

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad Ingeniería



Excelencia que trasciende

DEL VALLE
GRUPO EDUCATIVO

“Determinación de la presencia de *Salmonella spp.* de huevo en cáscara para consumo humano, en granjas de producción autorizadas por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, ubicadas en el departamento de Guatemala”

Trabajo de investigación presentado por

Kevin Adolfo Mauricio Robles

para optar al grado académico de

Maestría Tecnología de Alimentos y Gestión

Guatemala

2018

"Determinación de la presencia de *Salmonella* spp. de huevo en cáscara para consumo humano, en granjas de producción autorizadas por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, ubicadas en el departamento de Guatemala"

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería

“Determinación de la presencia de *Salmonella* spp. de huevo en cáscara para consumo humano, en granjas de producción autorizadas por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, ubicadas en el departamento de Guatemala”

Trabajo de investigación presentado por

Kevin Adolfo Mauricio Robles


para optar al grado académico de

Maestría Tecnología de Alimentos y Gestión


Guatemala


2018

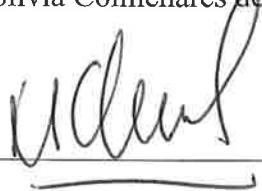
Vo. Bo.

(f) 
MSc. Ana Alicia Paz

Tribunal examinador:

(f) 
MSc. Ana Alicia Paz

(f) 
MSc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f) 
Dra. Marializ Gramajo Rodríguez

Fecha de aprobación: Guatemala, 03 de abril de 2018. ✓

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE CUADROS	VI
RESUMEN	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
A. Huevo	5
B. Formación del huevo	6
1. El ovario.....	6
2. El oviducto.....	6
3. Anormalidades.....	7
C. ENTE OFICIAL	8
1. Dirección de Sanidad Animal.....	8
2. Dirección de Inocuidad de Alimentos.....	8
D. Producción de huevo	8
E. Salmonella spp.	9
1. Clasificación.....	9
2. Patogenicidad.....	10
3. Enfermedades transmitidas por alimentos ETA's.....	11
4. Tratamiento y prevención.....	12
5. Contaminación del huevo por Salmonella.....	12
6. Identificación de Salmonella.....	14
a. Metodología para la identificación clásica.....	14
b. Pruebas bioquímicas para la identificación de Salmonella.....	15
c. Identificación Serológica.....	15
d. Identificación por PCR.....	16
III. METODOLOGÍA	18
A. Determinación de número de muestras	18
1. Fórmula.....	18
2. Cálculo de muestra.....	18
B. Materiales	18
C. Muestreo de huevos	18
1. Toma de la muestra.....	18
2. Identificación de la muestra.....	19
3. Transporte de la muestra.....	19
4. Análisis de la muestra.....	19
a. Muestras compuestas.....	19
b. PCR (Reacción en cadena de polimerasa).....	20
c. Análisis Estadísticos.....	20

d. Control	20
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
A. Identificación de granjas autorizadas	21
B. Visita a granjas	23
C. Muestreo	23
D. Manejo de la muestra en el laboratorio	24
1. Desinfección de la muestra.....	24
2. Preparación de pools.....	25
3. Enriquecimiento de la muestra.....	26
4. Preparación de LISIS:	28
5. PCR (Reacción en cadena de polimerasa).....	29
E. Análisis estadístico	32
V. CONCLUSIONES.....	36
VI. RECOMENDACIONES.....	37
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	38
VII. APÉNDICE	43
Apéndice 1. Esquema de la formación del huevo en la gallina	43
Apéndice 2. Boleta de toma y envío de muestras.....	44
Apéndice 3. Informe de resultados de Laboratorio	45
Apéndice 4. Método USDA MLG 4C.07	46
Apéndice 5. ATCC® 14028™	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema Integrado Inocuidad Alimentos (SIIA-WEB)	22
Figura 2. Muestra compuesta de 10 huevos medianos, 10 huevos grandes y 10 huevos extra grandes.....	24
Figura 3. Desinfección de la muestra con etanol al 70%	25
Figura 4. Pools de huevo	26
Figura 5. Pesaje de peptona	27
Figura 6. Solución de peptona con agua destilada	27
Figura 7. Preparación de lisis.....	28
Figura 8. Placa calefactora.....	29
Figura 9. Traslado de lisado a las pastillas de reacción de PCR	30
Figura 10. Colocación de muestras en bandeja de termociclador.....	30
Figura 11. Análisis de las muestras	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Medios de cultivo para distinguir especies de Salmonella.....	14
Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para identificación de Salmonella.....	15
Cuadro 3. Codificación de granjas	23
Cuadro 4. POOLS o muestras compuestas	25
Cuadro 5. Enriquecimiento de la muestra	26
Cuadro 6. Resultados del análisis estadístico descriptivo.....	33

RESUMEN

Los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son recurrentes en muchos países y entre ellos Guatemala, siendo este un problema que afecta la salud y la economía de las personas, Así también afecta a los sistemas de salud pública como privada. Cuando los brotes afectan a un gran número de personas, los sistemas de salud colapsan al no estar preparados para cubrir las emergencias; Así mismo las empresas se ven afectadas ya que los consumidores pueden llegar a desconfiar en los productos y evitar su consumo. Por eso es importante generar información para que los consumidores y los productores estén confiados de la inocuidad de los alimentos que se venden y consumen en el mercado.

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, por medio de la dirección de Inocuidad de Alimentos, ejerce el control y vigilancia de las medidas de inocuidad en granjas autorizadas, supervisando los programas prerrequisitos, las buenas prácticas de manufactura y los programas operativos estándar de sanitización para producir alimentos inocuos. En este estudio se determinó la presencia de *Salmonella spp.*, en huevo en cáscara para consumo humano no solo por la alta distribución y consumo (es uno de los 28 alimentos que se encuentran dentro de la canasta básica alimentaria de los guatemaltecos), sino que es una bacteria patógena común en este tipo de alimento.

Se evaluaron 10 granjas autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación ubicadas en el departamento de Guatemala, tomando 30 huevos de muestra por granja; la muestra estaba compuesta por los tres diferentes tamaños de huevo comercial siendo estos mediano, grande y extra grande. Las muestras fueron llevada al laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala, campus central, donde se realizaron muestras compuestas (pools) y por medio de la técnica de PCR en tiempo real, se determinó la presencia de *Salmonella spp.* Se utilizó el método BAX® *Salmonella*. (USDA MLG 4C.07) ver anexo No. 4

Las granjas productoras autorizadas en el departamento de Guatemala de donde se tomaron las muestras, producen el 39% de la producción nacional de huevos. Para la determinación de número de muestras se tomó como referencia el plan de muestreo de la Comunidad Europea (niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE y Decisión 97/747/CE)

La técnica de análisis que se utilizó fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), que consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico, para llevar a cabo el experimento de amplificación es necesario conocer la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de un gen, una región no codificadora). Esta técnica es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos, se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. También se utilizaron muestras compuestas (Pools) para reducir costos y tiempo durante el diagnóstico.

Los resultados obtenidos de las muestras compuestas analizadas por medio de la técnica de PCR, fueron 100% negativas para *Salmonella spp*, con esto se evidencia el buen control que ejerce el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación en las granjas autorizadas, obteniendo información de la ausencia de la bacteria en los huevos producidos para consumo humano en el departamento de Guatemala. Se agradece a la empresa DUPONT, por toda la asesoría técnica brindada durante el análisis de las muestras y el uso del kit para salmonella.

I. INTRODUCCIÓN

El huevo de mesa es un alimento rico en nutrientes, de bajo costo y accesible a la población en general. En el año 2015 el Instituto Nacional de Estadística INE reportó que el huevo es uno de los productos que integran la casta básica. En el año 2000 encuestas realizadas por ENIGFAM (Encuesta Nacional de Ingresos Familiares) reportó el huevo como el alimento más consumido en Guatemala, obteniendo el 81% de las encuestas realizadas.

La producción de huevos según la base de datos del programa de sanidad avícola PROSA del VISAR-MAGA, indica que para el 2016 se tienen 10 millones de aves de postura registradas a nivel nacional, con una producción de huevos mayor a 8 millones de cajas al año (360 huevos/caja). Con un consumo per cápita de 147 huevos al año. (MAGA-VISAR, 2016)

El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Guatemala cuenta con la Dirección de Inocuidad de Alimentos del Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones, que tiene la responsabilidad de extender los permisos de operación a las empresas de productos no procesados destinados al consumo humano, de la vigilancia y del transporte, los permisos de importación y exportación y el monitoreo sobre sustancias prohibidas y bacterias patógenas que puedan afectar la salud de los consumidores.

La Dirección de Inocuidad también es la responsable de velar por la inocuidad del huevo de mesa para consumo humano, la cual otorga Licencias Sanitarias de Funcionamiento a las granjas productoras y centros de acopio según el "Acuerdo Gubernativo 969-99 Reglamento para la Inocuidad de los Alimentos". Actualmente se tienen registradas más de 60 empresas que se dedican a la producción y comercialización de huevo, las cuales representan un 67 % de la producción a nivel nacional, el otro 33 % se produce en granjas muy pequeñas o con sistemas de producción artesanal que no cuentan con registro en la Dirección de Inocuidad. En el departamento de Guatemala es donde se tienen registrada la mayoría de granjas de producción de huevo para consumo humano, en el año 2016 se tienen registradas 11 granjas productoras y 28 centros de acopio.

El huevo puede ser trasmisor de enfermedades, cuando este se contamina por bacterias principalmente del genero *Salmonella spp.* Esta contaminación puede ser de forma congénita durante el paso del huevo por el oviducto y endógena por mala higiene, manipulación y huevos fisurados o rotos que contaminan al resto durante la clasificación y almacenamiento.

La salmonelosis es una enfermedad provocada por la bacteria *Salmonella*, se caracteriza por fiebre alta, dolor abdominal, diarrea, náusea y a veces vómitos. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre 6 y 72

horas después de la ingesta de alimentos contaminados con la bacteria, la enfermedad puede durar entre 2 y 7 días. En la mayoría de los casos, los síntomas de salmonelosis son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico. Sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños de menor edad y ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida.

La Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) estima que hay 79,000 casos de enfermedades transmitidas por alimentos y 30 muertes cada año por comer huevos contaminados con *Salmonella*. En Guatemala se desconoce el número de casos reportados por consumo de huevo contaminado con esta bacteria.

En el 2015, Varquin, *et al.* Realizó el estudio *Salmonella en Aves Crudas en Mercados Minoristas en Guatemala: Niveles, Susceptibilidad a los antibióticos y la distribución de los serotipos*. En total, se recolectaron 300 cadáveres de pollo de siete departamentos en Guatemala. Los números de *Salmonella* se determinaron utilizando el método del número más probable. En total, se obtuvieron 103 aislamientos, para la susceptibilidad a los antibióticos, mientras que 46 aislados fueron serotipificados. La prevalencia de *Salmonella* fue de 34,3%. Se encontraron diferencias significativas ($P, 0,05$) en la prevalencia de *Salmonella* por condición de almacenamiento (refrigerado o ambiente Temperatura), tipo de mercado (mercados húmedos, supermercados y establecimientos avícolas independientes), sistema de producción (Compañía de producción no integrada), y color de piel de pollo (blanco o amarillo). Los pollos producidos por empresas integradas muestran menor número de *Salmonella* ($P, 0,05$) que las empresas no integradas, y las carcasas de piel blanca tuvieron números más bajos ($P, 0,05$) que las carcasas de piel amarilla. Entre los 13 diferentes serovares de *Salmonella* identificados, Paratyphi B (34,8%) fue más prevalente, seguido por Heidelberg (16,3%) y Derby (11,6%). De todos los aislados de *Salmonella*, 59,2% eran resistentes a uno a tres Antibióticos y 13,6% a cuatro o más antibióticos.

Randall S. Singer, *et al.* (2006), realizó un estudio con el objetivo de optimizar un protocolo que utiliza los cultivos de caldo de enriquecimiento de *Salmonella* agrupados de heces bovinas y la PCR para la detección del gen *invA* de *Salmonella* en heces. En un ensayo de campo, se muestrearon 196 animales y se realizó la PCR *invA* en grupos de 5 muestras además del cultivo bacteriológico de muestras individuales. Basándose en estos ensayos de campo, la PCR *invA* en muestras agrupadas parece ser un método eficaz de detección de *Salmonella* siempre y cuando las cargas de *Salmonella* no sean extremadamente bajas. En el 2007 Molina E, *et al.* evaluó cultivo fecal combinado y PCR fecal individual para el monitoreo del nivel del rebaño para tuberculosis, los objetivos fueron evaluar un sistema de cultivo fecal cruzado y evaluar la utilidad del método de cultivo descrito en combinación con la PCR fecal individual, logrando reducir los costos y el tiempo hasta el diagnóstico.

Según la información proporcionada por la Organización Mundial de la Salud, estima que uno de cada diez habitantes en el mundo se enferma al ingerir alimentos contaminados, dichos alimentos producen las enfermedades transmitidas por alimentos conocidas como ETA's, son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas las cuales penetran en el organismo a través de agua o alimentos contaminados.

Dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos cuyo origen lo causan las bacterias se mencionan a las *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli enterohemorragica*, estas afectan a millones de personas cada año; los síntomas pueden ir desde el dolor de cabeza, náuseas, vómitos, dolores abdominales y diarrea.

Los alimentos que están asociados con brotes de salmonelosis son: el huevo, carne de aves y productos de origen animal. Según los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social se reportan las diarreas como el segunda causa de muerte entre lactantes y niños, sin embargo no se detalla el agente etiológico implicado en la transmisión de la enfermedad así, como también la fuente de infección.

Para el sistema de salud, minimizar la aparición de casos de intoxicación alimentaria bacteriana es importante pues supone hacer eficiente el uso de los recursos ya escasos y priorizar el gasto en otras enfermedades de mayor impacto, dicho gasto puede minimizarse si se define que alimentos pueden contribuir a casos de intoxicaciones y procurar evitarlos.

Para la industria supone aportar un producto inocuo para consumo humano, evitando el retiro de producto, desconfianza del consumidor y mayores gastos financieros, aunque en Guatemala no se han dado casos de retiro de producto por parte de empresas, se sabe de países donde es una práctica común cuando se determina el origen y causa de las enfermedades por alimentos contaminados, dando un duro golpe en las finanzas de la empresa, credibilidad del consumidor hacia los productos, desestabilizando de esta manera el proceso económico.

La importancia de evaluar el huevo destinado al consumo humano es determinar si hay presencia de *Salmonella spp.* por su valor comercial, es accesible para la mayoría de la población guatemalteca, según el Instituto nacional de Estadística, es uno de los 28 alimentos que constituyen la canasta básica alimentaria y su consumo per cápita para el año 2015 fue de 147 huevos.

En Guatemala no existen estudios específicos que determinen la presencia de *Salmonella spp.* en granjas productoras de huevo, actualmente el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación –MAGA- es el encargado de velar por la inocuidad de este producto, sin embargo no se realiza ningún plan Nacional de muestreo para verificar la presencia de salmonella en huevo. Es por

ello la importancia de este estudio, pues se podía determinar la presencia de esta bacteria en granjas autorizadas y demostrar la inocuidad de los huevos que se comercializan.

Por lo tanto, para el control de las enfermedades transmitidas por lo alimentos es necesario el muestreo de los productos de consumo humano para indicar el riesgo que puedan presentar, en este estudio se realizará el muestreo de huevos en cáscara destinados al consumo humano en las granjas autorizadas por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación –MAGA-, con la finalidad de que si se encuentra algún positivo son *Salmonella spp.*, se pueda identificar la granja y la galera de donde proviene el huevo y poder determinar la trazabilidad del producto con el fin de realizar las acciones correctivas para controlar la contaminación. El muestreo no se realizará en puntos de venta sean estos mercados o tiendas, porque los vendedores no tienen trazabilidad del producto que obtienen, por tanto sería ineficiente al momento de encontrar algún positivo y solo se podría reportar el hallazgo sin poder desarrollar acciones correctivas para el problema.

El objetivo del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación es tener base científica por medio de estudios específicos en huevo para consumo humano, para generar el programa nacional de muestreo de huevo en cáscara para consumo humano y poder implementar el control oficial de todas las granjas autorizadas.

La técnica que se utilizó es la de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), debido a que es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos, se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. También se utilizaron muestras compuestas (Pools) para reducir costos y tiempo durante el diagnóstico.

II. MARCO TEÓRICO

A. Huevo

El huevo es el gameto o célula reproductiva que aporta el miembro femenino en la reproducción sexual con un cuerpo unicelular, de forma esférica o más o menos elíptica a la que se le conoce como ovoide, en términos de biología se denomina también huevo (o cigoto) a la célula resultante de la unión del gameto masculino con el femenino en la reproducción sexual de los animales y de las plantas. (Instituto de Estudios del Huevo. 2009)

Con respecto al huevo de gallina, en promedio pesa alrededor de 57 gramos o 2 onzas, las partes de un huevo son la yema, la clara, la cáscara y las membranas (USDA, 2000). Aproximadamente de un 9,5% de cáscara, 63% de clara y 27,5% de yema. La cáscara es porosa, tiene aproximadamente entre 7,000 a 15,000 poros que forman túneles entre los cristales minerales y permiten el intercambio gaseoso entre el interior y el exterior, son numerosos en la zona del polo ancho del huevo donde se encuentra la cámara de aire. Toda la superficie del huevo está recubierta por una cutícula orgánica que está formada principalmente por proteínas (90%) y en menores cantidades de lípidos y carbohidratos. Las funciones principales de esta película consisten en cerrar los poros, formando una barrera física contra la penetración de microorganismos, regula el intercambio de gases, evita la pérdida de agua y da un aspecto brillante al huevo. (Instituto de Estudios del Huevo. 2009)

En la clara se distinguen dos partes según su densidad, el albumen denso y el fluido. El primero rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo, el albumen fluido es el más próximo a la cáscara, cuando se abre un huevo fresco se puede diferenciar entre ambos, porque el denso rodea la yema y flota centrada sobre él. A medida que el huevo pierde frescura, el albumen denso es menos consistente y termina por confundirse con el fluido, quedando finalmente la clara muy líquida y sin consistencia. La clara o albumen está compuesta con 10,6% de proteínas, 0,9% de carbohidratos, 0,6% de minerales y trazas de lípidos. (Instituto de Estudios del Huevo. 2009)

La yema o vitelo es la parte central y anaranjada del huevo, se encuentra rodeada de la membrana vitelina que es la encargada de dar forma a la yema y permite mantenerla separada de la clara. Cuando se rompe esta membrana, la yema se mezcla con la clara. En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50%. Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y carotenoides. (Instituto de Estudios del Huevo. 2009)

El huevo es un alimento que contiene proteína, carbohidratos, grasa (no saturadas), vitaminas (A,D,B1,B12 y riboflavina) y contiene un perfil de minerales que incluye, hierro, fósforo, calcio, cobre, yodo, magnesio, manganeso, potasio, sodio, selenio, cinc y azufre. Adicionalmente contiene los carotenoides, lecitina y colina, que han sido ampliamente investigados por sus beneficios en el desarrollo cerebral y la visión. (El Sitio Avícola. 2013)

B. Formación del huevo

La gallina produce un huevo cada 24 o 26 horas, independientemente de que estos sean o no fecundados por un gallo. El proceso de formación comprende desde la ovulación hasta la puesta del huevo, la calidad del huevo depende de la alimentación y ambiente que se le proporcione a la gallina. La gallina inicia la puesta de huevo a las 20 semanas de vida, donde alcanza su madurez sexual.

