



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella spp* MEDIANTE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN UN
SISTEMA DE INCUBACIÓN DE HUEVOS CRIOLLOS**

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Médico Veterinario

AUTOR: DANIEL ALEJANDRO MACAS RODRÍGUEZ

TUTORA: DRA. MÓNICA JUDITH ESPADERO BERMEO, Msc.

Cuenca - Ecuador

2025

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Daniel Alejandro Macas Rodríguez con documento de identificación N° 1400875504 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 11 de noviembre del 2025

Atentamente,



Daniel Alejandro Macas Rodríguez

1400875504

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Daniel Alejandro Macas Rodríguez con documento de identificación N° 1400875504, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Identificación de *Salmonella spp* mediante análisis microbiológico en un sistema de incubación de huevos criollos”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 11 de noviembre del 2025

Atentamente,



Daniel Alejandro Macas Rodríguez

1400875504

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mónica Judith Espadero Bermeo con documento de identificación N° 0103645412, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella spp* MEDIANTE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO EN UN SISTEMA DE INCUBACIÓN DE HUEVOS CRIOLLOS, realizado por Daniel Alejandro Macas Rodríguez con documento de identificación N° 1400875504, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 11 de noviembre del 2025

Atentamente,



Dra. Mónica Judith Espadero Bermeo, Msc.

0103645412

Dedicatoria

A Dios y a la Purísima de Macas por darme la vida y por darme la oportunidad de cumplir mis metas.

A mis padres Marcelo Macas y Ruth Rodríguez, por darme el regalo de la educación y el amor, la motivación y fortaleza para seguir adelante.

A mis abuelitos, Ovidio Macas y Luz Silva, quienes desde el cielo me han acompañado.

A mis hermanos, Jairo y Marcelo, por ser importantes en mi vida.

Por ser partícipe de este logro, a mis amigos, Bernarda, Geovanny, Karla y Sebastián.

Y, por último, se lo dedico a mi primer paciente, mi mejor amigo y compañero, Rocco.

Agradecimiento

Ante todo, doy gracias a Dios y a la Virgen Purísima de Macas por ser mi guía en los caminos buenos y malos, además de brindarme la fortaleza y sabiduría para no rendirme y seguir adelante. Quiero agradecer también a mis modelos de inspiración en la vida que son mis padres, Marcelo Macas y Ruth Rodríguez, quienes nunca me dejaron solo y me dieron fuerzas para no dejarme vencer de los obstáculos, dándome su apoyo incondicional y obsequiándome la fortuna de tener dos padres amorosos y disciplinados. Agradezco a la vida por brindarme todas las oportunidades y por mostrarme que siempre hay una luz al final del túnel. Quiero agradecer también a mis amigos por acompañarme en todo este proceso dentro y fuera de las aulas, en el campo laboral, profesional y fuera de él. Karla Cedillo, Bernarda Molina que fueron dos excelentes compañeras que desde primer ciclo me brindaron su amistad y su conocimiento, y a mis dos mejores amigos de la Universidad con quienes formábamos el grupo, Geovanny Palacios y Sebastián Carrasco, quienes siempre mostraban su apoyo y hacían ameno el ambiente académico con sus bromas, dentro y fuera del aula, por todos los consejos y los recuerdos que quedarán grabados en mi memoria.

Quiero agradecer a todos los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Politécnica Salesiana, ya que además de ser excelentes profesionales y brindarme conocimientos, me han brindado su amistad y apoyo.

Finalizando, agradezco a la Dra. Mónica Espadero por aceptar guiarme y tenerme paciencia al momento de realizar éste proyecto.

Índice

Índice de tablas	10
Índice de figuras.....	11
Abstract	13
1. Introducción	14
1.1. Problema.....	15
1.2.1. Temporal	17
1.2.2. Espacial	17
1.2.3. Académica.....	17
1.3. Explicación del problema	17
1.4. Objetivos.....	20
1.4.1. Objetivo General	20
1.4.2. Objetivos Específicos.....	20
1.5. Hipótesis	20
1.5.1. Hipótesis alternativa.....	20
1.5.2. Hipótesis nula.....	20
1.6. Fundamentación teórica.....	21
2. Revisión y análisis bibliográfico y documental	22
2.1. Generalidades	22
2.1.1. Morfología.....	22
2.1.2. Etiología	23
2.1.3. Serovariedades	24

2.1.4.	Patogenia	24
2.1.5.	Epidemiología	25
2.1.6.	Transmisión.....	26
2.1.7.	Mecanismos de contaminación de <i>Salmonella</i> en el huevo	26
2.1.8.	Incubación	27
2.1.9.	Diagnóstico.....	28
2.1.10.	Métodos de detección.....	28
2.2.	El Huevo	34
2.2.1.	Definición y formación	34
2.2.2.	Estructura y composición	35
2.2.3.	Factores que permiten la proliferación bacteriana	36
2.3.	Riesgo de eclosión	37
2.3.1.	Embriodiagnosisis.....	37
2.3.2.	Relación entre <i>Salmonella spp</i> y fallos en la eclosión	37
2.3.3.	Normativas y protocolos en Ecuador	38
2.4.	Sistema 3M Petrifilm Salmonella Express	40
2.4.1.	Descripción.....	40
2.4.2.	Beneficios del Sistema 3M Petrifilm <i>Salmonella</i> Express:.....	41
2.5.	Resumen del arte del estado del problema	42
3.	Métodos y Materiales.....	44
3.1.	Método.....	44
3.1.1.	Diseño estadístico.....	44

3.2.	Población y muestra.....	45
3.2.1.	Población de estudios y tamaño de la muestra.....	45
3.2.2.	Toma de muestra	45
3.2.3.	Metodología de evaluación de riesgos de eclosión	49
3.3.	Materiales	51
3.3.1.	Materiales físicos.....	51
3.4.	Consideraciones éticas.....	54
4.	Resultados y discusión.....	56
4.1.	Recolección de muestras	56
4.2.	Presencia de <i>Salmonella</i> spp.....	59
4.3.	Evaluación del riesgo de eclosión por la presencia de <i>Salmonella</i> spp.	63
5.	Conclusiones y recomendaciones	65
5.1.	Conclusiones.....	65
5.2.	Recomendaciones	66
6.	Referencias bibliográficas	67
7.	Anexos	75

Índice de tablas

Tabla 1	22
Tabla 2	39
Tabla 3	46
Tabla 4	49
Tabla 5	49
Tabla 6	50
Tabla 7	51
Tabla 8	52
Tabla 9	53
Tabla 10	53
Tabla 11	54
Tabla 12	57
Tabla 13	60

Índice de figuras

Figura 1. Eurolab.(s.f). Salmonella spp. [Imagen]. Recuperado de https://www.eurolab.net/es/testler/gida-analizleri/salmonella-spp-atanmasi/	23
Figura 2. Proceso para detección de Salmonella spp. Adaptada de (Herrera, 2001).	29
Figura 3. Procedimiento para las muestras utilizando las placas 3M Petrifilm	48
Figura 4. Cambios en la formación y pesaje diario del desarrollo del embrión de pollo ..	51
Figura 5. Resultados finales, sumando los huevos, desde el día 0 hasta el día 21 de incubación.	62
Figura 6. Embrión dentro del cascarón	63
Figura 7. Embrión con muerte intermedia.	63

Resumen

El presente trabajo de investigación se realizó en la ciudad de Macas, provincia de Morona Santiago, cuyo objetivo fue identificar la presencia de *Salmonella spp* en huevos de gallina tipo criollo dentro de un sistema de incubación, mediante de análisis cualitativo, utilizando el un método microbiológico como es el Sistema 3M Petrifilm Salmonella Express, todo esto bajo la normativa vigente en el Ecuador. Se analizaron un total de 150 huevos, obteniendo un total de 50 muestras divididas en dos, es decir, 25 en el día cero y 25 al terminar el proceso de incubación (21 días), obteniendo como resultado el 28% y 63,64% respectivamente, lo que nos quiere decir que el sistema de incubación se encuentra contaminado. Además de una embriodiagnosia para evaluar el riesgo de eclosión.

Palabras clave: *Salmonella spp*, embriodiagnosia, incubación.

Abstract

The present research work was carried out in the city of Macas, province of Morona Santiago, whose objective was to identify the presence of *Salmonella* spp in Creole-type chicken eggs within an incubation system, through qualitative analysis, using a microbiological method. such as the 3M Petrifilm *Salmonella* Express System, all of this under current regulations in Ecuador. A total of 150 eggs were analyzed, obtaining a total of 50 samples divided into two, that is, 25 on day zero and 25 at the end of the incubation process (21 days), obtaining 28% and 78% respectively. which means that the incubation system is contaminated. In addition to an embryodiagnosis to evaluate the risk of hatching.

Key words: *Salmonella* spp, embryodiagnosis, incubation.

1. Introducción

Las aves de corral representarán la mayor parte del crecimiento de la carne consumida durante la próxima década (Conway, 2016a). De igual manera, el aumento en la producción mundial de huevos entre 2000 y 2015 fue 38.7%, una tasa promedio de 2.2% por año (Conway, 2016b) y según CONAVE (Corporación Nacional de avicultores del Ecuador), en Ecuador, hasta el 2021 las provincias líderes en producción de huevos son Tungurahua (45%), seguida por Cotopaxi (21%), Manabí (15%) y Pichincha (14%).

Ecuador, al ser un país que vive de su agricultura y ganadería, es importante hablar de las nuevas tecnologías que ayudarán en la evolución en lo que a industria se refiere, como es el proceso de la incubación artificial de huevos, las instalaciones deben de mantenerse en lo posible libres de gérmenes por medio de análisis microbiológicos que indiquen el grado de contaminación de las zonas de más riesgo como son, las de almacenamiento de huevos fértiles, salón de emparrillado, incubación y nacimiento, interior de las máquinas, ductos y ventiladores (EcuRed, 2014), uno de los problemas más comunes es la salmonelosis, ocasionada por la *Salmonella gallinarum*, *Salmonella entérica*, *Salmonella typhimurium*, a su vez, la *Salmonella entérica*, es la serovariedad que más se transmite verticalmente en las aves (European Food Safety Authority, 2011) y la *Salmonella typhimurium*, siendo la serovariedad que tiene mayor propensión a presentar multirresistencia a antibióticos (Hur et al., 2012). Se ha descubierto que pueden co-existir infecciones duales en las mismas granjas y ahora con técnicas moleculares modernas se ha demostrado que este fenómeno puede ocurrir con frecuencia (Pulido-Landínez et al., 2014).

La presencia de *Salmonella spp* en la granja avícola tiene un gran impacto económico, y de salud pública debido a la contaminación de productos y su fácil transmisión a los seres humanos (Farrell, 2013). Dicho esto, hay que tomar en cuenta que la distribución de serotipos de *Salmonella*

de fuentes avícolas varía geográficamente, aunque varios serotipos se encuentran consistentemente con una alta incidencia (Gast, 2013). Los sistemas de producción de huevos son afectados por varios tipos de enfermedades causadas por distintos agentes bacterianos, existen géneros tales como: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus* y *Salmonella* (Musgrove et al., 2008).

En este estudio no solo nos enfocaremos en la bacteria como tal, sino también en la observación de los puntos críticos y posibles factores de riesgo que asocian a la *Salmonella spp* en el ciclo de incubación y en el ambiente dentro de un sistema de incubación de huevos de tipo criollo.

1.1. Problema

La salmonelosis es una zoonosis causada por *Salmonella spp*, una bacteria Gram negativa de la clase Gamma-proteobacteria, orden Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae (Betancor y Yim, 2012). Ésta es una de las enfermedades más comunes en aves, está considerada de declaración obligatoria según el Código Sanitario para los animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Algunas bacterias del género *Salmonella* pueden causar enfermedades graves en las aves como: tifoidea aviar y pulorosis; con manifestación clínica severa (Disminución del apetito y pérdida de peso, deshidratación, plumas erizadas y diarrea) (Pulido y Landínez 2016a).

La modernización de las granjas avícolas y la globalización del comercio de aves también ha desempeñado un papel clave en la propagación de la infección (Velge et al., 2005). En su investigación Pulido y Landínez, (2016b) explicó que, debido a la gran variedad de serotipos que pueden estar involucrados en la enfermedad, así como por las múltiples fuentes de infección existentes, la erradicación de *Salmonella spp* en las explotaciones de aves puede ser un objetivo

difícil de alcanzar. Se requiere de un trabajo intenso para llegar a eliminar al menos los serotipos que específicamente pueden estar involucrados como causantes de enfermedades alimentarias o que produzcan enfermedades específicas en las aves como lo son la *Salmonella Gallinarum* y *Typhimurium*. Las bacterias pueden formar biopelículas en los alimentos producidos, y también en áreas de procesamiento de granjas avícolas como paredes, pisos, tuberías y desagües, y en superficies de contacto, como acero inoxidable, aluminio, nylon, caucho, plástico, poliestireno y vidrio (Schonewille et al., 2012; Wang et al., 2013). Según la Corporación Nacional de Avicultores (CONAVE), la industria avícola en el país ocupa el 2% del Producto Interno Bruto (PIB).

