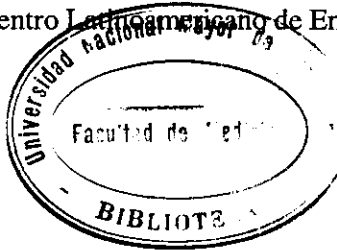


## “EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Salmonella* en HUEVOS FRESCOS, UTILIZANDO EL MEDIO XILOSA-LISINA-TERGITOL 4 (XLT4)”

Gisella del Carmen Lévano Muñante, Carmen López Flores

Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Centro Latinoamericano de Enseñanza e Investigación en Bacteriología Alimentaria (CLEIBA)



### RESUMEN

Se evaluó la presencia de *Salmonella* en 680 huevos frescos de gallina, provenientes de 4 granjas de Lima y 4 de Chincha y de los mercados de Ate-Vitarte, Surco y Villa El Salvador, se evaluó la cáscara y la parte interna del huevo, se comprobó la selectividad del agar Xilosa-Lisina-Tergitol4 (XLT4) en la recuperación y el aislamiento de especies del género *Salmonella*, con una significancia estadística  $p < 0,01$ , frente al agar Hecktoen. En el análisis de los huevos frescos de gallina no se encontró *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis, sin embargo se obtuvo *Salmonella entérica* serovar. Djugu y *Salmonella entérica* serovar. Mbandaka.

### ABSTRACT

We evaluated the presence of *Salmonella* in 680 fresh hen eggs, coming from 4 farms from Lima and 4 ones from Chincha and from markets in Ate-Vitarte, Surco and Villa El Salvador. Eggshell and internal part were evaluated and the selectivity of Xylose-Lisine-Tergitol 4 agar medium (XLT4), checked up on the recuperation and isolation of species of *Salmonella* genus, with a statistical significance of  $p < 0,01$  in comparison with Hecktoen agar medium. In the analysis of fresh eggs, *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis was not found; however, we found *Salmonella enterica* serovar. Mbandaka.

## INTRODUCCIÓN

La Salmonellosis en humanos es una infección intestinal causada por el género *Salmonella*, a menudo ocurre después del consumo de huevos mal cocidos, carne y productos derivados de aves y otros alimentos contaminados con *Salmonella*.

La manifestación de esta enfermedad en humanos y aves está influenciada por algunos factores comunes entre ellos se incluyen: la serovariedad de *Salmonella*, la edad del huésped, la dosis de infección, el tipo de alimento, la predisposición a enfermedades y otros factores.

En la última década, el número de aislamientos de *S. enteritidis*, en aves y humanos, se ha elevado tanto que en muchos países *S. enteritidis* es conocida como la principal serovariedad aislada, a menudo comprometiendo el 60 a 80% de todos los aislamientos de *Salmonella*. En muchos países *S. enteritidis* es reemplazada por *S. typhimurium* como la serovariedad más frecuentemente aislada. Esta tendencia empezó en países europeos, donde *S. enteritidis* pt 4 ha llegado a ser el fagotipo más común identificado.

Un incremento similar en aislamientos de *S. enteritidis* pt 4 se ha observado en Sudamérica. En los Estados Unidos, los aislamientos de *S. enteritidis* se ha incrementado desde 1985 y consiste principalmente de *S. enteritidis* pt 8 y cepas 13a.

En Canadá, en 1993, se produjo un gran

brote de *S. enteritidis* en gallinas ponedoras de corral y un incremento significativo en los casos de Salmonelosis humanas, ambas infecciones causadas por *S. enteritidis* pt 4, siendo *S. typhimurium* la serovariedad más aislada en humanos, seguida por *S. enteritidis* (17.1% y 16.5% de los aislamientos reportados, respectivamente) (8).

El incremento de la prevalencia de *S. enteritidis* en humanos se debe a varias causas; una de ellas son las aves consideradas como una importante fuente de infección en criaderos de pollos, también se ha demostrado el rol de los ratones como vectores de la infección, en dichos criaderos.

En los países como Estados Unidos, en donde el consumo de carnes de aves y huevos es alto, ya se están tomando medidas severas de control para la erradicación de salmonela.