El aparato reproductor de la hembra está formado por ovario y oviducto, resultando funcionales únicamente los izquierdos, el conjunto derecho está formado pero más tarde involuciona. El oviducto representa todo el tracto genital y se extiende desde el ovario hasta la cloaca. (Instituto de Estudios del Huevo. 2009)

1. El ovario. El ovario se desarrolla gradualmente desde una pequeña estructura irregular con una superficie finamente granular a otra en la que se puede observar folículos individuales. Estos folículos aumentan después rápidamente en cantidad y tamaño. El ovario funcional se muestra como un racimo de uvas de color amarillo debido a la presencia de los redondeados folículos en diferentes estados de desarrollo. (M.J. Shively. 2003)

2. El oviducto. Mide aproximadamente 65 cm de largo en las aves de postura y puede dividirse en cinco regiones, según la función de sus partes, además añade grandes cantidades de nutrientes. Para la formación del huevo este debe permanecer un tiempo en cada región del oviducto. (M.J. Shively. 2003)

- *Infundíbulo:* el oocito transcurre a través del infundíbulo en alrededor de 20 minutos además es el lugar donde se puede producir la posible fertilización del huevo.
- *Magnum:* añade casi la mitad de la albúmina total al huevo. El huevo tarda unas 3 horas y 30 minutos en pasar por esta porción.
- *Istmo:* sus glándulas secretan más albúmina y también un material que rápidamente se coagula para formar las dos membranas homogéneas que se encuentran entre la albúmina y el cascarón. El huevo tarda más de una hora y 15 minutos en atravesar el istmo.
- *Útero:* cierta cantidad de albúmina acuosa se añade aquí para que el huevo se hinche al pasar a través de las membranas permeables. A esto le sigue la deposición del cascarón que está formado principalmente de carbonato de calcio que se deposita sobre una matriz orgánica de

proteína-polisacárido, además de los pigmentos de este y una capa externa como barniz (cutícula). El huevo permanece ahí durante 21 horas.

- *Vagina*: es un tubo muscular en forma de S, a través de la cual, pasa el huevo completo en segundos cuando es expulsado. Una vez formado el huevo se producirá la expulsión a través de la cloaca o vagina. El huevo sale con fuerza gracias a las contracciones de la musculatura lisa que rodea a la mucosa. En algunas gallinas, 1 hora antes de la ovoposición, el huevo gira 180 °C y sale primero la parte roma. (K.M. Dyce et al. 2007). Ver anexo 1.

La puesta de huevos suele producirse entre las 7 y las 11 de la mañana. La ovulación puede iniciarse de 15 a 30 minutos después de que haya sido puesto el huevo anterior. (M.J. Shively. 2003)

3. Anormalidades

- Los huevos con doble yema resultan cuando se liberan dos yemas casi al mismo tiempo o cuando una yema se pierde en la cavidad del cuerpo durante un día y es recogido por el embudo cuando se libera la yema del día siguiente.
- Un huevo dentro de un huevo se debe a la inversión de dirección del huevo por la pared del oviducto. Se agrega un huevo de un día al huevo del día siguiente y la cáscara se forma alrededor de ambos.
- Las manchas de sangre son causadas por una ruptura de uno o más pequeños vasos sanguíneos en el folículo de la yema en la ovulación.
- Se ha demostrado que las manchas de carne son sangre que han cambiado de color debido a la acción del tejido desprendido de los órganos de la gallina.
- Los huevos de cáscara blanda generalmente ocurren cuando un óvulo es prematuro y el tiempo insuficiente en el útero impide la formación de la cáscara.
- Los huevos de cáscara delgada pueden ser causados por deficiencias en la dieta, de origen hereditario o algún tipo de enfermedad.
- Las yemas de color se deben a las sustancias de los piensos que causan coloración en las yemas. (USDA, 2000)

C. ENTE OFICIAL

En Guatemala, el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación MAGA, es el ente oficial encargado de la prevención y control de las etapas de producción, transformación, almacenamiento, transporte, importación y exportación de alimentos naturales no procesados (código de salud, 2009), se integra por cuatro viceministerios dentro de los cuales se encuentra el Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones VISAR, formada por cinco direcciones que para este estudio son de interés.

1. Dirección de Sanidad Animal. Según el artículo 1, de la Ley de Sanidad vegetal y animal DECRETO No. 36-98 dice "tiene como objetivo velar por la protección y sanidad de los vegetales, animales, especies forestales e hidrobiológicas. La preservación de sus productos y subproductos no procesados contra la acción perjudicial de las plagas y enfermedades de importancia económica y cuarentenaria, sin perjuicio para la salud humana y el ambiente".

Dentro de la dirección de sanidad animal se encuentra el programa de sanidad avícola PROSA, ACUERDO MINISTERIAL No. 1528-2003, en su artículo 1, dice "Se establece el Programa Nacional de Sanidad Avícola, que en adelante se denominará PROSA, para la prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar, Newcastle, Salmonelosis (*S gallinarum S pullorum*), Laringotraqueítis Infecciosa Aviar y otras enfermedades de interés para la avicultura nacional". Este programa se encarga del registro de las granjas avícolas, emisión de licencias de funcionamiento de ave viva y monitoreo y erradicación de enfermedades.

2. Dirección de Inocuidad de Alimentos. Según el artículo 3, Reglamento para la inocuidad de los alimentos, Acuerdo Gubernativo No. 969-99 dice "Quedan obligados a la observancia de este reglamento las personas individuales o jurídicas, públicas y privadas, nacionales, extranjeras e internacionales que produzcan, transformen, empaquen, fraccionen, importen, exporten, almacenen, transporten, distribuyan y comercialicen alimentos dentro del territorio nacional". La dirección se conforma de varios componentes, dentro de los cuales se encuentra el Componente huevo, encargado de velar por la inocuidad en la cadena productiva de este alimento, emisión de licencias sanitarias de funcionamiento a granjas productoras y centros de acopio y de transporte de huevo destinado para el consumo humano.

D. Producción de huevo

A nivel mundial según datos de la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación) de 1998, la producción de huevos de gallina se sitúa en 48,5 millones de toneladas. Esta producción da lugar a unos 867.000 millones de unidades (considerando un peso aproximado de 56 gramos por unidad), es decir unos 72.250 millones de docenas.

Asia es la región del mundo que tiene mayor producción de huevos de gallina, una parte muy importante de esta producción, aproximadamente el 65,4%, la aporta China, el continente europeo es la segunda zona productora de huevos. Su producción global es de unos 9,4 millones de toneladas. El conjunto de países de Europa no pertenecientes a la Unión Europea producen el 43,5% del total de este continente. Otra gran potencia productora de huevos de gallina es norte-Centroamérica. Su producción asciende a 6,9 millones de toneladas, de las cuales 5 millones de toneladas (el 67,7%) las aporta Estados Unidos.

La producción de aves en Guatemala se clasifica según su destino o finalidad zootécnica siendo estas: incubación, engorde y postura. La base de datos del programa de sanidad avícola PROSA del VISAR-MAGA, indica que son 10 millones de aves de postura registradas a nivel nacional en 2016, las cuales tienen una producción de huevo para consumo humano aproximado de más de 8 millones de cajas al año (360 huevos/caja) con un consumo per-cápita de 147 huevos al año. (Maga, 2016)

La Dirección de Inocuidad de VISAR-MAGA, es la encargada de velar por la inocuidad del huevo de mesa para consumo humano. Se tienen registradas más de 60 empresas que se dedican a la producción y comercialización de huevo las cuales representan un 67 % de la producción a nivel nacional. En el departamento de Guatemala se tienen registradas 11 granjas productoras y 28 centros de acopio.

E. Salmonella spp.

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, bacilos gramnegativos no forman esporas, algunos pueden ser móviles o inmóviles, crecen en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Mide de 0.4-0.6 x 1.3 μm ., pero ocasionalmente forma filamentos cortos. Es normalmente móvil por flagelos peritricos, pero variante no móvil con o sin flagelos podría ser encontrado bajo condiciones naturales. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque se desarrollan entre 20 y 40°C. Las enterobacterias están ampliamente distribuidas en plantas, agua y suelo, además puede encontrarse en el intestino del hombre y animales. La calidad del agua y alimento depende de la ausencia de estas enterobacterias. (Stanchi. 2007).

1. Clasificación. La epidemiología de la *Salmonella* es muy compleja debido a su distribución ubicua, su creciente número de serovares, su amplio rango de hospedadores y su compleja patogénesis. Desde el punto de vista epidemiológico puede clasificarse en tres grupos:

- **Grupo I:** Son aquellas *Salmonellas* que no tiene afinidad a ningún hospedero por lo que puede afectar por igual al hombre y animales. (Stanchi. 2007)

- **Salmonella enteritidis:** Ocasiona diarreas en cerdos, terneros y potros y una toxi-infección alimentaria en el hombre.
- **Salmonella typhimoriun:** Causa enteritis y toxi-infección alimentaria en el hombre. (García. 2013)
- **Grupo II:** Son aquellas Salmonellas que afectan únicamente al humano. (Stanchi. 2007)
- **Salmonella Tiphosa:** Cuando están contaminando los alimentos, las aguas, la leche y es consumido por el hombre le ocasiona el tifus, es identificada también la bacteria como *Bacillus typhi*. (García. 2013)
- **Grupo III:** Son aquellas Salmonellas que afectan únicamente a los animales. (Stanchi. 2007)
- **Salmonella pullorum:** Ocasiona la diarrea blanca en los pollos ó pullorosis, los pollitos nacen con pullorosis constituyendo fuente de contagio.
- **Salmonella gallinarun:** Ocasiona una infección intestinal aguda denominado tifus aviar, también una infiltración leucocítica del hígado.
- **Salmonella cholera suis:** Ocasiona la salmonelosis en cerdos, identificada la enfermedad como enteritis necrótica, siendo más afectados los lechones.
- **Salmonella abortus equina:** Es causante del aborto en yeguas; la S. abortus ovis en ovejas y la S. abortus bovis en vacas. (García. 2013)

2. Patogenicidad. En el hombre se dan tres formas de salmonelosis clínicamente diferentes: fiebres entéricas, septicemias y gastroenteritis agudas.

