosa impide la entrada de algunos microorganismos y retarda la entrada de otros. La membrana externa es mucho más porosa y sirve como asentamiento para la formación de la cáscara. Ambas membranas se forman alrededor de la parte comestible del huevo en el istmo, que es la porción del oviducto situada entre el magno y el útero o glándula cascarógena que, tal y como dice su nombre, es el lugar donde se forma la cáscara del huevo.

A medida que el huevo pierde frescura, pierde también agua en forma de vapor a través de los poros de la cáscara y la cámara de aire se expande. Un huevo sometido a altas temperaturas «envejece» antes. La altura de la cámara de aire es una de las medidas de la frescura de un huevo en términos de calidad, independientemente de los días transcurridos tras la puesta. Los huevos de categoría A deben tener una altura de la cámara de aire no superior a 6 mm.

La integridad y limpieza de la cáscara son factores que determinan si un huevo es apto o no para su consumo como huevo fresco. Cuando la cáscara está sucia o deteriorada es posible que los microorganismos adheridos a la superficie penetren al interior del huevo. Por esta razón, no pueden comercializarse para consumo humano directo los huevos cuyas cáscaras presenten suciedad, fisuras o roturas.

La creencia popular sugiere que ingerir la cáscara de huevo triturada permite aprovechar la gran cantidad de calcio que contiene. Sin embargo, la forma química en que se encuentra ese calcio hace que no sea aprovechable por nuestro organismo. (Instituto de Estudios del Huevo, 2009)

## **B. Clara o Albumen**

En la clara se distinguen dos partes según su densidad: el albumen denso y el fluido. El albumen denso rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo. El albumen fluido es el más próximo a la cáscara. Cuando se casca un huevo fresco se puede ver la diferencia entre ambos, porque el denso rodea la yema y esta flota centrada sobre él. A medida que el huevo pierde frescura, el albumen denso es menos consistente y termina por confundirse con el fluido, quedando finalmente la clara muy líquida y sin apenas consistencia a la vista.

La clara o albumen está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (cerca del 12%). La proteína más importante, no solo en términos cuantitativos (54% del total proteico), es la ovoalbúmina, cuyas propiedades son de especial interés tanto desde el punto de vista nutritivo como culinario. La calidad del albumen se relaciona con su fluidez y se puede valorar a través de la altura de su densa capa externa.

Las Unidades Haugh (UH) son una medida que correlaciona esta altura en mm con el peso del huevo y se emplea como indicador de frescura.

La riqueza en aminoácidos esenciales de la proteína de la clara del huevo y el equilibrio entre ellos hacen que sea considerada de referencia para valorar la calidad de las proteínas procedentes de otros alimentos. En la cocina, la ovoalbúmina es particularmente interesante en la elaboración de muchos platos debido a la estructura gelatinosa que adquiere cuando se somete a la acción del calor. En la clara se encuentran algo más de la mitad de las proteínas del huevo y está exenta de lípidos. Las vitaminas B2 y niacina están en mayor cantidad en la clara que en la yema.

La clara es transparente, aunque en ocasiones pueda presentar alguna «nube» blanquecina que no supone ningún problema para su consumo y suele estar relacionada con la frescura del huevo. Sujetando la yema para que quede centrada se encuentran unos engrosamientos del albumen denominados chalazas, con forma de filamentos enrollados, que van desde la yema hasta los dos polos opuestos del huevo. (Instituto de Estudios del Huevo, 2009)



### **C. Yema o Vitelo**

La yema es la parte central y anaranjada del huevo. Está rodeada de la membrana vitelina, que da la forma a la yema y permite que esta se mantenga separada de la clara o albumen. Cuando se rompe esta membrana, la yema se desparrama y se mezcla con la clara.

En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%.

Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y carotenoides. Estos últimos son compuestos de efecto antioxidante y los responsables del color amarillo, que varía en tono e intensidad en función de la alimentación de la gallina. El color de la yema tiene interés comercial, por lo que puede medirse con colorímetros.

En su interior se encuentra el disco germinal, que es un pequeño disco claro en la superficie de la yema, lugar en el que se inicia la división de las células embrionarias cuando el huevo está fecundado.

Ocasionalmente pueden encontrarse huevos con dos yemas. Esto es debido a que la gallina produce en una misma ovulación dos óvulos en lugar de uno, que es lo corriente. Este accidente fisiológico es más común en las aves al principio del período de puesta. (Instituto de Estudios del Huevo, 2009)

## **CAPITULO III.**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

En las granjas avícolas de producción de huevo comercial de la Parroquia Cotaló de la Provincia del Tungurahua se determina la presencia de *Salmonella* mediante la utilización del Sistema Microgen GN A.

#### **3.2. OBJETIVOS**

##### **Objetivo General**

- Caracterizar las subespecies de *Salmonella* en huevos frescos de gallina mediante la utilización del Sistema Microgen GN A en la Parroquia Cotaló.

##### **Objetivos Específicos**

- Determinar la presencia de *Salmonella* en huevos frescos de gallina mediante la utilización de un sistema cualitativo bioquímico en las granjas avícolas de la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua.
- Tipificar las Subespecies de *Salmonella* mediante la utilización del Sistema Microgen GN A.

