

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE MÉDICO VETERINARIO

Tema: Detección de enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas avícolas en occidente de Nicaragua Octubre-Noviembre 2013.

Autores:

Milagros de la Concepción Ramírez Andino.

Yuslenia María Rodríguez Quintanilla.

Tutores:

Lic. Brenda Mora Sánchez. MSc.

Lic. Byron Flores Somarriba. MSc.

LEON-NICARAGUA



Dedicatoria

Dedicamos este trabajo en primer lugar a Dios por siempre proveer en momentos de necesidad, nuestros padres, por apoyar nuestros sueños y ayudarnos a conquistar nuestras metas sin importar lo complicado de la travesía a cumplir, por encontrar la forma de inspirarnos y ser nuestro ejemplo a seguir en virtud de lo correcto, darnos el voto de confianza que incentivó la madurez en las acciones que nos determinan como personas y profesionales

A nuestros docentes que secundaron la propuesta de este estudio y nos ayudaron a hacerlo realidad e incitaron a poner en práctica los conocimientos transmitidos por ellos a lo largo de la carrera sin esperar más que el triunfo en dicho trayecto.

Milagros y Yuslenia



Índice	Páginas
I. Agradecimiento -----	4
II. Abreviaturas -----	6
III. Resumen -----	7
IV. Introducción -----	8
V. Antecedentes -----	10
VI. Justificación -----	12
VII. Planteamiento del problema -----	13
VIII. Objetivos -----	14
IX. Marco Teórico -----	15
X. Diseño Metodológico -----	41
XI. Resultados -----	44
XII. Discusión -----	46
XIII. Conclusión -----	49
XIV. Recomendaciones -----	50
XV. Referencias bibliográficas -----	51
XVI. Anexos -----	56



I. AGRADECIMIENTOS

A las siguientes instituciones y personas que de alguna manera colaboraron en este estudio

- **Centro de diagnóstico e investigación veterinario (CEVEDI)**
- **Ministerio Agropecuario y Forestal (MAGFOR Región II)**
- **Productores avícolas**; por apoyarnos en la realización del estudio presente.
- Director de la Escuela de Medicina Veterinaria **William Jirón** por facilitar el ambiente propicio para la realización de los análisis físicos y microbiológicos en las instalaciones del campo agropecuario.
- **Br. Álvaro Chávez**, alumno ayudante del laboratorio de microbiología, quien nos brindó su ayuda durante el estudio.
- **Dr. José María Pereira**, quien nos ofreció su apoyo completo durante todo el estudio.
- **Lic. Brenda Mora y Byron Flores Somarriba**, tutores quienes nos brindaron sus ayuda incondicional en todos los momentos de dificultad que se presentaron en el transcurso del estudio y por dedicarnos horas de ardua labor en al proceso de las muestras en el laboratorio de microbiología del campo agropecuario.



Agradecimientos

Al finalizar mi carrera profesional he logrado uno de mis objetivos en la vida, razón por la cual quiero dar infinitas gracias a todas las personas que me apoyaron y acompañaron en todo el trayecto de mi vida universitaria.

A ti Diosito por darme la oportunidad de vivir y mostrarme día a día que con humildad, perseverancia y sabiduría todo es posible.

Con todo mi amor y cariño a dos personas maravillosas que hicieron todo en la vida para que yo lograra mis objetivos, mis padres, mil gracias por sus consejos, dedicación, comprensión, apoyo y amor incondicional. Los amo muchísimo!

A mis amigos Erick, Alba, Maykely, Anielka, Tiquito, Wilder, Iván, Edgar, Claudio, Tania, Hazzel, Engels, Tomy (E.P.D) en especial a Yuslenia además de una muy buena amiga una excelente compañera de tesis. Muchas gracias por esos seis años maravillosos e inolvidables, siempre los llevare en mi corazón.

A mi novio por el apoyo y la ayudada brindada siempre que la requería, gracias amor por ser tan incondicional y estar en esta etapa de mi vida, te quiero muchísimo!!

A mis profesores que en este andar por la vida influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como persona de bien y preparada para los retos que nuestra profesión impone. En especial a mis tutores Lic. Byron Flores y Lic. Brenda Mora por el apoyo y la ayuda brindada en la realización de este trabajo.

A todas las persona que de alguna u otra manera colaboraron en la realización de esta tesis, muchas gracias.

Milagros Ramírez



II. ABREVIATURAS

ETAs: Enfermedades transmitidas por alimentos.

BCN: Banco Central de Nicaragua.

APE: Agua Peptonada Estéril.

XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato

SS Agar: *Salmonella Shigella* Agar

TSI: Triple Azúcar más Hierro

LIA: Lisina Hierro Agar

SIM: Azufre Indol Motilidad

SPSS: Paquete estadístico para las ciencias sociales (siglas en inglés).

LPS. Lipopolisacárido.

H₂S: Ácido Sulfúrico

CO₂: Dióxido de carbono



III.RESUMEN

Las *Enterobacteriaceae* son las responsables de la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS), siendo las principales causantes de intoxicaciones alimentarias asociadas al consumo de huevos. El objetivo principal de este estudio, fue detectar la presencia de enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas avícolas en occidente de Nicaragua. El tamaño de la muestra fue de 66 huevos tomados al azar, 12 por fase de postura, a los que se les realizó aislamiento a partir del cascaron externo así como de clara y yema, las bacterias fueron identificadas en base a sus reacciones bioquímicas, se tomaron datos sobre las características físicas de los huevos y de las características higiénico-sanitarias de las granjas. El 78.8% de las muestras presentaron crecimiento de enterobacterias en el cascaron, siendo la *E. coli* la que en mayor porcentaje se encontró, mientras que en clara y yema el 39.4% presentaron infección, encontrando *Shigella spp.* en un 18.2%. Se detectó *Salmonella spp.* en cascaron con un 3.7% y en clara y yema 1.5%. Los resultados reflejan un alto porcentaje de huevos infectados los que están asociados con las inadecuadas condiciones de manejo y que podría tener repercusiones graves en salud pública, los resultados fueron reportados a las autoridades correspondientes, para la implementación de medidas de prevención y asegurar un producto inocuo para los consumidores.



IV. INTRODUCCIÓN

El huevo es un alimento de gran valor nutricional, es una de las materias primas de origen animal de mayor consumo diario por su bajo costo de adquisición, el cual, le permite estar presente en la mesa de una gran parte de la población Nicaragüense, además de ser utilizado en diversas industrias del sector alimentario, como panaderías, pastelerías, restaurantes, entre otros.

En Nicaragua, el consumo per cápita del huevo en 2012, rondó las 86 unidades y para este año, se espera que este supere los 90 huevos por persona al año. La producción de huevos ha ido en ascenso desde el 2009, hasta la actualidad 39.33 millones de docenas de huevos se produjeron en 2012, 37.10 millones de docenas de huevos alcanzó en 2011, la producción de este producto, rico en proteínas. 34.77 millones de docenas de huevos fue en 2010 la producción del sector avícola. 32.95 millones de docenas de huevos fue la producción en 2009, según datos oficiales del Banco Central de Nicaragua (BCN).

Las bacterias pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae*, son las responsables de la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), siendo la *Salmonella spp.* el patógeno más importante causante de intoxicaciones alimentarias en el mundo. El huevo por su contenido en nutrientes representa un sustrato excelente para el crecimiento de bacterias, principalmente *Salmonella spp.* y otras enterobacterias; por lo tanto se consideran un vehículo importante en la transmisión de enfermedades, por el consumo de alimentos. (Torres *et al.*; 2002)

La salmonelosis humana, es una enfermedad zoonótica que genera cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial, por su elevada morbilidad y mortalidad. En la Unión Europea la salmonelosis ha sido una de las enfermedades transmitidas por alimentos más frecuentes, constituyendo el 31% de todos los brotes. Mientras que en Estados Unidos la *Salmonella spp.* fue la segunda causa más común de



las ETAs con 1.027.561 casos (11%) siendo la primera causa de hospitalizaciones y muertes (Valencia *et al.*; 2012).

El control de las enterobacterias transmitida por alimentos de origen animal, debe realizarse en todos los niveles de producción, donde el médico veterinario cumple un factor primordial en la prevención de salud pública, a través del desarrollo y control de buenas prácticas de producción, así como de la prevención y control de enfermedades.

En Nicaragua, no se han realizado estudios sobre la calidad e inocuidad del huevo, por lo que este estudio pretende detectar la presencia de enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas avícola en occidente de Nicaragua.



V. ANTECEDENTES

En Guadalajara, Jalisco se realizó un estudio sobre Aislamiento e identificación de enterobacterias en conos de cajas de huevos de las cien muestras, resultaron 11% negativas y un 89% positivas; en estas las bacterias aisladas fueron: *Echerichia coli* 28%; *Klebsiella* 27% y *Aerobacter* 21 %.(Olson *et al*,; 1983).

Leyva. Realizó un estudio sobre Determinación de *Salmonella* y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. Se aisló *Salmonella* en 2 (0,60 %) y Enterobacterias en 58 (17,57 %). No se aisló *Salmonella* en ninguna de las muestras del interior del huevo. Se obtuvo crecimiento de Enterobacterias en 1 (0,3 %) clara y yema juntas, en 13 (8,6 %) de las yemas y en ninguna de las claras. (Leyva *et al*,; 1996).

Fernández, realizó un estudio sobre control bacteriológico en huevos provenientes de crianza artesanal, a la venta en el mercado municipal de Chillán en Chile. Reportando que entre los microorganismos encontrados un 78% pertenecía a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos recuentos variaron en el rango de 1.0×10^5 - 6.5×10^6 UFC/ml, no se detectó *Salmonella spp.* (Fernández.*et al*,; 2005)

Clerc realizo´ un estudio sobre detección de *Salmonella spp*, en huevos de gallina comercializados en ferias de la ciudad de Valdivia. Se aisló *Salmonella spp*, en siete muestras de cáscara, pero no se aisló en ninguna de las muestras de yema. Las cepas aisladas corresponden a *Salmonella Enteritidis*., el porcentaje de muestras contaminadas con *Salmonella spp* encontrado, fue de 15.6%, valor muy por sobre el 1% (Clerc *et al*,;2005).

Loaiza realizaron un estudio sobre Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área Metropolitana, se aislaron *Bacillus sp*; *Pseudomonas sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia sp.*, *Citrobacter sp.*, *E. coli*, *Streptococcus viridans*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Sarcinas sp.*, *Acinetobacter sp*, *E. hermannii*, *Proteus* y *Stenotrophomonas*



maltophilia. Todos los cultivos y PCR fueron negativos para *Salmonella*. (Loaiza, et al,; 2011.)

Sánchez, realizó un estudio sobre Determinación de la prevalencia de enterobacterias del género *Salmonella spp*, en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia de Tungurahua. Se encontró una Prevalencia de *Salmonella enteritidis* de 0.0133% (2/150). (Sánchez et al,; 2013)



VI.JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) a nivel mundial se encuentran asociadas al consumo de huevos contaminados y sus derivados, siendo las enterobacterias los principales agentes responsable de infección e intoxicaciones con sus productos metabólicos, ocasionando enfermedades y pérdidas económicas; cada año aproximadamente 60 millones de personas alrededor del mundo sufren de intoxicación alimentaria, los más expuestos a la intoxicación son los niños (especialmente lactantes), los mayores de 50 años y aquellos con una afección médica seria como diabetes o con un sistema inmunológico debilitado. En Nicaragua, no existen datos o estudios reportados acerca del nivel de contaminación en los huevos que podrían afectar al consumidor final de estos mismos, razones por las cuales se realizó un estudio sobre detección de enterobacterias en huevos de gallinas, procedentes de 5 granjas en occidente de Nicaragua; los resultados fueron reportados a las autoridades correspondientes para la implementación de medidas de prevención y asegurar un producto inocuo para los consumidores.



VII.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuáles son las enterobacterias presentes en huevos, procedentes de 5 granjas avícolas en occidente de Nicaragua?



VIII.OBJETIVOS.

Objetivo general.

-Detectar la presencia de enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas avícolas en occidente de Nicaragua.

Objetivos específicos

-Identificar las enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas en occidente de Nicaragua.

-Asociar las características Clínicas-epidemiológicas con la presencia de enterobacterias.



IX.MARCO TEÓRICO

La gallina, es la más prolífica de las aves, particularmente las ponedoras de los criaderos avícolas modernos, que producen un promedio de 260 huevos al año.

El peso y el volumen de los huevos, dependen de la raza y de la edad de las gallinas, así como del alimento con que se críen y de la estación del año en que los ponga. Así, cuanto más joven sea la gallina, más pequeños serán los huevos, y también serán más pequeños los puestos en invierno que los puestos en verano. No obstante; ni el tamaño ni el color de la cáscara alteran sus valores nutritivos, así como tampoco lo hacen las manchas eventuales de sangre que puedan tener en su interior, ni el color más o menos intenso de la yema. (Castelló *et al.*,1989).