En Macas, provincia de Morona Santiago, como en el resto del país, se consume el pollo Broiler en mayor cantidad. CONAVE nos da a conocer que en el país que en el año 2022 se produjeron 495 mil toneladas de carne de pollo a partir de la cría de 263 millones de pollos de engorde, por lo que quiere decir que un ecuatoriano promedio consume 28 kg por año. Todo esto debido a que la carne del pollo Broiler es la más conocida y comercial, por su producción más rápida y fácil obtención. No obstante, existe un gran sector de la población que, de manera progresiva, está consumiendo aves de tipo criollo, como consecuencia de los beneficios que ofrece la producción de estas aves, muchos finqueros han incursionado en la incubación artificial de huevos para dar abasto al mercado, pero se ha observado que estos productores están siendo afectados por la presencia de microorganismos.

De aquí la necesidad de realizar un estudio que nos permita identificar la presencia de *Salmonella spp* en el ambiente de nuestro sistema de incubación. Este estudio beneficiará a los productores de aves criollas de la zona, pues eliminará las pérdidas que al momento tienen debido a la posible presencia de esta bacteria en el proceso de incubación. Este fenómeno aún no ha sido investigado en Macas, se tiene sospechas sobre la posible presencia de esta bacteria en el proceso

de incubación, considerando un estudio fundamental que permita determinar la presencia y el impacto en la región.

1.2. Delimitación

1.2.1. Temporal

El presente trabajo tuvo una duración de 400 horas distribuidas en el trabajo de campo y en la elaboración de la redacción final.

1.2.2. Espacial

El trabajo de campo se llevó a cabo en la "Incubadora Macas", ubicada en la ciudad de Macas, en la provincia de Morona Santiago, cuyas coordenadas son 2°18'31.3"S y 78°06'40.9"W.

El componente práctico, por su parte se llevó a cabo en el laboratorio del área de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca, campus "El Vecino", ubicada en la Calle Vieja 12-30 y calle De Las Carretas, con coordenadas: 2°53'11"S 78°59'23"O.

1.2.3. Académica

Esta investigación está enfocada a la sanidad animal, y relacionado con las disciplinas de Microbiología y Epidemiología.

1.3. Explicación del problema

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica de gran importancia a nivel mundial, producida por bacterias del género *Salmonella spp.* afectando tanto a animales como a humanos y se transmite principalmente a través del consumo de alimentos contaminados. Los productos avícolas, incluyendo los huevos, son una de las principales fuentes de infección. En particular, los huevos de incubación representan un riesgo significativo debido a la posibilidad de contaminación en diversas etapas de la producción avícola, desde la granja hasta el procesamiento y la distribución, la presencia de estos riesgos genera la necesidad de implementar controles estrictos

y procedimientos de higiene en cada fase del proceso para minimizar la presencia de bacterias y garantizar la seguridad del producto final.

En Ecuador, se han identificado niveles considerables de prevalencia de *Salmonella spp.* en huevos criollos destinados a incubación. Por ejemplo, un estudio realizado en la provincia de Manabí encontró una prevalencia del 7.3% en huevos criollos comercializados en mercados locales, subrayando la necesidad de mejorar las prácticas de manejo y bioseguridad en estos entornos (Moreira et al., 2022). En la Sierra Central, otro estudio reportó una prevalencia del 5.9% en huevos de gallina criolla para incubación, lo que resalta la importancia de implementar mejores controles de bioseguridad en granjas rurales (Montalvo et al., 2020). Por otro lado, en la Amazonía Ecuatoriana, se detectó una prevalencia del 7.4% en huevos criollos destinados a incubación, sugiriendo que las prácticas preventivas deben ser fortalecidas para reducir la incidencia de *Salmonella* en estas regiones (Vega et al., 2022).

En el país existen un número considerable de incubadoras industriales de pollo Broiler, según la tabla de Unidades de Producción Certificadas con Buenas Prácticas Pecuarias de AGROCALIDAD (2020), existen registradas alrededor de 7 grandes incubadoras de huevos de aves de tipo Broiler en el territorio. Dicho esto, es preciso argumentar que no existe un registro de incubadoras industriales de huevos criollos a nivel nacional, por lo que es muy difícil mantener el control y propagación de agentes que pueden afectar a la industria avícola como puede ser la *Salmonella spp.* Y ni hablar del sin número de incubadoras caseras que se distribuyen en el mercado sin control alguno, evadiendo todas las normas de bioseguridad.

En el capítulo 6.5 del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, titulado “Prevención, detección y control de *Salmonella* en aves de corral”, se estipula que solo deberían incubarse huevos de parvadas libres de *Salmonella spp.* En situaciones donde esto no sea viable, los

huevos provenientes de parvadas positivas deben transportarse y manejarse de forma separada respecto a los de otras parvadas. Además, se enfatiza la importancia de mantener separados estos huevos durante la incubación y de realizar un rastreo de la contaminación hasta las parvadas reproductoras infectadas, revisando las medidas de control implementadas. Esta directriz subraya la relevancia de análisis microbiológicos, como los realizados en este estudio, para mejorar el manejo del ambiente y los sistemas de incubación, permitiendo identificar factores de riesgo y puntos críticos. Esto contribuye a corregir problemas en la eclosión y aumentar la tasa de nacimiento de pollitos. Como señalan Pulido y Landínez (2016), un programa exitoso de control de *Salmonella spp* comienza con un buen esquema de monitoreo, identificando y gestionando puntos críticos en todo el proceso de producción, siendo el proceso de incubación uno de los más relevantes.

El problema específico que se aborda en esta tesis es la identificación eficiente y precisa de *Salmonella spp*. en huevos de incubación. La falta de técnicas rápidas y fiables para la detección de esta bacteria en la industria avícola plantea un riesgo significativo para la salud pública. Por lo tanto, es crucial desarrollar e implementar métodos que puedan detectar *Salmonella spp*. de manera eficaz en las primeras etapas de la producción avícola.

Como se menciona anteriormente, existen muchos avicultores en Macas, provincia de Morona Santiago que están produciendo huevos criollos para la incubación artificial y, debido a que no existe un registro o control como tal, esto abre la ventana a posibles contaminaciones en los procesos que se dan en el ciclo de incubación.

De aquí la importancia de realizar un estudio que nos permita identificar la presencia de *Salmonella spp* en huevos de aves de tipo criollo, y si existe un problema también en el sistema de incubación de huevos de manera artificial. Este estudio beneficiará a los productores de aves de

este tipo que se encuentren en la zona, pues eliminará las pérdidas que al momento tienen debido a la posible presencia de esta bacteria en el proceso de incubación.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Identificar la presencia de *Salmonella spp* en un sistema de incubación para huevos de tipo criollo en la ciudad de Macas mediante un análisis microbiológico.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Recolectar las muestras para el análisis de *Salmonella spp* utilizando las normas vigentes en el Ecuador en un sistema de incubación para huevos criollos.
- Determinar la presencia de *Salmonella spp* mediante la técnica de 3M™ petrifilm™ Express (SALX) en un sistema de incubación para huevos criollos.
- Evaluar el riesgo en la eclosión de huevos de tipo criollo que se encuentran en el sistema de incubación mediante embriodiagnosic relacionándolo con la posible presencia de *Salmonella spp*.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis alternativa

La presencia de *Salmonella spp* en un sistema de incubación de huevos criollos si afecta a la producción de pollos.

1.5.2. Hipótesis nula

La presencia de *Salmonella spp* en un sistema de incubación de huevos criollos no afecta a la producción de pollos.

1.6. Fundamentación teórica

En nuestro territorio, las medidas de control se encuentran opacadas por las grandes industrias, en este caso las grandes incubadoras de pollo Broiler, dejando de lado a la industria del pollo criollo que, aunque está en crecimiento, se está dejando de lado.

Con éste trabajo, se generará información importante y se espera que sea el punto de partida para futuros avances en el área de incubación y manejo de huevos y aves de tipo criollo. Teniendo en cuenta que la cadena de producción de pollo o de huevo en la mayoría de los casos está totalmente integrada, se hace necesario establecer medidas de control en cada uno de sus eslabones (Pulido y Landínez, 2016).

2. Revisión y análisis bibliográfico y documental

Un riesgo significativo para la salud pública es la bacteria del género *Salmonella*, es común encontrarla en productos avícolas, en la carne y los huevos siendo responsable de numerosos casos de intoxicación alimentaria en todo el mundo.

2.1. Generalidades

La *Salmonella* es un género de bacterias que causa infecciones en humanos y animales. Estas bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* según el Centro de control de Enfermedades (CDC).

Tabla 1
Taxonomía de la Salmonella spp.

Dominio	Bacteria
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Enterobacteriales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Salmonella</i>

2.1.1. Morfología

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, con un tamaño de 0,7 a 1,5 μm de ancho y 2 a 5 μm de largo. Son móviles gracias a sus flagelos peritricos, excepto por las cepas SP y SG, que son inmóviles. (Tunes y Vigo, 2007, p. 213). Este género es la causante de

la Salmonelosis, siendo una enfermedad que se distribuye a nivel mundial, afectando tanto a humanos como también a animales de sangre fría y caliente, teniendo variaciones en la morbilidad y mortalidad dependiendo de los huéspedes. Su distribución es ubicua y se aloja en el tracto gastrointestinal, siendo su excreción el contaminante de agua, alimentos y medio ambiente (Tunes y vigo, 2007, p.212).



Figura 1. Eurolab.(s.f). Salmonella spp. [Imagen]. Recuperado de <https://www.eurolab.net/es/testler/gida-analizleri/salmonella-spp-atanmasi/>.

2.1.2. Etiología

La clasificación más reciente proviene de investigaciones basadas en técnicas de hibridación del ADN de *Salmonella*. Estos estudios han concluido que se deben reconocer dos especies dentro del género *Salmonella*: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*.

Salmonella entérica, dividida en 6 subespecies:

- *Salmonella entérica subsp. entérica*
- *Salmonella entérica subsp. salamae*
- *Salmonella entérica subsp. arizonae*
- *Salmonella entérica subsp. diarizonae*
- *Salmonella entérica subsp. houtenae*
- *Salmonella entérica subsp. indica*

Es fundamental señalar que, aunque según la hibridación de ADN solo existen dos especies de *Salmonella*, tanto estas especies como sus subespecies incluyen más de 2400 variedades serológicas. Estas variedades se definen por diferentes combinaciones de antígenos somáticos O y flagelares H. (Stanchi, 2007, p. 210).

2.1.3. Serovariedades

La mayoría de las serovariedades aisladas en humanos y animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie entérica (subespecie I) y generalmente llevan nombres relacionados con el lugar geográfico donde fueron aisladas por primera vez. Las serovariedades de las otras subespecies y de *Salmonella bongori* tienen una baja incidencia en enfermedades humanas o animales y se nombran usando el nombre de la subespecie seguido de su fórmula antigénica (Terragno, Caffer, y Binsztein, 2008, p. 11).

2.1.4. Patogenia

La infección por *Salmonella* depende de la capacidad de la bacteria para colonizar (adherirse) e ingresar (invadir) las células intestinales, replicarse dentro de ellas y resistir la digestión por los fagocitos, lo cual facilita su propagación en el organismo. (Montville y Mathews, 2008, p. 97).

Mediante un sistema de secreción tipo III, *Salmonella* puede introducir una serie de proteínas en la célula hospedadora que reorganizan el citoesqueleto, lo que resulta en una endocitosis. (Zhou y Galan, 2001, p. 1230).

Los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran en 12 islas de patogenicidad (SPI, por sus siglas en inglés), algunas de las cuales están ubicadas cerca de los genes del ARNt (ácido ribonucleico de transferencia). Se cree que algunas SPIs fueron adquiridas por transferencia horizontal, mientras que otros genes son altamente conservados. Los genes de virulencia

involucrados en la fase intestinal de la infección están localizados en SP1 y SP2; los restantes son necesarios para provocar la infección sistémica, la supervivencia intracelular, la expresión de las fimbrias, la resistencia a antibióticos y la absorción de hierro e iones Mg^{2+} (Bhunia, 2008, p. 206).