## **CAPITULO IV.**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO**

En la presente investigación el muestreo se realizó en las granjas avícolas productoras de huevos localizadas en la Parroquia Cotaló.

La Parroquia Cotaló pertenece a la jurisdicción del Cantón Pelileo de la Provincia de Tungurahua, a nivel interno se encuentra conformada por ocho comunidades que son: San Juan, Laurelpamba, Mucubí, San José las Queseras, Panguilí, Pillate, Chacauco, Cusúa y el Centro Parroquial.

**Sus límites son:**

**Norte:** Parroquia Huambaló y La Matriz.

**Sur:** Provincia del Chimborazo.

**Este:** Cantón Baños.

**Oeste:** Cantón Quero y la Parroquia Huambaló.

#### **4.2. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR**

##### **4.2.1. Clima**

El clima es templado variando su temperatura entre 8°C y 17°C, con nubosidad y lluvias permanentes en invierno.

**Región:** sierra

**Población Total:** 1977 habitantes

**Superficie:** 45,5 Kilómetros cuadrados

**Altitud:** 2.560 msnm

**Latitud:** -1.41667

**Longitud:** -78.5

### **4.3.EQUIPOS Y MATERIALES**

#### **4.3.1. Materiales para la toma de muestras.**

- Fundas Wirlpack estériles
- Guantes estériles
- Marcadores permanentes
- Hielera portátil
- Bolsas de hielo químico
- Registro de las muestras
- Registros de ubicación de las granjas

#### **4.3.2. Equipos para el estudio microbiológico.**

- Balanza electrónica (150gr)
- Algodón
- Cajas Petri
- Autoclave
- Pipetas estériles
- Incubadora
- Difusor plano
- Asas de inoculación estériles
- Mechero
- Encendedor eléctrico
- Refrigeradora
- Agua peptonada
- Guantes estériles
- Jeringas estériles
- Huevos
- Alcohol antiséptico
- Agitador magnético con calentador
- Pipetas Pasteur

### **4.3.3. Medios y reactivos para el estudio microbiológico.**

- Agua Destilada Estéril
- 3M™ Base para Enriquecimiento de *Salmonella*
- 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella*.
- Placa 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express.
- 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express Disco Confirmatorio.
- Sistema Microgen GN-ID A (API 20 E)
- Reactivos para revelación de pruebas bioquímicas (Aceite mineral OIL, VP1 = KOH 40%, VP2 =  $\alpha$ -naftol, TDA = FeCl<sub>3</sub> 10%, IND = Reactivo de Kovac o de Dimetilamino- cinamaldehido).
- Solución Salina

## **4.4.FACTORES EN ESTUDIO**

*Salmonella* en huevos frescos de gallina mediante la utilización del Sistema Microgen GN A en la Parroquia Cotaló.

### **4.4.1. Recolección de las muestras**

#### **4.4.1.1 Huevos frescos de gallina**

En el presente trabajo de investigación, las muestras se tomaron en forma aleatoria de las diferentes empresas productoras de huevos de la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua.

El muestreo se realizó mediante la recolección aleatoria de 229 huevos del total de las granjas existentes en la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua.

Las muestras se recolectaron mediante una relación porcentual entre las unidades muestrales (producción diaria de cada granja) vs el universo de la muestra (producción diaria de Cotaló).

Cabe mencionar que las 229 muestras calculadas de acuerdo a la fórmula Epidemiológica Veterinaria para la Determinación del tamaño mínimo de muestra

para demostrar la presencia de una enfermedad propuesta por Canon y Roe citado por Martínez J, (2010); no fueron muestras individuales sino cada muestra constó de un grupo de 3 huevos, dando como resultado final 76 pulls o muestras. Los análisis muestrales fueron tomados específicamente sólo de las yemas de los huevos de acuerdo a la recomendación dada por Castillo L, 1995, en la cual menciona que: *“Para estudios del interior del huevo debe analizarse la yema sola debido a que la alcalinidad de la clara puede inhibir cualquier crecimiento microbiano que hubiera en la yema”*.

#### 4.4.2 Población de muestreo

Para calcular el tamaño de la muestra se empleó la ecuación Epidemiológica de la Determinación del tamaño mínimo de muestra para demostrar la presencia de una enfermedad propuesta por Canon y Roe (Martínez J, 2010).

$$n = \left[ 1 - (1 - \infty)^{\frac{1}{E}} \right] \left[ N - \left( \frac{E - 1}{2} \right) \right]$$

$$n = \left[ 1 - (1 - 0,95)^{\frac{1}{9100}} \right] \left[ 700000 - \left( \frac{9100 - 1}{2} \right) \right]$$

$$n = [1 - (0,05)^{0,0001098}] \left[ 700000 - \left( \frac{9099}{2} \right) \right]$$

$$n = [1 - (0,99967)] [700000 - (4549,5)]$$

$$n = [0,000329147165] [695450,5]$$

$$n = 228,9 = 229$$

#### Donde:

**n** = tamaño de la población.

**N**= Total de individuos en la población muestra. (700000 Producción diaria de huevos de Cotaló).

**E**= Es el número probable de individuos afectados, es igual a la prevalencia estimada por el número de individuos de la población. (P x N)=1,3% Prevalencia tomada de una investigación realizada por Sanchez, M. 2013.