Partes del huevo

Cascara, aísla el huevo del medio ambiente y regula la respiración del huevo que va a estar eliminando CO₂ desde la puesta. Es una envoltura dura y calcárea formada por una red proteica (3%) donde se depositan minerales y que corresponde, aproximadamente, al 10% del peso del huevo. El carbonato cálcico está cristalizado en forma de aragonita, lo cual le confiere su dureza. Presenta una cutícula exterior de naturaleza cérea con una serie de poros (7.000 a 17.000 por huevo) que permiten el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior. La cáscara no tiene aplicación en alimentación humana; pero sí en alimentación animal, como fuente de calcio. Las características de la cáscara son el color (depende de la estirpe de gallina) y la dureza (depende de factores genéticos, nutricionales y de manejo). La calidad del cascarón disminuye al incrementarse la edad de la gallina y aunque no se conoce la causa, se cree que la gallina es capaz de sintetizar una cantidad uniforme de material para el cascarón en toda su vida; pero al aumentar paulatinamente el tamaño del huevo, este material debe distribuirse sobre una superficie mayor, lo que da como resultado un cascarón más delgado. (Sauveur *et al.*; 1993).



La formación del cascarón se verá afectada por factores que afecten la ingestión o absorción adecuada de nutrientes, así como cualquier causa que altere el ambiente o función uterina, tales como: cambios de presión, temperatura, pH, o algunas enfermedades como bronquitis infecciosa y síndrome de baja postura. (North *et al*,; 1993).

Clara, aquí 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, 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. A medida que el huevo envejece se va a producir una alcalinización del huevo, la clara va a perder CO₂, de un pH en clara 7.6-7.9 (recién puesto) pasando al cabo de 21 días (3-5°C) a un pH de 9.7, como consecuencia de esto, la ovomucina desestabiliza las uniones, por lo tanto la altura de la clara va a ser menor (Castelló *et al*,; 1989).

Yema, es la porción amarilla del huevo, está recubierta por la membrana vitelina que la separa de la clara y la protege de una posible rotura. El color está determinado principalmente por la dieta de la gallina. Puede presentar una mancha rojiza, que corresponde al disco germinativo, a partir de la cual se desarrollaría el pollo, en caso que el huevo hubiera sido fecundado. Es una dispersión de diferentes tipos de partículas suspendidas en una solución proteica. La cantidad de proteína sobre sustancia seca es de 31,1% y la de grasa del 65,8%, con gran cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en colesterol. La fase continua (78%) está formada por un extracto seco de proteínas globulares y LDL, mientras que la fase dispersa (20%) lo está con proteínas globulares y lipoproteínas de baja densidad. (Instituto de Estudio del huevo 2006)

Membranas testáceas, estas son dos envolturas una está adherida al cascarón y otra en contacto con la clara, son de naturaleza proteica y actúan como filtro de defensa contra la entrada de microorganismos. En el polo más romo del huevo se



separan y forman una cámara de aire, tanto mayor cuanto más envejecido está el huevo. (Instituto del estudio del huevo 2007)

Cámara de aire, se forma en las orillas del huevo, con las membranas inmediatamente pegadas a la cáscara, mientras se enfría, luego de la ovoposición. Se localiza en el polo obtuso o ancho del huevo. Es relativamente pequeña en el huevo recién puesto (3mm) y aumenta de profundidad a medida que pasa el tiempo. Por tal motivo interviene de manera importante para determinar la calidad del huevo, entre más pequeña sea la cámara de aire, es más fresco el huevo. (Castelló *et al.*; 1989).

Las chalazas, son dos formaciones similares a cordones de un color transparente-blanquecino, localizados en los ejes longitudinales del huevo que se forman en el útero por torsión de las fibras de mucina, secretadas en el mágnum. La función principal es la de fijar la yema al centro del huevo, cuanto más prominente es la chalaza, más fresco es el huevo (muchas veces las personas desconocen esta función de las estructuras fijadoras y creen que son partes de la clara que no se pueden utilizar, o incluso que el huevo está en mal estado, cuando en realidad no lo está). (Sauveur, 1993).

Cutícula, Es la estructura exterior final del cascarón, es una cubierta orgánica grasosa que se deposita sobre el cascarón conforme pasa a través de la vagina. Tiene un espesor de 10 a 30micras, está compuesta de materia orgánica llamada mucina. Su función es impedir la entrada de partículas líquidas o sólidas y así evitar la invasión microbiana al interior del huevo. Constituye la primera y más importante barrera contra la invasión bacteriana. La cutícula regula el intercambio de gases a través del cascarón y previene la invasión microbiana. (Castelló *et al.*;1989).



Mecanismos de defensa del huevo.

Los huevos enteros con cáscara, son ciertamente los productos alimenticios que presentan las defensas antimicrobianas naturales más eficaces. Estas defensas son de naturaleza física (cutícula, cáscara, membranas testáceas, viscosidad de la clara), y química (factores antimicrobianos naturales del albumen). La cutícula es una capa de naturaleza proteica de un espesor medio de, 10 a 30 micras cuya función es impedir la penetración de bacterias, mohos y virus al interior del huevo, ya que obtura la mayor parte de los poros de la cáscara (Thapon *et al.*, 1994).

La cáscara del huevo, contiene de 7.000 a 17.000 poros, variando su tamaño de 13 micras en el polo ancho a 6 en el estrecho (Castelló *et al.*; 1989). La mayor parte de estos poros se encuentran obturados por tapones constituidos por fragmentos de cutícula. Son estos tapones los que confieren a la cáscara su función de barrera, ya que el diámetro de los poros descubiertos permite el paso fácil de los microorganismos. Esta es la razón por la que la contaminación de los huevos es mucho más frecuente después del lavado o de cualquier otro tratamiento que dañe la cutícula.

Las membranas testáceas, son dos; una interna y la externa están formadas por una red de fibras de queratina y actúan como barrera microbiana. Entre todas las defensas físicas del huevo contra la invasión microbiológica, las membranas testáceas representan seguramente la barrera más eficaz (Thapon *et al.*; 1994).

Los inhibidores del crecimiento microbiano se encuentran; tanto en la clara líquida, como en la densa. Su concentración es sin embargo más elevada en la clara densa, que es más rica en materia seca y más viscosa. Esta es la razón por la cual el proceso de licuefacción de la clara densa durante la conservación de los huevos, favorece el desarrollo microbiano. Dentro de estos inhibidores del crecimiento microbiano se encuentra la lisozima, que es una proteína que posee actividad biológica de naturaleza enzimática. Es una 1-4-B-N- acetilmuramidasa, que hidroliza el enlace glucosídico entre el carbono C-1 del ácido N-



acetilmurámico y el C-4 de la N-acetilglucosamina del peptidoglicano de la pared de las bacterias Gram positivas. Sin embargo; algunos microorganismos son capaces; bajo ciertas condiciones, de resistir la acción de la lisozima, como es el caso del *Staphylococcus aureus* (Thapon *et al.*; 1994).

Otro inhibidor, es la Ovotransferrina o Conalbúmina; que inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas a través de la quelación del Hierro (Chen *et al.*; 2001).

Cuando la cutícula, la cáscara y las membranas testáceas fallan en su protección contra el ataque microbiano, la clara puede contaminarse.

El pH de la clara del huevo fresco recién puesto, se sitúa alrededor de 7,5 siendo favorable para el desarrollo de la mayor parte de los gérmenes saprófitos. Durante la conservación se produce una pérdida de CO₂ a través de la cáscara, que trae consigo un aumento de pH que se estabiliza por encima de 9, lo que es un factor desfavorable para el crecimiento e incluso, la supervivencia de un gran número de microorganismos. De este modo para que el huevo sufra una degradación intensa, que conduzca a la putrefacción del mismo, las bacterias contaminantes deben alcanzar la yema, cuya composición la convierte en un excelente medio de cultivo (Thapon *et al.*;1994).

Contaminación bacteriana de los huevos.

El contenido interno de los huevos recién puestos, es generalmente estéril (Jay, 1992). Al momento de la ovoposición, los huevos tienen escaso grado de contaminación en la superficie debido al paso a través de la cloaca de la gallina (Brake *et al.*;2000).

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: *Acinetobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*,



Enterobacter. Sin embargo, existen estudios que han establecido diversos análisis en huevos de gallinas ponedoras, reconociendo que la incidencia de contaminación interna es relativamente baja, no es muy frecuente y cuando se presenta es debida a *Salmonellas* y de forma secundaria a *Estafilococos* (Dolman *et al*,,1992). Por el contrario, la superficie de la cáscara del huevo lleva, de manera completamente normal, un número elevado de bacterias, que puede variar entre 10³-10⁴ (cáscara muy limpia) a más de 10⁷ (cáscara muy contaminada) (Sauveur *et al*,,1993).

Hay tres vías posibles por las cuales los microorganismos pueden contaminar los huevos, las dos primeras se asocian con infecciones del tracto reproductivo:

1. Transovárica: la yema se puede contaminar con sangre que transporta los patógenos dentro del folículo ovárico (Griffiths, *et al*,; 2002). Los huevos pueden, en el curso de su formación, contaminarse además con bacterias aportadas por la alimentación, que transitan por vía digestiva y sanguínea hasta el ovario, como es el caso de las *Salmonellas* patógenas para el hombre (Thapon, *et al*,;1994).
2. Oviductal: la membrana vitelina o huevo blanco es infectada durante el tránsito a través del oviducto. Esta es la ruta mediante la cual, la mayoría de los huevos se contaminan con *Salmonella enteritidis*, esto se debe a que las células epiteliales del istmo, son el sitio predominante de colonización por parte de esta bacteria (De Buck *et al*,,2004).
3. A través de la cáscara: los microorganismos de la superficie de la cáscara penetran la membrana de la cáscara (Griffiths *et al*,; 2002).

Existe una serie de factores que influyen en la penetración de las bacterias a través de la cáscara:

A. Cutícula:

- ❖ Diferencias en la deposición de la cutícula, entre diferentes gallinas y estirpes.
- ❖ Algunas gallinas, producen huevos total o parcialmente sin cutícula en forma constante.



- ❖ La cantidad y calidad de la cutícula, disminuye con la edad de la gallina.
- B. Cascarón:
- ❖ Los huevos con cáscara delgada (gravedad específica <1074), son más susceptibles a la invasión bacteriana.
- C. La penetración puede ser asistida por:
- ❖ Daño en la cutícula: rasguños de la gallina, ácido úrico presente en las heces.
 - ❖ Presencia de humedad en la cáscara.
 - ❖ Diferencias de temperatura.
- D. La incidencia de la contaminación aumenta a medida que la edad de la gallina avanza, debido a la interacción entre algunos factores:
- ❖ La calidad de la cutícula y de la cáscara disminuye.
 - ❖ El medio ambiente se encuentra cada vez más contaminado.
 - ❖ Las gallinas se encuentran más contaminadas (Padrón, 1992).

Los huevos puestos por gallinas infectadas, aunque posean una baja cantidad interna de bacterias, representan un riesgo potencial que aumenta, durante el almacenaje por períodos prolongados a temperatura ambiente (Hammack *et al.*; 1993).

Una parte importante de la contaminación externa de los huevos, procede de los nidos, de las heces y del polvo del aire (Thapon *et al.*; 1994).

La recolección frecuente de los huevos ayuda a minimizar la exposición microbiana (Brake *et al.*; 2000). Asimismo la rápida refrigeración de los huevos, a una temperatura no superior a los 7°C , es fundamental para obtener control sobre microorganismos como *S. enteritidis*.

Por otra parte las fisuras en la cáscara pueden tener consecuencias nefastas en la conservación de los huevos. Si la cáscara permanece intacta, la única vía de penetración de los microorganismos al interior del huevo son los poros. Aunque se ha reportado que la contaminación es más marcada en aquellos huevos puestos en nidales de paja o material orgánico, ya que contienen un mayor número de



bacterias que los puestos en nidos automáticos o en batería (Nadeem *et al*,; 1999).

Enterobacterias

Familia *Enterobacteriaceae*; está constituida por bacilos gramnegativos, no esporulados que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa, reducen nitratos a nitritos y se hallan ampliamente distribuidos por la naturaleza, muchas de sus especies tienen como hábitat el intestino del hombre y los animales, mientras que otros pueden parasitar a plantas y tener vida saprofita. Pueden ser móviles por medio de flagelos peritricos, o pueden carecer de estos y ser inmóviles. (Valdez *et al*,2001) Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. En algunas especies como *Proteus* las formas jóvenes pueden presentarse formando filamentos. El tamaño promedio de la mayoría de las enterobacterias oscila entre 0.5 - 2 micras de largo. La presencia de una capsula puede ser observada en *Klebsiella*, aunque en algunas cepas de *E. coli* es posible apreciar la misma estructura. (Valdez *et al*,2001)

Cultivo: La temperatura optima de crecimiento de la mayoría de sus especies es de 37 °C, aunque algunas *E. coli* y *Salmonella* toleran temperaturas hasta 42 °C y otras como *Yersinia* y *Serratia* pueden crecer a bajas temperaturas 1 y 5 °C.

Las enterobacterias poseen una estructura antigénica muy compleja; Mencionaremos los más importantes.

Antígeno O u somático: es parte de un lipopolisacárido que se encuentra en la pared celular. Este lipopolisacárido tiene tres fracciones:

- Región uno: oligosacárido que contiene al Antígeno O.
- Región dos: polisacárido central constante para un género determinado.
- Región tres: dado por el lípido A, que constituye la endotoxina.



Antígeno K o capsular: que está presente sólo en algunas bacterias capsuladas como; *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

Antígeno Vi: es un polisacárido que rodea a la bacteria sin llegar a ser una cápsula, y es característico de algunas especies de *Salmonella*.

Antígeno H o flagelar: Es proteico, es específico de especie y está presente solo en las especies móviles.