En el Perú, el número de aislamientos de *Salmonella enteritidis*, referidas a fuentes humanas representa un 54% y *Salmonera typhi* representa un 36%, siendo ambas las especies de mayor prevalencia en nuestro país; la mayor parte de estos aislamientos provienen de pacientes con ETA, causadas por el consumo de huevos frescos o alimentos que lo contengan.

Los objetivos iniciales planteados para la realización de este trabajo fueron:

- Determinar la prevalencia de *S. enteritidis* y otras salmonelas en

huevos frescos de gallina, en nuestro medio.

- Evaluar la selectividad de un medio de aislamiento para *Salmonella*, nuevo en el mercado, el agar Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT4).

## PARTE EXPERIMENTAL

El muestreo se realizó durante los meses de enero - abril de 1998, se analizaron un total de 680 huevos frescos de gallina, en las 8 primeras semanas las muestras provinieron de granjas (4 granjas de Chíncha y 4 de Lima, las cuales se muestrearon en dos oportunidades), en las siguientes 6 semanas las muestras provinieron de mercados (Ate-Vitarte, Surco y Villa El Salvador). El muestreo fue al azar. Las unidades muestrales estaban compuestas por 4 huevos.

Se investigó la presencia de *Salmonella* en la cáscara y en el contenido de los huevos. Para ello se aplicó el procedimiento de Baker y Goff, usando Caldo Tripticosa Soya (TSB) en lugar de Caldo Lactosado (1). Los huevos se introdujeron en bolsas de polietileno estériles, cubriéndolos totalmente con 100 ml de Caldo Tripticosa Soya (TSB) y se procedió a realizar el lavado de las cáscaras durante 1 – 2 minutos aproximadamente por cada huevo. Luego la solución de lavado se trasvasó a un frasco estéril. Posteriormente, los huevos fueron sumergidos en alcohol etílico de 95° y luego se flamearon para

eliminar el exceso de alcohol. Después de la ruptura aséptica, se trasvasó a un frasco estéril el contenido de 4 huevos donde se realizó la homogeneización, luego de esto se tomó un aproximado del contenido de un solo huevo y se transfirió a otro frasco que contenía 100 ml de TSB. Este frasco, junto con el frasco que contenía la solución de lavado, se incubó a 35 °C por 18 horas. A partir de aquí se tomaron alícuotas de 1ml. y se agregan a diferentes caldos de enriquecimiento para *Salmonella* (Caldo Tetrionato Mueller-Kauffman y Rappaport Vasiliadis) que se incubaron a 43 °C por 24 horas. Posteriormente se realizaron los aislamientos en agares selectivos: Agar Hecktoen (HE) y Agar Xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLT4), incubados a 35 °C por 18 – 24 horas. Luego se practicaron las pruebas bioquímicas correspondientes a las cepas presuntivas de ser salmonelas. La serotipificación fue realizada en el Laboratorio de Referencia de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos después de analizar 680 huevos, se muestran en las Tablas 1, 2, 3 y 4.

En la Tabla N° 1, se observa la cantidad de muestras que se analizaron, tanto de granjas como de mercados.

La Tabla N° 2 presenta el porcentaje de muestras positivas para *Salmonella*

encontradas en las cáscaras (4,40 %) y contenidos (1,10 %) de los huevos procedentes de los mercados.

En la tabla N° 3, se puede observar las serovariedades de *Salmonellas* aisladas de todas las muestras analizadas. De las 21 cepas aisladas se identificaron 2 serotipos: *Salmonella enterica* serovar. Djugu ( 90,5 %) y *Salmonella enterica* serovar. Mbandaka ( 9,5 %).

Una comparación de la selectividad de los agares HE y XLT4 se observa en la Tabla N° 4. en la que el agar más eficaz resultó

ser el Agar XLT4 ya que se obtuvo mayor aislamientos de colonias presuntivos de *Salmonella* que posteriormente se confirmaron como tales. Aplicando el análisis estadístico usando la prueba del Chi-cuadrado, se obtuvo una diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ) con el agar XLT4 con respecto al agar HE. En el análisis de las muestras de contenido, la diferencia encontrada no alcanzó significancia estadística, debido a que la diferencia entre el número de cepas sospechosas y confirmadas de ambos agares, no es suficiente para obtener dicha significancia.