**œ**= Nivel de confianza. Es un valor constante que, si no se tiene su valor, se lo toma en relación al 95%.

Dentro del análisis de las explotaciones avícolas correspondientes a la Parroquia Cotaló, de la Provincia de Tungurahua, realizamos un muestreo aleatorio de 229 huevos; que se obtuvieron mediante una relación porcentual entre las unidades

muestrales (producción diaria de cada granja) vs el universo de la muestra (producción diaria de Cotaló), cabe mencionar que no fueron muestras individuales sino que cada muestra constó de un grupo de tres huevos, exclusivamente solo de las yemas.

#### **4.4.3 Técnicas de recolección de las muestras**

La recolección de los huevos se realizó con guantes estériles, posteriormente fueron colocados dentro de las fundas Wirlpack etiquetadas previamente, guardadas en una hielera portátil y finalmente trasladados al laboratorio donde fueron procesadas. La metodología de diagnóstico de las muestras fue basado en la tecnología de las placas 3M Petrifilm *Salmonella* Express la cual provee una detección cualitativa y una confirmación bioquímica y la tipificación se lo realizó mediante el Sistema Microgen GN A.

#### **4.4.4. Localización de los sitios de análisis de laboratorio**

Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

### **4.5. TRATAMIENTOS**

En la presente investigación no existen tratamientos ya que se determinó la presencia de *Salmonella* y su tipificación.

### **4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Es una evaluación estadística no paramétrica, es decir no existe un diseño experimental lo cual la investigación se centra en una estadística descriptiva, con la utilización de Chi cuadrado.

### **4.7. VARIABLES DE RESPUESTA**

#### **4.7.1 Detección y Tipificación de *Salmonella***

##### **4.7.1.1 Procesamiento microbiológico de los huevos**

Durante todo el proceso de diagnóstico se trabajó guardando todas las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Ambato, en el mismo que se utilizó materiales estériles, se

usó mascarilla, mandil y guantes de látex, y siempre se trabajó frente a un mechero, sin olvidar que se desinfectó la superficie del huevo con alcohol y posteriormente se flamearon antes de iniciar con el procedimiento, además se respetó con los protocolos de instrucción de los métodos de diagnóstico anteriormente mencionados para la determinación y tipificación de *Salmonella*.

Los procesos bacteriológicos de las muestras se realizaron mediante la metodología sugerido por Food Safety, (2013).

## **A. MÉTODO CUALITATIVO BIOQUÍMICO**

### **Suplemento para el Medio**

- 1.- Se pesó asépticamente 0,05 gr del 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de Salmonella.
- 2.- Se pesó asépticamente 37 gr del 3M™ Base para Enriquecimiento de Salmonella

### **Procedimiento de Enriquecimiento**

- 3.- Se Agregó de manera aséptica los 0,05gr del 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de Salmonella a los 37gr del 3M™ Base para Enriquecimiento de Salmonella, previamente preparado en un litro de agua y esterilizado en el autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos.

### **Procedimiento de la Muestra**

- 4.-Las extracciones de las yemas se lo realizó con la utilización de jeringas estériles de 50 cc mediante succión, las cuales posteriormente fueron colocadas en fundas wirlpack estériles para su correcta homogenización.
- 5.-Posteriormente de cada muestra (3 yemas) se Pesó asépticamente 25 gr del contenido dentro de una nueva funda wirlpack estéril.
- 6.- Se Agregó 225 ml de la combinación del Enriquecimiento Base para *Salmonella* más el Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* a la bolsa que contenía la muestra de las yemas y se procedió a homogenizar la muestra.



### **Procedimiento de Enriquecimiento**

7.- La incubación de las muestras enriquecidas se realizó a  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante de 18 a 24 horas.

### **Procedimiento de Hidratación**

8.- La hidratación de las Placas 3M Petrifilm se realizó sobre una superficie plana en la cual se añadió con una pipeta 2,0 mL de diluyente estéril sobre el centro de la película inferior posteriormente se dejó caer suavemente la película superior sobre el diluyente para evitar atrapar burbujas de aire.

9.- Se colocó el Difusor Plano 3M Petrifilm en el centro de la placa y se presionó ligeramente el centro del difusor para distribuir el diluyente de manera uniforme y se lo dejó 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 gelidifique.

### **Inoculación, Incubación**

10.- La realización de la siembra se lo hizo por estriado, desde la parte superior hasta la parte inferior de la placa, para obtener colonias aisladas

11.- Se bajó la película superior para cerrar la Placa 3M Petrifilm *Salmonella* Express y se aplicó un movimiento suave de presión constante sobre la película superior para retirar todas las burbujas de aire del área de inoculación.

12.-La incubación de las placas se lo hizo a  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas en posición horizontal con el lado coloreado hacia arriba.