Antígeno F o fimbrial: presente en las fimbrias, son de naturaleza proteica

Factores determinantes de patogenicidad

- La cápsula tiene propiedades de adhesina y es anti fagocitaria.
- Las fimbrias permiten la adherencia a la célula huésped e impiden el barrido por las barreras mecánicas de defensa del organismo.
- Algunas especies producen exoenzimas como ureasa, gelatinasa, lipasa, desoxirribonucleasa, las cuales actúan permitiendo que sobreviva la bacteria dentro del órgano afectado.
- Debido a que el Hierro es indispensable para ciertas funciones de las bacterias, estos microorganismos producen aerobactinas, que permiten la captación de Hierro desde el medio.
- Todas las enterobacterias, poseen el lipopolisacárido (LPS) de pared, el cual tiene acción de endotoxina, esta se libera al destruirse la bacteria.
- Exotoxina: no todas las especies las producen sólo las patógenas obligadas y poseen efectos específicos. (Biberstein E. *et al*,;1990)

Características de crecimiento

Los representantes de este grupo de microorganismos; son anaerobios facultativos. Para crecer, utilizan diversos sustratos sencillos. En anaerobiosis, su crecimiento depende de que en el medio existan carbohidratos fermentables en



aerobiosis, la gama de sustratos apropiados para su crecimiento incluyen ácidos orgánicos, aminoácidos y carbohidratos (Biberstein E. *et al.*; 1990)

Los métodos que se utilizan para aislar las enterobacterias patógenas, son distintos dependiendo de si la procedencia de la muestra es intestinal o extra intestinal. Cuando la muestra no procede del intestino, es significativo el aislamiento de cualquier representante de esta familia, a partir de sitios que normalmente son estériles. Se utiliza un medio de cultivo con abundantes nutrientes (Biberstein E. *et al.*;1990)

Todos los medios para enterobacterias están ideados para facilitar la identificación de *Salmonella* de *Shiguelia* o de ambos géneros. Las sustancias básicas de estos medios son las siguientes:

- ❖ Una sustancia inhibidora; generalmente una sal biliar o un colorante. Estas sustancias inhiben el crecimiento de los microorganismos Gram positivos.
- ❖ Un sustrato que es utilizado o no por *Salmonella* por *Shiguelia* y por algunos otros géneros.
- ❖ Un indicador de pH, que revela si el sustrato ha sido modificado (Biberstein E. *et al.*;1990)

En los medios sólidos se observan colonias relativamente grandes, de color grisáceo, de aspecto húmedo y bordes definidos. *Klebsiella* da lugar a colonias mucoides que tienden a levantarse con el asa de forma filamentosa, esta característica se corresponde con la presencia de la capsula, por lo que otras especies de enterobacterias pueden presentar las mismas características. Las colonias que pertenecen a *Proteus*, se esparcen en la superficie como sabanas (Valdez *et al.*;2001)

Género *Escherichia*

Dentro del género la especie de mayor importancia es *Escherichia coli*. (*E. coli*) se encuentra en número muy elevado en el contenido intestinal y tiene la capacidad



de suprimir el crecimiento de microorganismos proteolíticos debido a la liberación de bacteriocinas (colicinas), sustancias con acción bactericida, y está relacionado con la síntesis de vitamina K , fermentadoras de lactosa y móviles. (Mandell *et al*,2006)

E.coli; es causante de varias enfermedades en los animales como es la diarrea enterotoxigena, enfermedad de los edemas y colibacilosis aviar.

La colibacilosis aviar: es una enfermedad de importancia en el aspecto económico, producida por cepas invasoras de *E.coli*. Según la edad de las aves y el modo de infección, la enfermedad adopta varias formas clínicas; en el momento de ser puesto el huevo, su superficie puede estar contaminada con cepas potencialmente patógenas. Las bacterias atraviesan la cascara e infectan el saco vitelino. Si las bacterias se multiplican, el embrión muere, normalmente en la fase final de la incubación. Es posible que los embriones que sobreviven mueren poco después, ocurriendo las bajas alrededor de las 3 semanas, después de nacidos los pollitos. (Biberstein E. *et al*,;1990)

Género *Klebsiella*

El género *Klebsiella*; está muy extendido en la naturaleza: en la tierra, el agua, el polvo, la leche y los alimentos. También se las ve como organismos saprófitos de las vías respiratorias y del tracto digestivo del hombre y de los animales. Son microorganismos capsulados, inmóviles, fermentadores de lactosa, que fermentan la glucosa mediante la vía de fermentación del 2-3 butanodiol al igual que los del género *Enterobacter*. (Mandell *et al*,;2006)

La mayoría, produce colonias sumamente mucoides en placas debido a la producción de una cápsula de polisacárido abundante. Son indol negativas y pueden utilizar citrato como única fuente de carbono.

Género *Proteus*

Este género está muy difundido en la naturaleza, se le encuentra en el suelo, agua, aguas servidas, materiales de animales en descomposición, tracto intestinal del hombre, etc. Juega un papel importante en la descomposición de los cadáveres.

Se presenta con flagelos peritricos muy abundantes que hacen que “hormiguee” sobre la superficie de un medio sólido de cultivo. Dentro del género *Proteus* las especies más importantes son: *P. mirabilis* (indol negativo) y *P. vulgaris* (indol positivo). Estos microorganismos son lactosa negativos y son productores de ureasa, factor de patogenicidad en la producción de infecciones urinarias ya que esta enzima desdobla a la urea (muy abundante en la orina) en amoníaco y dióxido de carbono. (Mandell *et al.*, 2006)

Género *Shigella*

Shigella, es inmóvil y lisina negativa, no produce gas a partir de la glucosa, con la excepción de algunas cepas. No utilizan el citrato como fuente de carbono, no fermentan el mucato y no producen hidrolisis de la urea.

Género *Salmonella*

El género *Salmonella*, está constituido por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles con algunas pocas excepciones (*S. pullorum* y *S. gallinarum*). Se desarrollan entre 8 y 45°C, siendo 37°C su temperatura óptima de crecimiento. No sobreviven a temperaturas mayores de 70°C. Son bacterias fermentadoras de glucosa, no así de lactosa y sacarosa, con producción de ácido y gas. El pH óptimo para su desarrollo varía de 4 a 8 (Acha *et al.*, 2001).

Existen más de 2000 serotipos diferentes de *Salmonellas*, tienen distribución mundial e infectan a muchos mamíferos, aves y reptiles y son excretadas principalmente por las heces. En aves de corral, serotipos tales como *S.*



enteritidis, *S. gallinarum* y *S. pullorum*, infectan los ovarios y pueden ser aislados desde los huevos. La presencia de *Salmonella enteritidis* en huevos poco cocinados, puede dar lugar a intoxicaciones alimentarias en humanos (Quinn *et al.*;2002)

Género *Serratia*

Se trata de bacterias oportunistas, móviles y que fermentan la lactosa con lentitud o no la fermentan, aerobios facultativos, oxidasa negativo, indol negativo. Tinción de Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles, en forma de barra. Los microorganismos llevan flagelos peritricos. No resulta complicado su cultivo en laboratorio. Como única especie de enterobacterias, son capaces de producir tres enzimas, la ADNasa, gelatinasa y la lipasa. Como única fuente de carbono, pueden utilizar el citrato, no forman hidrógeno de azufre. *Serratia rubidea* y algunas cepas de *Serratia marcescens*, forman un colorante rojo (prodigiosina) bajo exclusión de aire.

Genero *Enterobacter*

Enterobacter: es un género de anaerobios facultativos, con forma de vara, bacteria común Gram negativas, y no formadoras de esporas de la familia enterobacteriaceae. Varias cepas de estas bacterias, son patógenas y causan infecciones oportunistas. El género *Enterobacter*, es un miembro del grupo de bacterias coliformes. No pertenece al grupo de coliformes fecales de bacterias, al igual que la *E. coli*, porque es incapaz de crecimiento en 44.5 °C en presencia de sales biliares. (Salazar *et al.*;2006)

El género *Enterobacter*, fermenta la lactosa con producción de gas durante una hora de incubación de 48 a 35-37 °C en presencia de sales biliares y detergentes. Es oxidasa negativa, indol negativo y la ureasa negativa.



Género *Acinetobacter*

Las especies de *Acinetobacter*, se encuentran ampliamente diseminadas en la naturaleza, siendo el agua y el suelo sus principales nichos ecológicos. Se han aislado de numerosos focos y fuentes, incluyendo leche y sus derivados, aves de corral y comida congelada, son bacterias Gram negativas, inmóviles, saprófitas, oxidasa positivas y negativas, que se distinguían de otras bacterias por su falta de pigmentación. Son bacilos cortos en fase logarítmica de crecimiento, haciéndose más cocoides o esféricos en fase estacionaria; se disponen en parejas, cadenas o agrupados irregularmente, pueden variar en la tinción, tamaño y disposición; además son inmóviles y no forman esporas. Son aerobios estrictos, temperatura de crecimiento 20 a 44°C, y su temperatura óptima es de 30-35°C. Para su aislamiento se recomienda una temperatura de 30°C. (Salazar *et al.*;2006)

Medios de cultivos.

En microbiología; un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos, fundamental para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades en animales y humanos.

Un microorganismo se puede sembrar en un medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar. Los medios de cultivo, contienen distintos nutrientes que van, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio para observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad.



Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

Temperatura

Los microorganismos mesófilos, crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43°C. Otros como los psicrófilos crecen a 0°C y los termófilos a 80°C o incluso a temperaturas superiores (hipertermófilos). En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más cortos, alrededor de 37°C, y los saprofitos tienen rangos más amplios.

Humedad

Un nivel mínimo de humedad, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37°C proporcionando una fuente adecuada de agua que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseque el medio.

Oxígeno

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos, sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. En un punto intermedio, los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias (tensión de oxígeno muy reducida), mientras los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones.



pH

La concentración de iones hidrógeno, es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque hay quienes requieren medios más o menos ácidos. No se debe olvidar que la presencia de ácidos o bases en cantidades que no impiden el crecimiento bacteriano pueden sin embargo inhibirlo o incluso alterar sus procesos metabólicos normales.

Esterilidad del medio

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles, para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El sistema clásico para esterilizar los medios de cultivo es el autoclave (que utiliza vapor de agua a presión como agente esterilizante)

Disponibilidad de nutrientes adecuados

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener, como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. Siempre han de estar presentes las sustancias adecuadas para ejercer de donantes o captadores de electrones, para las reacciones químicas que tengan lugar.

Agar XLD

El agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos, especialmente del género *Shigella*.



Fundamento

Agar XLD; es un medio selectivo y de diferenciación. Contiene extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas. Utiliza el desoxicolato de sodio como agente selectivo y, por consiguiente, inhibe los microorganismos Gram positivos. La xilosa, se incorpora en el medio, dado que la fermentan prácticamente todos los entéricos, excepto *Shigella* y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella* de los organismos no patógenos, dado que, sin lisina, *Salmonella* fermentaría rápidamente la xilosa y no se distinguiría de las especies no patógenas. Cuando la *Salmonella* agota el suministro de xilosa, la lisina es atacada por la enzima lisina descarboxilasa, lo que genera un cambio a un pH alcalino que imita la reacción de *Shigella*, para evitar el cambio similar en los organismos coliformes positivos a la lisina, se añaden lactosa y sacarosa para producir ácido en exceso. Para aumentar la capacidad de diferenciación de la fórmula, se incluye un sistema indicador de H₂S, formado por tiosulfato sódico y citrato férrico amónico, para la visualización del ácido sulfhídrico producido, lo que origina la formación de colonias con centros de color negro. Los organismos no patógenos no productores de H₂S no descarboxilan la lisina; por tanto, la reacción ácida producida por dichos organismos evita el oscurecimiento de las colonias, lo que sucede sólo con pH alcalino o neutro.

Crecimiento positivo

La fermentación de la Xilosa, lactosa y sucrosa, genera la producción de ácido provocando un cambio de color en el medio de rojo a amarillo. La producción de H₂S en condiciones alcalinas produce colonias con centro negro. Esta reacción se ve inhibida en condiciones acidas acompañadas de la fermentación de carbohidratos. La descarboxilación de la lisina en ausencia de fermentación de sucrosa y lactosa causa reversión en condiciones alcalinas y el color del medio cambia de nuevo a rojo.



La morfología y color de las colonias en agar XLD son las siguientes:

Salmonella: Colonias rojas con centro negro.

Shigella: Colonias rojas

E.coli: Colonias grandes, amarillas, algunas cepas pueden ser inhibidas.

Enterobacter/ Klebsiella: Colonias amarillas, mucoides

Proteus: Colonias rojas a amarillas, muchas cepas presentan centro negro.

***Salmonella Shigella* Agar**

Salmonella Shigella Agar (agar SS) es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, en especial los pertenecientes al género *Salmonella*, a partir de muestras clínicas

Fundamento

En el medio de cultivo la pluripectona y el extracto de carne, aportan los nutrientes para el desarrollo microbiano. Las sales biliares y el verde brillante inhiben el desarrollo de una amplia variedad de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus spp*, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. El tiosulfato de sodio permite la formación de H₂S que se evidencia por la formación de sulfuro de Hierro. El rojo neutro es el indicador de pH y el agar, es el agente solidificante. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo.

Salmonella, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen adecuadamente en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes.

