

Enterobacteriaceae y Hongos en huevos frescos de gallina para el consumo humano en la Ciudad de Valledupar, C

Vet. Arg. ? Vol. XXXVI ? N° 373 ? Mayo 2019.

*Araujo Guerra, Alvaro^{1,2}; Fragozzo Castilla, Pedro³; Orlando Pineda, Alvaro^{1,2}; Mejía Arbeláez, Jesús^{1,2}; Peña Güillen, Alex³.

Resumen

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica como agentes patógenos para humanos y animales domésticos y silvestres. Los huevos frescos de gallina para el consumo humano, aun los que tienen cáscaras limpias sin rajaduras, contienen bacterias, que pueden causar enfermedades transmitidas por alimentos, a menudo llamadas intoxicación alimentaria para lo cual se investigó la presencia de *Enterobacterias* y hongos en 200 huevos en 10 expendios que comercializan huevos frescos de gallinas para el consumo humano de la ciudad de Valledupar, Cesar, y se estudió la cascara y las yemas de estos, en las cuales se analizaron siguiendo el protocolo de preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo y luego se empleó un medio selectivo diferencial. Se determinó la presencia de *Enterobacterias* en un 31% en cascara y yemas, así como el 15,5% evidenciaron contaminación con algún tipo de microorganismo. Se observó también la presencia del hongo *Aspergillus fumigatus* en una sola muestra, que equivale al 0.5% del total de huevos estudiados. Se evidencio que, con las pruebas convencionales como cultivos microbiológicos, se pudo constatar la presencia de *Enterobacterias* totales y la del hongo *Aspergillus fumigatus* en huevos frescos de Gallina para el consumo humano.

Palabras clave: Alimentos, Consumo, Cultivos, Expendios, Microbiología.

Detection of *Enterobacteriaceae* and Fungi in fresh chicken eggs for human consumption in the City of Valledupar, Cesar. Colombia.

Summary

The family *Enterobacteriaceae* is the largest and most heterogeneous group of gram-negative bacilli with clinical significance as pathogens for humans and domestic and wild animals. Fresh chicken eggs for human consumption, even those that have clean shells without cracks, contain bacteria, which can cause foodborne illness, often called food poisoning, for which the presence of *Enterobacteria* was investigated and *fungi* in 200 eggs in 10 stores that sell fresh eggs of chickens for human consumption in the city of Valledupar, Cesar, and their cascara and yolks were studied, in which they were analyzed following the protocol of pre-enrichment and selective enrichment and then a differential selective medium was used. The presence of *Enterobacteria* was determined in a 31% in

shell and buds, as well as 15.5% evidenced contamination with some type of microorganism. The presence of the fungus *Aspergillus fumigatus* was also observed in a single sample, equivalent to 0.5% of the total eggs studied. It was evidenced that with conventional tests as microbiological cultures, it was possible to confirm the presence of total *Enterobacteria* and the fungus *Aspergillus fumigatus* in fresh eggs of Chicken for human consumption.

Keywords: Food, Consumption, Crops, Expenditures, Microbiology

1Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Valledupar. Colombia

2 Grupo de investigación ZooBios.

3Laboratorio de Microbiología. Universidad Popular del Cesar. Valledupar. Colombia.

*Autor correspondencia: Álvaro Vicente Araujo Guerra. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Universidad Nacional Abierta y a Distancia Valledupar. Colombia.

Calle 39 N° 4-02. Barrio Panamá. (57) (5) 826234

Correo electrónico: alvaro.araujo@unad.edu.co

Introducción

Cada vez es más frecuente recurrir a la determinación de microorganismos indicadores para determinar la inocuidad de un alimento (Koneman, *et al*; 1999). En la literatura científica se reporta a una amplia variedad de *enterobacterias* como agentes patógenos para humanos, animales domésticos y silvestres (Pachón, 2009), además contiene una gran cantidad de géneros que son bioquímicos y genéticamente relacionados entre sí. Este grupo de organismos incluye varios que causan Infecciones primarias del tracto gastrointestinal humano. Las *enterobacterias* causan alrededor del 57% de las toxiinfecciones alimentarias humanas y entre ellas, los géneros *salmonella*, *Campilobacter* y *Listeria*, de enorme importancia en la salud pública, en especial con relación al sector avícola. Existen más de 2.500 serovariedades de *salmonella*, de las cuales unas 250 se han aislado de las aves de corral, siendo 40 de ellas las más comúnmente encontradas que representan el 1.6%. (Soria, *et al*; 2012).