13.- En la película superior de la Placa 3M Petrifilm *Salmonella* Express, se marcó con círculos las colonias aisladas presuntivas positivas de *Salmonella* usando un marcador permanente de punta fina. Se Confirmó bioquímicamente todos los resultados presuntivos positivos de *Salmonella* mediante el uso del Disco de Confirmación 3M Petrifilm *Salmonella* Express.

### **Confirmación Bioquímica de *Salmonella* spp**

14.- Se levantó la película superior (con las colonias presuntivas de *Salmonella* ya marcadas) de la Placa 3M Petrifilm *Salmonella* Express y se insertó el disco sobre el

gel en forma tal que se evite atrapar burbujas de aire y se procedió a volver a cerrar la placa.

15.- Se Deslizó suavemente los 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 se procedió a la incubación a  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  por 4 a 5 horas

16.-Se retiró el sistema 3M Petrifilm *Salmonella* Express de la incubadora y se procedió a leer los resultados.

Color de la Colonia			Metabolismo de la Colonia		Resultado
Rojo	Rojo Oscuro	Marrón	Zona Amarilla	Burbuja de gas	
●			●		Presuntiva +
●				●	Presuntiva +
●			●	●	Presuntiva +
	●		●		Presuntiva +
	●			●	Presuntiva +
	●		●	●	Presuntiva +
		●	●		Presuntiva +
		●		●	Presuntiva +
		●	●	●	Presuntiva +

**Figura. 1** Interpretación de especies presuntivas positivas de *Salmonella spp*

**Fuente:** (Food Safety, 2013)

## B. SISTEMA MICROGEN GN-ID A

Se utilizó el Sistema Microgen GN A el cual tiene las siguientes pruebas bioquímicas: (Lisina, Ornitina, H<sub>2</sub>S, Glucosa, Manitol, xilosa, ONPG, Indol, Ureasa, Voges Proskauer, Citrato, TDA. Triptófano desaminasa.), con el siguiente procedimiento según las indicaciones del fabricante:

### **Inoculación e incubaciones**

1. Se emulsificó una única colonia obtenida del cultivo del Sistema 3M Petrifilm *Salmonella* Express en 3 mL de solución salina estéril 0.85% y se procedió a mezclar.
2. Se quitó la lámina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente y usando una pipeta estéril, se procedió añadir de 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira
3. La incubación de la placa se lo realizó a 35-37°C durante 18-24 horas.
4. Después de la inoculación, se añadió aceite mineral entre 3-4 gotas en los pocillos 1,2,3 y 9; pocillos que están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.
5. Posteriormente se selló la parte superior de las tiras con la cinta adhesiva que se había retirado antes y se incubo a 35-37°C.

### **Lectura y adición de reactivos**

6. Se Procedió a retirar la cinta adhesiva y se registró todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (incluida) en la hoja de resultados proporcionada.
7. Se adicionó los reactivos apropiados en los siguientes micro pocillos:
  - a) 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8. Y se procedió a leer y anotar los resultados después de 60segundos.
  - b) 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y se procedió a leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos.
  - c) 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y se procedió a leer después de 60 segundos.

### **Identificación**

En la hoja de resultados de Microgen GN-ID A, los substratos se han organizado en tripletes (sets de 3 reacciones) y se ha asignado un valor numérico a cada substrato (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete da lugar a un único dígito, el Perfil numérico, que se utilizó para determinar la identidad del organismo aislado.

El Perfil numérico obtenido se introdujo en el Software Microgen Identificación System (MID-60), que generó un informe de la tipificación de los microorganismos de una base de datos selectiva.

# MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No. 3341

Specimen Type: CHEESE SANDWICH  
Date: 28<sup>th</sup> JANUARY 2002



Well Number	GN A wells												GN B wells														
	Oxidase	Motility	Nitrate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Reaction				Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6	7	6	0	0	0	7	6	0															

Profile No: 67600760 Final Identification: E. coli

WF6125/01/12

Figura. 2 Ejemplo de hojas de resultado

Fuente: ( Microgen Bioproducts Limited, 2014).

## Especies identificadas con la tira de micropocillos GN A

- *Salmonella pullorum*
- *Salmonella species*

Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs

Microgen™ GN A ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negative	Yellow	Green	Yellow	Blue	Blue	Blue	White	Yellow	White	White	White	Yellow	White
Positive	Blue	Blue	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Pink	Red	Blue	Red	Red

Microgen™ GN B ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12
Reaction	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arabinose 24hrs	Arabinose 48hrs
Negative	White	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	White	White
Positive	Black	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Blue

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to limited discoloration and paper ageing, the colours on this chart will change.  
These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legend:

- Appropriate reagents to be added prior to reading.
- Overlaid with sterile mineral oil.
- Not overlaid with oil for oxidase positive organism.

Microgen Bioproducts Limited, 1 Admiralty Way, Camberley Surrey GU15 3DT UK

Edition: 2004 - 12

Figura. 3 Tabla a color de interpretación de resultados.

Fuente: ( Microgen Bioproducts Limited, 2014).