La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de Hierro. Para aumentar la selectividad, se recomienda incubar previamente la muestra en Selenito Caldo



Resultados Positivos

Después de la incubación; registrar el crecimiento de microorganismos, las características típicas a observar incluyen: tamaño de la colonia color y morfología, después del crecimiento los no fermentadores de lactosa aparecerán como colonia sin color mientras que cualquier comensal fermentador de lactosa que sea hábil para crecer en el medio aparecerá en forma de colonias rosa o rojas. La mayoría de la *Salmonella* a menudo aparecerá con un punto negro en el centro que indica formación de H₂S.

La morfología y color de las colonias en SS agar son las siguientes:

E. coli: Crecimiento ligero, color rosa o rojo

Enterobacter/Klebsiella: Crecimiento leve, color rosa

Proteus: Incoloro, con centros blancos

Salmonella: Incoloro, generalmente con centro de color negro

Shigella: Incoloro

Pseudomonas: Crecimiento leve e irregular

Bacterias Gram positivas: Ausencia de crecimiento

Agar MacConkey.

Se trata de un medio selectivo, para el aislamiento de enterobacterias y diversos bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa aerobios y anaerobios facultativos. Puede utilizarse para todos los tipos de muestras clínicas y para una diversidad de materiales no clínicos

Fundamento

En el medio de cultivo; las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente



solidificante. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Resultados Positivos

Microorganismos fermentadores de lactosa: colonias rosadas rojizas,

Puede observarse halo de precipitación biliar.

Microorganismos no fermentadores de lactosa: colonias del

Color del medio, incoloras.

La morfología y color de las colonias en agar MacConkey son las siguientes:

E. coli: Colonias de color de rosa a rojo (pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis) *Enterobacter*, *Klebsiella* Colonias mucoides de color rosa

Proteus: Colonias incoloras, inhibición de agrupamiento dinámico alrededor de colonias aisladas.

Salmonella, *Shigella*: Colonias incoloras. Color del medio: Anaranjado a ámbar

Pseudomona: Colonias irregulares, de incoloras a color rosa

Agua Peptonada

Medio de cultivo empleado para el preenriquecimiento de microorganismos a partir de diferentes muestras. Es ampliamente utilizado en los protocolos de control higiénico de alimentos para la búsqueda de *Salmonella spp.*

Fundamento

El Agua Peptonada Bufferada; mantiene un pH alto durante el período de preenriquecimiento y anula los efectos del daño celular que pueden ocurrir a pH ácido. Esto es particularmente importante en las muestras de vegetales que tienen



una baja capacidad reguladora. También puede ser utilizado para evaluar alimentos de aves de corral.

En el medio de cultivo; la peptona, es la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y los fosfatos forman un sistema buffer que regulan el pH del medio.

Resultados Positivos

El crecimiento microbiano se observa por la turbidez del medio.

Caldo de selenito f

El caldo Selenito: sirve para el enriquecimiento de *Salmonellas* y *Shigellas* a partir de muestras como heces y orina. Es inhibidor de otros coliformes que incluyen algunas de las especies de *Shigella*. Este medio funciona mejor bajo una reducida tensión de oxígeno y para que sea más óptimo, se recomienda distribuirlo en tubos que proporcionen por lo menos 5 cm de profundidad. El medio preparado es claro y ligeramente amarillento.

Fundamento

En el medio de cultivo; la peptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, el selenito de sodio inhibe la flora Gram positiva y la mayoría de la flora entérica excepto *Salmonella* spp, durante las primeras 8-12 horas de incubación.

Resultado positivo

El crecimiento microbiano se observa por turbidez.

Pruebas bioquímicas

El estudio bioquímico que se lleva a cabo como complemento de otros estudios bacteriológicos, es posible gracias a las reacciones fisiológicas y químicas que llevan a cabo los microorganismos. Para esto se emplean medios de cultivo enriquecidos con productos útiles para el metabolismo celular, los cuales además contienen algún indicador que hace cambiar el color del medio, al efectuar dichos microorganismos sus funciones. Estos varían en su capacidad para utilizar diferentes compuestos (por ejemplo: carbohidratos, urea, citrato, etc.), para algunos microorganismos que se usan en su identificación en el laboratorio.

La identificación de un aislamiento bacteriano, puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de similitudes. Los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados, llamadas pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas), a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no. Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos, porque proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano, porque simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, ya que proveen los reactivos listos para su uso y son totalmente automatizables.

Agar citrato

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias, estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Serratia spp*, *Citrobacter spp* y algunas especies de *Salmonella spp*, sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, son incapaces de crecer con esos nutrientes.



Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons. Este medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente y azul de bromotimol como indicador de pH. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul.

RESULTADO +: Crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta.

RESULTADO -: No se observa crecimiento ni cambio de color, apareciendo verde

Indol

Mediante esta prueba, se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano, dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa. Para la realización de esta prueba la bacteria se cultiva durante 24-48 horas en un caldo de triptona con NaCl al 0,5% (la triptona presenta abundante triptófano). Para la posterior detección del indol se usa el reactivo de Kovacs, cuyos componentes son los siguientes: Alcohol amílico o isoamílico (puede sustituirse por alc.butilico) p-dimetilamino-benzaldehído HCl (concentrado)

Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, al añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs al medio, se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. Si esto ocurre después de 24 horas, la prueba se considera completa, pero si es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba.

RESULTADO +: Anillo de color rojo en la superficie del medio.

RESULTADO -: Anillo del color del Reactivo de Kovacs (ocre oscuro)



.Prueba de la Movilidad

Sirve para determinar, si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos, aunque existen algunas formas de cocos móviles. El medio manitol movilidad permite la realización de esta prueba gracias a ser semisólido, ya que presenta solamente 3,5 g/l de agar. En estas condiciones, las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por el contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron. Entre las enterobacterias, la movilidad nos permite diferenciar el género *Klebsiella spp* (-) de las restantes que suelen ser movilidad (+).

RESULTADO +: Aparece una turbidez que se difunde por todo el tubo.

RESULTADO -: Se produce una línea de crecimiento limitada a seguir la línea de siembra, mientras que el medio que la rodea se mantiene claro.

Prueba del ácido sulfhídrico

La presencia de un precipitado negro en los tubos de los medios SIM indica la formación del ácido sulfhídrico.

Agar Azúcar Triple Hierro (TSI).

Este medio de identificación contiene glucosa, sacarosa y lactosa, el agar TSI es uno de los más usados para ver la fermentación de carbohidratos en la familia Enterobacteriaceae. Se pueden tener varias posibilidades de fermentación de acuerdo a las características metabólicas del microorganismo como son:

Utilización de glucosa sola. Los microorganismos que fermentan solo la glucosa provocan en este medio una reacción alcalina en la superficie (roja) sobre un fondo ácido (amarillo, k/a) debido a que realizan una degradación aeróbica de la



glucosa en la superficie, convirtiendo el piruvato en agua y dióxido de carbono. Después de 18 a 24 horas de incubación, como la concentración de glucosa es baja (0.1%), los microorganismos empiezan a utilizar las peptonas que se encuentran en el medio, causando la liberación de amoníaco y produciendo un pH alcalino (rojo), gracias al rojo de fenol que tiene el medio como indicador de pH. En el fondo, como no hay oxígeno, se realiza una degradación anaeróbica y el piruvato se convierte en lactato con lo cual el pH disminuye quedando el pH ácido (amarillo).

Utilización de lactosa y sacarosa: algunos microorganismos tienen la facultad de fermentar la glucosa y la lactosa resultando una reacción ácida en la superficie (amarilla) y ácida en el fondo (amarilla, a/a). En este caso después de 18 a 24 hrs como la concentración de lactosa es alta (1.0%), o sea 10 veces más que la de la glucosa presente, no se ha utilizado completamente y la acidez persiste tanto en el fondo como en la superficie, en el caso de usar sacarosa la reacción sería la misma.

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Algunos microorganismos son capaces de provocar la descarboxilación de los aminoácidos por inducción de enzimas específicas, el resultado de esta descarboxilación es la producción de una amina o diamina y dióxido de carbono, tal es el caso de la producción de la enzima lisina descarboxilasa, la cual al actuar sobre la lisina produce una diamina llamada cadaverina.

En el medio LIA, se puede detectar la producción de la lisina descarboxilasa ya que se produce una reacción coloreada por un cambio en el pH del medio, que contiene como indicador púrpura de bromocresol. Un cambio del color original del medio (morado) hacia amarillo, en el fondo indica una reacción ácida por la fermentación de una pequeña cantidad de glucosa en el medio. Si el microorganismo produce lisina descarboxilasa, la acción de esta enzima sobre la lisina dará lugar a la cadaverina, la cual provocará un cambio de pH hacia la



alcalinidad, dando un color morado que sobrepasa la acidez debida a la glucosa, así pues, un fondo amarillo indica que no se produce lisina descarboxilasa y un color morado que si es producida.



X.MATERIALES Y MÉTODOS:

Tipo de estudio: Corte transversal

Población de estudio: 5 granjas avícolas; semi-tecnificadas, ubicadas 3 en el Departamento de León y 2 ubicadas en el departamento de Chinandega, con explotación de ponedoras

Área de estudio:

El departamento de León está ubicado en la parte occidental del país entre las coordenadas 12° 26' de latitud norte y 86° 53' de longitud oeste.

Limita al norte con los municipios de Quezalguaque y Télica al sur con el Océano Pacífico al este municipios de Lareynaga, La Paz Centro y Nagarote al oeste con los municipios de Corinto y Chichigalpa (Dpto. de Chinandega). Altitud sobre el nivel del mar 109.21 m.s.n.m.

El departamento de Chinandega, está ubicado entre las coordenadas 12° 37' de latitud norte y 87° 07' de longitud oeste, limita al norte con los municipios de Somotillo y Villanueva al sur municipios de Chichigalpa, El Realejo y Posoltega al este con los Municipios de Villanueva y Télica. Al oeste con los municipios de El Viejo y Puerto Morazán. Altitud sobre el nivel del mar 70.42 m.s.n.m.

Tamaño de la muestra: 180 huevos procedentes de 5 granjas avícolas semi-tecnificadas con explotación de ponedoras a manera que todas las granjas posean grupos de aves en las tres diferentes fases de postura, sin embargo se procesaron 132 huevos procedentes de las 5 granjas avícolas semi-tecnificadas con explotación de ponedoras, por no poseer grupos de aves en las tres diferentes fases de postura. Estos 132 huevos fueron procesados en pareja de acuerdo a la fase que pertenecía realizándoles exámenes físicos y microbiológicos una vez establecidos los grupos de cada fase.



Selección de la muestra: Se tomaron 12 huevos de forma aleatoria de cada una de las fases de postura (inicial, intermedia y final) de los diferentes grupos de aves en cada granja, siendo 6 huevos para examen físico y 6 para examen bioquímico por cada granja.

Toma y transporte de las muestras:

Las muestras, fueron tomadas con guantes estériles usando un guante por cada huevo fresco, con el fin de evitar la contaminación cruzada, cada muestra fue rotulada con código único en el guante empleado para su recolección, todos fueron depositados en un termo a 4-8 °C para su transporte al laboratorio de microbiología, en la escuela de medicina veterinaria de la universidad nacional autónoma de Nicaragua UNAN-León, donde se procedió a realizar la detección de enterobacterias en la parte externa e interna de los huevos.

Recolección de datos.

Se utilizó una ficha de recolección de datos de las granjas que contiene los siguientes acápite: datos generales, información productiva de la granja, manejo general, instalaciones, control de fauna nociva, adquisición/vaciado/repoblación/desinfección, otras consideraciones, bioseguridad, aspectos clínicos epidemiológico (ver anexos).

La ficha morfología de las características físicas e higiénicas de huevo, se utilizó para obtener información del examen físico de los huevos y se compone de los siguientes acápite: cascara, clara, yema, y cámara de aire. (Ver anexo)

Análisis de las muestras.

Los cascara(C) se lavaron en 100 ml de agua peptonada estéril (APE), luego se procedió a lavar los cascara con agua destilada estéril y alcohol, y secar con una gasa estéril, se perforaron por la cámara de aire con una puntilla estéril, el contenido del huevo (clara- yema) se mezcló en el propio cascara con una



jeringa estéril y se tomó 1ml de mezcla que se incubó en 9ml de APE en una relación de 1:10. (APE+ clara-yema) La mezcla se depositó en un tubo de ensayo de 15ml, se almacenó 10ml para detectar el crecimiento de microorganismos sin previo enriquecimiento de la muestra. Ambas mezclas (APE+ C) y (APE+ clara yema) se incubaron a 37°C por 18-24 horas y posteriormente, fueron inoculadas en agar MacConkey y agar XLD he incubadas a 37°C por 18-24 horas. Para la búsqueda de enterobacterias.

Detección de *Salmonella spp.*

De las mezclas anteriores (APE+ C) y (APE+ clara yema) se le agregó 1ml a 9ml de selenito F, en relación 1:10 se incubó a 37°C por 18-24 horas y a partir del crecimiento de este, se realizaron los cultivos en los medios agar MacConkey y agar SS, los cultivos en los agares mencionados fueron incubados a 37°C por 18-24 horas.

Identificación bacteriana

Se identificó la morfología de las colonias en todos los agares mencionados y se procedió a la identificación de las bacterias, mediante la realización de pruebas bioquímicas Triple azúcar más hierro (TSI), Lisina Hierro agar (LIA), Citrato y Azufre, Indol, Motilidad (SIM), preparados según las indicaciones de manufactura (OXOID).