El prototipo de la fiebre entérica es la producida por *Salmonella typhi*, contraída por la ingestión de alimentos o aguas contaminadas, suele empezar de modo insidioso, tras un período de incubación de siete a catorce días, con malestar, anorexia y cefalea, seguidas de fiebre, ésta última aumenta a menudo gradualmente y se acompaña de bradicardia relativa. Especialmente durante la primera semana, la postración puede ser importante, y aunque en general no hay diarrea, son frecuentes la distensión y el dolor abdominal sordo. Las propiedades patógenas de las salmonelas son debidas definitivamente a endotoxinas asociadas con la porción somática del organismo.

Las fiebres entéricas producidas por otras salmonelas (fiebres paratifoideas) son generalmente menos graves, y poseen un período de incubación más corto (1 a 10 días). En las fases iniciales se produce una bacteremia, la fiebre dura de una a tres semanas y la manifestación de manchas rosadas es poco frecuente. Las fiebres entéricas pueden ser producidas por casi la totalidad de las salmonelas, pero los agentes más frecuentes reportados en Estados Unidos son: *S. paratyphi B* (*S. schottmulleri*) y *S. typhimurium* (6). Casi la mitad de las personas infectadas continúan excretando salmonelas un mes después de la desaparición de los síntomas y una de cada veinte todavía lo hace hasta cinco meses después. Los individuos que continúan excretando el organismo después de un año se consideran portadores. (Galiano. 2005)

3. Enfermedades transmitidas por alimentos ETA's. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un problema que debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político. Por ser un problema recurrente en los países en vías de desarrollo, las autoridades e instancias gubernamentales y otras instituciones afines, tanto del sector público como privado, deberían dirigir campañas de vigilancia y asistencia continua a fin de prevenir o corregir situaciones que pueden ser muy peligrosas y que pueden afectar adversamente la salud de la población. (Schneides. 2009)

Los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala se limitan principalmente a la incidencia de las diarreas sin detallar el agente etiológico ni el alimento implicado en la transmisión de la enfermedad. Las diarreas son el segundo problema en importancia como causa de muerte entre lactantes y niños, después de la neumonía. Igualmente está en la segunda posición entre las enfermedades infecciosas, después de las infecciones respiratorias agudas. (Galiano. 2005)

La *Salmonella*, género de bacterias patógenas descubiertas por el veterinario americano Daniel Elmer Salmon en 1,885. La bacteria llega a los alimentos por contaminación del animal que produce el alimento, los alimentos más comunes comprometidos son: la carne, productos cárnicos como salchichas y carnes curadas, aves, huevos, leche y productos lácteos. Si los alimentos se cocinan de forma apropiada, la bacteria morirá y no habrá ningún problema, pero muchos de estos productos se comen sin cocinar o parcialmente cocinados. (Galiano. 2005)

La salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad nutricional de los alimentos que consumen diariamente, la cual a su vez depende de la calidad higiénica y sanitaria a que estos son sometidos en toda la cadena productiva, desde el campo hasta la mesa del consumidor. Si bien la falta de higiene y de sanidad en el procesamiento y preparación de los alimentos es un problema que puede ocurrir en cualquier lugar del mundo, la incidencia de enfermedades causadas por los alimentos mal procesados o pobremente preparados es un problema crítico, severo y que se encuentra con más frecuencia en los países en vías de desarrollo. (Schneides. 2009)

4. Tratamiento y prevención. En la gastroenteritis no complicada por salmonela, como cualquier otra diarrea, se debe vigilar el equilibrio hidroelectrolítico del enfermo. Los casos leves se tratan con dieta y limonada alcalina; no se debe usar anti-diarreico porque pueden transformar al enfermo en portador crónico de salmonela. Los casos graves deben hospitalizarse y tratarse con rehidratación intravenosa. El tratamiento antimicrobiano no reduce la duración ni la gravedad de los síntomas y puede prolongar la convalecencia y el estado de portador intestinal del microorganismo infectante. Para la prevención de estas infecciones se debe tomar en cuenta la higiene, la limpieza cuidadosa, el tiempo y la temperatura en la preparación culinaria de los alimentos. (Galiano, 2005)

5. Contaminación del huevo por Salmonella. El género *Salmonella* está asociado a las aves y los huevos, siendo estos los principales vehículos de su distribución e infección en el hombre. Al estar en el tracto gastrointestinal de las aves principalmente en el buche y ciego su diseminación es fecal-oral. Según la clasificación de *Salmonella* los géneros *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* pueden infectar el tracto reproductor de la gallina ponedora y así se transmiten verticalmente al huevo al colonizar los tejidos del ovario y oviducto de la gallina, la contaminación del huevo puede producirse por tres vías:

- **Transovárica:** Contaminación, poco frecuente, de la yema por microorganismos que se encuentran en el ovario de la gallina. Se produce en el proceso de formación.
- **Oviductal:** Contaminación de la membrana vitelina y/o albumen durante su paso por el oviducto. Esta vía es la más relevante en la contaminación por *S. enteritidis*.
- **Transcascárida:** Contaminación posterior a la puesta, cuya causa suele ser ambiental. Es la forma más habitual de contaminación del huevo.

El huevo al momento de la postura generalmente es estéril o posee pocos microorganismos, la cáscara del huevo a la altura del útero es esponjosa y muy porosa, y al salir al exterior y como consecuencia del cambio de presión y de temperatura, permite la succión de bacterias presentes en la cloaca, en la cama de las aves o durante la manipulación en la clasificación y almacenamiento, aquellos huevos que durante este proceso presenten fisuras, o se encuentren rotos pueden ser fuente de contaminación para el resto de los huevos que se encuentren en buenas condiciones. (Carrillo *et al.* 2007.)

Sin embargo *S. aureus* puede sobrevivir al agua de lavado y llegar al interior del huevo a través de los poros de la cáscara hasta a la membrana interna, crecer sobre la membrana y alcanzar la clara o la yema, contaminando todo el interior del huevo. (Carrillo *et al.* 2007.)

Factores que pueden incidir en la contaminación del huevo:

- Extrínsecos: contaminación de la cáscara, las condiciones de almacenamiento (humedad y temperatura) y manipulación.
- Intrínsecos: pH, nutrientes y calidad del huevo.

Se debe tomar en cuenta que el calor acelera la actividad de las enzimas y puede alterar los huevos; la humedad permite el desarrollo del moho tanto en el interior como en el exterior de los huevos, y la consecuente aparición de olores anormales. (Carrillo *et al.* 2007.)

La luz y el oxígeno disminuyen la resistencia de las cáscaras a la penetración de las bacterias. El envejecimiento fluidifica la clara, que deja de soportar y proteger a la yema, que por adherencia a la cáscara no tarda en contaminarse. El almacenamiento a la temperatura de refrigeración no evita totalmente la alteración. (Carrillo *et al.* 2007.)

Mónica Jára *et al.*, (2009). Realizó un estudio de prevalencia de Salmonella en huevos del bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) para producción interna. Se analizaron 900 unidades de huevo en un periodo de 10 semanas, correspondientes a 45 muestras de 20 unidades cada una. Ambas metodologías mostraron que los huevos producidos por el Bioterio están libres de Salmonella spp. Este resultado puede ser atribuido a las buenas prácticas de producción avícola empleadas en el Bioterio Chena. Este estudio no consideró la cáscara y los resultados negativos sugieren la ausencia de contaminación transovárica.

María Sánchez, (2013). Llevó a cabo un estudio de para la determinación de la prevalencia de enterobacterias del género salmonella spp. en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia de Tungurahua. En total, se seleccionaron 450 huevos de gallina, distribuidas en 150 muestras procedentes de 50 granjas avícolas. Del total de las muestras que fueron procesadas y analizadas, se encontró una prevalencia de Salmonella Enteritidis de 0.0133% (2/150). Estas muestras fueron confirmadas por pruebas bioquímicas y serotipificación. En conclusión, se puede evidenciar que la salmonelosis está presente en el área de estudio.

Diana Rincón *et al* (2001). Hizo un estudio de la transmisión de salmonella entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. Concluyendo que la propagación mundial de casos de intoxicación alimentaria y su efecto combinado con la desnutrición principalmente en países en desarrollo, así como el incremento global de Salmonella Enteritidis hacen imperativo realizar estudios de caracterización epidemiológica, de control y prevención de esta enfermedad, en áreas de control primario como la industria avícola y en la distribución y comercialización de alimentos como el pollo, huevo o alimentos preparados con este último, todo esto apuntando a garantizar la salud pública.

Siendo la *Salmonella* spp. una bacteria de riesgo para la salud pública es importante determinar su presencia en los alimentos y reducir así el riesgo de enfermedades. El huevo es un alimento que puede presentar contaminación con dicha bacteria por lo que estudios que determinen su presencia ayudan a reducir los riesgos de enfermedades y establecer métodos que ayuden a reducir la contaminación desde la producción.

6. Identificación de Salmonella. El diagnóstico incluye aislamiento, identificación bioquímica y serotipificación de las cepas aisladas. Al tratarse de una enterobacteria, su aislamiento no es tan sencillo y la metodología dependerá del tipo de muestra. (Stanchi.2007)

a. Metodología para la identificación clásica: A continuación se presenta el Cuadro 1 en el cual se describen el medio de cultivo, el grado de selectividad y el aspecto de las colonias.