## 4.8. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Recolectada la información se revisó cada uno de los resultados obtenidos y se procedió a la interpretación mediante Chi-cuadrado que al ser una prueba de hipótesis compara la distribución observada de los datos con una distribución esperada de los mismos.

**CAPITULO V.  
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**RESULTADOS**

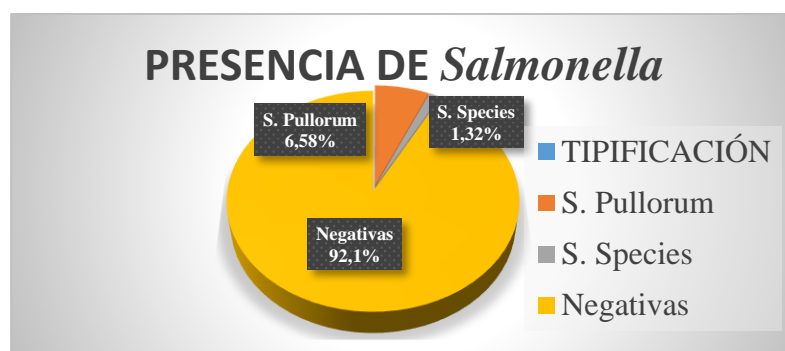
Dentro de los resultados obtenidos de las explotaciones avícolas de la Parroquia Cotaló mediante la prueba cualitativa de confirmación bioquímica para *Salmonella*, se pudo encontrar 6 casos positivos de *Salmonella spp*, como se puede observar en la tabla 1, los cuales representan el 7,9% de presencia de *Salmonella spp*. en huevos frescos de gallina en la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua.

De los resultados positivos obtenidos en la presente investigación y posterior tipificación se detectó la existencia de dos serovariedades de *Salmonella* las mismas que fueron *Salmonella pullorum* con una presencia de 6,58% y *Salmonella species* con una presencia de 1,32% (FIGURA 4).

**Tabla. N: 1 RESULTADOS OBSERVADOS DE PRESENCIA DE *Salmonella*  
EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA**

<b>OBSERVADOS</b>			
<i>PRESENCIA DE Salmonella</i>			
<b>TIPIFICACIÓN</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>TOTAL</b>
<i>S. Pullorum</i>	5	35	40
<i>S. Species</i>	1	35	36
<b>TOTAL</b>	6	70	<b>76</b>

Elaborado por: (Acosta, 2016)

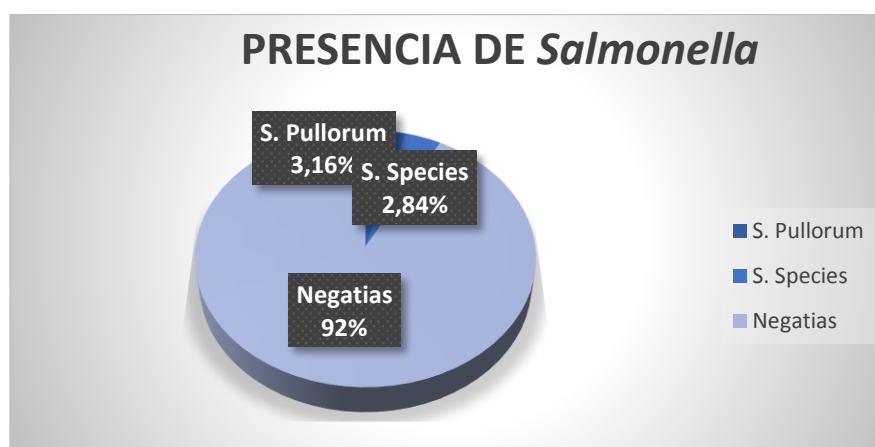


**Figura. 4** Presencia de Salmonella Observados

**Tabla. N: 2** RESULTADOS ESPERADOS DE PRESENCIA DE *Salmonella* EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA

ESPERADOS			
TIPIFICACIÓN	PRESENCIA DE <i>Salmonella</i>		TOTAL
	SI	NO	
<i>S. Pullorum</i>	3,16	36,84	40
<i>S. Species</i>	2,84	33,16	36
<b>TOTAL</b>	<b>6</b>	<b>70</b>	<b>76</b>

Elaborado por: (Acosta, 2016)



**Figura. 5** Presencia de *Salmonella* Esperados

$$X^2 = \frac{(O - E)^2}{E}$$

$$X^2 = \frac{(5-3.16)^2}{3.16} + \frac{(35-36.8)^2}{36.8} + \frac{(1-2.84)^2}{2.84} + \frac{(35-33.16)^2}{33.16}$$