Análisis de los datos

Los resultados fueron procesados en estadísticos descriptivos como frecuencias relativas y las asociaciones se determinaron por análisis de Chi cuadrado mientras que los gráficos de barra y sectores, se utilizaron para la presentación. Los datos fueron registrados y analizados en el Paquete Estadístico, para las Ciencias Sociales (SPSS) versión 19.



XI.RESULTADOS

Al realizar el aislamiento de Enterobacterias en 66 muestras de huevo procedentes de 5 granjas avícolas del occidente de Nicaragua, se encontró que el cascara presentaba un 78.8% de contaminación bacteriana y clara/yema 39.4 % (Gráfico N° 1)

Respecto al aislamiento de Enterobacterias en cascara, 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 *Shiguelia spp* 3.7%, *Serratia spp* 1.9 %. (Gráfico N° 2)

En el aislamiento de Enterobacterias a partir de Clara/Yema, se encontró *Shiguelia spp* 18.2 %, *E. coli* 10.6 %, *Klebsiella spp* 4.5%, *Enterobacter spp* 3%, *Salmonella spp* y *Serratia spp* en 1.5%. (Gráfico N° 3)

Al realizar el análisis físico de los 66 huevos, se observó que el 82% de estos presentaban ambas chalazas y el 18% presentaba solamente una. (Gráfico N° 4). El color de la yema en 61% de los huevos fue amarilla, el 24 % amarillo pálido y el 15 % de color naranja (Gráfico N° 5). Al observar las claras el 76 % fue de color amarilla y el 24 % transparente (Gráfico N° 6). La limpieza del cascara un 70 % de los huevos no presentaba suciedad, el 26 % presentaba heces y el 4 % basura (Gráfico N° 7)

De las cinco granjas avícolas, se observó que las razas de gallinas ponedoras que explotan son Deklad White 46 %, Hi Line 36 % y Hisex Brown 18 % (Gráfico N° 8).

De los aislamientos bacterianos en cascara de acuerdo a las razas de gallinas ponedoras, se observó que la raza Hisex Brown, fue la que menor contaminación bacteriana presento con un 37.5% de *E. coli* únicamente, la Hi line, se vio afectada por *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Enterobacter spp* y *Shiguelia spp* con un 16.7 % respectivamente. La Dekald White, fue la más afectada por *Klebsiella spp*,



Enterobacter spp y *Shiguelia spp* con 5.6% (Gráfico N° 9), afectada con *E. Coli* 66.6 %, *Salmonella spp* con 11 % (Gráfico N°9)

De los aislamientos bacterianos en clara/yema de acuerdo a las razas de gallinas ponedoras, se pudo ver que la Hisex Brown, se encontró contaminada solamente por *E. coli* con un 25%, la Hi line por *Klebsiella spp* 8.3% y *Serratia spp* 16.7%, la Dekald White con *E. coli* 13.3%, *Salmonella spp* 3.3%, *Enterobacter spp* 6.7% y *Shiguelia spp* 40% (Gráfico N° 10)

En los aislamiento bacteriano de clara/yema de acuerdo a la clínica, se observó que presentaron diarrea los que fueron positivos a *E. coli* 14.3%, *Salmonella spp* 100%, *Klebsiella spp* 33.3% y *Enterobacter spp* 100%. Los que tuvieron disminución de la postura fueron positivos a *E. coli* 42.9% y la dificultad respiratoria los positivos a *Klebsiella spp* 66.7% y *Serratia spp* 100% (Gráfico N° 11).

De información productiva de la granja, se observa que la granja 1 y la granja 4 contaban con las tres etapas de postura y que todas las granjas contaban con la fase final (Tabla N° 1)

De información sobre bioseguridad en las granjas avícolas, se observó que la granja 1 la granja 2 no cuentan con registro de visitas, las granjas 1, 2 y 3 no poseen pediluvios ni módulos sanitarios (Gráficos N° 2)

De información Clínica-Epidemiológica, se observó que las granjas 3, 4 y 5 presentaron muertes recientes, y solo dos granjas tuvieron aves enfermas recientes (Tabla N° 3)



XII.DISCUSIÓN

En este estudio se encontró un alto porcentaje (78.8%) de enterobacterias en el cascara externa, resultado que no debe alarmar por la procedencia de dichas bacterias, estos resultados, son similares al estudio de Fernández, quien reporta un 78% de huevos con enterobacterias en el cascara de huevos. (Fernández *et al.*; 2005) Los altos porcentajes de contaminación en ambos estudios, quizás sea por una deficiencia de manejo en las granjas avícolas, estos estudios difieren al de Leyva, al reportar un porcentaje inferior (17.57%), esto probablemente indica que los huevos de dicha granja posee un mejor manejo sanitario. (Leyva *et al.*; 1996)

En el análisis interno de clara y yema homogenizadas, se detectó una cantidad considerable con enterobacterias (39.4%), resultados superiores a los encontrados por Leyva que aisló 0.3% de enterobacterias en clara yema homogenizadas, mientras al analizarlas por separado encontró 8.6% en yemas y ninguna en clara, (Leyva *et al.*; 1996), estas condiciones pueden darse por varios factores intrínsecos al ave como la edad, ya que a mayor edad disminuye la calidad del huevo y el espesor de la cutícula será menor a 5 micras. La raza, algunas aves producen huevos desprovistos de cutícula, factores extrínsecos como temperatura, el huevo recién puesto se encuentra caliente y al tener contacto con heces frías las bacterias penetran al interior del huevo, ventilación, estrés, alimentación, manejo deficiente de la granja y el manejo higiénico sanitario del personal, son factores que contribuyen a que se desarrollen infecciones del tracto reproductivo de las aves a nivel transovarica y oviductual .

Se aislaron enterobacterias, en cascara intactos siendo las predominantes *E.coli* y *Enterobacter spp*, bacterias microbionas de la flora cloacal de la gallina, estas bacterias pueden producir enfermedades en los humano solo bajo ciertas condiciones, tales como: la dosis infectante, especie y serotipos bacterianos así como el estado inmunológico del receptor, no obstante la detección de *Salmonella spp* es importante debido a su alta patogenicidad, estos datos concuerdan con los



resultados del estudio realizado por Leyva y Clerc encontrando los mismos géneros de enterobacterias (Leyva *et al.*; 1996, Clerc *et al.*; 2003)

De los aislamientos en clara y yema homogenizadas, se detectaron enterobacterias, siendo los géneros predominantes *Shigella spp* y *E.coli*, la presencia de *E. coli* dentro del huevo, quizás se deba a una contaminación transovarica y oviductual, la *Shigella spp* al tener un alto porcentaje (18.2%) sugiere que posee mecanismos específicos que le permitan atravesar el cascaron con mayor facilidad. Se aisló *Salmonella spp*, en 1.5% de las muestras totales, detectar tales género en el interior de los huevos, es de interés veterinario, ya que la contaminación puede estar asociada a malas prácticas de manejo, la salud publica también se ve afectada al consumir huevos contaminados que pueden causar intoxicaciones alimentarias, sin embargo, debido a los hábitos alimenticios de los Nicaragüenses de poco consumo de huevo crudo, no se han reportados brotes de intoxicaciones o infecciones asociadas al consumo de huevos.

En el examen físico, no se encontró ninguna anomalía que indicara la posible contaminación de los huevos frescos comerciales, pese a que no se realizó tipificación de las enterobacterias encontradas según Gantois, 2008 “*Salmonella Enteritidis*, es la única bacteria que puede atravesar el huevo y multiplicarse dentro de él sin inducir cambios notables”.

Tres razas de gallinas ponedoras son explotadas en las granjas muestreadas, siendo las predominantes Dekalb White, esto puede deberse a que los avicultores consideren esta raza de mayor rentabilidad, ya sea por la producción de huevos, resistencia a enfermedades y por ser más cotizado por los consumidores el huevo blanco que el moreno.

Las razas Dekalb White y Hi Line, son las más afectadas con diferentes enterobacterias en cascaron y en menor porcentaje Hisex Brown. De las dos primeras mencionadas coinciden en tres géneros de enterobacterias y difieren en tres, Dekalb White, es la única de las tres razas que presento *Salmonella spp*.



Siendo analizados todos los cascarones por cultivos bacteriológicos, caldo enriquecido (selenito F) y pruebas bioquímicas.

En el análisis de clara y yema, resultaron positivas a enterobacterias las tres razas de gallinas muestreadas, siendo la más afectada Dekalb White con 5 géneros, seguida de Hi Line con 2 y Hisex Brown 1, cabe mencionar que Dekalb White es la única que presenta *Salmonella spp.* Las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son las responsables de la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), siendo *Salmonella spp.* El patógeno más importante causante de intoxicaciones alimentarias en el mundo. El huevo por su contenido en nutrientes representa un sustrato excelente para el crecimiento de bacterias, principalmente *Salmonella spp.* Y otras enterobacterias, por lo tanto, se consideran un vehículo importante en la transmisión de enfermedades por el consumo de alimentos. (Torres *et al.*,; 2002)

Del aislamiento de enterobacterias en clara y yema homogenizada, se asocian las enfermedades padecidas por las aves procedentes de las granjas muestreadas, que presentaban cuadros gastroentericos provocados por *E.coli*, *Salmonella spp*, *Klebsiella spp* y *Enterobacter spp*, estos géneros coinciden en las mismas características de dichos cuadros, en la asociación de los géneros bacterianos aislados de clara y yema con las características clínicas, se observó que *Serratia spp* y *Klebsiella spp*, tienen antecedentes de dificultades respiratorias, lo que es congruente con las patologías propias de estos agentes, mientras que la disminución de la postura se asocia con *E. Coli*, esta suele afectar órganos internos como corazón, bazo, hígado y ovarios, la principal forma de infección del tracto reproductivo es por contaminación fecal de la cloaca. (Biberstein E. *et al.*,;1990)



XIII.CONCLUSIONES

- Se obtuvo una alta proporción de cascarones contaminados con enterobacterias.
- Se encontró una alta cantidad de clara y yema homogenizadas infectadas con enterobacterias.
- *Escherichia coli*. (*E. coli*) fue la bacteria encontrada con más frecuencia en la contaminación de cascarones.
- *Shiguella spp.* fue la bacteria encontrada con más frecuencia en la infección de clara y yema homogenizadas.
- *Escherichia coli*. (*E. coli*) fue la bacterias detectada con más frecuencia de las enfermedades padecidas por las aves
- De todos los huevos analizados físicamente la mayoría presento condiciones propias de huevos frescos.
- De las tres razas Dekalb White es la raza más afectada por enterobacterias.



XIV.RECOMENDACIONES

- Elaboración de estudios posteriores, donde se realice la tipificación de cada enterobacteria y el conteo de la carga bacteriana, así como la recolección de muestras de cama, dentro de los galpones e hisopos cloacales de las gallinas ponedoras.
- A las autoridades encargadas de la vigilancia epidemiológica de las granjas de gallinas ponedoras, procedan a realizar estudios microbiológicos del huevo periódicamente.
- A los encargados de las granjas avícolas, deben mejorar la condición higiénica sanitaria dentro del galpón, la activación de pediluvios sanitarios fuera de los galpones, la aspersion de vehículos al entrar y salir de la granja, el cambio de ropa y calzado al ingreso de galeras y el mejoramiento del estado sanitario de las aves.



XV.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Arias, J.; M. Fernández; Y. Nys. (1998)¿Qué se entiende por un huevo fresco? Nouzilly, Santiago: Universidad de Chile-INRA, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Revista de Extensión Tecnovet. Disponible en Internet,URL:http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9610%2526ISID%253D458,00.html.
2. Acha, P., B. Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al Hombre y a los animales.2001, Volumen I, Bacteriosis y micosis. (3ª ed). Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C, USA.
3. Biberstein L, Chung Zee Y.Tratado de Microbiología Veterinaria, ACRIBIA S.A, 1990, Zaragoza, España
4. Brake, J. Prevención de contaminación bacteriana en huevos. Avicultura Profesional 2000, 18 (1):22-25.
5. Clerc Troncoso M *et al.*, Detección de *Salmonella spp.* en huevos de gallina comercializados en ferias de la ciudad de Valdivia (tesis de grado) Valdivia– Chile: Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias Instituto de Patología Animal; 2005. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fvc629d/doc/fvc629d.pdf> .
6. Castelló, J. A., F. Franco G. y M. Pontes P. 1989. Producción de huevos. Real Escuela de Avicultura. Barcelona, España.
7. Dolman, J., R.G Board. The influence of temperature on the behavior of mixed bacterial contamination of the shell membrane of the hen's eggs. Epidemiol. Infect.1992 108 (1):115-121.
8. Fernández Salazar K. Control bacteriológico de huevos provenientes de crianza artesanal, a la venta en el mercado municipal de Chillán.(tesis de grado). Chillán-Chile: Universidad De Concepción facultad de medicina veterinaria departamento de patología y medicina preventiva; 2005 http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/tesis/2005/fernandez_k/doc/fernandez_k.pdf.



9. FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación /Organización Mundial de la Salud). 2002. Evaluaciones de riesgos de *Salmonella* en huevos y pollos: Resumen interpretativo. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra1_sp.pdf
Consultado el 15 de Noviembre de 2013
10. FAO. Código de prácticas de higiene para los huevos y los productos de huevo. (2007) CAC/RCP. Disponible en URL: [//www.fao.org/docrep/012/i1111s/i1111s01](http://www.fao.org/docrep/012/i1111s/i1111s01.pdf). Pdf. Consultado el 30 de noviembre 2013
11. Gantois, I *et al*.; Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*. (2008) Disponible en URL: <http://www.tandfonline.com.ezbiblio.usfq.edu.ec/doi/pdf/10.1080/03079450802216611> [consulta 20 de Diciembre de 2013]
12. Instituto de Estudios del Huevo (2006) *Seguridad Alimentaria en huevos y ovoproductos*. Segunda edición. Madrid- España.
13. Instituto de Estudios del Huevo (2007) *Manejo del huevo y los ovoproductos en la cocina*. Primera edición. Madrid- España.
14. Jay, J. Microbiología moderna de los alimentos 1992 (3ª ed.). Acribia. Zaragoza, España.
15. Loaiza Juliana. Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área Metropolitana. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia 2011; 6(2)20-28 <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/2037>.
16. Latorre, A. Detección de *Salmonella spp.* en crianzas artesanales de gallinas autóctonas chilenas mediante técnicas microbiológicas y moleculares (PCR). 2003, Tesis Mg. Cs. Vet. Universidad de Concepción, Fac. Med. Vet. Chillán, Chile.
17. López, J., A. Latorre, P. Gädicke. Detección de *Salmonella spp.* en crianzas artesanales de gallinas autóctonas chilenas mediante técnicas microbiológicas y moleculares 2003(PCR). Acta Microbiología 9 (1):126.



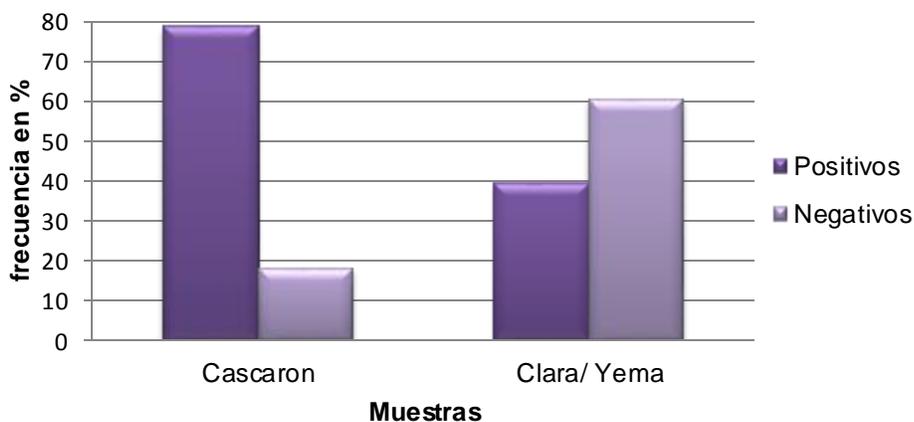
18. López, S. Calderon, V. Manual de Procedimientos de Bacteriología Medica. LITONIC. 2004. Managua, Nicaragua.
19. Mandell GL, Dolin R, Bennett J Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica. Elsevier Churchill Livingstone 2006 Madrid;
20. Naadem, H.F. Uso de Formaldehído en las operaciones de incubación. Avicultura Profesional 1992, 17 (9): 22-23.
21. North, M., D. Bell. 1993. Manual de producción avícola (3ª ed) El Manual Moderno. México.
22. Olson Cuenca M. Aislamiento e identificación de enterobacterias en conos de cajas de huevos (tesis de grado) Guadalajara, Jalisco: Universidad de Guadalajara Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia; 1983 http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4088/Olson_Cuenca_Martha_Elena.pdf?sequence=1
23. Padrón, M. Calidad Microbiológica del huevo incubable. 1992 Avicultura Profesional 9 (4): 173-178.
24. Quinn, P., B. Markey, M. Carter, W. Donnelly and F. Leonard. 2002. Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Science. Oxford, UK.
25. Stanchi, N., Martino, P., Microbiología Veterinaria. Inter-Medica. 2007. Buenos Aires, Argentina
26. Salazar de Vegas, E.Z, *Acinetobacter spp* aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos, Mérida, Venezuela, Universidad de los Andes Mérida, 2006. Disponible en medicina.ufm.edu/imagenes/e/e6Acinetobacter.pdf
27. Sánchez Mora M. Determinación de la prevalencia de enterobacterias del género *Salmonella spp.* en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia de Tungurahua. (tesis de grado) Quito-Ecuador: Universidad Central del Ecuador Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2013. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1157>.
28. Sauveur, B. El huevo para consumo: bases productivas. 1993 Mundi Prensa. Madrid, España.



29. Thapon, J.L. Huevos y ovoproductos. 1994. pp 221-235 En: C.M Burgeois, J.F. Mescle, J Zucca. (Ed.) Microbiología alimentaria vol 1. Acribia. Zaragoza, España.
30. Valdez. M, Vivanco. D, Microbiología y Parasitología Medica, 2001 <http://www.sisman.utm.edu.ec/libros/FACULTAD%20DE%20CIENCIAS%20DE%20LA%20SALUD/CARRERA%20DE%20MEDICINA/03/Salud%20e%20Infeccion%20Parasitol,%20Bacteriol/Llop,%20Valdez-Dapena%20-%20Microbiologia%20y%20Parasitolog%C3%ADa%20m%C3%A9dica%20omo%201/microcap26.pdf>

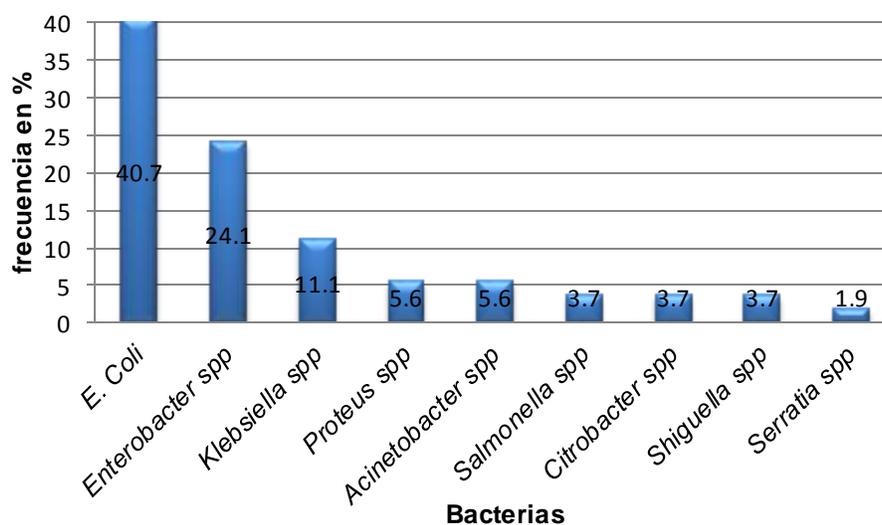
ANEXOS

Gráfica N° 1



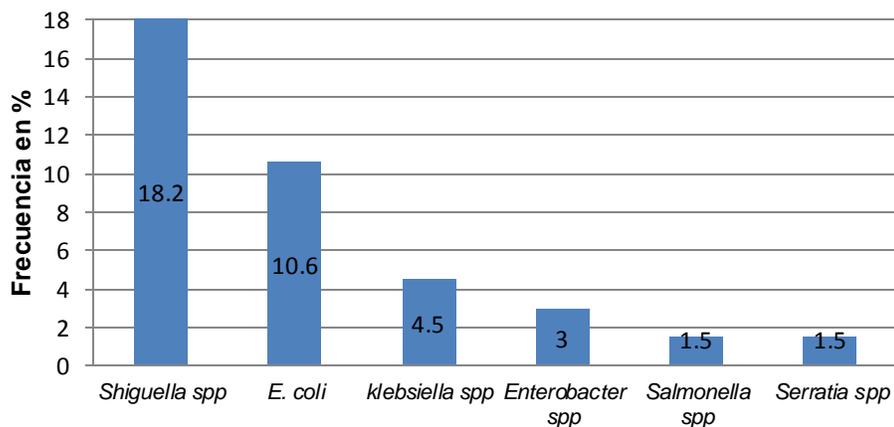
Aislamiento de enterobacterias en 66 muestras de huevos

Gráfica N° 2



Bacterias aisladas a partir de cascoron de huevos

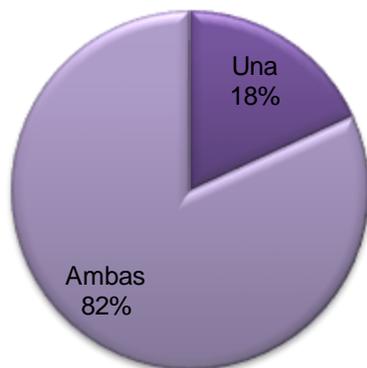
Gráfica N° 3



Enterobacterias

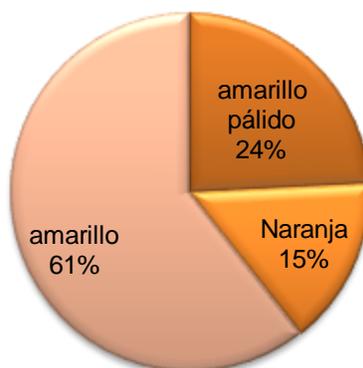
Enterobacterias aisladas a partir de clara/yema en huevos de 5 granjas del occidente de Nicaragua

Gráfica N° 4



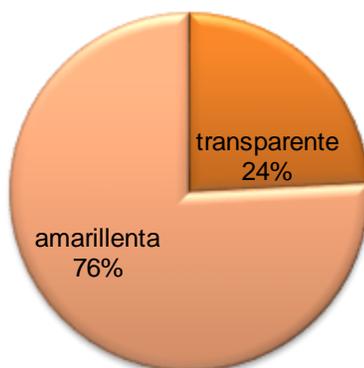
Presencia de chalaza en 66 huevos de 5 granjas en occidente de Nicaragua

Gráfica N° 5



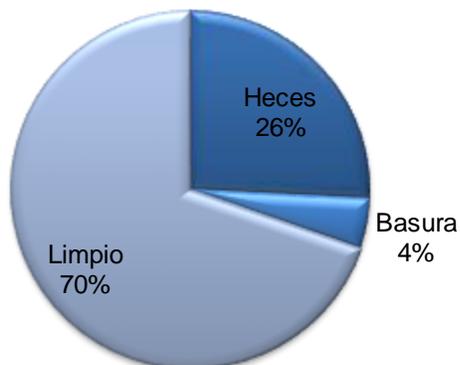
Color de la yema en 66 huevos de 5 granjas en occidente de Nicaragua

Gráfica N° 6



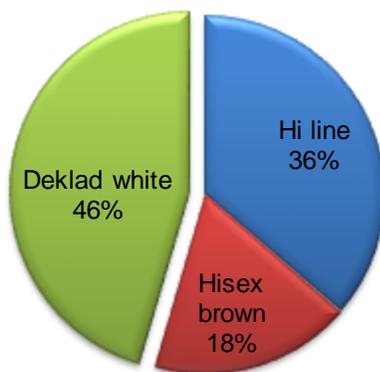
Color de la clara en 66 huevos de 5 granjas en occidente de Nicaragua

Gráfica N° 7



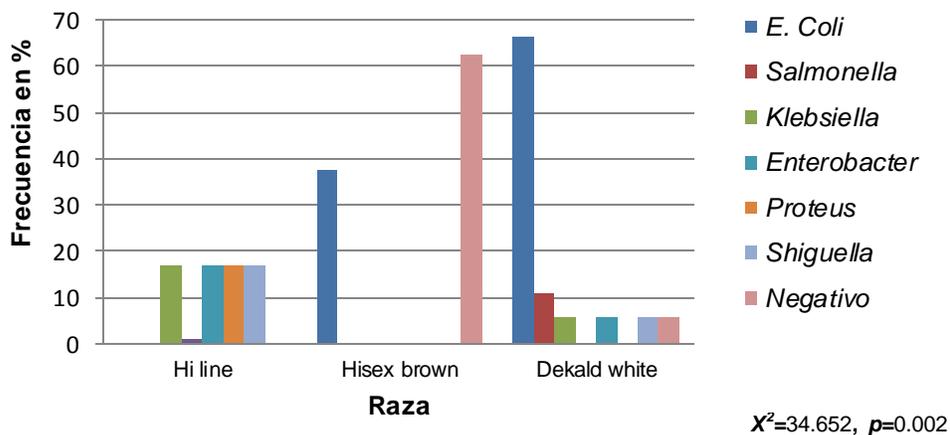
Limpeza del cascaron en 66 huevos de 5 granja en occidente de Nicaragua

Gráfica N° 8



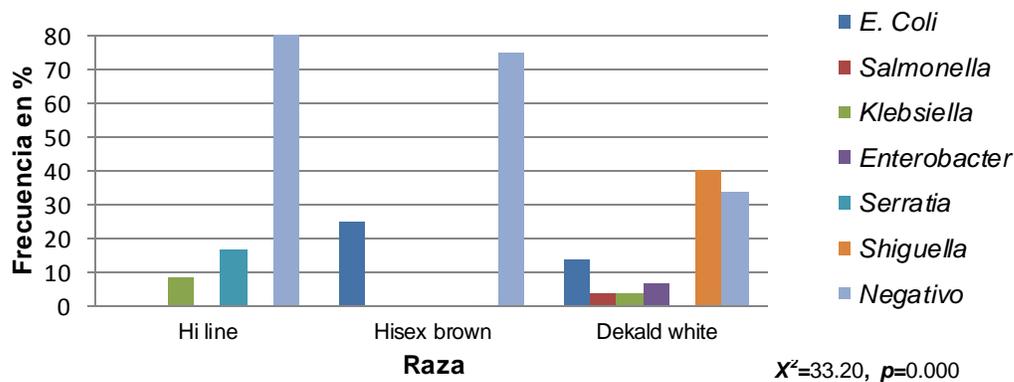
Raza de gallinas ponedoras en 5 granjas en occidente de Nicaragua