2.1.5. Epidemiología

La salmonelosis puede ser causada por diversas especies de *Salmonella* y se caracteriza por uno o más de tres signos: septicemia, enteritis aguda que puede volverse crónica. Esta enfermedad se observa en todos los animales y ocurre en todo el mundo. Los animales son importantes como reservorios de la infección humana, la cual se adquiere por vía oral al consumir alimentos y bebidas contaminados, especialmente aves y huevos. (World Health Organization, 2018).

Cualquier alimento susceptible de contaminación fecal puede transmitir la infección. La dosis infectiva suele ser alta y depende de la virulencia de la cepa. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, se requiere un período de multiplicación en el alimento antes de que alcance la dosis infectiva. Esto puede ocurrir cuando el alimento se mantiene a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración insuficiente durante cierto tiempo antes de su consumo. (Eley, 1994).

Daniel E. Salmon (1850 – 1914), informó que el primer aislamiento que se dio de *Salmonella spp* fue en cerdos, en 1885 bajo el nombre de *Bacterium Choleraesuis*. Ahora conocida como *Salmonella entérica*, cuya subespecie entérica es la serovariedad *Choleraesuis* (Bhunia, 2008, pp. 201-215). Hay que recalcar que existe evidencia epidemiológica previa a esta identificación, debido a que éste agente se asoció a la fiebre tifoidea, debido al consumo de agua y leche contaminados.

2.1.6. Transmisión

Salmonella spp se propaga por contacto directo a través de animales infectados (mediante heces o aerosoles), o de manera indirecta por la contaminación del medio ambiente, que incluye alimentos, agua, vectores y suelo, entre otros; (Fernández, Velasco, Benito, y Nieto, 2006, p. 55). La ruta de infección típica de *Salmonella* es la vía fecal-oral, donde la bacteria se transmite a través del consumo de alimentos o agua contaminados. Sin embargo, también se ha descrito que la infección puede ocurrir a través de mucosas, como la conjuntiva y la mucosa respiratoria, así como a través de soluciones de continuidad en la piel y por inhalación. (Domínguez, Porrero, y Téllez, 2006, p. 29).

Exactamente, considerando estas diversas vías de infección, es comprensible el papel destacado que desempeñan los fómites (objetos contaminados) y los vectores (como insectos y roedores) en la propagación del patógeno. Estos elementos pueden contribuir a la diseminación de *Salmonella* tanto entre explotaciones como dentro de ellas, facilitando la transmisión del microorganismo entre animales y entornos. (Creus y Mainarl-Jaime, 2010, p. 49).

2.1.7. Mecanismos de contaminación de *Salmonella* en el huevo

El contenido interno de los huevos recién puestos suele ser generalmente estéril. Sin embargo, durante el proceso de oviposición, los huevos pueden estar contaminados en su superficie debido al contacto con la cloaca de la gallina. Aunque inicialmente tienen cierta contaminación en la superficie, en un período relativamente corto después de la puesta, pueden acumular una gran cantidad de microorganismos en su exterior. Estos microorganismos, bajo condiciones apropiadas, pueden penetrar en los huevos, crecer en su interior y causar alteraciones. (Rincón, Ramírez, y Vargas, 2011, p. 168).

2.1.8. Incubación

La *Salmonella* puede transmitirse a los huevos de dos maneras: a través de la transmisión vertical, también conocida como transovárica, o mediante la transmisión horizontal. En la transmisión vertical, los microorganismos ingresan a los huevos desde los ovarios o el tejido del oviducto infectados antes de la formación de la cáscara. Por otro lado, la transmisión horizontal ocurre generalmente debido a la contaminación fecal de la cáscara, y puede incluir también la contaminación por vectores ambientales, como criadores, animales domésticos o roedores. La transmisión vertical se considera la principal vía de contaminación por *Salmonella* y es la más difícil de combatir, mientras que la transmisión horizontal puede reducirse eficazmente mediante medidas de limpieza y desinfección del entorno.(FAO, 2005).

Según la RAE (Real Academia Española), la palabra “incubación” se deriva del latín *incubare*, que significa acostarse sobre. Siendo esta actividad, acostarse o colocarse sobre los huevos para incubarlos, lo que hacen la mayoría de aves para que luego de ese proceso surge un polluelo, siendo éste el producto final. Con la introducción de las máquinas incubadoras en el desarrollo de la industria agrícola, el hombre ha logrado emular el proceso de incubación natural, utilizando al ave únicamente como proveedor de huevos fértiles. Esto ha permitido incrementar la producción de pollos pues una sola máquina moderna puede producir 100 000 pollitos en el periodo de tiempo que una gallina produce de 10 a 12 (Vanegas , 2014).

La incubación de huevos artificialmente tiene su inicio en el año 400 A.C por parte de los egipcios, posteriormente los chinos desarrollan incubadoras artificiales cerca del año 246 A.C. A mediados del año 1844 en los Estados Unidos, se construyó, desarrollo y patento las incubadoras artificiales para aves, las cuales se encargan de controlar factores como la humedad relativa,

temperatura, volteo de los huevos y aireación, factores esenciales para presentar niveles bajos en mortalidad y contaminación y producir lotes con altos niveles de calidad (Ecured, 2014).

Como una parte más de la cadena de producción alimentaria, la planta de incubación intenta producir un producto seguro: pollitos saludables libres de agentes patógenos. Los diferentes procesos en la planta de incubación se organizan en torno a los puntos de control críticos, estos puntos están diseñados para controlar posibles riesgos biológicos, químicos o físicos que pueden amenazar la inocuidad alimentaria (EcuRed, 2014).

2.1.9. Diagnóstico

Es importante destacar que hay numerosos procedimientos diferentes para aislar *Salmonella spp.* El método ideal debería tener una alta sensibilidad y especificidad, y al mismo tiempo ser simple, rápido y económico. Sin embargo, ningún método cumple con todos estos criterios y ninguno es óptimo para todas las condiciones. (Caffer y Terragno, 2008, p. 2).

El análisis de *Salmonella* se centra en determinar su presencia o ausencia, y generalmente se utilizan métodos de detección en lugar de recuentos en placas. Esto se debe a dos razones principales: primero, estos microorganismos tienden a estar presentes en números bajos y acompañados de una flora variada y numerosa, lo que dificulta su aislamiento; segundo, la mera presencia de *Salmonella* en una muestra representa un riesgo para la salud pública o la seguridad alimentaria. Por lo tanto, la detección se basa en las propiedades de cultivo, bioquímicas y serológicas de este microorganismo. (Yousef y Carlstrom, 2006, p. 182).

2.1.10. Métodos de detección

Existen varios métodos de detección para *Salmonella spp.*, entre ellos tenemos los métodos de: aislamiento, pre- enriquecimiento no selectivo, medios de cultivo diferenciales y selectivos, confirmación bioquímica, pruebas rápidas, inmunoensayos, enzimoimmunoensayos, separación

inmunomagnética, sistemas de aglutinación en porta, inmunodifusión. Los mismos que serán detallados a continuación.

2.1.10.1. Aislamiento

Para identificar este microorganismo en muestras donde las células están sometidas a estrés debido a daño físico o químico, o en muestras de alimentos, materia fecal y órganos de animales sin signos de enfermedad, es necesario seguir el procedimiento descrito en la *Figura 2* que implica varios pasos como: Preenriquecimiento no selectivo, Enriquecimiento selectivo, siembra en medios agarizados selectivos y diferenciales, caracterización química y confirmación serológica.

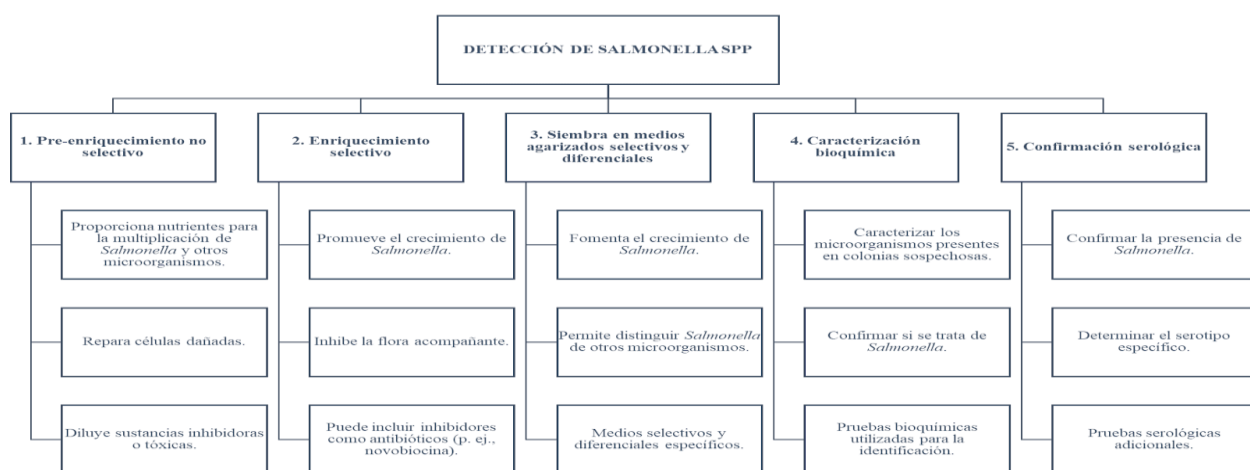


Figura 2. Proceso para detección de *Salmonella* spp. Adaptada de (Herrera, 2001).

El procedimiento completo puede tardar de 5 a 7 días en completarse. (Herrera, 2001, p. 113). En situaciones donde se trata de muestras de animales o humanos con síntomas, y el número de células viables en la muestra es alto y el tiempo es crucial, se puede optar por sembrar directamente en medios de agar selectivos y diferenciales. Esto permite una detección más rápida de *Salmonella*, evitando los pasos de pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo. (Riemann y Cliver, 2006, p. 58).

2.1.10.2. Medios de cultivo selectivos y diferenciales

Los medios de cultivo selectivos son aquellos que permiten seleccionar ciertos microorganismos al detener el desarrollo de otros. Esto se logra mediante la adición de sustancias inhibitorias como antibióticos, colorantes específicos, sales biliares, entre otros. Estas sustancias inhiben el crecimiento de microorganismos no deseados, permitiendo que los microorganismos de interés crezcan y sean identificados con mayor facilidad.

- El agar MacConkey (McK): Es un medio selectivo que utiliza sales biliares y cristal violeta para inhibir significativamente el crecimiento de bacterias Gram-positivas. La presencia de lactosa y un indicador como el rojo neutro permite monitorear la degradación de este disacárido. Las colonias que pueden fermentar la lactosa, como *E. coli*, aparecen rojas con un halo turbio, mientras que las que no pueden, como *Salmonella spp*, son incoloras.
- El agar Desoxicolato: Es un medio altamente efectivo debido al desoxicolato de sodio, que suprime el crecimiento de coliformes y bacterias Gram-positivas. Las colonias típicas de *Salmonella spp* en este medio son pequeñas, incoloras, elevadas y opacas. Algunas cepas pueden producir un precipitado negro en el centro. (Stanchi, 2007, pp. 99-103).
- Los medios de cultivo diferenciales: Permiten distinguir bioquímicamente entre diferentes bacterias basándose en su actividad metabólica. Estos medios contienen un sustrato que puede ser utilizado o no por la bacteria, y esta actividad se revela mediante cambios en el pH del medio o por alguna actividad enzimática que modifica su apariencia durante el proceso de recuperación de *Salmonella spp*.

- El agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) es un medio utilizado para el aislamiento y la diferenciación de enterobacterias patógenas, especialmente especies de *Shigella spp* y *Salmonella spp*. Aunque su efecto inhibitorio es débil, el desoxicolato contribuye a la inhibición de bacterias coliformes y permite la dispersión de cepas de *Proteus*, que a veces pueden confundirse con las colonias de *Salmonella*. Las colonias de *Salmonella spp* en este medio pueden ser rosa o rojas, transparentes con o sin un centro negro, o completamente negras.
- El agar *Salmonella - Shigella*: Es un medio selectivo y diferencial. La selectividad se logra mediante sales biliares y verde brillante, que inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas, la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasivo de *Proteus spp*. La diferenciación ocurre debido a la fermentación de la lactosa y la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. Las colonias de *Salmonella spp* pueden ser translúcidas u opacas, con algunas presentando un centro negro debido a la producción de ácido sulfhídrico. (Murray, 2004, pp. 150-156).

2.1.10.3. Confirmación Bioquímica

TSI (Triple Azúcar Hierro): Este agar diferencial se basa en la fermentación de azúcares y la producción de H₂S y gas. Contiene glucosa, sacarosa y lactosa, con estas dos últimas en una concentración diez veces mayor que la glucosa. El indicador de pH es rojo fenol, que vira a amarillo cuando se forma ácido a partir del carbohidrato. *Salmonella* típicamente muestra una reacción alcalina/ácida en esta prueba, con producción de H₂S, que se manifiesta como un fondo negro en el tubo.