Cuadro 1 Medios de cultivo para distinguir especies de Salmonella

Medio de cultivo	Grado de selectividad	Aspecto de las colonias
Agar BPLS (agar verde brillante, rojo de fenol, lactosa y sacarosa)	Baja	Rosas
Agar EMB (agar eosina, lactosa, azul de metileno)	Baja	Incoloras
Agar MC (agar Mac Conkey)	Baja	Incoloras
Agar DCLS (agar desoxicolato, citrato, lactosa, sucrosa)	Baja	Incoloras
Agar para <i>Salmonella</i> (según Onoz) (agar lactosa, sacarosa, tiosulfato, citrato férrico, sales biliares, verde brillante y rojo neutro)	Mediana	Amarillas con centro negro, medio de cultivo periférico a la colonia de color amarillo
Agar BGA (agar verde brillante)	Alta	Rosadas, blancas o transparentes sobre fondo rojo
Agar bismuto-sulfito (según Wilson-Baird)	Alta	Borde claro y centro negro, con precipitado periférico negro con brillo metálico rojo de conejo o de pescado.
Agar HK (agar Hektoem)	Alta	Verde-azuladas, centro negro.
Agar SS (agar <i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i>)	Alta	Incoloras con centro negro
Agar XLD (agar xilosa, lisina, desoxicolato)	Alta	Rojas con centro negro
Caldo RVS (caldo peptona soja de Rappaport y Vassiliadis)	Muy alta	

Fuente: (Stanchi, 2007)

b. Pruebas bioquímicas para la identificación de Salmonella. Existen diferentes pruebas bioquímicas que se utilizan para la identificación de Salmonella, en el Cuadro 2 se describen las principales pruebas.

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas para identificación de Salmonella

Pruebas bioquímicas	<i>Salmonella entérica</i>						S. Bongori (V)
	Subsp entérica (I)	Subsp salamar (II)	Subsp arizonae (III a)	Subsp diarizonae (III b)	Subsp houtenae (IV)	Subsp indica (VI)	
Lactosa	-	-	-(75%)	+ (75%)	-	V	-
H,S	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
KCN	-	-	-	-	+	-	+
ONPG	-	-	+	+	-	V	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	V	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
L(-) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-

Fuente: (Stanchi, 2007)

c. Identificación Serológica: *Salmonella* posee antígenos somáticos O (lipopolisacáridos) y flagelares H (proteicos) algunas serovares poseen también un antígeno denominado Vi, o antígeno de envoltura o capsular. Cuando el microorganismo encuentra aislamientos bacterianos que bioquímicamente se corresponden con especies de salmonellas, la ratificación del diagnóstico se realiza por medio de suero policlonales que contienen anticuerpos contra la mayor parte de los subgrupos de este microorganismo. Luego se remiten repiques a laboratorio o centros de referencia, en donde se lleva a cabo la identificación serotípica sobre la base de reacciones de determinantes H y O. por último, hay que tener en cuenta que el informe de los resultados de identificación de salmonellas por serotipificación se redacta de la siguiente manera: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium (antiguamente se incluía la especie; por ejemplo: *Salmonella* Enteritidis serotipo enteritidis, *Salmonella* Enteritidis serotipo typhimurium seguida de su fórmula antigénica. (Stanchi.2007)

d. Identificación por PCR: La reacción en cadena de la polimerasa PCR son las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction, técnica creada por Dr. Kary Mullis a principios de la década del 80. La técnica consiste en obtener millones de copias de ADN a partir de una poca cantidad de ADN que se desea investigar. Para la realización de la técnica es necesario la mezcla de las muestras de ADN extraídas de lo que se quiere investigar ya sea: sangre, suero, biopsias, etc. además de los marcadores patrones, controles negativos y positivos y por último los reactivos necesarios para la síntesis de ADN (cebadores específicos, polimerasa termorresistente y los cuatro desoxirribunocleóticos); todo ello es colocado en un aparato llamado Termociclador que permite someter a las muestras de ADN a calentamiento y enfriamiento a distintas temperaturas, varias veces (ciclos), cada ciclo conlleva reacciones (etapas) de desnaturalización del ADN, alineación de cebadores y síntesis de ADN, cada una a distintas temperaturas. Todo este proceso permite hacer ADN *in vitro*, de forma similar a como las células lo hacen *in vivo*. (Vélez. 2008)

Las etapas de cada ciclo de PCR se dividen en tres pasos:

- Desnaturalización del ADN, para ellos la muestra se calienta a altas temperaturas (90-96°C) durante varios minutos para que las hebras de ADN se separen en tiras simples, una que va en sentido 3'-5' y otra en 5'-3'.
- Una vez separadas las hebras de ADN, la temperatura se baja 50-65°C, por unos minutos, esto permite que los cebadores se separen (alineen) a las secuencias de ADN que les son complementarias. Para esto es necesario el conocimiento previo del gen (secuencia de ADN) de interés y de las secuencias que lo flanquean para que los cebadores sean complementarios a estas y se apareen siguiendo la regla de apareamiento de bases.
- Luego la temperatura vuelve a elevarse (72°C) durante unos minutos, para que la polimerasa se una al sitio donde están los cebadores y los extienda, es decir que, a partir del extremo 3' de los cebadores, empiece a sintetizar una nueva tira de ADN por cada una de las hebras que se separaron.

Al finalizar el ciclo se tienen dos copias de ADN de interés. Después de este primer ciclo, se empieza otro ciclo de cada uno de los tres pasos anteriores, al final del cual se tienen cuatro copias de ADN. Cada ciclo proporciona el doble de ADN que el anterior, por lo que el tercer ciclo proporciona 8 copias, el cuarto 16, el quinto 32 y así sucesivamente. Los ciclos se repiten según el protocolo establecido (entre 35 a 40 veces) para obtener suficiente cantidad de las secuencias de ADN de interés. (Vélez. 2008)

Ángela Lluque, *et al*, (2010). Hizo un estudio de comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Escherichia Coli* enteropatógena (EPEC), concluyendo que la mayoría de las cepas clasificadas como EPEC por serología no presentan el gen *eaeA* característico de las EPEC por PCR, es decir hay falsos positivos. Por otro lado, los serotipos clásicos de EPEC pueden también corresponder a otros patotipos de las *E. coli* diarrogénicas, es decir la serología de EPEC no es específica. Por lo tanto, el método de elección debe ser el uso del PCR.

José Gonzalez, *et al*, (2010). Llevó a cabo un estudio para el aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección, donde concluye que los costos para la detección molecular de *Salmonella* spp. son elevados en comparación con los métodos tradicionales, pero la alta sensibilidad y alta especificidad que ofrece la PCR, los beneficios al sector salud al lograr un diagnóstico rápido y preciso, la relación costo beneficio que otorga al sector productivo permitiendo la liberación de productos alimenticios al mercado con mayor rapidez y el ahorro de costos, justifican la implementación de esta técnica.

Edna Yáñez *et al*, (2008). Desarrolló un estudio de Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba, donde concluye que los resultados son promisorios para la implementación de la técnica molecular PCR-TR como una valiosa alternativa para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos, por su especificidad y rapidez, sobre todo a la hora distribuir productos inocuos para el mercado consumidor.

Al evaluar los estudios realizados para la detección de *Salmonella* spp con las diferentes técnicas, se determina que el uso de PCR es un método de alta sensibilidad y especificad, además de ser un método de detección rápido para determinar la presencia de *Salmonella* spp en los alimentos, por ello en este estudio se utilizó la técnica de PCR para la determinación de *Salmonella* spp. en huevo en cáscara para el consumo humano.

III. METODOLOGÍA

A. Determinación de número de muestras

Las 10 granjas productoras autorizadas en el departamento de Guatemala, representan un 39% de la producción de huevo a nivel nacional. Para la determinación de número de muestras se tomó como referencia el plan de muestreo de la Comunidad Europea (niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE y Decisión 97/747/CE) en donde indica que por cada 1,000 toneladas anuales producidas de huevo se debe tomar una muestra, con un mínimo de 200 muestras anuales. Para ello se verificó la base del MAGA de la producción Nacional de huevo en el año 2016 la cual fue 146,000 toneladas; al dividir la producción entre lo que indica la referencia de la comunidad europea, da el número de muestras a tomar, es decir 146 unidades. Al ser un mínimo de 200 muestras, se tomaron 30 huevos (1 cartón) por cada empresa, con un total de 300 huevos como muestra total.

1. Fórmula

$$\text{No. muestra} = 1 * 1,000 \text{ toneladas}$$

(Mínimo de 200 muestras)

2. Cálculo de muestra

$$\text{No. muestra} = 146,000 \text{ toneladas} / 1,000 = 146 \text{ huevos}$$

Se tomaron por arriba del mínimo de muestras= **300 huevos**

B. Materiales

- ✓ Huevos en cáscara
- ✓ Separadores de cartón
- ✓ Boleta "toma de muestras"
- ✓ Kit BAX® Salmonella
- ✓ Aparato de PCR
- ✓ Lapicero
- ✓ Automóvil

C. Muestreo de huevos

1. Toma de la muestra. Para la obtención de la muestra, se visitaron 10 granjas productoras de huevo para consumo humano autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación MAGA, entre el 21 al 28 de noviembre del 2017, donde se tomaron 30 muestra por granja de forma aleatoria

en las salas de clasificación, las muestras estuvieron compuesta por 10 huevos medianos, 10 huevos grandes y 10 huevos extra grandes que comprenden los tamaños que más se comercializan. Los diferentes tamaños de huevo hicieron que la muestra sea representativa de las granjas y contenga huevos de las diferentes edades de las gallinas de postura comercial. Para poder ingresar a las granjas se cumplió con todos los controles de bioseguridad que las granjas deben tener en sus políticas internas y supervisadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.

2. Identificación de la muestra. Las muestras se colocaron en separadores de cartón nuevo, identificando a cada granja por medio de un código, para la identificación se llenó la boleta de toma de muestra. (ver anexo 2).

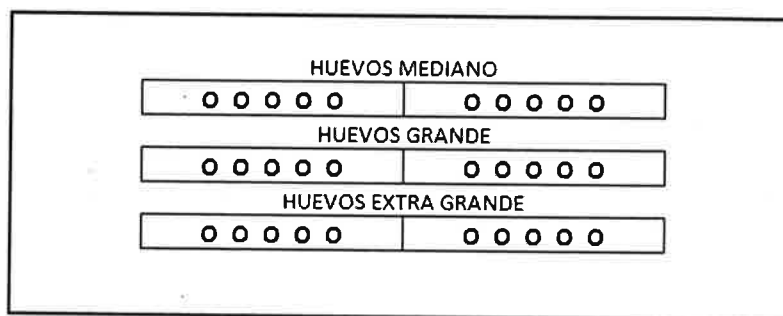
3. Transporte de la muestra. Todas las muestras se transportaron vía terrestre a temperatura ambiente al laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala UVG, evitando contacto con el sol, polvo y agua para que la muestra no se contamine.