Gráfica N° 9



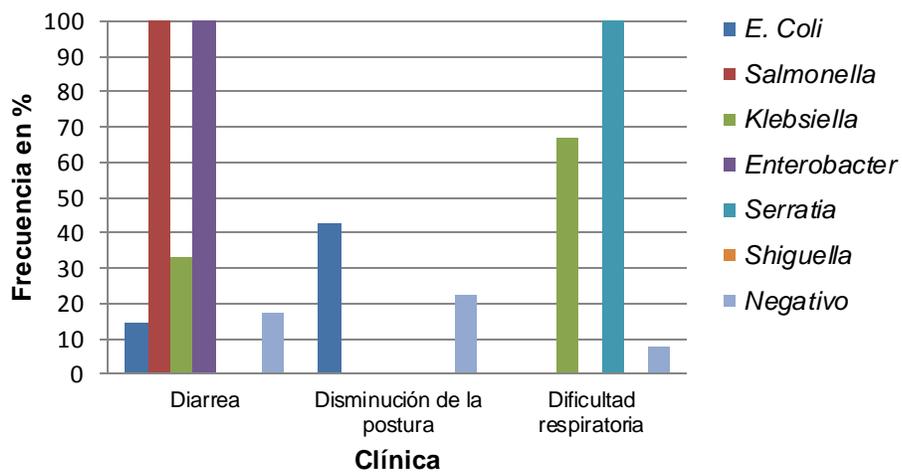
Aislamiento bacterianos en cascara de acuerdo a las razas de gallinas ponedoras

Gráfica N° 10



Aislamiento bacterianos en clara/yema de acuerdo a las razas de gallinas ponedoras

Gráfico N° 11



Aislados bacterianos de clara/yema de acuerdo a la Clínica

Aislados bacterianos de clara/yema de acuerdo a la clínica		
Clínica	χ^2	p
Dificultad respiratoria	24.356	0.000
Disminución de la postura	-	0.270
Diarrea	16.936	0.010



Ficha para la recolección de datos



Universidad
Nacional
Autónoma de
Nicaragua - León

Centro Veterinario
Diagnóstico e Investigación
CEVEDI
Laboratorio Microbiología Veterinaria

UNAN - León
Campus Agropecuario, León,
Nicaragua
Teléfono: (505) 311 1779
(505) 311 1780
e-mail: cevediananleon@gmail.com



Facultad de Medicina Veterinaria

Ficha de recolección de datos para el estudio Detección de enterobacterias que alteran las características físicas e higiénicas en huevos procedentes de 6 granjas avícolas de los Departamentos de León y Chinandega Octubre 2013.

I- Datos Generales.

Código _____
Fecha y hora de toma de muestra _____ Departamento _____
Municipio _____ Comunidad _____

I- Datos de la Granja:

- 1- Nombre de la granja _____
- 2- Nombre del propietario _____
- 3- Dirección y Coordenadas _____

II- Información productiva de la granja

Capacidad de la granja _____
Capacidad utilizada _____
Numero de galera _____
Numero de aves por galera _____

Categoría de las aves

- Pollitas
- Reemplazo
- Ponedoras

Producción de huevo por día _____

Etapas de postura

- Inicial
- Intermedia
- Final

Razas

- Hi line
- Hi line brown
- Hisexbrown
- Dekaldwhite
- Ross Hubbard
- Otros

III. Manejo general

- | | |
|--|---|
| 1- Se maneja una sola línea | 6- Tipo de alimento |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Crecimiento |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Desarrollo |
| 2- Se maneja edades múltiples en la granja | <input type="checkbox"/> Ponedoras |
| <input type="checkbox"/> Si | 7- Alimento comercial |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Si |
| 3- Posee programa y registro de vacunación | <input type="checkbox"/> No |
| <input type="checkbox"/> Si | 8- Alimento elaborado por la misma granja |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Si |
| 4- fecha de ultima vacunación | <input type="checkbox"/> No |
| | 9- Cantidad de alimento consumido por etapa |

IV. Instalaciones

- | | |
|---|--|
| 1- Existe bodega para químicos | 6- Dimensión de las galerías(m ²) |
| <input type="checkbox"/> Si | Largo _____ |
| <input type="checkbox"/> No | Ancho _____ |
| 2- Existe bodega para alimento | Alto _____ |
| <input type="checkbox"/> Si | 7- Frecuencia con que se limpia los nidos |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Diario |
| 3- Pisos de cemento dentro de la galera | <input type="checkbox"/> Dos veces por semana |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Otros |
| <input type="checkbox"/> No | 8- Frecuencia de cambio de cama |
| 4- Tipo de bebedero | <input type="checkbox"/> Semanal |
| <input type="checkbox"/> tipo niple | <input type="checkbox"/> Cada quince días |
| <input type="checkbox"/> campana | <input type="checkbox"/> Una vez al mes |
| <input type="checkbox"/> canaleta | <input type="checkbox"/> Otras |
| 5- Tipo de cama | 9- Tratamiento físico, químico biológico de la gallinaza |
| <input type="checkbox"/> Viruta | <input type="checkbox"/> si |
| <input type="checkbox"/> Granza | <input type="checkbox"/> no |
| <input type="checkbox"/> Otras | |

V- Control de fauna nociva

1- Control de la maleza y desechos alrededor de las galeras

- Si
- No

2- Existen medidas que eviten el ingreso de aves silvestres a las galeras

- Si
- No

3- Tienen programa y control de roedores

- Si
- No

4- Tienen programa y control de insectos

- Si
- No

5- Existen otros animales domésticos con acceso a la granja

- Si
- No

VI. Adquisición/vaciado/repoblación/desinfección

1- Semanas de vida de las pollitas compradas

- De una semana
- De quince semanas

2- Repoblación de parradas provenientes de establecimientos aprobados con estatus sanitario reconocido

- Si
- No

3- Procedencia de parrada

- Nacionales
- Extranjera

4- Tienen Programa de limpieza, lavado y desinfección

- Si
- No

5- Realizan vacío sanitario de al menos 12 días (cuarentena)

- Si
- No

VII. Otras consideraciones

- | | |
|---|---|
| 1- Áreas específicas para la selección del huevo | 4- En que se almacena el huevo |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Separadores |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> Cajas de cartón |
| 2- Existe lavamanos en área donde se selecciona el huevo | 5- Se transporta el huevo en vehículo cerrado que se pueda desinfectar fácilmente. |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Si |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| 3- Hay descarte seguro del huevo no comercial | |
| <input type="checkbox"/> Si | |
| <input type="checkbox"/> No | |

VIII. Bioseguridad

- | | |
|--|--|
| 1- Posee registro de visitas | 6- Al ingresar a las galeras se bañan, usan ropa y ropas exclusivas para dicha Área |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Si |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| 2- Existencia de cerca perimetral | 7- Pediluvio sanitario al ingreso de la granja y de galeras |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Si |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| 3- Acceso controlado de personas y vehículos | 8- Se utiliza el sistema todo dentro-todo fuera |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Si |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| 4- Desinfección de vehículos a la entrada y salida | 9- Poseen fosa de cremación |
| <input type="checkbox"/> Si | <input type="checkbox"/> Si |
| <input type="checkbox"/> No | <input type="checkbox"/> No |
| 5- Módulos sanitarios funcionales y limpios al ingreso de la granja | |
| <input type="checkbox"/> Si | |
| <input type="checkbox"/> No | |



IX- Aspectos clínicos epidemiológicos

1- Presencia de aves muertas en los últimos días.

- Si
- No

2- Se le han presentado muertes repentinas

- Si
- No

3- Se le han presentado muertes masivas

- Si
- No

4- Ha habido aves enfermas en los últimos 3 días

- Si
- No

5- Sintomatología de aves enfermas

- Diarrea
- Estornudos
- Inapetencia
- Tos
- Disminución de la postura
- Descargas nasales
- Tos
- Estertores
- Dificultad respiratoria
- Aves deprimidas
- Síntomas nerviosos
- Otros

6- Se han realizado análisis de laboratorio anteriormente

- Si
- No

Resultados _____



FICHA DE LA MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y ORGANOLÉPTICAS

Morfología y características físicas y organolépticas del huevo

Cascaron

Cascara

- Lisa
- Corrugada
- Fisuras

Color

- Blanco
- Moreno

Limpieza del cascaron _____

Resistencia a la rotura

- Resistente
- Poco resistente

Clara

Consistencia

- Alta
- Baja

Color

- Transparente
- Amarillenta

Chalaza

- Asimétrica
- Simétrica
- Ambas
- Una



Yema

Color

- Amarillo pálido
- Naranja
- Amarillo

Estructura de la yema

- Abombada
- Plana
- Batida

Ubicación

- Centrada
- No centrada

Cámara de aire _____

- Fresco
- No fresco

Índice de la yema _____

Resultados cascara Bacteriología

Código de la muestra:

1- Salmonella

- Positivo
- Negativo

2- Enterobacterias

- Positivos
- Negativos

Tipo de enterobacteria

- E.coli
- Klebsiella
- Pseudomona
- Enterobacter
- Citrobacter
- Proteus
- otras

Resultados Clara- Yema Bacteriología

1- Salmonella

- Positivo
- Negativo

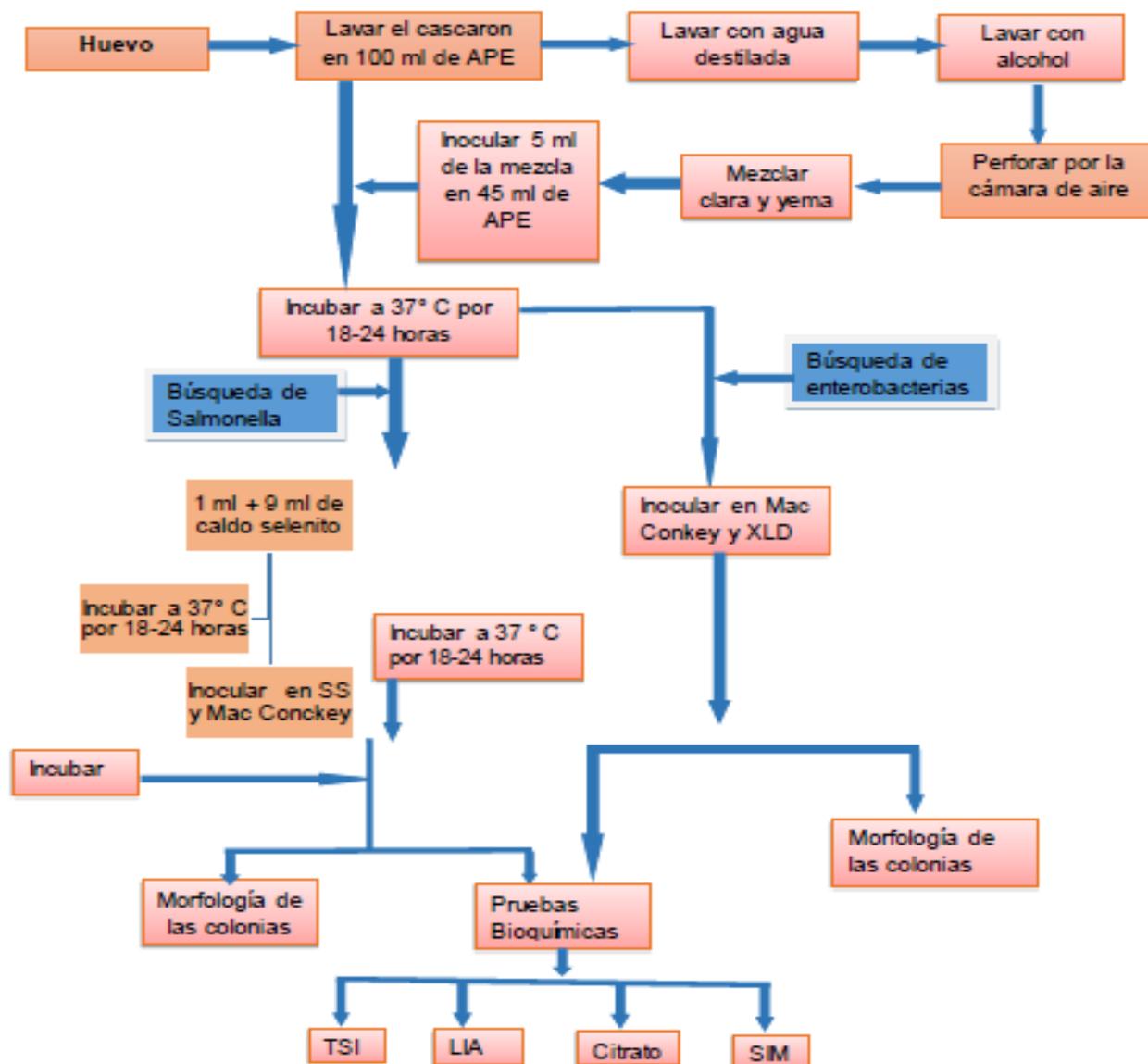
2- Enterobacterias

- Positivos
- Negativos

Tipo de enterobacteria

- E.coli
- Klebsiella
- Pseudomona
- Enterobacter
- Citrobacter
- Proteus
- otras