- LIA (Agar Lisina Hierro): Esta prueba se basa en los procesos de descarboxilación en el medio de cultivo, que ocurren tras la fermentación del carbohidrato presente (glucosa) y la acidez producida por esta reacción. *Salmonella spp* generalmente da como resultado un tendido púrpura y un fondo púrpura, con producción de H₂S y gas, lo que indica la presencia de la enzima descarboxilasa.
- Sulfuro de Hidrógeno - Indol - Motilidad (SIM): Este medio se utiliza para determinar la producción de sulfuro de hidrógeno, la producción de indol y la movilidad, lo cual es útil para el diagnóstico de *enterobacterias*. (OMS, 2004, p.116).

2.1.10.4. Pruebas rápidas para la investigación de *Salmonella*.

Se han desarrollado varios procedimientos nuevos para detectar *Salmonella* de manera más ágil. Aunque estas pruebas son más rápidas que las convencionales, todas requieren un pre-enriquecimiento y/o enriquecimiento del alimento antes de ser aplicadas. (Pascual y Calderón, 2013, p. 215).

2.1.10.5. Inmunoensayos.

Los inmunoensayos se basan en la unión específica de antígenos con anticuerpos, donde la elección de un anticuerpo adecuado es crucial para el éxito del método. Los resultados positivos obtenidos con estos métodos son siempre considerados presuntos positivos y, por lo tanto, requieren confirmación. El límite de detección de estos inmunoensayos suele situarse entre UFC/ml. Existen diversos métodos inmunológicos aplicables al diagnóstico alimentario.

Estos métodos son rápidos, fáciles de usar y de interpretar. Normalmente, consisten en una membrana, habitualmente de nitrocelulosa, donde se encuentra inmovilizado el anticuerpo que une

y captura específicamente el antígeno de la bacteria si está presente en la muestra. Esto forma una línea visible, por ejemplo, mediante el uso de partículas de látex coloreadas.

2.1.10.6. Enzimoimmunoensayo (ELISA).

En el ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), uno de los formatos más utilizados basados en anticuerpos para el análisis de patógenos en alimentos, se emplea un anticuerpo unido a una matriz sólida que captura los antígenos presentes en el cultivo enriquecido. La detección se realiza con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima. En presencia del sustrato, esta enzima cataliza una reacción colorimétrica. Las paredes de los pocillos de las placas de microtitulación son el soporte sólido más común en estos ensayos. Actualmente, muchos de estos tests se proporcionan como sistemas automatizados y robotizados, lo que ahorra tiempo al reducir el trabajo manual y mejora la reproducibilidad y estandarización de cada paso. Ejemplos de estos sistemas para *Salmonella* incluyen el RayAL *Salmonella* (RayAl, Nottinghamshire, UK), los sistemas 3M™ Tecra™ (3M, St. Paul, Minnesota, USA) y el TRANSIA® PLATE *Salmonella* Gold (BioControl). Aunque los métodos mencionados anteriormente generalmente utilizan sustratos cromogénicos para la detección, la enzima también puede catalizar una reacción fluorescente.

2.1.10.7. Separación inmunomagnética (IMS)

Este método está diseñado para separar el organismo objetivo directamente de una suspensión compleja, como una muestra de alimento. A la suspensión se le añaden partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo específico del microorganismo que se desea detectar. La muestra se incuba para facilitar la unión de las células de interés a los anticuerpos, y luego se utilizan fuerzas magnéticas para aislar estos complejos del resto de la muestra. Estos complejos

pueden ser utilizados para realizar más pruebas, como inocular otro cultivo, transferir a medios selectivos, o ser utilizados en reacciones de PCR o ensayos de ELISA.

En los métodos de detección de *Salmonella*, la técnica de Separación Inmunomagnética (IMS, por sus siglas en inglés) se utiliza generalmente para reemplazar el paso de enriquecimiento selectivo, lo que permite ahorrar hasta 24 horas en el proceso.

2.1.10.8. Sistemas de aglutinación en porta

Estos son algunos de los métodos inmunológicos más sencillos. El más utilizado es la aglutinación en látex (LA), donde las partículas de látex están unidas a los anticuerpos específicos. Al entrar en contacto con los antígenos específicos del microorganismo objetivo, se produce una reacción de aglutinación que puede ser detectada visualmente. Normalmente, estos tests se utilizan en la última fase del método tradicional de detección de *Salmonella*, es decir, en la confirmación serológica. (American Society for Microbiology, 2019).

2.1.10.9. Inmunodifusión

La inmunodifusión es una técnica de precipitación que se basa en el movimiento de las proteínas en una agarosa que contiene el anticuerpo específico. Si al añadir la muestra el antígeno específico está presente, se formarán complejos antígeno-anticuerpo, generando una línea de precipitación. Para *Salmonella*, existe el 1-2 Test de BioControl, en el cual el anticuerpo utilizado es específico para el antígeno flagelar de *Salmonella*, por lo que no se detectarán *Salmonellas* no móviles. (Feng, 2007, p. 913-923).

2.2. El Huevo

2.2.1. Definición y formación

El huevo se define como el óvulo completamente desarrollado de la gallina (*Gallus gallus*), ya sea fecundado o no, que contiene reservas de nutrientes y está cubierto por una cáscara calcárea.

Por lo tanto, cuando se menciona genéricamente "huevo", se refiere exclusivamente al huevo de gallina. Los huevos de otras especies aviares, como perdices o codornices, se identifican especificando la especie de la que provienen. Los huevos de gallina, en su estado natural y sin romper, incubar o cocinar, son adecuados para el consumo humano y para su uso en la industria alimentaria. (Rodríguez y Magro, 2008, p 56).

Las aves producen huevos como parte de su ciclo reproductivo, y estos pueden ser fecundados o no. Independientemente de si están fecundados, las aves ponen huevos de todos modos, tienen una forma ovalada con un polo más obtuso que el otro y su peso oscila entre 50 y 70 gramos, la cáscara, que puede ser blanca, amarilla o morena, generalmente presenta una superficie lisa. (Mayer, 1986, p. 481).

La formación del huevo comienza con la ovulación en el ovario, donde la yema madura se libera y es capturada por el infundíbulo. Luego, pasa a través del magnum, donde se añade la clara. En el istmo, se forman las membranas de la cáscara y, finalmente, en el útero (glándula de la cáscara), se deposita la cáscara. (Alais y Limden, 1991).

2.2.2. Estructura y composición

El huevo de gallina está compuesto por tres partes principales: cáscara, el vitelo (yema) y la albúmina (clara), el 60% corresponde a la clara, el 30% a la yema y el 10% restante a la cáscara y las membranas que la rodean. (Larrañaga, Carballo, y Fernández, 1999, p. 11). La estructura del huevo está inherentemente diseñada por la naturaleza para proteger y nutrir al embrión en desarrollo que eventualmente se convertiría en un pollito tras la eclosión. Por esta razón, el huevo está protegido de la contaminación externa gracias a la barrera física que proporcionan su cáscara y membranas, así como a la barrera química que ofrecen los componentes antibacterianos presentes en su contenido. (Instituto de Estudios del Huevo, 2009, p.31).

La cáscara del huevo es una cubierta protectora que mantiene la integridad física del huevo, está compuesta por una matriz de fibras proteicas entrelazadas y cristales de calcita (carbonato de calcio) en proporciones de aproximadamente 1:50 en su estructura. Esta cáscara está atravesada por numerosos poros que forman túneles entre los cristales minerales, permitiendo el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior del huevo.

Los principales elementos minerales que componen la cáscara son calcio (98,2%), magnesio (0,9%), y fósforo (0,9%), en forma de fosfatos. La dureza de la cáscara está directamente relacionada con su contenido de magnesio, presentando una serie de poros distribuidos por toda la superficie, que varían entre (7,000 - 17,000) por huevo, poseen fibras proteicas que dificultan la entrada de microorganismos. En la superficie externa de la cáscara, se encuentra una capa protectora de aproximadamente 10 a 30 micras de espesor, conocida como la cutícula, que se encuentra formada por glicoproteínas (ovotransferrina, ovomucina) y polisacáridos (glucosa, manosa, galactosa y fucosa), Esta capa puede desprenderse al frotarla, lo que incrementa la permeabilidad a las bacterias.

En los huevos de gallina, la cáscara puede variar en color desde blanco hasta marrón, dependiendo de la raza, sin embargo, no hay evidencia científica que respalde la creencia de que los huevos con cáscara más oscura sean nutricionalmente superiores a los blancos. (Larrañaga, Carballo, y Fernández, 1999, pp. 11-12).

2.2.3. Factores que permiten la proliferación bacteriana

La contaminación ocurre después de la postura, principalmente debido a la suciedad y las materias fecales. La flora predominante en los huevos está compuesta por cocos Gram positivos, de los géneros (*Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp* y *Streptococcus spp*) y bacilos Gram negativos de los géneros (*Neisseria spp* y *Moraxella spp*), aunque estos últimos están en menor

cantidad, tienen una mayor facilidad para penetrar a través de las membranas de la cáscara y multiplicarse en comparación con los cocos Gram positivos, y la presencia de *Salmonella* es más significativo en los huevos y sus productos, se debe exclusivamente a la recontaminación de los huevos después de su postura. (Estrada y Valencia, 2012, p. 45).

2.3. Riesgo de eclosión

La eclosión de huevos criollos en sistemas de incubación presenta desafíos específicos debido a factores como la variabilidad genética y el menor control de condiciones sanitarias comparado con los huevos industriales. Evaluar el riesgo en la eclosión es crucial para garantizar la salud de los pollitos y la eficiencia de la producción avícola. Uno de los métodos para esta evaluación es la embriodiagnos, que permite detectar problemas de desarrollo embrionario y la posible presencia de patógenos como *Salmonella spp.* (Palomino y Molina, 2022).

2.3.1. Embriodiagnos

La embriodiagnos es una técnica que permite la observación y análisis de embriones en desarrollo dentro del huevo, proporcionando información crucial sobre la viabilidad del embrión y la presencia de posibles anomalías. En el contexto de incubación de huevos criollos, esta técnica se utiliza para identificar fallas en el desarrollo que podrían estar relacionadas con infecciones bacterianas, incluida la contaminación por *Salmonella spp.* (Fernández y González, 2019).

La embriodiagnos permite detectar problemas en el desarrollo embrionario o que puedan indicar infecciones o condiciones subóptimas de incubación (Fernández y González, 2019).

2.3.2. Relación entre *Salmonella spp.* y fallos en la eclosión

La contaminación por *Salmonella spp.* en huevos criollos puede afectar negativamente la tasa de eclosión y la salud de los pollitos. Esta bacteria puede atravesar la cáscara del huevo y causar infecciones embrionarias, ocasionando la muerte de pollos débiles. Además, los embriones

infectados pueden servir como reservorios de *Salmonella*, facilitando su propagación en el sistema de incubación y afectando futuros lotes de huevos (Reed y Wilson, 2020).

Impacto de la *Salmonella spp* en la eclosión.

Mortalidad Embrionaria: La presencia de *Salmonella* puede causar la muerte del embrión antes de la eclosión (Palomino y Molina, 2022).

Debilitamiento de Pollitos: Pollitos que sobreviven a la infección pueden nacer debilitados, afectando su crecimiento y aumentando la mortalidad post-eclosión.

Propagación del Patógeno: La eclosión de huevos contaminados puede facilitar la dispersión de *Salmonella* a través del entorno de incubación (Reed y Wilson, 2020)

2.3.3. Normativas y protocolos en Ecuador

En Ecuador, la evaluación del riesgo en la incubación de huevos criollos debe seguir normativas específicas que regulan la bioseguridad y el manejo de enfermedades en granjas avícolas. Las normativas locales enfatizan la importancia de la vigilancia epidemiológica y la implementación de sistemas de control para prevenir la propagación de *Salmonella* y otros patógenos (AGROCALIDAD, 2016; ARCSA, 2021).

La norma ISO 6579-1:2017 establece los requisitos para la detección de *Salmonella spp.* en alimentos y alimentos para animales, incluyendo los huevos criollos destinados a incubación. Esta norma especifica los métodos microbiológicos para la detección y enumeración de *Salmonella*, incluyendo el muestreo, el preenriquecimiento, el enriquecimiento selectivo, y la identificación bioquímica y serológica. El enfoque de la ISO 6579-1:2017 se centra en proporcionar un procedimiento estandarizado para asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados en la detección de *Salmonella spp.* en diversas matrices, facilitando el monitoreo de

la contaminación en sistemas de incubación de huevos criollos (International Organization for Standardization [ISO], 2017).