El incremento de la presencia de *Salmonella spp.* en productos avícolas se ha agudizado con la globalización, debido a que el consumo de carne de pollo, huevos y subproductos ha aumentado en todo el mundo (Uribe & Suárez, 2006). Sin embargo, los datos que hay en el país no son suficientes para establecer los posibles niveles de contaminación de los huevos de gallina y en especial con relación a los del género *Enterobacteriaceae* (Espinosa, *et al*; 2009). Dos factores además de los mencionados, se asocian a la contaminación de los huevos: deficientes procesos de cocción y contaminación cruzada con materias primas crudas contaminadas, (Efesa, 2007).

Así mismo por la condición sanitaria del huevo, es posible que los hongos colonicen al

interior de este, gracias a que la cáscara del huevo es una estructura permeable generando condiciones para el ingreso del aire propiciando un hábitat para el desarrollo de hongo. Así los hongos pueden atravesar la cáscara y desarrollarse dentro. Los huevos se alteran por putrefacción de hongos, proceso que se retarda mediante almacenamiento a baja temperatura o por tratamiento de la cámara para cerrar los poros. Un hongo en estado de micelio (Telilla o pelillos) necesita alimento, Temperatura, humedad y tiempo, factores estos que necesita para sobrevivir. Los hongos que afectan los huevos fértiles son ubicuos, se encuentran en el ambiente, en el suelo, estiércol, y hasta en las partículas de polvo en el aire. Para llegar al huevo los hongos emplean diversas vías, una de ellas es cuando están presente en la gallina ponedora de donde proviene el huevo, aquí la contaminación se da internamente, (Suárez & Mantilla, 2000). La otra posibilidad, es que el hongo esté presente en la cascara y sus orígenes pueden estar asociados a la manipulación, presencia de animales y personas en los procesos de recolección, empaque, transporte (Efesa, 2007).

En la fase productiva primaria se deben extremar los cuidados de tal manera que se garantice medidas integrales de prevención y control en términos de medidas sanitarias como de bioseguridad para garantizar la calidad e inocuidad del producto (Álvarez, 2013).

Epidemiológicamente, el control de microorganismo. en la cadena avícola es de vital importancia (Pegues, *et al*; 2002), porque al reducir la prevalencia de *enterobacteriaceae* y hongos en los huevos de gallinas, se disminuyen proporcionalmente los riesgos para la salud humana, por lo tanto, el control primario en cuanto a estos agentes, la mayoría de ellos declarados como causantes de enfermedades zoonóticas debe enfocarse directamente a la gestión y gerencia de riesgos en la planta de producción (Díaz, *et al*; 2006).

El contenido interno de los huevos recién puestos es generalmente estéril. Al momento de la ovoposición, los huevos tienen cierto grado de contaminación en la superficie debido al paso a través de la cloaca de la gallina (Rincón, *et al*; 2011). No obstante, luego de 8 a 10 días 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 (Backer, *et al*; 1980). Por transmisión vertical los microorganismos entran en los huevos desde los ovarios o el tejido del oviducto infectado antes de la formación de la cáscara (Fao & Oms, 2002). El hallazgo de *enterobacteriaceae* en la yema del huevo y no en su superficie, respalda el concepto de contaminación transovárica del huevo (Mancera, *et al*; 2005). Así, los riesgos de contaminación de huevos con agentes de la familia *Enterobacteriaceae* se constituye en una importante amenaza para la salud pública a nivel mundial (Varela, *et al*; 2016). Por lo tanto, se hace necesario realizar una investigación de riesgos de la detección de *enterobacterias* y hongos en huevos fresco para consumo humano, en diferentes expendios, de la Ciudad de Valledupar, Cesar. ya que éstos no cumplen con las normas de bioseguridad.

Materiales y Métodos

Toma y transporte de las muestras

Para la toma de muestras se hizo una selección completamente al azar hasta completar el número de expendio totales por muestreo durante 3 semanas. A cada expendio se le tomaron 20 huevos. (Cada muestra corresponde a un grupo de 20 huevos por expendio), determinando su ubicación, estructura física, vigencia de registro sanitario y número de trabajadores. Los huevos fueron tomados con guantes estériles, con el fin de evitar una contaminación cruzada y cada huevo del expendio fue rotulada con código, los cuales fueron depositados en un termo a 4-8 oC para su respectivo transporte al laboratorio de Microbiología de la Universidad Popular del Cesar, de la Ciudad de Valledupar. El tamaño de la muestra se estimó asumiendo un nivel de confianza de un 95%, con una prevalencia esperada del 3% y un error menor a un 5%.

Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras tanto para la cascara como para la yema de huevo se hizo acorde a la Norma Técnica Colombiana 4574 (Icontec, 2007), que consiste en 4 etapas:

Prenriquecimiento en medio liquido no selectivo.

La muestra fue cortada con pinzas de disección estériles y puestas en cajas de Petri para su pesaje, al obtener 25 gramos de la muestra, se introdujo en un mortero estéril para macerar la muestra. Los 25 gramos de muestra macerada se introdujeron en 225 mililitros de agua peptonada tamponada contenida en frascos de tapa ancha, se incubó a 37 °C ± 1 °C por 18 h +/- 2 horas. Este procedimiento se realizó el fin de obtener una mayor proliferación de los probables gérmenes patógenos existentes en cada muestra.

Enriquecimiento en medio liquido selectivo.

Pasadas 18 horas se sacaron de las incubadoras los recipientes con agua peptonada, de los cuales se extrajeron 0.1 mililitros para inocularlo en 10 mililitros de caldo Rappaport Vassiliadis (medio RVS). Este medio se incubó a 41,5 °C ± 1,0 °C durante 24 h ± 3 horas.

Siembra en medio selectivo.

Transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el recipiente con el caldo RVS, a partir de este caldo se inculó en el medio sólido Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) el cual se incubó a 37° C ± 1 ° C, esperada las 24 ± 3 horas se registraron los resultados. Este medio produce colonias con un centro negro grande brillante o colonias casi completamente negras dando un diagnostico presuntiva para *Salmonella spp.*

Selección de colonias para su confirmación

Las colonias negras presentes en los medios XLD fueron seleccionadas e inoculadas en

agar nutritivo que se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Confirmación por pruebas bioquímicas.

Se realizó una batería bioquímica de 6 componentes en total: Citrato, Lisina Hierro Agar (LIA), Sulfuro, Indol, Motilidad (SIM), -Urea, Voges ? Proskauer (VP), Triple azúcar hierro (TSI). Esta pila de pruebas bioquímicas se incubó a 37°C por 24 h ± 3 horas. Posterior a esto, los resultados se leyeron a las 24 a 48 horas y se reportaron como presencia o ausencia de *Enterobacterias*.

Resultados y Discusión

Del total de huevos procesados por expendios que en conjunto fueron 200, se determinó que 31 huevos procedentes de los 10 expendios, revelaron algún tipo de contaminación bacteriana bien sea en cáscara o yema que corresponde al 15.5% del total de huevos estudiados (Tabla 1). Este resultado es muy inferior a lo que reporta en otras investigaciones quienes encontraron que las *Enterobacterias* estaban presentes en el 17.57% de las muestras de huevos en un estudio efectuado en Cuba (Leyva, *et al*; 1996), sin embargo, nuestro estudio es inferior y muy distante a otras investigaciones, en donde se evidenció la presencia de *Enterobacterias* en un 26%, como también se reporta un crecimiento en la detección de un 78.8% de huevos procedentes de 5 granjas avícolas (Vejar, 2011; Ramírez & Quintanilla, 2013). De igual manera el estudio revela que en el expendio No 10, el porcentaje de muestras positivas de huevos fue superior a los demás expendios, ya que se estableció que el proveedor carecía de las condiciones higiénicas sanitarias para la producción de huevos libres de microorganismos.

Tabla No 1

Expendio	Nº de huevos muestreados	Nº de huevos positivos	Porcentaje de positivos
1	20	0	0
2	20	2	10%
3	20	4	20%
4	20	3	15%
5	20	0	0
6	20	1	5%
7	20	4	20%
8	20	3	15%
9	20	6	30%
10	20	8	40%

. Huevos positivos y participación porcentual de Enterobacterias en expendios comercializados en la ciudad de Valledupar, Cesar. Colombia.

En la **Figura No 1**, se observa la frecuencia en que las *Enterobacterias* está presente en las muestras total de huevos, en donde se demuestra que el 95% se encuentran localizadas en las cascara de los huevos, mientras que el 5% están presente en las yemas, evidenciándose que de los 200 huevos que se analizaron, todos presentan contaminación bacteriana. Este hallazgo es superior a otros estudios similares al nuestro, en donde se informan que las *Enterobacterias* están presente en un 12 % de las cáscaras y en el 7,1 % de las yemas de los huevos (De La Osa, *et al*; 1988). Igualmente es superior a lo que se reporta en otras investigaciones en donde se evidencia que el 13 y 67% de *Enterobacterias* corresponde a la cascara y yema respectivamente (Mancera, *et al*; 2005).