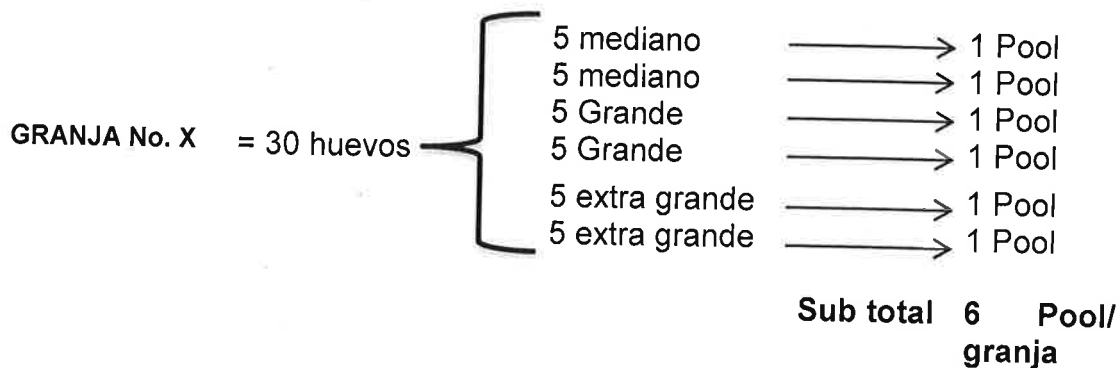
4. Análisis de la muestra

a. Muestras compuestas. En estudios anteriores se evaluaron muestras compuestas logrando reducir los costos y el tiempo del diagnóstico, en este estudio se realizó de la misma forma muestras compuestas (pools), que consiste en homogenizar 5 huevos del mismo tamaño y de la misma granja logrando reducir costos y tiempo para realizar el diagnóstico, en caso contrario el costo sería demasiado alto al tratar de realizar el diagnóstico por cada huevo de cada granja. El total será de 60 pool por las 10 granjas, como se describe a continuación:

CARTÓN DE 30 HUEVOS

Pools de 5 huevos formados del mismo tamaño





TOTAL= 10 granjas * 6 pool = 60 POOL

b. PCR (Reacción en cadena de polimerasa). Para determinar la presencia de *Salmonella spp.* en los pools de huevo, se utilizó técnica de PCR en tiempo real, se utilizó el método BAX® *Salmonella*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante y las guías de laboratorio USDA, MLG 4C.07 y USDA MLG 4.09. (ver anexo No. 4).

c. Análisis Estadísticos. Para los resultados de la investigación del muestreo, se realizó un análisis estadístico a nivel descriptivo de los datos obtenidos.

d. Control. En la técnica de PCR en tiempo real, se utilizó el control positivo de la bacteria *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*. (ATCC® 14028™). (ver anexo 5).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Identificación de granjas autorizadas

El objetivo de trabajar con granjas autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación es que si se encontraba alguna muestra positiva son *Salmonella spp.*, se pudiera identificar la granja y la galera de donde proviene el huevo, poder determinar la trazabilidad del producto con el fin de realizar las acciones correctivas para controlar la contaminación. El muestreo no se realizó en puntos de venta, porque los vendedores no tienen trazabilidad del producto, por tanto sería ineficiente al momento de encontrar algún positivo y solo se podría reportar el hallazgo sin poder desarrollar acciones correctivas para el problema. Para poder identificar las granjas autorizadas por la Dirección de Inocuidad de VISAR-MAGA, se verificó la base de datos del sistema integrado de inocuidad alimentos (SIIA-WEB), logrando obtener información sobre las granjas autorizadas para coordinar las visitas y toma de muestras.

Algunos antecedentes del sistema integrado de inocuidad alimentos (SIIA-WEB) se resumen en que anteriormente la información de los registros de importación, exportación, certificados, licencias de funcionamiento y de transporte de alimentos, se llevaba en forma manual, lo cual originaba descontrol y duplicidad de documentos, existía falta de manejo cronológico y ordenado de los procesos. Además inoperancia de un Sistema de Información de Inocuidad, lo que generaba que la información no estuviera integrada y su búsqueda tanto electrónica como física fuera lenta.

Por estos motivos se implementó el sistema de inocuidad, para que pueda cumplir con los siguientes objetivos:

- Proporcionar a los departamentos del componente cárnicos, componente leche, componente huevo, componente apícola, componente vegetales y el componente hidrobiológicos, que conforman la Dirección de Inocuidad de los Alimentos; la información necesaria para controlar sus actividades.
- Utilizar la Información como un recurso operativo que debe ser gestionado y controlado, para que sea más efectivo.
- Presentar informes de una manera rápida y eficiente, con información actualizada al día y hora de los procesos generados.
- Que el sistema facilite la emisión de reportes de las distintas transacciones que se realizan en la Dirección de Inocuidad de los Alimentos, así como la cantidad de Importaciones y exportaciones que se llevan a cabo de otros países.

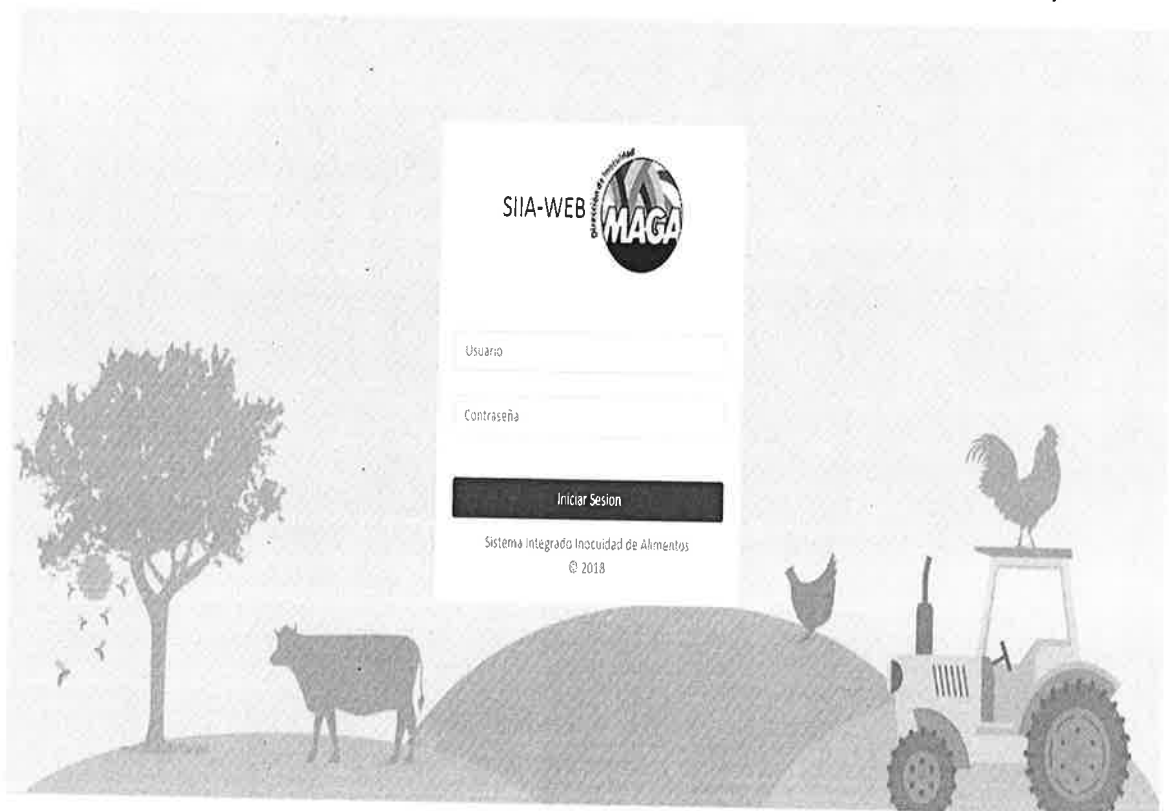
Luego de seis meses de reuniones de planificación, se acordó la creación de un Sistema Integrado de la Dirección de Inocuidad, la cual dio inicio con el apoyo de empresas de informática externas, en el mes de abril

del año 2012, sistema que ha sido sujeto a modificaciones y actualizaciones de acuerdo a las necesidades que se van adoptando.

Las actualizaciones realizadas al sistema de inocuidad son:

- 10.1.9.69 Programa Inicial el cual fue creado a través del Programa MySQL
- 10.1.9.69/sii la primera actualización, en la cual se incluyó el Módulo de Monitoreo y se realizaron algunas correcciones dentro de la Base de Datos y fue montado en una Nueva Plataforma.
- Actualmente el Sistema de Inocuidad sufrió una modificación de Nuevo Catálogo de Inspecciones, Módulo de Laboratorio, en el cual se podrán tener registrada los análisis de las muestras de cada uno de los componentes como Apícola, Huevo, Hidrobiológicos, Cárnicos y Vegetales que se realizan a través de distintos métodos de laboratorio, los productos que son muestreados para su análisis. 10.1.0.211/sii . La última actualización del sistema está montado en un Servidor Virtual para mayor seguridad informático (SIAA-WEB).

Figura 1. Sistema Integrado Inocuidad Alimentos (SIIA-WEB)



La base de datos de la dirección de inocuidad de VISAR-MAGA, se actualiza a diario, registrando granjas nuevas dedicadas a la comercialización de huevo que cumplen con los requisitos de inocuidad de alimentos, actualizaciones

de granjas registradas, acciones correctivas encontradas durante las visitas en temas de manipulación del huevo, para tener control del producto que este destinado a la venta para consumo humano.