Por otro lado, la norma técnica INEN 1348-2011 de Ecuador establece las directrices específicas para la recolección de muestras de huevos, incluyendo aquellos destinados a incubación, para la detección de *Salmonella spp.* Esta norma detalla los procedimientos para la toma de muestras, incluyendo el equipo requerido, la frecuencia de muestreo, y las condiciones de almacenamiento y transporte de las muestras hasta el laboratorio de análisis. La INEN 1348-2011 también proporciona los criterios de aceptación para la calidad de los resultados analíticos, contribuyendo a la seguridad alimentaria y al control de enfermedades en la producción avícola ecuatoriana, y complementando así la implementación de sistemas de bioseguridad en las plantas de incubación de huevos criollos (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2011). Los factores en el riesgo de eclosión se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2
Evaluación del riesgo de eclosión en el sistema de incubación.

Factor de riesgo	Descripción
Capacidad de respuesta	Variable (Dependiendo de implementación de medidas de seguridad) (Agrocalidad, 2016).
Exposición	Continua (Contacto constante de huevos con ambiente contaminado) (ISO,2017)
Va	

Viene

Probabilidad de Alta (78% presencia en nacedora) (ISO,2017)

ocurrencia

Severidad del impacto Alta (posibles pérdidas en eclosión e infección de pollitos) (ISO,2017)

Vulnerabilidad Alta (Embriones vulnerables a infecciones bacterianas) (ISO,2017).

2.4. Sistema 3M Petrifilm Salmonella Express

2.4.1. Descripción

Las 3M™ Petrifilm™ son placas de cultivo utilizadas en microbiología para el análisis de alimentos y otros materiales para detectar y enumerar bacterias y otros microorganismos. Estas placas tienen varias características distintivas:

- **Diseño simplificado:** Las 3M Petrifilm están diseñadas para simplificar el proceso de análisis microbiológico. Consisten en una película delgada que contiene todos los medios de cultivo necesarios para el crecimiento de microorganismos específicos.
- **Medios de cultivo selectivos:** Cada tipo de Petrifilm está formulado con medios de cultivo selectivos que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras inhiben o reducen el crecimiento de otros, lo que ayuda a detectar específicamente la presencia de un tipo de bacteria.

- Formato estándar: Tienen un formato estandarizado y pre-dispuesto en placas individuales que simplifican la inoculación de muestras, la incubación controlada y la interpretación de los resultados.
- Interpretación visual: Después de la incubación, las colonias de microorganismos aparecen como puntos o áreas coloreadas en la superficie de la película, lo que facilita la cuenta y la interpretación visual de los resultados.
- Aplicaciones diversas: Son utilizadas ampliamente en la industria alimentaria para la detección de patógenos como *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli*, entre otros, así como para el conteo de bacterias indicadoras de calidad higiénica.

2.4.2. Beneficios del Sistema 3M Petrifilm *Salmonella* Express:

Los beneficios de usar las placas 3M™ Petrifilm™ en microbiología de alimentos incluyen varios aspectos clave que las hacen una opción viable debido a que me permite simplificar procesos, facilidad de uso, reducción de espacio de almacenamiento, resultados más rápidos, precisión y reproducibilidad; lo que contribuye a resultados precisos y reproducibles.

El sistema fácil de usar consiste de:

3M™ Base para Enriquecimiento de *Salmonella* y 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella*: Medios exclusivos de enriquecimiento para la recuperación y el desarrollo de las especies de *Salmonella*.

Placa 3M Petrifilm *Salmonella* Express: Un medio de cultivo cromogénico listo para el muestreo que es selectivo y diferencial para *Salmonella*, y que provee un resultado presuntivo.

3M Petrifilm *Salmonella* Express Disco Confirmatorio: Contiene un sustrato que facilita la confirmación bioquímica de todas las especies de *Salmonella*.

Las placas 3M Petrifilm son la marca número uno en pruebas de indicadores de alimentos. Noventa de las cien empresas estadounidenses más importantes de procesamiento de alimentos usan las placas 3M Petrifilm para sus pruebas.

2.5. Resumen del arte del estado del problema

La avicultura es un negocio en auge en el país. Desde 1992, el consumo de carne de ave en el Ecuador, se ha incrementado de 7,5 kg de pollo per cápita por año a 32 kg hasta el 2012, mientras que los huevos subieron de 32 unidades a 140 unidades consumidas por año per cápita en el mismo período. La creciente demanda de carne está obligando a los avicultores a enfrentarse a nuevos retos. (Quijije, 2017). En Macas, provincia de Morona Santiago, como en el resto del país, también se consume el pollo Broiler en mayor cantidad, pero la mayor parte de la población se ha dedicado a la producción de pollo criollo, y han incursionado en la incubación artificial para dar abasto al mercado, pero se ha observado que estos productores están siendo afectados por la presencia de microorganismos ocasionando pérdidas considerables está provocando pérdidas considerables.

La detección de *Salmonella spp.* en sistemas de incubación de huevos criollos es un tema crítico en la producción avícola, particularmente en regiones con prácticas tradicionales como Macas, Morona Santiago. La presencia de *Salmonella spp.* en los huevos destinados a incubación puede influir negativamente en la calidad de los embriones, aumentar las tasas de mortalidad y representar un riesgo para la salud pública al contaminar la cadena alimentaria.

Por otra parte, Mora et al. (2021) investigaron el impacto de las prácticas de bioseguridad en la reducción de *Salmonella spp.* en huevos criollos durante la incubación. Encontraron que las granjas que aplicaban medidas de bioseguridad, como la limpieza y desinfección regular de las incubadoras, presentaban tasas significativamente más bajas de *Salmonella spp.* en comparación con aquellas que no seguían estas prácticas (Mora et al., 2021). Esto resalta la importancia de la

bioseguridad para minimizar la contaminación y mejorar los resultados en la incubación de huevos criollos.

A su vez, Navarrete et al. (2020) analizaron el impacto de la implementación de prácticas de bioseguridad en la reducción de la prevalencia de *Salmonella spp.* en sistemas de incubación de huevos criollos. Su estudio demostró que las instalaciones que aplicaban medidas de bioseguridad, como la limpieza y desinfección regular de las incubadoras, la separación de lotes y el control de acceso, presentaban tasas significativamente menores de *Salmonella spp.* en comparación con aquellas que no implementaban dichas prácticas (Navarrete et al., 2020). Esto subraya la importancia de las estrategias de bioseguridad para minimizar la contaminación y mejorar la calidad de la producción avícola.

Según estudios realizados por Flores et al. (2023) evaluaron la incidencia de *Salmonella spp.* en huevos criollos destinados a incubación en diferentes regiones de Ecuador. Su estudio indicó que las condiciones de almacenamiento y manejo de los huevos antes de la incubación tienen un impacto significativo en la prevalencia de *Salmonella spp.* En áreas con prácticas menos controladas, la incidencia fue considerablemente mayor, lo que resalta la necesidad de implementar medidas de manejo más estrictas en las granjas avícolas tradicionales (Flores et al., 2023).

Incluso en otros países se han realizado estudios relacionados a la *Salmonella*; así, por ejemplo, (Baskerville et al., 1992) ha demostrado que el ovario de gallina puede ser colonizado con *Salmonella spp.* a través de la inoculación en el aire.

3. Métodos y Materiales

3.1. Método

El método que se utilizó en el trabajo expuesto fue de tipo descriptivo en el que se realizó la toma de muestras en una sola línea de tiempo. Se utilizó el medio de cultivo bacteriano para identificar la prevalencia de *Salmonella spp* en huevos de tipo criollos para incubación en la zona de Macas, todo esto empleando la norma ISO 6579-1:2017.

3.1.1. Diseño estadístico

Para el presente trabajo por sus características no se realizó análisis estadísticos paramétricos y pruebas de significancia, sino más bien un análisis objetivo de tipo numérico y proporcional.

Este trabajo de investigación correspondió a un estudio epidemiológico de tipo descriptivo, prospectivo de corte transversal y causal, ya que en primera instancia se determinó la presencia de *Salmonella spp* como el agente etiológico.

Para el cálculo de la prevalencia de *Salmonella spp*, se aplicó la siguiente fórmula:

$$PA = \frac{TMP}{TM} * 100$$

TM

TM: Total de muestras positivas a *Salmonella spp*.

TM: Total de muestras

La construcción de la base de datos muestrales, se realizó en una hoja de cálculo del paquete informático Microsoft Excel y el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico EpiInfo 7.2.5.0.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población de estudios y tamaño de la muestra

La población de estudio estuvo conformada por una muestra finita de 144 huevos criollos para incubación aparentemente sin contaminar, con una edad entre 1 a 7 días, los mismos que fueron tomados de distintos nidos, ubicarlos dentro de la incubadora y realizar la técnica de cultivo dentro de ésta.

La determinación de las muestras estuvo sujeta al cálculo del tamaño mínimo de muestras para poblaciones infinitas, teniendo en cuenta la prevalencia del 9,72% de anteriores investigaciones que se realizaron en el país.

Fórmula utilizada:

$z = \text{Nivel de confianza } 95\% = 1.96$

$p = \text{Probabilidad de que ocurra el evento}$

$q = 1 - p$, probabilidad de que no ocurra el evento

$d = \text{Error estimado } 5\%$

El número de muestras será de 144 huevos, para la realización completa y utilización de todo el reactivo se elevó a 150 huevos, todo esto debido a que 3 yemas generan 1 muestra.

3.2.2. Toma de muestra

3.2.2.1. Obtención de la muestra

Las muestras se recolectaron directamente desde las granjas, que fueron llevadas al local de recepción con su respectiva identificación, utilizando los equipos de protección personal (guantes estériles, mascarilla y cofia) para evitar contaminación, el criterio de selección de los huevos se detalla en la Tabla 3 de acuerdo a la norma INEN 1348-2011.

Tabla 3

Criterios para la recolección de huevos criollos para incubación

Criterio	Descripción
Fecha de recolección	XXXX
Número de huevo	#
Origen	Ciudad
Peso del huevo (g)	55-62 g
Longitud del huevo (cm)	8-12 cm
Ancho del huevo (mm)	41.9 -54.9 mm
Color de la cáscara	Verde/Marrón/Blanco
Estado de la cáscara	Completa, sin daños ni malformaciones
Temperatura de almacenamiento	18- 22 °C
Humedad de almacenamiento	50-60% HR
Observaciones adicionales	Frescura del huevo (1-7 días)

Los huevos seleccionados para el estudio fueron almacenados, medidos y pesados de acuerdo a lo descrito en la norma anterior, excluyendo aquellos huevos que no cumplen con lo establecido. Posterior a ello se los empacó para su traslado a los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

3.2.2.2. Procedimiento de preparación de las muestras

Para el procesamiento y análisis de las muestras se utilizó el sistema 3M Petrifilm *Salmonella* Express, proporcionando una detección cualitativa y una confirmación bioquímica. Dicha metodología se realizó según lo sugerido por Food Safety, como se describe en la *Figura 3*.

3.2.2.2.1. Suplemento para el Medio

- Se pesó asepticamente 0,05 g del 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella*.
- Se pesó asepticamente 37 g del 3M™ Base para Enriquecimiento de *Salmonella*

3.2.2.2.2. Procedimiento pre enriquecimiento

- Se agregó de manera aseptica los 0,05 g del 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* a los 37g del 3M™ Base para Enriquecimiento de *Salmonella*, previamente preparado en un litro de agua destilada y esterilizado en la autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos.

3.2.2.2.3. Procedimiento de la muestra

- Posteriormente se colocó la muestra con el hisopo estéril en un tubo de ensayo, para su preparación.
- Se agregó 225 ml de la combinación del Enriquecimiento Base para *Salmonella* más el Suplemento para Enriquecimiento de *Salmonella* al tubo de ensayo y se procedió a homogenizar la muestra.

3.2.2.2.4. Procedimiento de enriquecimiento

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

3.2.2.2.5. Procedimiento de hidratación

- La hidratación de las Placas 3M Petrifilm se realizó sobre una superficie plana en la cual se añadió con una pipeta 2,0 mL de diluyente estéril sobre el centro de la película inferior posteriormente se dejó caer suavemente la película superior sobre el diluyente para evitar atrapar burbujas de aire.
- Se colocó el Difusor Plano 3M Petrifilm en el centro de la placa y se presionó ligeramente el centro del difusor para distribuir el diluyente de manera uniforme y se lo dejó en una superficie plana durante al menos 1 hora a temperatura ambiente (20–25 °C), protegida de la luz, para que se gelidifique.