**TABLA N° 1: Muestras según Tipo y Procedencia**

PROCEDENCIA	TIPO DE MUESTRA		TOTAL
	Cáscara	Contenido	
Granjas	80	80	160
Mercados	90	90	180
<b>TOTAL</b>	170	170	340

**TABLA N° 2: Porcentaje de muestras positivas para Salmonella, según tipo y procedencia.**

PROCEDENCIA	TIPO DE MUESTRA	
	Cáscara	Contenido
Granjas	0 %	0 %
Mercados	4,40 %	1,10 %
<b>TOTAL</b>	2,40 %	0,60 %

**TABLA N° 3 : Serovariedades de Salmonelas aisladas en las muestras analizadas**

SEROVARIEDAD	N°	%
<i>Salmonella enterica</i> serovar. Djugu	19	90.5
<i>Salmonella enterica</i> serovar. Mbandaka	2	9.5
<b>Total</b>	21	100

**TABLA N° 4:** Comparación del poder selectivo del agar XLT4 frente al agar HE.

Tipo y procedencia de las muestras	Agar XLT4		Agar HE		Significancia p*
	Sospechosas	Confirmadas	Sospechosas	Confirmadas	
Cáscara-Mercados	14	14	9	2	< 0,01 (a)
Contenido-Mercados	4	4	4	1	> 0,10 (b)

- Prueba Chi-Cuadrado para comparación de proporciones.
- (a) La diferencia encontrada es altamente significativa, el agar XLT4 muestra mayor poder selectivo que el agar HE.
- (b) La diferencia encontrada no alcanzó significancia estadística.

## DISCUSIÓN

El tamaño de la muestra utilizado en este trabajo se determinó en base al estudio anteriormente realizado por Mendoza y Rincón (5) quienes investigaron la presencia de *Salmonella spp.* en 55 docenas de huevos, analizando solamente la cáscara. Es por ese motivo que se determinó analizar 680 huevos; considerando la cáscara y el contenido como muestras independientes.

La metodología y los medios de cultivo empleados influyen en el aislamiento de *Salmonella* ya que ciertos serotipos prosperan mejor en determinados medios de enriquecimiento y de selección, y esta selectividad puede ser un fenómeno general entre las especies de este género. Por ello, y para que las probabilidades de aislamiento de salmonela fueran mejores, en este trabajo se utilizaron simultáneamente dos caldos de enriquecimiento (Tetrationato y Rappaport Vassiliadis) y dos agares de aislamiento selectivo (XLT4 y HE), como mejores

alternativas; como se propone en Métodos de Laboratorio para la detección de *Salmonella enteritidis* y Programas de Seguimiento. (9).

La contaminación en las muestras provenientes de mercados es mayor que en las muestras provenientes de granjas, probablemente debido a que se puede incrementar la contaminación de los huevos en el transporte de éstos hacia el mercado, como señala Mulder; (7) otra de las causas de la contaminación de los huevos se puede deber a las malas condiciones de almacenamiento a las que están sometidas los huevos, condición que favorece la multiplicación de *Salmonella* (4).

La baja contaminación encontrada en los huevos (cáscara 2,4 % y contenido 0,6%) se puede explicar por el desarrollo de una resistencia genética de las aves como se demostró en el estudio realizado por Beaumont y col en 1996 (2), además en la actualidad se han implementado medidas de control en donde se utilizan drogas y

vacunas para evitar la infección por *Salmonella*. (10)

La presencia de *Salmonella* en la cáscara de los huevos, evidencia que el riesgo de contaminación por causas externas (suelo, heces, inapropiado almacenamiento, etc) no ha sido controlada aún. (3).

La contaminación en el contenido de los huevos, es normalmente el resultado de la infección del tejido reproductivo, más que el paso a través de la cáscara después de la puesta del huevo (4). En nuestro estudio las muestras de contenido que presentaron contaminación, también presentaron contaminación en la cáscara.