$$X^2 = 2,45 N.S$$

El valor calculado de Chi - cuadrado de 2,45 al ser menor al valor tabular de 3,84, considerando que se trabajó con un nivel de confianza del 95% y con 1 grado de libertad, es decir en consecuencia no hubo diferencia estadística significativa en cuanto a la presencia de *Salmonella* en huevos frescos de gallina en la parroquia de Cotaló.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio epidemiológico los resultados obtenidos demuestran que existe una presencia no significativa de *Salmonella* en las explotaciones avícolas de la Parroquia Cotaló, el cual representa el 7,9 % del total del muestreo, y con respecto a la tipificación se encontraron dos serovariedades las cuales son *Salmonella pullorum* 6,58% y *Salmonella species* 1,32%, investigaciones llevadas a cabo por Sánchez M, (2013) revelaron que la incidencia de *Salmonella* en las granjas avícolas de la Provincia de Tungurahua, alcanzó una prevalencia de 0,0133%. Por otro lado, en investigaciones llevadas a cabo por Estrada J; Valencia B, (2012) dieron a conocer que no se evidenció la presencia de *Salmonella spp.* en huevos frescos de gallinas en los principales mercados de la Ciudad de Quito, y de acuerdo a las recomendaciones dadas de efectuar muestreos directamente de las granjas avícolas, y mediante el presente estudio se pudo llegar a determinar que la existencia de *Salmonella spp.* está relacionado directamente al nivel de bioseguridad de granjas.

La baja presencia de *Salmonella* encontrada en los huevos frescos de gallina (7,9%) se puede explicar que es debido a la vacunación que se realiza en esta zona, la cual se lo hace con una vacuna viva atenuada (9R), ya que la habilidad de la mayoría de las cepas vacunales de multiplicarse en el interior del hospedador dan lugar a una respuesta inmunitaria más intensa y de mayor duración, similar a la provocada por infección natural, de acuerdo a lo que menciona Spreng et al.,2006; Barrow y Freitas Neto, 2011, citados por Díaz, T et al. 2014, en lo cual radica el objetivo de la vacunación que es la prevención o reducción de la colonización intestinal de la bacteria, lo que permite reducir la excreción y por lo tanto la contaminación de la cascara, asimismo, gracias a la vacunación, se reduce la invasión y colonización de los tejidos reproductivos, por lo tanto, la contaminación del interior del huevo. (EFSA, 2010, citados por Díaz, T et al. 2014)

**CAPITULO VI.**  
**CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA, Y ANEXOS**

**CONCLUSIONES**

- En la presente investigación los resultados obtenidos no son significativos por lo tanto se concluye que en la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua la presencia de *Salmonella* en las explotaciones avícolas es relativamente inferior con relación a otras Investigaciones realizadas en país.
- Las especies caracterizadas de *Salmonella* fueron *Salmonella Pullorum* y *Salmonella species* lo cual se determino mediante el Sistema Microgen GN A el cual dio positivo a las pruebas Bioquimicas de: Lisina, Ornitina, H<sub>2</sub>S, Glucosa, Manitol, Xilosa, Indol, Ureasa, Citrato.
- Mediante la utilización del Sistema Petrifilm *Salmonella* Express del total de las 76 muestras procesadas se identificó 6 muestras positivas lo que representa un porcentaje de presencia del 7,9% de *Salmonella*, representando el 6,58% de *Salmonella pullorum* y 1,32% de *Salmonella species* en huevos frescos de gallina en las granjas avícolas de la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua.



## BIBLIOGRAFÍA

- Aconda, A. 2013. Revista Técnica Maíz y Soya. La realidad del huevo de mesa en Ecuador. Ed. 2013- 2014. (en línea). Disponible en: <http://maizysoya.com/la-realidad-del-huevo-de-mesa-en-ecuador/>
- Badouei, M. A., Ghalejooghi, B. M., & Madadgar, O. (2012). Study on Salmonella contamination of traditionally produced edible poultry eggs. *Comparative Clinical Pathology*, 21(5), 1093-1097. (en línea). Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00580-011-1238-z>
- Castillo, V. L., Amey, E. V., Despaigne, E. C., & Rodríguez, O. P. (1996). Determinación de Salmonella y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. *Revista Cubana AlimentNutr*, 10(2), 2. (en línea). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10\\_2\\_96/ali03296.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali03296.htm)
- Corporación Nacional De Avicultores Del Ecuador (CONAVE). 2013. Estadísticas de producción avícola 2013. (en línea). Disponible en: <http://www.conave.org/upload/informacion/Estadisticas%20avicolas.pdf>
- Cosano, L. 2003. Evaluación sanitaria (físico, químico, bacteriológico) del huevo de gallina de traspatio, en expendios del Mercado de la terminal, zona 4 de la Ciudad de Guatemala. (en línea). Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10\\_0929.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/10/10_0929.pdf)
- Díaz, T., *et. al.* (2014). Vacunación en Avicultura. Zaragoza-España: Servet
- Estrada Aguila, J. P., & Valencia Bustamente, B. A. (2012). Determinación de Salmonella spp. En huevos frescos de gallina en los principales mercados de la Ciudad de Quito. (en línea). Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/handle/25000/599>
- Fernández, k. 2005. Control bacteriológico de huevos provenientes de crianza artesanal, a la venta en el Mercado Municipal de Chillán. (en línea). Disponible en: [http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2005/fernandez\\_k/doc/fernandez\\_k.pdf](http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2005/fernandez_k/doc/fernandez_k.pdf)
- Food Safety. 2013. Salmonella Guía de Interpretación. Sistema 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express. (en línea). Disponible en: [www.3M.com/foodsafety](http://www.3M.com/foodsafety)
- Garcés. 2015. Actividad Avipecuaria. 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>  
[http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/salud\\_sociedad/article/view/3496/3119](http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/salud_sociedad/article/view/3496/3119)