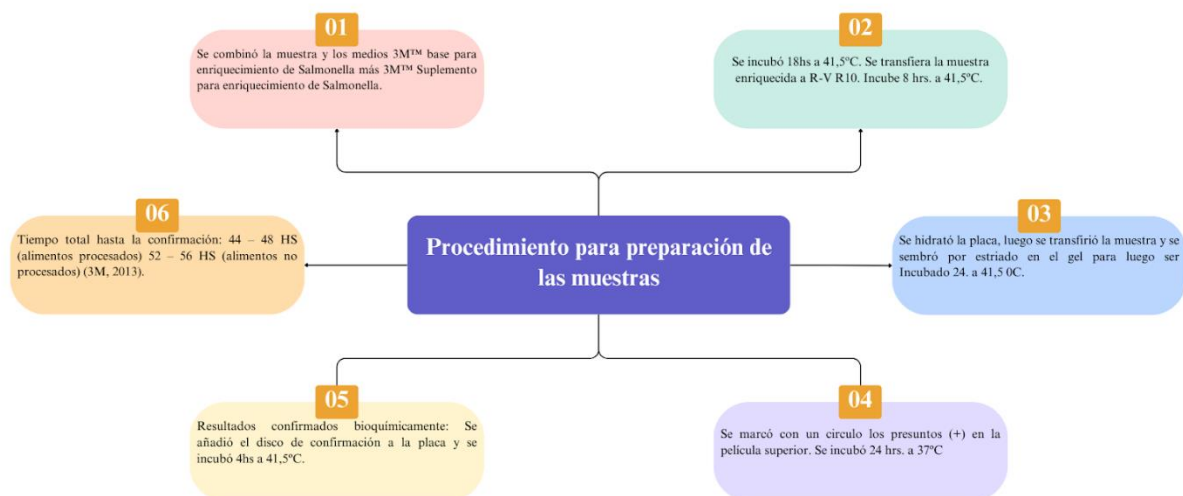


Figura 3. Procedimiento para las muestras utilizando las placas 3M Petrifilm

3.2.3. Metodología de evaluación de riesgos de eclosión

La evaluación del riesgo de eclosión implicó analizar diversos factores que pudieron influir en la viabilidad y el éxito de la eclosión del huevo en el sistema de incubación. En la Tabla 4 y 5 se describen algunos de los pasos o factores que se consideraron importantes: Condiciones ambientales (temperatura, humedad y ventilación). Manejo de incubación (giro del huevo, limpieza y desinfección) y por último se incluyó la embriodiagnosia que consistió en la recolección de las muestras representativas para el análisis microbiológico y la observación directa de los embriones (Rivera & Morales, 2021).

Tabla 4
Factores ambientales para el buen manejo del embrión

Parámetros	Descripción
Humedad Relativa	55-60% HR
Temperatura	70°F-80°F
Ventilación	20-25% de oxigenación

Tabla 5
Manejo en el proceso de incubación

Parámetros	Descripción
Volteo	45° cada hora
Desinfección	Amonio Cuaternario (semanal)

El procedimiento del análisis de la embriodiagnosia se realizó en los huevos sometidos al proceso de incubación a los 21 días. Se recogieron los huevos que no eclosionaron para luego ser abiertos, lo que nos dio la facilidad de observar en qué etapa se dejó de formar el embrión.

Según CONAVE. (2018), no existe uniformidad en los periodos establecidos para la distribución o clasificación de los estados embrionarios, pues algunos toman 4 periodos y en la mayoría de casos tres periodos, encontrando diferencia en los días de corte para estos últimos; el autor prefiere la categoría 0-6, 7-18, 19-21, todo esto explicado en la Tabla 6 y en la *Figura 4*.

Tabla 6

Referencias de días para la evaluación de la embriodiagnosia según distintos criterios.

Días	0-4	11-17	18-21
Mortalidad	Temprana	Intermedia	Tardía
	0-4	5-17	18-21
	0-6	7-18	19-21
	0-6	7-19	20-21
	0-7	8-14	15-21

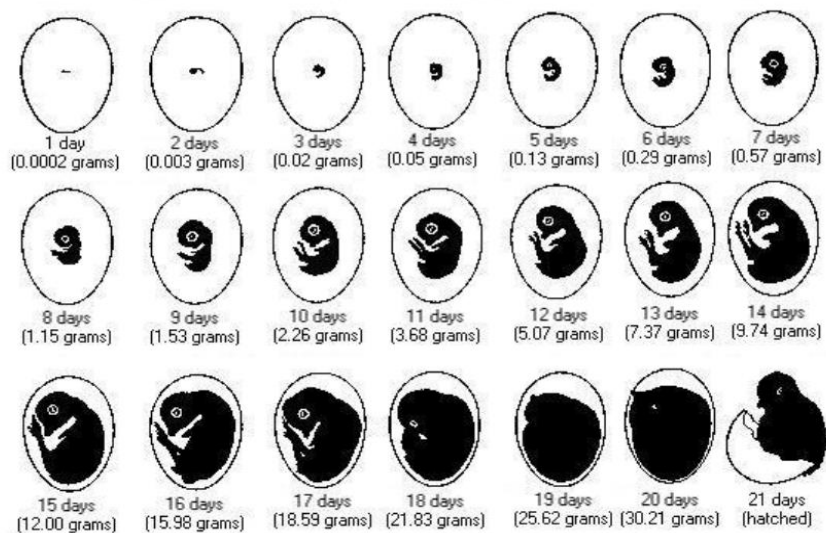


Figura 4. Cambios en la formación y pesaje diario del desarrollo del embrión de pollo

3.3. Materiales

Para el desarrollo del componente práctico en los laboratorios del área de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, se utilizaron materiales: físicos químicos y equipos laboratorio que se describen en las Tablas 3, 4, 5, 6 y 7.

3.3.1. Materiales físicos

Tabla 7

Materiales de oficina utilizados para el desarrollo del componente práctico.

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Cámara Digital	Unidad	1
Esferográfico	Unidad	1
Impresora	Unidad	1
Va		

Viene		
Laptop	Unidad	1
Marcador permanente punta fina	Unidad	1
Papel bond	Resma	1

Tabla 8

Materiales de laboratorio utilizados para el componente práctico

<u>Descripción</u>	<u>Unidad de medida</u>	<u>Cantidad</u>
<u>Algodón</u>	<u>Funda</u>	1
<u>Asas de inoculación</u>	<u>Unidad</u>	144
<u>Bandejas de aluminio</u>	<u>Unidad</u>	4
<u>Encendedor eléctrico</u>	<u>Unidad</u>	1
<u>Espátula</u>	<u>Unidad</u>	1
<u>Fundas wirlpack estériles</u>	<u>Caja</u>	6
<u>Jeringuilla 30ml</u>	<u>Caja</u>	3
<u>Jeringuilla 3ml</u>	<u>Unidad</u>	5
<u>Pipeta 50ml</u>	<u>Unidad</u>	1
<u>Probeta 250ml</u>	<u>Unidad</u>	1
<u>Varilla de vidrio</u>	<u>Unidad</u>	1
<u>Vaso de precipitación 500ml</u>	<u>Unidad</u>	1

Tabla 9
Equipos de laboratorio

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Autoclave	Unidad	1
Balanza digital	Unidad	1
Cabina de bioseguridad tipo 2	Unidad	1
Cocina eléctrica	Unidad	1
Incubadora	Unidad	1
Refrigeradora	Unidad	1

3.3.2. Materiales químicos

Tabla 10
Medios y reactivos

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Agua destilada	Litros	60
3M™ Base para Enriquecimiento de Salmonella	Unidad	1
3M™ Suplemento para Enriquecimiento de Salmonella	Unidad	2
Placa 3M™ Petrifilm™ Salmonella Express	Unidad	50
3M™ Petrifilm™ Salmonella Express Disco Confirmatorio	Unidad	50

3.3.3. Materiales biológicos

Tabla 11

Biológicos

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Huevos de gallina criolla	Unidad	150
Estudiante	Unidad	1

3.4. Consideraciones éticas

El artículo 1 del Reglamento General a la Ley de Sanidad Animal, expedido mediante Decreto Ejecutivo N° 3609, publicado en el Registro Oficial Suplemento N° 1 del 20 de marzo de 2003 del Texto Unificado de Legislación Secundaria del MAG, libro 1, establece que le corresponde al Ministerio de Agricultura y Ganadería, a través del Servicio Ecuatoriano de Sanidad 11 Agropecuaria (SESA) (Hoy AGROCALIDAD), realizar investigaciones de las diferentes enfermedades, plagas y flagelos que afectan a la ganadería nacional, así como, coordinar y supervisar las que efectúe entidades públicas y privadas, nacionales y extranjeras, con miras a lograr resultados de diagnóstico, prevención y tratamiento.

El Art. 2 del Acuerdo Nro. 18 prescribe: “El MAGAP apoyará en el establecimiento y en la ejecución de las siguientes políticas: a) El permiso fitosanitario otorgado por la Agencia Aseguradora de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) será el único documento requerido para la importación de huevo fértil y reproductor. b) Una vez que se incremente la producción nacional de huevo fértil, se establecerá un régimen de importaciones no automáticas de huevo fértil, destinadas a apoyar la producción nacional de este rubro. c) El MAGAP, con el fin de apoyar el desarrollo de la producción nacional de huevo fértil, gestionará ante las instituciones públicas de

crédito, como la CFN, BNF y otras, la apertura de líneas de crédito a largo plazo para el establecimiento de granjas avícolas para este propósito, de acuerdo a los términos y condiciones de las instituciones que generen el crédito. d) El MAGAP apoyará la implementación del Plan Sanitario Avícola Nacional que está aprobado por la Agencia Aseguradora de la Calidad del Agro – AGROCALIDAD; así como, gestionará ante el Ministerio del Ambiente la recategorización ambiental de granjas avícolas. e) Elaborará y ejecutará un plan de control efectivo de contrabando de huevo fértil y pollito/pollita bb (...)

Los establecimientos dedicados a la producción y explotación de aves están obligados a obtener el registro bianual correspondiente de acuerdo a las siguientes normas: a. La solicitud será presentada por el interesado en la Dirección Provincial del Ministerio de Agricultura y Ganadería, correspondiente al lugar donde esté Instalada la granja avícola; b. Deben registrarse en el plazo de noventa días, contados a partir de la fecha de publicación del presente acuerdo, los planteles avícolas ya existentes.

4. Resultados y discusión

4.1. Recolección de muestras

La investigación se desarrolló en un sistema de incubación para huevos criollos en la ciudad de Macas, el día lunes 4 de marzo de 2024 ingresó un lote de 437 huevos criollos, la selección de los huevos criollos utilizados en este estudio, se realizó en base a la normativa nacional (Norma Técnica INEN 1348-2011), Los criterios para la selección de los huevos se consideraron: peso, longitud, ancho, color de la cáscara, estado del huevo, temperatura y humedad, en donde nos pudimos dar cuenta de que, del lote ingresado de 437 huevos, 432 de éstos cumplen todos los parámetros establecidos, mientras que 5 de ellos no cumplieron con uno de los parámetros mencionados, éstos se encontraron con cáscaras rotas y con malformaciones. Según la normativa INEN 1348-2011, al no cumplir uno de los parámetros mencionados anteriormente, el huevo no es apto para el proceso de incubación, los resultados se verán en la Tabla 12.

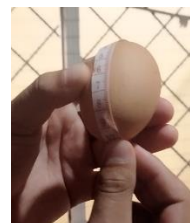
Después del análisis de los huevos se consideraron al azar 150 unidades para el estudio, tomando de aquí 3 yemas por muestra.

Tabla 12

Criterio para la recolección de huevos para incubar. adaptada de la normativa INEN


1348-2011

Criterio	Descripción	Resultado
Fecha de recolección	4 de marzo de 2024	
Número de huevos	437	100%
Origen	Macas-Morona	100%
Peso del huevo (g)	55-59 g	100%
Longitud del huevo (cm)	8-12 cm	100%
Ancho del huevo (mm)	41.9 -54.9 mm	100%



Va

 Viene

Color de la cáscara	Verde/Marrón/Blanco	100%	
Estado de la cáscara	Completa, sin daños ni malformaciones	98.86%	
Temperatura de almacenamiento	18-22 °C	100%	
Humedad de almacenamiento	50-60% HR	100%	
Observaciones adicionales	Frescura del huevo (1-7 días)	100%	

Un análisis similar realizado por Morales y García (2020), que evaluó el impacto de los métodos de manejo y recolección de huevos en la presencia de *Salmonella spp*, destacó que el manejo post-recolección, incluidas las prácticas de almacenamiento y limpieza de los huevos antes

de la incubación, es crucial para minimizar la contaminación. Dicho estudio se realizó mediante el método de análisis microbiológico. Los autores sugieren que la implementación de protocolos de limpieza y el uso de incubadoras bien controladas pueden reducir significativamente la prevalencia de *Salmonella spp.* (Morales, R., y García, P.2020). Con lo anterior, se observa la importancia de la aplicación de normativas para la selección de huevos aptos para el proceso de incubación.