B. Visita a granjas

Se programó la toma de muestras a las 10 granjas autorizadas, durante las fechas del 21 al 28 de noviembre del 2017, al llegar a cada granja se visitó el área de la clasificadora donde se procedió a realizar la toma de muestras. Antes del ingreso a las granjas se debe pasar por un sistema de bioseguridad, que incluye desinfección de los vehículos y baño del personal que ingreso a las instalaciones como medida de prevención para evitar el ingreso de plagas y bacterias que puedan afectar a los animales y al huevo.

C. Muestreo

Las muestras de cada granja se colocaron en un separador de cartón, 10 huevos medianos, 10 huevos grandes y 10 huevos extra grandes, con un total de 30 muestras por cada granja, que comprenden los tamaños que más se comercializan. Los diferentes tamaños de huevo hicieron que la muestra sea representativa de las granjas y contenga huevos de las diferentes edades de las gallinas de postura comercial. Luego se codificaron y se identificaron para ser transportadas, protegiéndolas del sol y polvo al laboratorio de la Universidad del Valle de Guatemala UVG. Todas las muestras fueron codificadas con la finalidad de evitar interferencia de resultados durante toda su manipulación y lograr obtener resultados confiables. La codificación de muestras se presenta en el Cuadro No. 03

Cuadro 3. Codificación de granjas

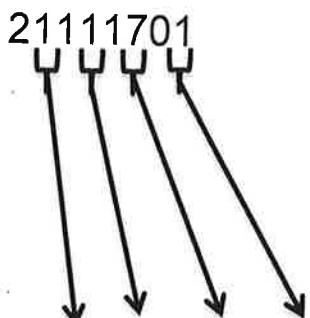
No. de granja	Código
1	DIA-HC-21111701
2	DIA-HC-21111702
3	DIA-HC-22111703
4	DIA-HC-22111704
5	DIA-HC-22111705
6	DIA-HC-23111706
7	DIA-HC-24111707
8	DIA-HC-24111708
9	DIA-HC-27111709
10	DIA-HC-28111710

Significado del Código:

DIA: Dirección Inocuidad Alimentos

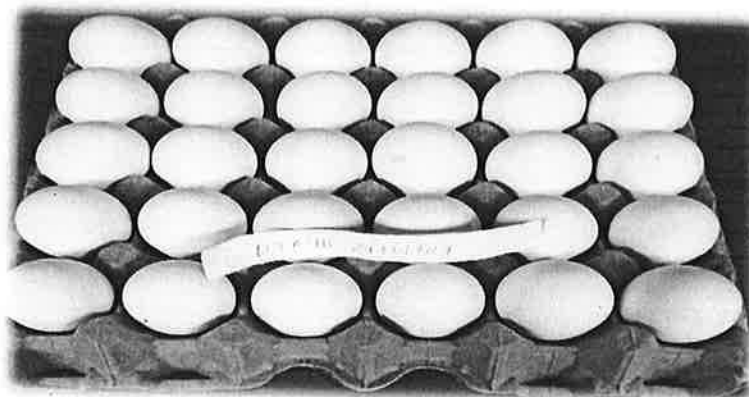
HC: Componente huevo

Ejemplo de números: 21111701



Fecha toma de la muestra día mes año correlativo

Figura 2. Muestra compuesta de 10 huevos medianos, 10 huevos grandes y 10 huevos extra grandes

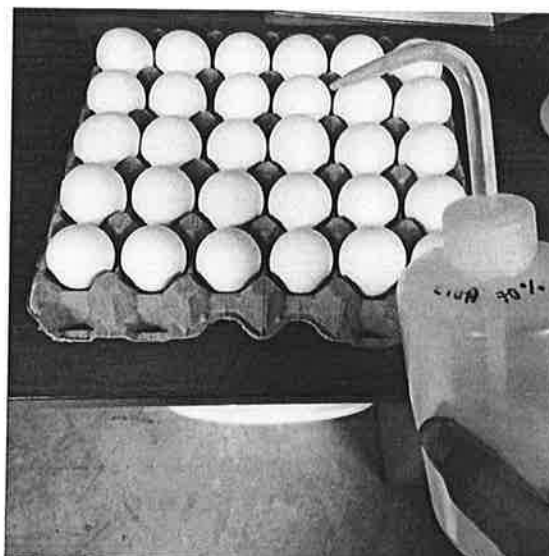


Luego de ingresar a la granja y pasar por el sistema de bioseguridad, fue obligatorio pasar por un filtro sanitario, que consiste en lavado y desinfección de manos, colocarse una redecilla y cubre boca para poder ingresar al área de clasificación de huevo, también se tuvo que cumplir con las buenas prácticas de manufactura (BPM) durante la estadía en la clasificadora, para mantener los sistemas de inocuidad que por ley el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación por medio de la Dirección de Inocuidad controla y regula en cada granja autorizada.

D. Manejo de la muestra en el laboratorio

1. Desinfección de la muestra. Todas las muestras se desinfectaron en la parte del cascarón para evitar contaminación al momento de realizar los pools, se aplicó etanol al 70% y se limpiaron con toallas de papel de forma individual.

Figura 3. Desinfección de la muestra con etanol al 70%



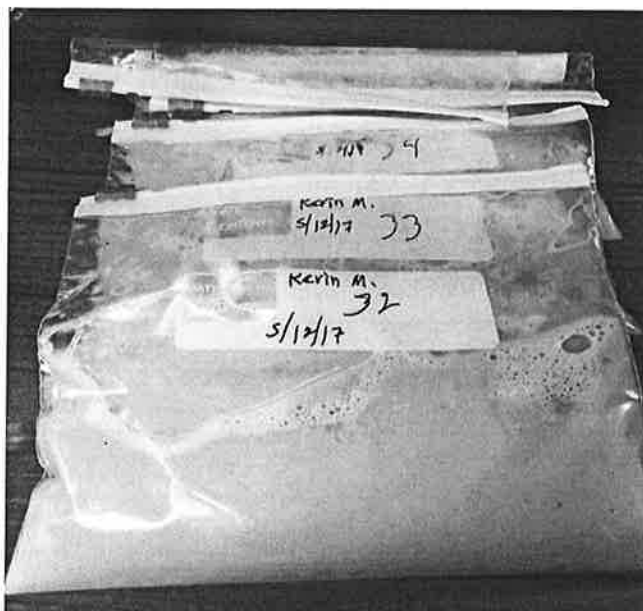
El etanol es efectivo para matar microorganismos, como las bacterias, los hongos y los virus. La FDA calificó al etanol como una sustancia generalmente reconocida como segura (Generally Recognized as Safe, GRAS). Dado que el etanol es una forma muy pura del alcohol, su consumo y uso en alimentos están regulados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EE. UU. su uso se encuentra determinada en la Guía de laboratorio MLG 4.09, 2017 que se utilizó de referencia para este estudio.

2. Preparación de pools. Para realizar los pools en el laboratorio, se utilizó la campana de flujo laminar para trabajar en ambiente libre de contaminación microbiológica, los pools estaban compuestos por 5 huevos del mismo tamaño de la misma granja, se colocaron en una bolsa estéril identificada con nombre de la muestra y fecha, se conformaron 6 pools por cada granja con un total de 60 pools de las 10 granjas como se muestra en el Cuadro No. 4

Cuadro 4. POOLS o muestras compuestas

No. de granja	Código	POOLS
1	DIA-HC-21111701	01 al 06
2	DIA-HC-21111702	07 al 12
3	DIA-HC-22111703	13 al 18
4	DIA-HC-22111704	19 al 24
5	DIA-HC-22111705	25 al 30
6	DIA-HC-23111706	31 al 36
7	DIA-HC-24111707	37 al 42
8	DIA-HC-24111708	43 al 48
9	DIA-HC-27111709	49 al 54
10	DIA-HC-28111710	55 al 60

Figura 4. Pools de huevo



El uso de pools en el laboratorio logró reducir el número total de muestras, en un principio era de 300 muestras, luego de utilizar la metodología de pools se redujo a 60 muestra, para el análisis de las muestras se utilizaron menos recursos en el laboratorio, menor tiempo para la preparación y diagnósticos de las muestras.

3. Enriquecimiento de la muestra. Como medio de enriquecimiento se utilizó agua peptona tamponada a una solución de 2.5 gramos de peptona por cada litro de agua destilada. En bolsas estériles se agregó 25 ml de muestra compuesta (pools) con 225 ml de agua peptonada tamponada y se agitaron para lograr la homogenización. Por último se dejó incubando a una temperatura de 35°C por 24 horas.

Cuadro 5. Enriquecimiento de la muestra

Producto	Preparación de la muestra		Incubación
	Tamaño	Enriquecimiento	
Huevo líquido	25 ± 2.5 g	225 ± 4.5 ml BPW	35°C por 20-24 h