FLUJOGRAMA PARA DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS



Leyenda

APE: Agua peptonada estéril

XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato

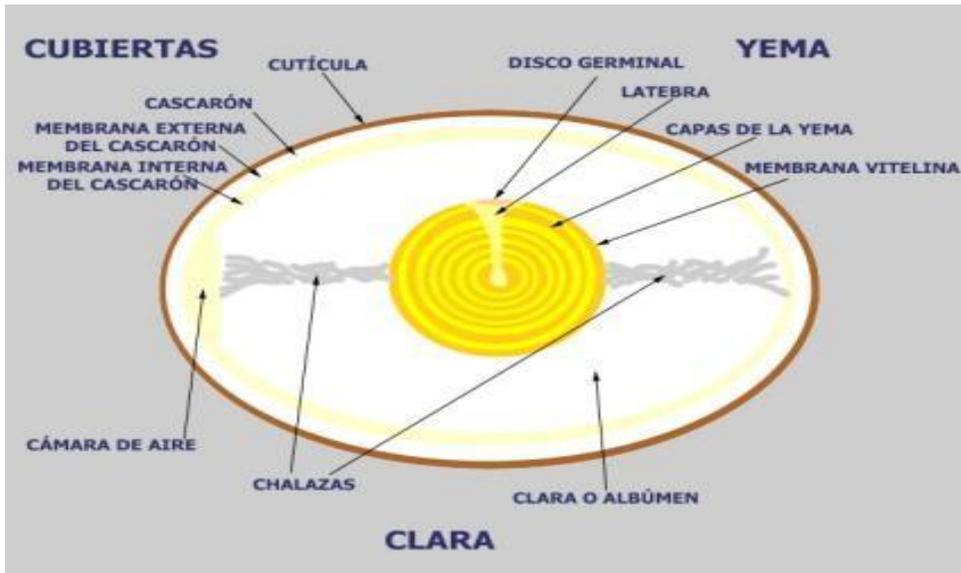
SS: Salmonella Shiguela

TSI: Triple Azúcar Hierro

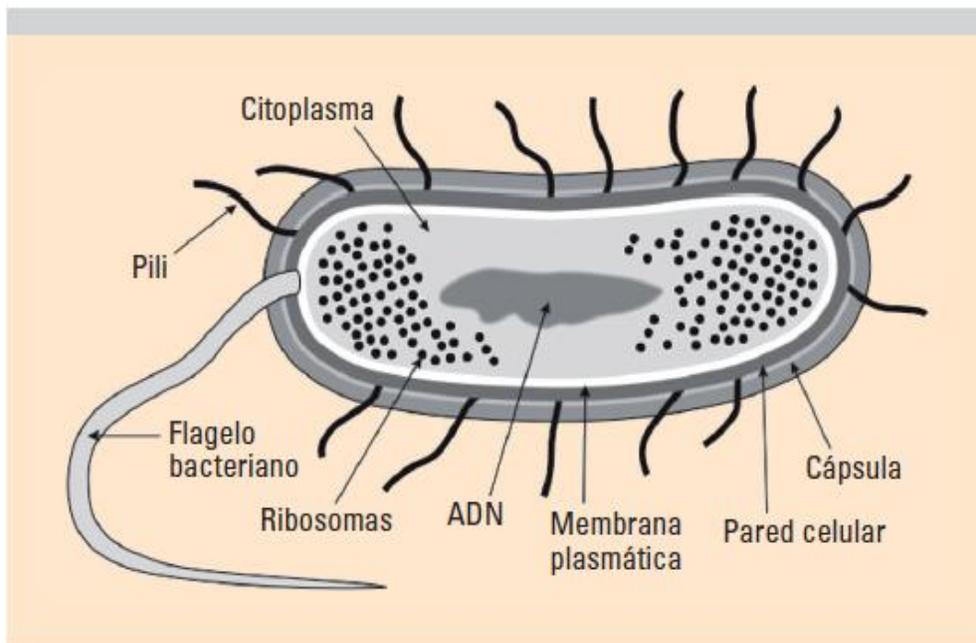
LIA: Lisina Hierro

SIM: Azufre, Indol, Motilidad

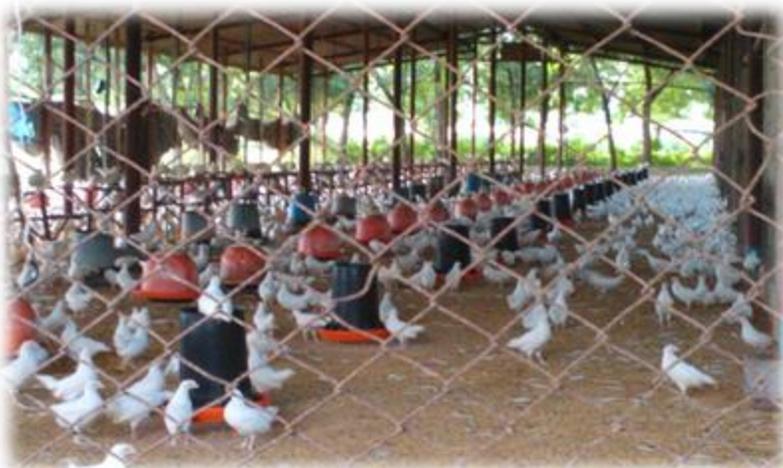
Estructura del huevo



Estructura de la familia *Enterobacteriaceae*



Granjas Visitadas



Análisis de los huevos



Pruebas bioquímicas realizadas



Crecimiento de *Salmonella* spp

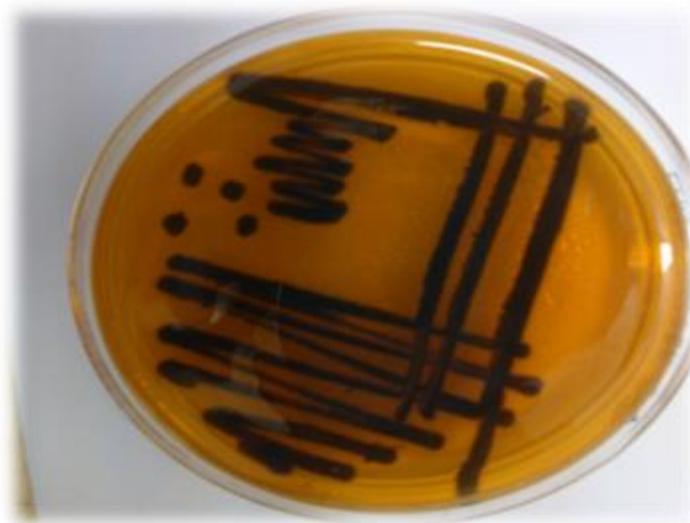
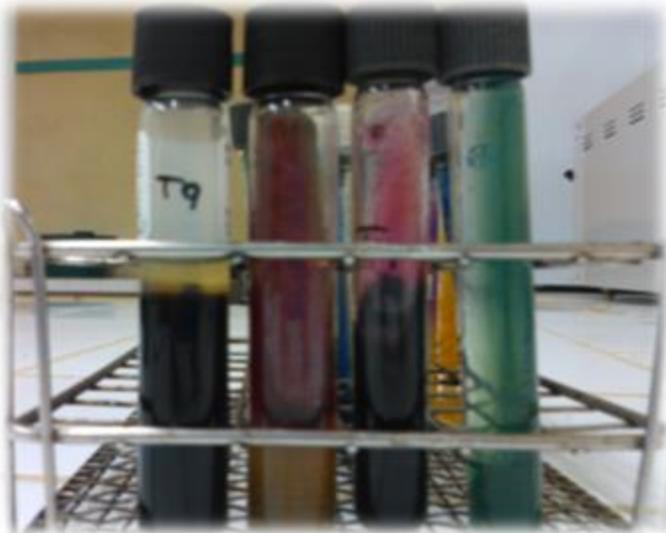


Tabla N° 1

Información Productiva de las granjas							
Granja	Capacidad	Capacidad utilizada	Número de galeras	Etapas de posturas			Producción de huevo/día
				Inicial	Intermedio	final	
1	10000	10000	4	Si	Si	Si	5000
2	7000	7000	3	No	No	Si	4800
3	30000	2000	12	No	No	Si	9300
4	28000	21000	4	Si	Si	Si	18000
5	40000	20000	6	Si	No	Si	11580

Tabla N° 2

Información sobre bioseguridad en las granjas							
Granja	Registros de visitas	Cerca perimetral	Acceso controlado	Módulos sanitarios	Pediluvios Sanitario	Disposición de cadáveres	Necropsia en zonas definidas
1	No	Si	Si	No	No	Si	Si
2	No	Si	Si	No	No	Si	Si
3	Si	Si	Si	No	No	Si	Si
4	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
5	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

Tabla N° 3

Información Clínica-Epidemiológica				
Granja	Muertes recientes	Muertes repentinas	Muertes masivas	Enfermas recientes
1	No	Si	Si	No
2	No	Si	Si	No
3	Si	Si	Si	No
4	Si	Si	Si	Si
5	Si	Si	Si	Si

Tabla N° 4

Distribución de razas por granja	
Código de la granja	Raza que explotan
G1	Dekald White
G2	Hisex Brown
G3	Hi Line
G4	Hi Line
G5	Dekald White

Tabla N° 5

Cuadro esquemático para el análisis bioquímico bacteriano

BACTERIA	TSI	GAS	H ₂ S	LISINA	CITRATO	INDOL	MOTILIDAD
<i>ESCHERICHIA COLI</i>	AC/AC	+/-	-	-V	-	+	V
<i>KLEBSIELLA</i>	AC/AC	+	-	+	+	V	-
<i>ENTEROBACTER</i>	AC/AC/AK	+	-	V	V	-	+
<i>CITROBACTER</i>	AK/AC	+	+	-	+	-	-
<i>SHIGUELLA</i>	AK/AC	V	-	-	-	V	-
<i>SALMONELLA</i>	AK/AC	V	+	+	V	-	+
<i>PROTEUS</i>	AK/AC	V	V	-	V	V	+
<i>SERRATIA</i>	AK/AC	V	-	V	+	-	+
<i>PSEUDOMONA</i>	AK/AC	-	-	-	+	-	+
<i>ACINETOBACTER</i>	AK/AC	-	-	-	V	-	-

Tabla N° 6

Aislamiento bacteriano en huevos por granja			
Código del huevo	Código de la granja	Aislamiento en cascarón	Aislamiento en clara/yema
G1H1F1	G1	<i>Klebsiella</i>	<i>Shiguella</i>
G1H2F1		<i>Enterobacter</i>	<i>E. coli</i>
G1H3F1		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H4F1		<i>salmonella</i>	<i>Shiguella</i>
G1H5F1		<i>Salmonella</i>	<i>Shiguella</i>
G1H6F1		<i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i>
G1H7F2		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H8F2		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H9F2		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H10F2		<i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i>
G1H11F2		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H12F2		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H13F3		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H14F3		<i>E. Coli</i>	<i>Shiguella</i>
G1H15F3		<i>Shiguella</i>	<i>Shiguella</i>
G1H16F3		negativo	negativo
G1H17F3		<i>E. Coli</i>	negativo
G1H18F3		<i>E. Coli</i>	negativo
G2H1F2	G2	negativo	negativo
G2H2F2		<i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i>
G2H3F2		<i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i>
G2H4F2		<i>E. Coli</i>	negativo
G2H5F2		<i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i>
G2H6F2		negativo	negativo
G2H7F3		<i>E. Coli</i>	negativo
G2H8F3		<i>E. Coli</i>	negativo
G2H9F3		negativo	negativo
G2H10F3		negativo	negativo
G2H11F3		<i>Enterobacter</i>	negativo
G2H12F3		negativo	negativo
G3H1F3	G3	<i>Shiguella</i>	negativo
G3H2F3		<i>Proteus</i>	<i>Serratia</i>
G3H3F3		<i>Citrobacter</i>	<i>klebsiella</i>

G3H4F3		<i>Klebsiella</i>	<i>klebsiella</i>
G3H5F3		<i>Citrobacter</i>	negativo
G3H6F3		<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H1F1	G4	<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H2F1		<i>Serratia</i>	negativo
G4H3F1		<i>Klebsiella</i>	negativo
G4H4F1		<i>Acinetobacter</i>	negativo
G4H5F1		<i>Klebsiella</i>	negativo
G4H6F1		<i>Acinetobacter</i>	negativo
G4H7F2		<i>Klebsiella</i>	negativo
G4H8F2		<i>Acinetobacter</i>	negativo
G4H9F2		<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H10F2		<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H11F2		<i>Proteus</i>	<i>negativo</i>
G4H12F2		negativo	negativo
G4H13F3		<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H14F3		<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H15F3		<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H16F3		<i>Enterobacter</i>	negativo
G4H17F3		negativo	negativo
G4H18F3	negativo	negativo	
G5H1F1	G5	<i>E. Coli</i>	negativo
G5H2F1		negativo	negativo
G5H3F1		negativo	negativo
G5H4F1		<i>negativo</i>	negativo
G5H5F1		<i>Enterobacter</i>	negativo
G5H6F1		<i>Enterobacter</i>	<i>klebsiella</i>
G5H7F1		<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
G5H8F1		<i>E. Coli</i>	negativo
G5H9F1		<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella</i>
G5H10F1		<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>
G5H11F1		<i>E. Coli</i>	<i>E. coli</i>
G5H12F1		<i>Proteus</i>	<i>negativo</i>