Figura No 1. *Enterobacterias* en huevos en expendios comercializados en la ciudad de Valledupar Cesar. Colombia.

Cáscara	Yema
95%	5%

Enterobacterias totales. En nuestro estudio no fue detectado *Salmonella spp* en huevo, en donde se ha demostrado que la incidencia de huevos contaminados con esta bacteria es

muy baja, ya que los reportes de investigaciones sobre ese tema que se han efectuado con huevos a partir de lotes de aves contaminadas, se han reportado valores del 0.26% de muestras positiva para dichos microorganismos. (Espinoza, *et al*; 2009)

En estudios relacionados con la presencia de *Salmonella sp.* en huevos, los datos respecto al número de aislamientos obtenidos varían considerablemente (Arnedo, *et al*; 1998), sin embargo, en la mayoría de los estudios se ha logrado la detección del microorganismo en este alimento, lo cual confirma su circulación en las cadenas de producción avícola de varios países. En un estudio hecho en México, *Salmonella spp.* se presentó en el 0,25% de los huevos muestreados (Mancera, *et al*; 2005), mientras que en Brasil se aisló a partir del 2% de las muestras de huevo procesadas (Gama, *et al*; 2003). En Cuba, *Salmonella spp.* fue aislada de 2 muestras de cáscara correspondientes al 0.6% del total de muestras (Leyva, *et al*; 1996), resultados que son similares a los informados por investigadores, quienes obtuvieron el 1% de positividad para *Salmonella spp.* en cáscara de huevo, pero no la aislaron del interior (De La Osa, *et al*; 1988). Así mismo, en Colombia se identificó la presencia de *Salmonella* en cuatro huevos correspondientes al 3% del total de muestras de 128 huevos provenientes de 5 avícolas de diferentes zonas de la ciudad de Tunja y de un vendedor independiente de la Plaza de Mercado del Sur provenientes de la zona rural de la ciudad de Tunja (Rincón, *et al*; 2011)

Algunos estudios sugieren que mientras los huevos en formación están colonizados significativamente en el tracto reproductivo, los factores dentro de los huevos pueden controlar la *salmonella* antes de que se pongan los huevos. Los datos muestran que antes de la deposición de huevos, la formación de huevos está sujeta a infecciones descendentes de tejido ovárico colonizado, infecciones ascendentes de tejidos vaginales y cloacales colonizados, e infecciones laterales de tejidos de oviducto superior colonizados (Timoney, *et al*; 1989)

En nuestro estudio **se evidenció el crecimiento del hongo conocido como *Aspergillus fumigatus* dentro de un huevo, que corresponde al 0.5% del total de huevos estudiados mostrando que la contaminación es positiva en los huevos para consumo humano (Figura 2). Esta evidencia de la presencia de este hongo en huevos de gallinas para consumo humano se reporta por primera vez en este estudio, ya que no existe información a nivel local ni regional. Las esporas de *Aspergillus* sobreviven y crecen en una amplia gama de condiciones, pero sobre todo en materia orgánica como la yema de huevo, cajas de cartón y madera. (Dinev,2014).**



Figura No 2. Presencia del Hongo *Aspergillus fumigatus* en el interior de un huevo de gallina para consumo humano en expendio de la Valledupar Cesar. Colombia.

Conclusiones

La presencia de *Enterobacterias* totales y la del hongo *Aspergillus fumigatus* en huevos frescos de Gallina para el consumo humano reportada en este estudio, pueden estar relacionada con las condiciones de manejo y almacenamiento de los huevos en los diferentes expendios de la ciudad, de Valledupar.