El agar XLT4, no sólo incrementa la frecuencia del aislamiento de *Salmonella*, en comparación con el agar HE, sino que además permite obtener una mayor pureza en el aislamiento de *Salmonella* por inhibición del crecimiento de bacterias competitivas como: *Proteus* y *Pseudomonas* principalmente, esto debido a la presencia del Tergitol 4 (sustancia inhibidora). Este agar también ofrece una diferenciación por el color, las bacterias coliformes como *Citrobacter* que da colonias amarillas, a diferencia de las colonias de *Salmonella* que da colonias negras o con centro negro. (6)

En este trabajo no se logró encontrar *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis, pero se encontró *Salmonella enterica* sero. Mbandaka y *Salmonella enterica* sero Djugu.

La presencia de *Salmonella enterica* en los huevos puede deberse a varias razones, una de las cuales pueden ser los ratones, que generalmente tratan de introducirse a los galpones en busca de alimento. Desafortunadamente, muchas veces sirven como vectores biológicos de la infección con salmonelas para las parvadas. Aún en el mejor de los casos, aunque no introduzcan la salmonela, si la parvada ya se ha infectado con ellas, los roedores servirían como amplificadores de la infección, al esparcir sus excretas en el alimento.

## CONCLUSIONES

1. Se ha analizado microbiológicamente 680 huevos en búsqueda de *Salmonella*. El resultado fue negativo a *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis, pero se encontró *Salmonella enterica* serovariedades: Djugu y Mbandaka.
2. Los huevos provenientes directamente de granjas fueron negativos para *Salmonella*. Sin embargo, los huevos procedentes de mercados estuvieron contaminados, en la cáscara en un 4,4 % y en el contenido en un 1,1 %, con cepas de *Salmonella enterica* serovariedades Djugu y Mbandaka.
3. La presencia de *Salmonella* en huevos constituye un riesgo a la salud pública.
4. Se comprueba que el medio de aislamiento XLT4 realmente recupera mejor y es más específico que el medio de aislamiento Hecktoen.

## AGRADECIMIENTO

Se agradece al Laboratorio de Referencia de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud por realizar la tipificación serológica de las cepas de *Salmonella* aisladas en el presente estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Baker RC and Goff J P.** (1980) Prevalence of Salmonellae on eggs from Poultry Farms in New York State. Poultry Sci. 59: 289-292.
2. **Beaumont C, Guillot J, Berthelot F.** (May. 1996) Preventing of farm infections through genetic selection. Supplement of WORKDPOULTRY Misset pp. 20-21.
3. **Buxade C.** (1987) La gallina ponedora. Ediciones Mundi – Prensa Madrid pp 480 – 483.
4. **Mc- Ilroy GS.** May.1996. How do the birds became infected by Salmonella Serotype – Misset pp 15-17.
5. **Mendoza S, Rincón D,**(1996) Universidad Simón Bolívar. Caracas. Investigación de *Salmonella spp.* en cáscara de huevos y envases de cartón. Libro de Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los Alimentos – Primer Simposio Peruano de conservación de los Alimentos del 14 – 18 de Abril de 1996. Lima.
6. **Miller** (1991) RG and Tate CR. Xylose-Lysine-Tergitol 4. An improved selective agar medium for the isolation of Salmonella. Poultry Sci. 70: 2429-2432.
7. **Mulder RWA W,** (1996) Impact of transport on the incidence of humans pathogens in poultry. WORLD POULTRY-Misset, 29 (9): 18-19.
8. **Food Safety:** (December 1, 1997) *Salmonella enteritidis* Phage type 4 in Ontario. Canada Communicable Report. Vol.23-23.  
URL: <<AHREF=http://foodsafety.org/ht/ht085.htm#sec9. Día de acceso: 18/09/97.
9. **Padrón NM.** (1994) Métodos de Laboratorio para la Detección de *Salmonella enteritidis* y Programas de Seguimiento. Amavea. pp: 7-18, 24-26.
10. **Pope C.** (May. 1996). Salmonellosis in poultry and people. Supplement of WORLD POULTRY-Misset. pp: 13-14.