4.2. Presencia de *Salmonella spp.*

Los 150 huevos recolectados al azar para el análisis, se distribuyeron de la siguiente manera: 75 huevos que fueron analizados al día 0 del proceso de incubación y los otros 75 huevos se sometieron al análisis microbiológico al final del periodo de incubación, es decir, al día 21, considerando que para cada muestra de análisis microbiológico se tomaron 3 yemas. Los resultados que se detallan en la Tabla 12 y 13.

Tabla 13

Presencia de Salmonella spp en huevos criollos traídos desde granja, al día cero.

Resultados	Frecuencia	Presencia
Negativo	17	68%
Positivo	7	28%
Sospechoso	1	4%
Total	25	100%

En las 25 muestras del inicio del proceso se tuvo un total de 8 presuntas positivas, las cuales fueron sometidas a confirmación bioquímica, dándonos un total de 7 positivas confirmadas, descartando una como sospechosa, en base al resultado nos permite indicar que

existió un 28% de *Salmonella spp* en las muestras analizadas traídas desde la granja hacia el sistema de incubación.

Al cumplir el proceso de 21 días de incubación, se observaron los 75 huevos, habiendo nacido 42 pollitos, y los 33 huevos, que no eclosionaron fueron sometidos al análisis microbiológico, se procedió a trabajar de la misma manera con 3 yemas por muestra con un total de 11 muestras a procesar, el resultado obtenido fue: 3 muestras negativas, 1 sospechosa y 7 muestras positivas para *Salmonella spp*, siendo ésta cantidad el 63.64%, todo esto comprobado mediante los discos de confirmación. como se detalla en la Tabla 13.

Tabla 13
Presencia de Salmonella spp en huevos criollos finalizado el proceso de incubación

Resultados	Frecuencia	Presencia
Negativos	3	27,27%
Positivos	7	63,64%
Sospechoso	1	9,09%
Total	11	100%

En un estudio realizado en la provincia de Tungurahua por Sánchez (2013), se encontró una prevalencia de *Salmonella* del 0,0133%. Este resultado es considerablemente más bajo en comparación a la presencia de *Salmonella spp* del 28 y 63,64% respectivamente, obtenida en la presente investigación. Esta discrepancia puede atribuirse a que las muestras analizadas en el estudio de Sánchez provinieron de granjas de la Asociación de Fabricantes de Alimentos

Balanceados y Avicultores de Tungurahua (AFABAT), donde se implementan rigurosas medidas de bioseguridad.

Por su parte, Acosta (2016), identificó 6 casos positivos de *Salmonella*, lo que representa un 7,9% en huevos frescos de gallina en la parroquia Cotaló de la Provincia de Tungurahua. La baja prevalencia observada en estos huevos podría estar asociada a los programas de vacunación aplicados en la región.

En contraste, otros estudios presentan resultados diferentes. Por ejemplo, Casierra (2015) en Loja detectó 11 muestras sospechosas (15,25%); sin embargo, al realizar la confirmación bioquímica, todas resultaron negativas, mostrando un 100% de ausencia de *Salmonella*. De manera similar, Estrada y Valencia (2012) no encontraron *Salmonella* en huevos analizados en mercados de Quito.

Adicionalmente, en Chile, Clerc (2005) reportó una presencia de *Salmonella* del 15,6% en huevos provenientes de producción artesanal vendidos en ferias. Este porcentaje, aunque menor al hallado en nuestro estudio (28% y 63,64%), se asocia a la falta de medidas básicas de bioseguridad entre los productores.

Como indica la figura N 6 y 7, se puede observar que existe diferencia en la presencia de *Salmonella spp* en huevos criollos para incubación al día cero y al día 21 (del 28% al 63,64%) lo que está relacionado con la contaminación de los materiales y máquinas que se encuentran dentro de todo el sistema debido a una posible omisión de medidas de bioseguridad. Hay que tomar en cuenta que los huevos llegan desde la granja sin ningún protocolo de limpieza o desinfección, el técnico, al ser consultado sobre la asepsia de las instalaciones, nos comunica que se realiza limpieza y desinfección cada semana y la máquina descansa dos veces al año.

Cabe recalcar que el total que hubo un parte de la población que dentro del proceso de incubación eclosionó, para ser exactos fueron 42 pollitos nacidos al día 21 que se traduce en un 56% de porcentaje de nacimiento, es decir que, en la segunda parte del trabajo, contamos con 33 huevos a los que extrajimos las yemas, brindándonos 11 muestras corridas, es decir que el total de muestras corridas fue de 36 en todo el experimento, siendo ésta la población final y por la cual concluimos que la presencia total tanto dentro como fuera del proceso de incubación de *Salmonella spp* fue de 38,89%, dejándonos el 55,56% de muestras negativas, junto a un 5,55% de muestras sospechosas.

Como resultado total de los 150 huevos escogidos al azar para nuestro experimento, podemos brindar la *Figura 5*, con los resultados finales.

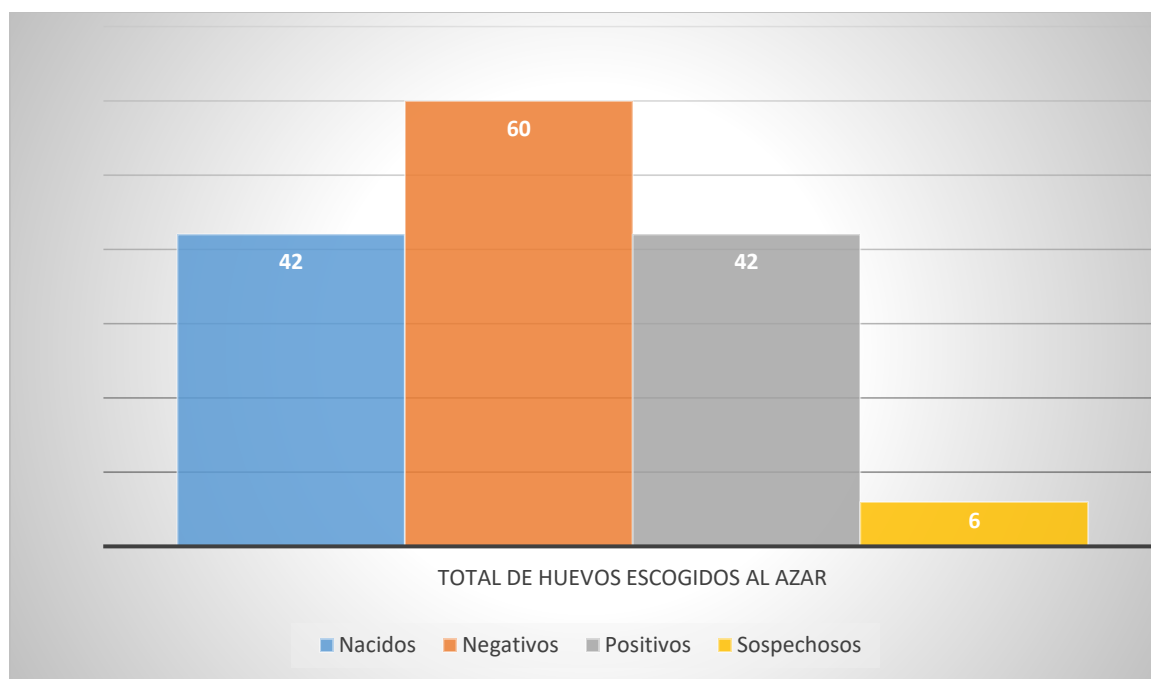


Figura 5. Resultados finales, sumando los huevos, desde el día 0 hasta el día 21 de incubación.

4.3. Evaluación del riesgo de eclosión por la presencia de *Salmonella spp.*

Para evaluar el riesgo de eclosión se utilizó el método de embriodiagnóstico, lo que se hizo fue abrir los huevos que no eclosionaron, uno por uno desde la parte más ancha del huevo, en la cámara de aire, luego se observó el interior del huevo para clasificar la muerte del embrión en temprana (Día 0-7), intermedia (Día 8-14) o tardía (Día 15-21), como nos indica CONAVE (2020) en su Guía de buenas prácticas de manejo en la incubación de huevos. Realizado esto, se constató que la totalidad de embriones se encontraban en muerte intermedia como se observa en las *Figuras 6 y 7*.

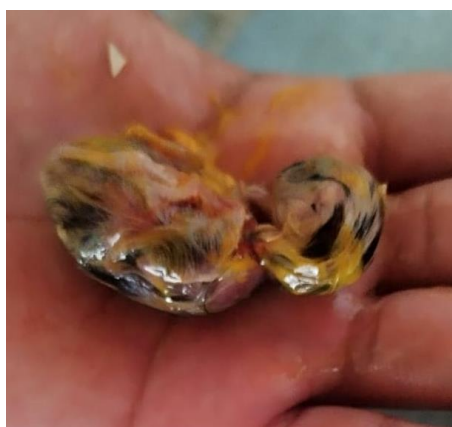


Figura 6. Embrión dentro del cascarón

Figura 7. Embrión con muerte intermedia

La evaluación del riesgo realizada para el sistema de incubación con una presencia del 63,64% de *Salmonella spp* revela un impacto significativo en la eclosión de huevos criollos como se demuestra en la *Figura 9*. Sin medidas de control, la probabilidad de infección es alta, lo que se traduce en una mayor mortalidad embrionaria, contaminación cruzada y una baja tasa de eclosión (ISO, 2017).

De Reu et al. (2008) documentaron una alta incidencia de *Salmonella* en la producción y distribución de huevos. Este estudio subraya la importancia de la higiene y la desinfección para controlar la propagación de la bacteria, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en esta

evaluación, donde la limpieza de la incubadora y la manipulación adecuada de los huevos son medidas esenciales para reducir el riesgo.

Gast y Holt (1997) encontraron que la persistencia de *Salmonella* en gallinas ponedoras afectaba negativamente la viabilidad de los embriones, reduciendo significativamente la tasa de eclosión. Estos hallazgos coinciden con la observación de una alta mortalidad embrionaria y una baja tasa de eclosión en la presencia de *Salmonella* en la incubadora evaluada.

Cox et al. (2002) demostraron que los métodos eficaces de limpieza y desinfección en la incubación reducían significativamente la presencia de *Salmonella*. Este estudio respalda la implementación de procedimientos de limpieza y desinfección rigurosos, como se ha recomendado en la evaluación de riesgo de esta investigación.

Jones (2012) revisó medidas prácticas para el control de *Salmonella*, destacando la bioseguridad y la desinfección como elementos clave. La aplicación de estas estrategias en la incubadora podría disminuir la probabilidad de infección, al igual que en el contexto de este estudio.

Gantois et al. (2009) resaltan la efectividad de las medidas de bioseguridad para reducir la incidencia de *Salmonella* en la avicultura. Las medidas de bioseguridad recomendadas en esta evaluación se alinean con los enfoques exitosos documentados en la literatura para mitigar la contaminación y mejorar la tasa de eclosión.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

Como se pudo observar en el trabajo realizado, es importante la aplicación de normativas para el control de los huevos que se colocaron en el proceso de incubación, ésta selección ayudó a excluir a los huevos que no eran aptos o no cumplieron alguno de los parámetros expuestos y de esta manera se optimizó espacio en el proceso de incubación, además de prevenir algún tipo de contaminación.

Al procesar los 150 huevos que se tomaron para el estudio mediante la 3M Petrifilm, se pudo constatar un incremento alarmante de la presencia de *Salmonella spp* del 28% en el día 0 al 63,64% en el día 21.

La importante presencia de *Salmonella spp* probablemente se atribuyó a una disminución en la tasa de eclosión, así como a una mayor mortalidad embrionaria. Los estudios previos también han identificado que la presencia de *Salmonella spp* afecta negativamente la viabilidad de los embriones y la salud de los pollitos nacidos.

Es importante aportar que la *Salmonella spp*, es miembro del género *Enterobacteriaceae*, por lo que es probable que no sea la única bacteria que afecta en lo que a porcentaje de eclosión se refiere, por ejemplo, es bien conocido que la contaminación de los huevos con *E. coli* puede ocurrir principalmente a través del contacto con material fecal contaminado. Esto puede suceder en el nido, durante la manipulación de los huevos o en el entorno de incubación (Messens et al., 2005). La presencia de *E. coli* en el entorno de incubación puede llevar a infecciones en los embriones y polluelos recién nacidos, resultando en una disminución de la tasa de eclosión y un aumento de la mortalidad neonatal (Saif et al., 2003).