Bibliografía

- Álvarez, M.2013. El Sector Avícola Colombiano. Un Caso de aplicación del concepto de Competitividad. Revista Unisangil Empresarial. 6.46-70
- Arnedo, A., Bellido, J. B., Pac, M. R., Criado, J., Usera, M. A., Mesanza, I. Cortés, J. 1998. Brotes epidémicos de salmonelosis por consumo de huevos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 16, 408-412.
- Backer, C.; Goff. J.; Timoney, J. 1980. Prevalence of Salmonellae on Eggs from Poultry Farms in New York State. Poult Sci. 59: 289-292.
- De La Osa, M.;Olmo, N.; Botas, M.; Menezet, A.; Pérez, F. 1988. Estudio bacteriológico y comercial en huevos de gallina. Rev de tecnología e higiene de los alimentos. 88: 41-47.
- Díaz, T.; Caballero, A.; Díaz, J.; Cardona, M.; Morejón, P.; Sánchez, Y. 2006. Estudio, control y prevención de las ETA: infección e intoxicación por alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Cuba. Rev. Soc. Ven. Microbial. 26:95-100.
- Dinev, I. 2014. Enfermedades de las Aves. El Sitio Avícola. Disponible. <http://www.elsitioavicola.com/publications/6/enfermedades-de-las-aves/>
- Efesa. 2007. Report of the task force on Zoonoses data collection on the analysis on the baseline survey on the prevalence of Salmonella in broilers flocks of Gallus gallus, in the EU, 2005-2006. Part A: Salmonella prevalence estimates. The EFSA Journal; 98: 1-85.

Espinosa, J.; López P.; Álvarez, C.; Chávez, J.; Guerrero, A. 2009. Informe de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos. Semanas epidemiológicas; 1 a 53. Bogotá D.C. Instituto Nacional de Salud. .Pp.10

Espinoza, E., Revollo, S., Espada, A. 2009. Identificación de salmonella sp mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidado (nested pcr) y técnicas convencionales en huevos recolectados en los principales mercados de la ciudad de la paz. *Visión Científica*. 1, 10.

FAO-OMS.2002. Evaluaciones de riesgos en salmonella en huevos y pollos. Pp 7-10. Disponible: <http://www.who.int/foodsafety/publication/micro/>

Gama, N.; Berchieri, R.; Fernández, A. 2003. Occurrence of Salmonella sp in laying hens [En línea]. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 5(1):15-21 Disponible en: <http://www.scielo.br/scielo.php?>

Leyva, V.; Valdés, E.; Cisneros, E.; Pérez, O. 1996. Determinación de Salmonella y Enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. [En línea] *Rev Cubana Aliment Nutr* 10(2):83-86 Disponible en :http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali

Mancera, A.; Navarrete, J.; Ontiveros, M. 2005. Identificación de Salmonella Enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México. *Téc Pecu Méx.* 43(2): 229-237. Disponible en: http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/.../Art_PdfRed.jsp

Pachón, D. 2009. Aislamiento, identificación y serotipificación de Enterobacterias del género Salmonella en una población de crocodylus intermedius y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco e.b.t.r.b.; Tesis de Pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Villavicencio

Pegues, A.; Ohl, E.; Miller, I. 2002. Salmonella including Salmonella typhi In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerran RL (eds.). *Infections of the gastrointestinal tract*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 669-697.

Ramírez A, R.; Quintanilla, M. 2013. Detección de enterobacterias en huevos procedentes de 5 granjas avícolas en occidente de Nicaragua Octubre-Noviembre. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León. Honduras. Disponible:<http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/3450/1/225912pdf>

Rincón, P.; Vargas, C.; Ramírez, Y. 2011. Búsqueda de Salmonella spp. en huevos para consumo humano comercializados en la ciudad de Tunja: estudio preliminar. *Revista Proyeccion Universitaria*.2. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/236024773>

Soria, C; Soria, J; Bueno, I; Godano, .C; Gómez, A.2012. Presencia de Salmonella spp. en huevos y ambiente de granjas de aves ponedoras de la provincia de Entre Ríos. 26 al 29 de noviembre. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos

Suárez, C.; Mantilla, R. 2000. Presencia de Salmonella serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. *IATREIA*. 13 :237-245.

Timoney, J. F., Shivaprasad, H. L., Baker, R. C., & Rowe, B. 1989. Egg transmission after infection of hens with Salmonella enteritidis phage type 4. *Veterinary Record*. 125 (24), 600-601.

Uribe C, Suárez C. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colombia Med. 37:151-8.

Varela, Z. S.; Lavalle, L. P.; Alvarado, D. 2016. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia Salud Uninorte. Barranquilla (Col.) 32 (1): 105-122

Vejar, O. 2011. Caracterización de microorganismos detectados en el interior del huevo de crianza de traspatio a la venta en el Mercado central de la Ciudad de Chillan- Chile.; Tesis de Pregrado) Universidad de Concepción.

Disponible: <http://www.bibliodigital.udec.cl/sdx/UDEC4/>.

Koneman, E., Allen, S., Tenenbaum, W., Schreckenberger, P., & Winn, W. 1999. Diagnóstico Microbiológico. 5ta. Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