- Im, M. C., Jeong, S. J., Kwon, Y. K., Jeong, O. M., Kang, M. S., & Lee, Y. J. (2015). Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. isolated from commercial layer farms in Korea. *Poultryscience*, pev137. Publicada: 25/05/2015. (en línea). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26015591>
- Instituto de Estudios del Huevo. 2009. El gran libro del huevo. 1era ed. Editorial Everest, s.a. (en línea). Disponible en: [http://www.huevo.org.es/images/archivos/el\\_gran\\_libro\\_del\\_huevo.pdf](http://www.huevo.org.es/images/archivos/el_gran_libro_del_huevo.pdf)
- Martínez, A. M., Navarrete, J. V., Corpus, M. D. L. O., Valencia, S. D., Huidobro, D. L., & Gutiérrez, V. R. T. (2012). Identificación de *Salmonella* Enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 43(2), 229-237. (en línea). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articuloBasic.aa?id=61343209>
- Martínez, J. (2010). Búsqueda de la información en investigación epidemiológica. Determinación del tamaño mínimo de muestra para demostrar la presencia de una enfermedad. J.L. Morales Saavedra. *Epidemiología Veterinaria*. (pp103-126). México: Manual Moderno
- Microgen Bioproducts Limited. 2014. Microgen GnA+B-ID System. ( en línea). Disponible en: <http://microgenbioproducts.com/biochemical-identification-kits-fim/>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP). 2009. Enfermedades y eventos de notificación obligatoria sujetas a Vigilancia Epidemiológica. (en línea). Disponible en: [http://instituciones.msp.gob.ec/dps/cotopaxi/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13:epimedologia&catid=3:epimedologia&Itemid=44](http://instituciones.msp.gob.ec/dps/cotopaxi/index.php?option=com_content&view=article&id=13:epimedologia&catid=3:epimedologia&Itemid=44)
- OIE. 2010. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2010. Salmonelosis. Publicado: Mayo 2010. (en línea). Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.09.09\\_SALMONELLOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.09_SALMONELLOSIS.pdf)
- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2). (en línea). Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/ojs/index.php/mvz/article/view/44/42>
- Ramírez, R. Y., Rincón, D. P., & Vargas, J. C. (2015). *Salmonella* Enteritidis en huevos de gallina comercializados en Tunja (Colombia). *Salud & Sociedad*, 1(2). (en línea). Disponible en: [http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/salud\\_sociedad/article/view/349](http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/salud_sociedad/article/view/349)

- Rincón Acero, D. P., Ramírez Rueda, R. Y., & Vargas Medina, J. C. (2011). Transmisión de Salmonella entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(2), 167-177. (en línea). Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-08072011000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000200008&lng=pt&nrm=iso&tlng=es)
- Rodríguez, E. 2014. Artículo Aves. Control de la salmonelosis en avicultura de puesta. Publicado: 15 de octubre del 2014. (en línea). Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/9834/articulos-aves-archivo/control-de-la-salmonelosis-en-avicultura-de-puesta.html>
- Sánchez, M. 2013. Determinación de la Prevalencia de Enterobacterias del género Salmonella spp. en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la Provincia de Tungurahua. (en línea ). Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1157/1/T-UCE-0014-36.pdf>
- Uribe, C., & Suárez, M. C. (2006). Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colombia médica*, 37(2), 151-158. (en línea). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v37n2/v37n2a10>

## ANEXOS

### Sistema Petrifilm *Salmonella* Express



Anexo 1. Pesaje de del suplemento



Anexo 2. Separación yemas de las Claras



Anexo 3. Homogenización de las yemas



Anexo 4. Pesaje de 25gr de la muestra



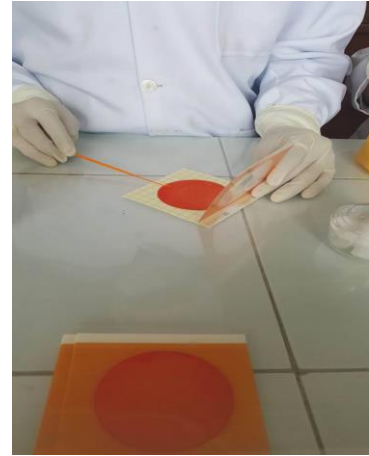
Anexo 5. Combinación de la muestra  
Con el enriquecimiento



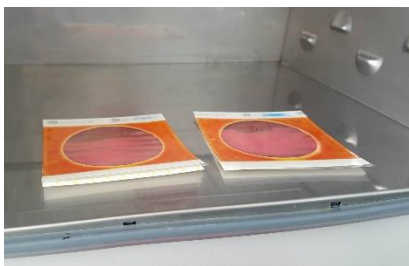
Anexo 6. Hidratación de las placas  
Petrifilm