En conclusión, éste estudio resalta la necesidad de fortalecer las prácticas de bioseguridad, limpieza y desinfección para controlar la propagación tanto de *Salmonella spp* como de otros agentes microbianos. La implementación deficiente de estas prácticas en el sistema examinado ha resultado en una mayor susceptibilidad a la contaminación, apoyando la importancia de los controles de higiene y manejo de huevos.

5.2. Recomendaciones

Como recomendación, sería necesario impulsar este tipo de estudios debido a su importancia para la salud pública y para la economía del avicultor, prestar más atención al sector rural y a las incubadoras que son de tipo caseras, debido a que si no tiene se tiene el debido cuidado y control sanitario es muy posible la propagación de bacterias como la *Salmonella spp* que no solo afectan a las aves, sino que también al hombre. Además, sería necesario realizar capacitaciones para el buen manejo de las medidas de bioseguridad e implementar nuevas tecnologías para el progreso de los avicultores.

6. Referencias bibliográficas

- 3M. (12 de Mayo de 2013). *Salmonella Guía de Interpretación. Sistema 3M™ Petrifilm™ Salmonella Express*. Obtenido de Salmonella Guía de Interpretación. Sistema 3M™ Petrifilm™ Salmonella Express: www.3M.com/foodsafety
- Acosta, R. (2016). *Caracterización de Salmonella (salmonella spp.) en huevos frescos de gallinas mediante la utilización del sistema microgen GN A en la parroquia Cataló*. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (Agrocalidad). (2016). Resolución 059/2016.
- Alais, C., y Limden, G. (1991). *MANUAL DE BIOQUÍMICA DE LOS ALIMENTOS*. Barcelona España: Masson S.A.
- Armada, L., y Ros, C. (2006). *Manipulador de alimentos. La importancia de la higiene en la elaboración y servicio de la comidas* (1era ed.). Vigo, España: Ideaspropias.
- Betancor, L. y Yim, L. (2012). Salmonella y salmonelosis. Obtenido de http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella_y_salmonelosis.pdf
- Bhunia, A. K. (2008). *Salmonella enterica. En Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. New York, USA: Elsevier.
- Blanco, F., Casadiego, G., y Pacheco, P. (2011). Calidad microbiológica de alimentos remitidos a un laboratorio de salud pública en el año. *Salud publica, vol. 13*(no. 6,), pp. 953-965.

- Caffer, M. I., y Terragno, R. (2008). *Familia Enterobacteriaceae. En: Enterobacterias: Actualización diagnóstica. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"*. Buenos Aires, Argentina: Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv.
- Casierra, A. (2015). *Detección de salmonella spp. en la superficie de huevos provenientes de gallinas de traspatio, comercializados en las principales ferias libres de la ciudad de Loja, a través del Sistema 3M Petrifilm* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
- Clerc, M. (2005). *Detección de Salmonella spp. en huevos de gallina comercializados en ferias de la ciudad de Valdivia* (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Conway, A. (2016a). World poultry meat market growth modest in 2015–2016. *Poultry Trends*, 6–12.
- Conway, A. (2016b). Egg production breaks record 70-million-metric-ton mark in 2015.
- Creus, E., y Mainarl-Jaime, R. C. (2010). Salmonelosis en las explotaciones porcinas. *Suis*(68), 40-48.
- Domínguez, L., Porrero, M. C., y Téllez, S. (2006). Salmonelosis porcona: Situación epidemiológica actual. *Anaporc*(33), 28-32.
- Eley, A. (1994). *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana*. Zaragoza, España: Acribia.

- Enfermedades en las Aves: Obtenido de “http://www.ecured.cu/index.php/Colibacilosis_aviar” Categorías: Mejorar Salud| Ciencias veterinarias.
- Estrada, J., & Valencia, B. (2012). *Determinación de Salmonella spp. en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of Salmonella in broilers. *FSA Journal* 2011;9(7):2106.
- FAO. (2005). *Evaluaciones de riesgos de salmonella en huevos y pollos para asar: resumen interpretativo*. Recuperado de <http://.fao.org/3/y4393s07.htm>
- FAO. (2007). *Código de prácticas de higiene para los huevos y los productos de huevo*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/i1111s/i1111s01.pdf>
- Farrell, D. (2013). The role of poultry in human nutrition. Poultry development review, 2–3. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Feng, P. (2007). Rapid methods for the detection of foodborne pathogens: Current and next-generation technologies. En M. Doyle, y L. Beuchat, *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers* (pp. 913-923). Washington, D,C: ASM Press.
- Fernández, V., Velasco, J., Benito, A., y Nieto, M. (2006). Salmonelosis porcina: Casos clínicos. *Anaporc*(33), 54-64.
- Gast, R. (2013). Paratyphoid infections. D. E. Swayne (Ed.). *Diseases of poultry* (pp. 673– 713). Ames Iowa: Wiley-Blackwell Publishing 718–733.

- Herrera, A. G. (2001). *Salmonella. En: Food Microbiology Protocols. SPENCER, J.F.T & SPENCER DE, A.J.R.* Totowa, New Jersey: Human Press.
- Houriet, J. L. 2007. Guía práctica de enfermedades más comunes en aves de corral (ponedoras y pollos) 48 pág. Argentina. Disponible en www.produccion-animal.com.ar
- Hurtado, F. (2001). *Obtención de un hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y Agrícola. Ingeniero de Alimentos* (Tesis pregrado). Escuela Superior del Litoral Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil.
- Instituto de Estudios del Huevo. (2009). *El Gran Libro del Huevo*. Madrid, España: EVERGRÁFICAS, S.L. .
- Iveson, J., Kivacs, N., y Laurie, W. (1964). An improved method of isolating salmonellae from contaminated desiccated coconut. *J Clin Pathol*, 17(1), 75-78.
- Jiménez, S. (12 de Mayo de 2019). *SALMONELOSIS. Fundación Española del aparato digestivo*. Recuperado de Salud Digestivo.com: <https://www.saludigestivo.es/wp-content/uploads/2016/07/C.-SALMONELOSIS.pdf>
- Larrañaga, I., Carballo, J., y Fernández. (1999). *Control e Higiene de los Alimentos (1ª edición ed.)*. Madrid, España: McGraw Hill.
- Mayer, H. F. (1986). *Bromatología: higiene y control de alimentos. Tomo 2.* Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad nacional del Nordeste. *Facultad Ciencias Veterinarias*, 481.

- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Bresee, J., Shapiro, C., . . . Tauxe, R. (1999). Food-Related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.*(5), 607- 25.
- Molback, K., Olsen, J. E., y Wrgener, H. C. (2006). *Salmonella infections*. En: *Foodborne infections and intoxications*. H.P. & CLIVER, D.O. p. 57-115: RIEMAN .
- Montville, T. J., y Mathews, K. R. (2008). *Gram-negative foodborne pathogenic bacteria*. En: *Food Microbiology. An introduction*. Washington: American Society for Microbiology.
- Murray, P. (2004). *Pocket Guide to Clinical Microbiology*. New York: ASM Press.
- Musgrove M.T, Northcutt J.K, Jones D, Cox N.A, Harrison M.A. 2008. Enterobacteriaceae and related organisms isolated from shell eggs collected during commercial processing. *Poultry Sci.* 87: 1211-1218.
- N.A. & COPEL, J.A. Buenos Aires, Argentina: Inter Médica .
- OMS. (2004). *Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo*. Switzerland.
- OMS. (23 de Febrero de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado de Organización Mundial de la Salud: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Organización Internacional de Normalización (ISO). (2017). **ISO 6579-1:2017**. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of Salmonella spp.

- Pascual, M., y Calderón, V. (2013). *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid, España: Diaz de Santos S.A.
- Pulido -Landínez, Martha, and Certificada Por El Acpv. *Diagnóstico E Identificación de Serotipos de Salmonella a Partir de Muestras de Avicultura: Importancia de Un Buen Muestreo*. Nov. 2016.a
- Pulido -Landínez, Martha, and Certificada Por El Acpv. *Diagnóstico E Identificación de Serotipos de Salmonella a Partir de Muestras de Avicultura: Importancia de Un Buen Muestreo*. Nov. 2016.b
- Pulido -Landínez, Martha, and Certificada Por El Acpv. *Diagnóstico E Identificación de Serotipos de Salmonella a Partir de Muestras de Avicultura: Importancia de Un Buen Muestreo*. Nov. 2016.c
- Pulido-Landinez M., Sanchez-Ingunza R., Guard J. , do Nascimento V.P. (2013). Assignment of serotype to Salmonella enterica isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 57, 288-294.
- Riemann, H. P., y Cliver, D. O. (2006). *Salmonella infections. En: Foodborne infections and intoxications*. California. USA: Elsevier.
- Rincón, D. P., Ramírez, R. Y., & Vargas, J. C. (2011). Transmisión de Salmonella entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(2), 167-177.
- Rodríguez, V., y Magro , S. (2008). *Bases de la Alimentación Humana*. Coruña. España: NETBIBLO S.A.
- Salyers, A., y Whitt, D. (2002). *Bacterial Patogénesis: a molecular approach*. Washinton: ASM press.

- Sánchez, L., Rodríguez , M., Álvarez , P. L., y Garrido , M. E. (1998). Salmonelosis: fiebre tifoidea. Otras formas clínicas sistémicas. Enfermedades infecciosas. *Medicine*, 7(79), 3659-65.
- Sánchez, M. (2013). *Determinación de la prevalencia de enterobacterias del género salmonella spp. en huesvos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia de Tungurahua* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Schonewille, E., Windhorst, D., Bräuni, I. (2012). Biofilm building properties of Salmonella on the poultry farm. *International Poultry Production*, 20, 13–15.
- Stanchi, N. (2007). *Microbiología Veterinaria. Buenos Aires (Argentina)*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica.
- Terragno, R., Caffer, M. I., y Binsztein, N. (2008). *Aislamiento y caracterización de Salmonella sp. En: Manual de Procediendo. Diagnóstico y caracterización de Salmonella sp. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*. Buenos Aires, Argentina. : Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv.
- Tunes, M., y Vigo, G. B. (2007). *Salmonella. En: Microbiología Veterinaria. STANCHI, N.O.; MARTINO; P.E.; GENTILINI, E.; REINOSO, E.H.; ECHEVERRIA; M.G.; LEARDINI,*
- USDA. (2015). *La refrigeración y la inocuidad de los Alimentos*. Recuperado de <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/manejo-adequado-de-alimentos/la-refrigeracion>

- Vanegas, David. *Proceso de Incubación de Pollito Ross 308 En Planta de Incubación. Barbosa-Antioquia (OPAV)*. 2014, p. 16.
- Velge, P., Cloeckart, A., Barrow, P. (2005). Emergence of Salmonella epidemics: The problem related to Salmonella enterica serotype enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research*, 36, 267–288.
- Yousef, A. E., y Carlstrom, C. (2006). *Salmonella. En: Microbiología de los alimentos. Manual de laboratorio*. Zaragoza. España: Acribia.
- Zhou, D., y Galan, J. (2001). Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted. *Microbes and Infection*.(3), 1293-1298.

7. Anexos

Foto 1. Pesaje Base



Foto 2. Pesaje Enriquecimiento



Foto 3. Mezcla de base y enriquecimiento



Foto 4. Preparación de la muestra



Foto 5. Placas petrifilm confirmadas



Foto 6. Placa sospechosa

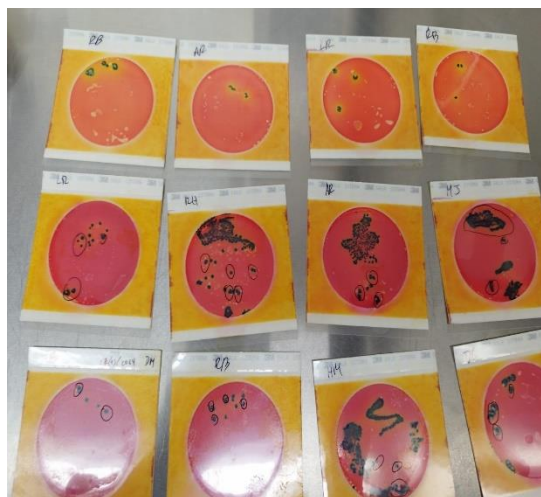


Foto 7. Proceso de embriodiagnos



Foto 8. Toma de muestra luego de embriodiagnos