Anexo 7. Toma de muestra para la siembra



Anexo 8. Siembra por estriado



Anexo 9. Incubación a 41,5



Anexo 10. Interpretación de las Placas



Anexos 11 .Placas Petrifilm Positivas



Anexos 12. Placas Petrifilm Negativas

## Sistema Microgen GN A



Anexo 13. Elección de una colonia



Anexo 14. Disolución de la colonia



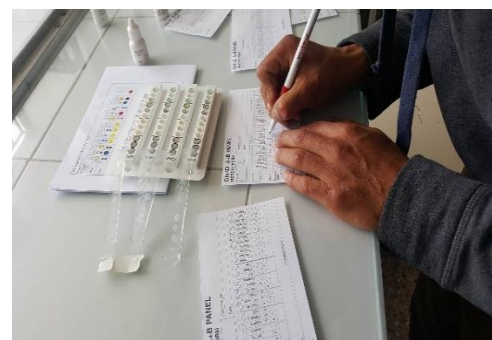
Anexo 15. Adición en cada pocillo



Anexo 16. Adición de los reactivos



Anexo 17. Interpretación de resultados



Anexo 18. Registro de resultados

## **CAPITULO VII.**

### **PROPUESTA**

Implementación de Medidas de control para la prevención de *Salmonella* en gallinas de postura.

#### **7.1. DATOS INFORMATIVOS**

Los planteles avícolas involucrados en la presente propuesta serán los ubicados en la Parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua, además de las responsables y técnicos encargados de dichas explotaciones.

#### **7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

A pesar de que en la presente investigación los resultados obtenidos no son significativos es necesario llevar a cabo un plan de medidas de control para la prevención de *Salmonella*, ya que al ser una bacteria de alta complejidad epidemiológica, altamente distribuida en la naturaleza, y transmitirse a través de alimentos contaminados especialmente de origen animal, en la que se destaca el consumo del huevo y sus subproductos convirtiéndose en una enfermedad de transmisión alimentaria.

#### **7.3. JUSTIFICACIÓN**

Mediante la aplicación de medidas de control para la prevención de *Salmonella* en gallinas de postura permitiría reducir considerablemente el ingreso y/o el grado de contaminación de *Salmonella* en los planteles avícolas existentes sin importar el tamaño de la explotación y por lo tanto debe ser llevada a cabo por todos los propietarios de los mismos, obteniendo como principal beneficiario al consumidor al proporcionar productos alimentarios inocuos.

#### **7.4.OBJETIVO**

- Establecer medidas de control para la prevención de *Salmonella* en gallinas de postura.

## **7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

Con respecto al análisis económico, se reducirán pérdidas de animales por mortalidad, costos en la utilización de antibiótico, y perdidas por baja producción debido a la presencia de *Salmonella* en las explotaciones avícolas.

## **7.6. FUNDAMENTACIÓN**

Es importante destacar que mediante la aplicación de medidas de control para la prevención de *Salmonella* en planteles avícolas, en conjunto con una adecuada educación sanitaria para el manejo correcto de las explotaciones avícolas, es posible reducir o impedir considerablemente la entrada y salida de diferentes agentes patógenos responsables de enfermedades en las aves, en el que destaca la *Salmonella* y por lo tanto lograr un mayor control de las explotaciones.

## **7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO**

Se elaborará un manual didáctico de medidas de control para la prevención de *Salmonella* en las explotaciones avícolas productoras de huevos.

## **7.8. ADMINISTRACIÓN**

Se trabajará con cada uno los productores de las explotaciones avícolas de la Parroquia Cotaló.





UB<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/verdebriagar.htm>

A pesar que en la presente investigación no existe una alta presencia de *Salmonella* la contaminación puede deberse a diferentes razones, una de las cuales

La *Salmonella* al localizarse en el tracto digestivo de las aves es fácilmente transmisible a través de las heces a los huevos, y a través de estas, bajo determinadas circunstancias, es capaz de producir enfermedades (EFSA, 2012, citados por F Torrubia et al. 2014).

La *Salmonella* por ser considerada patógena para los seres humanos que normalmente están vinculadas a las infecciones causadas por toxinas alimentarias, las cuales son responsables de múltiples infecciones intestinales.

La salmonelosis a nivel mundial es considerada una de las enfermedades zoonóticas y de mayor importancia para el ser humano ya que los casos más comunes se dan por el consumo de alimentos de origen animal contaminados y entre los que se destacan está el huevo y sus subproductos.

Una de estas medidas podría ser la implementación de la vacunación en gallinas ponedoras, lo cual disminuiría considerablemente el riesgo de padecer gastroenteritis originada por este microorganismo e incrementaría la calidad de vida de los consumidores con el fin de desarrollar estrategias de prevención que fortalezcan el trabajo en salud pública desde la granja hasta los hogares<sup>46</sup>.

Un adecuado manejo de inmunización y de bioseguridad en las explotaciones avícolas impide la entrada y salida de diferentes agentes patógenos responsables de enfermedades en las aves y por lo tanto lograr un mayor control de las explotaciones