Fuente: Guía de laboratorio MLG 4.09, 2017

Figura 5. Pesaje de peptona

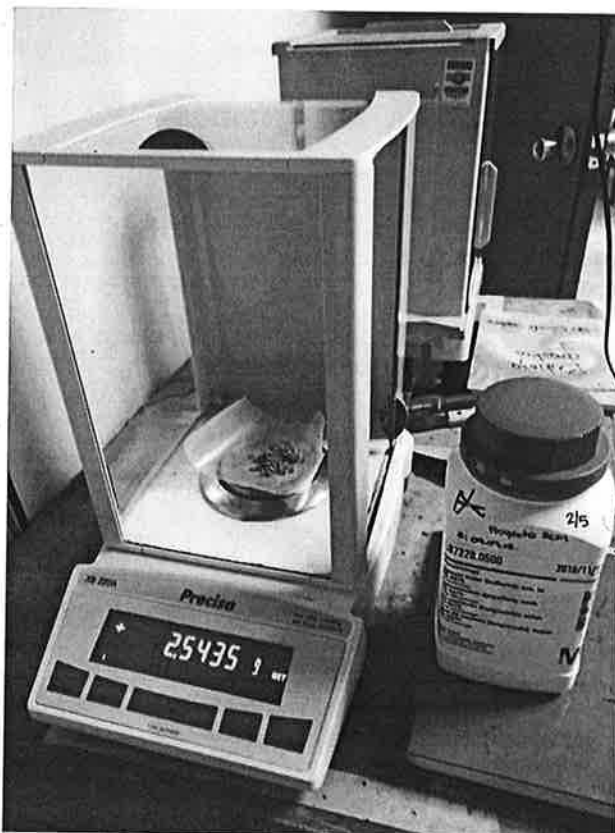
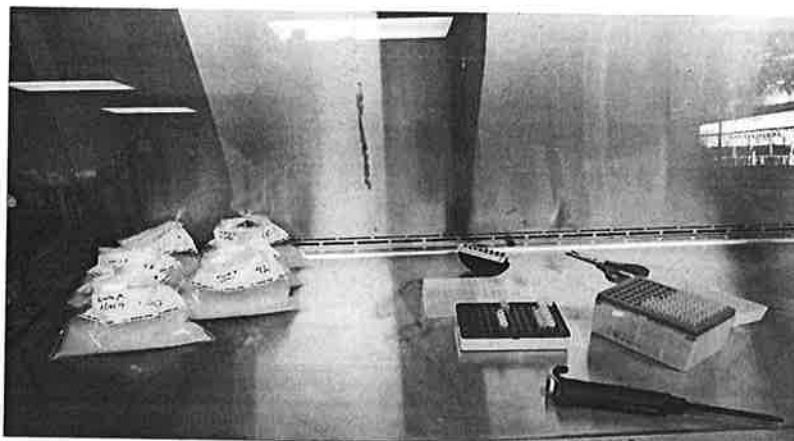


Figura 6. Solución de peptona con agua destilada



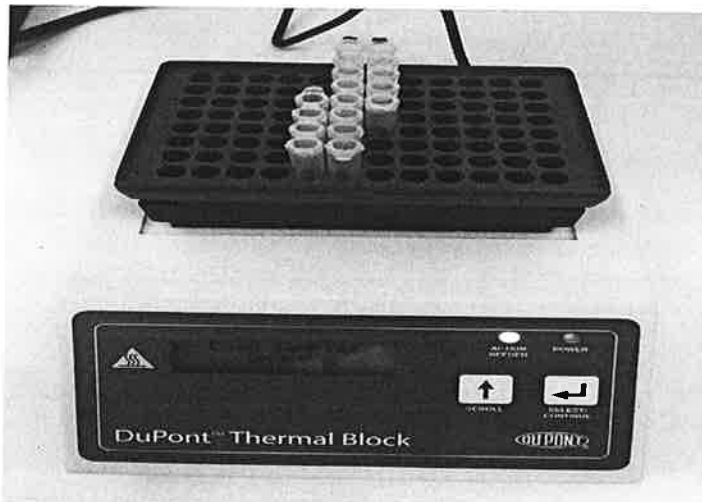
4. Preparación de LISIS. Se utilizaron 12 mL de buffer de lisis más 150 μ L de proteasa, se mezclaron suavemente en forma de 8 para evitar la producción de espuma. Luego se dosificó en volúmenes de 200 μ L por tubo. Se colocaron 5 μ L de las muestras compuestas (pools) luego de la incubación, a los tubos de lisis que contenían 200 μ L de buffer de lisis. Se colocaron los tubos a la placa calefactora programada para 20 minutos a 37°C, 10 minutos a 95 °C y 5 minutos a 4°C en rack de enfriamiento. Esta etapa es de suma importancia debido a que el ADN de la muestra se combina con ADN polimerasa, nucleótidos y partidores específicos. Esta mezcla es sometida a una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento. Al calentar se desnatura el ADN por consiguiente la doble hebra de ADN se abre, luego al enfriar, los partidores que son fragmento de ADN específicos para Salmonella, reconocen la zona de enlace, luego la enzima usa los nucleótidos extendiendo la nuevas hebras de ADN y así sucesivamente hasta lograr en corto tiempo, crear millones de copia del ADN buscado, si es que este se encuentra presente en la muestra.

Figura 7. Preparación de lisis



Los controles que se utilizaron en esta etapa fue la utilización de la campana de flujo laminar para trabajar en un ambiente libre de microorganismos, la sanitización de superficies de trabajo, herramientas de trabajo, micropipetas y repetidor, utilizando papel absorbente humedecido con las soluciones de: etanol 70% y agua destilada. Para el Rack de calentamiento fue importante la etapa de precalentamiento para poder monitorear que llegará a 37°C antes de colocar los tubos con las muestras para poder iniciar con la lisis.

Figura 8. Placa calefactora



5. PCR (Reacción en cadena de polimerasa). Una vez terminada la lisis se encendió el termociclador para precalentar. Con pipeta multicanal se introdujeron 50 μ L del lisado a los tubos que contienen las pastillas de reacción, por último se colocaron las tapas ópticas y se llevaron las muestras hasta el equipo. Se colocaron dentro de la bandeja del termociclador para iniciar la reacción, esta tuvo una duración de 2 horas aproximadamente para terminar el proceso. El PCR es método automatizado para detección de microorganismos en muestras ambientales y de alimentos. Fue el primer método de screening basado en PCR, combina la tecnología de PCR con la detección por fluorescencia.

Cada vez que se produce la amplificación, el colorante fluorogénico incluido en la tableta de PCR se intercala en la doble hebra de ADN y emite una señal fluorescente. Luego en la fase de detección esta señal es medida. Durante la detección la temperatura es llevada al punto en donde las hebras de ADN se separan, liberando el colorante y bajando la señal. Este cambio en la fluorescencia es trazado contra la temperatura generando la curva de meeting, la cual es interpretada en los resultados.

Figura 9. Traslado de lisado a las pastillas de reacción de PCR

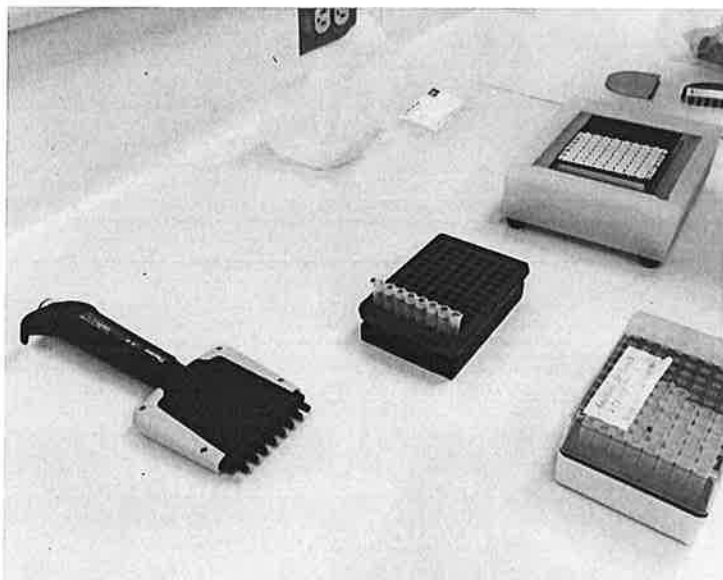


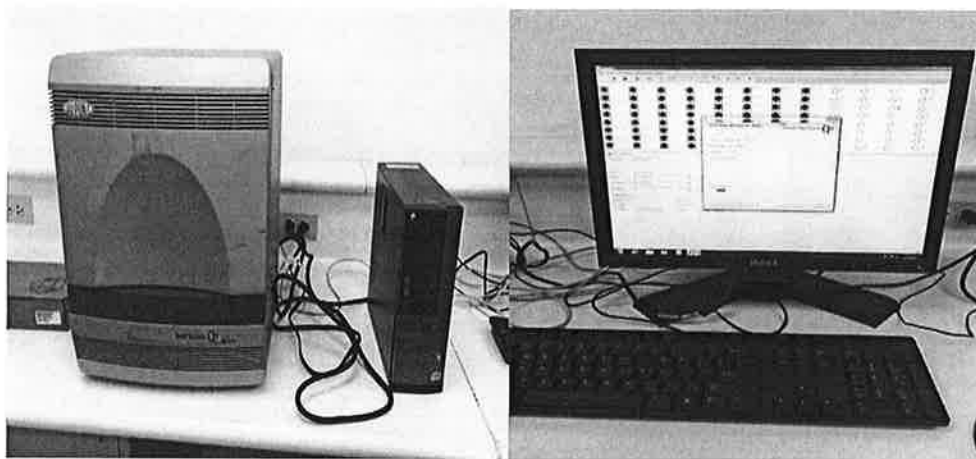
Figura 10. Colocación de muestras en bandeja de termociclador



La utilización del Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), en tiempo real es simple y fácil de utilizar, la guía de laboratorio MLG 4.09, 2017, nos lleva paso a paso sobre la metodología, con tiempo, temperatura y cantidades de muestra exactas, además el kit para este método facilita la preparación de las muestras. El rack de enfriamiento es automático para elevar y disminuir la temperatura al tiempo que la guía lo exige, y la preparación de la muestra con la pipeta multicanal facilita la repeticiones de cantidades de muestras a los tubos finales.

Todas las facilidades que ofrece este método nos asegura la eficiencia en todas las etapas de preparación de la muestra en el laboratorio y confiabilidad de los resultados, debido a que disminuye la intervención humana y realiza la reacción de forma automática e independiente.

Figura 11. Análisis de las muestras



Los resultados del laboratorio fueron negativos de los 60 pools analizados por la técnica de PCR, de las 10 granjas autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, lo que hace evidente el control que tiene la Dirección de Inocuidad del VISAR-MAGA sobre el manejo de este alimento a nivel de granjas. En el informe de resultados de laboratorio ver anexo No. 3 se observa con signo menos (-) y de fondo color verde las muestras compuestas que resultan negativas para Salmonella que fue en su totalidad en este estudio y con un signo más (+) y fondo color rojo las que resultan positivas para Salmonella (control). Un signo de interrogación indica que el resultado es indeterminado, esto ocurre cuando el control positivo interno no alcanza el nivel necesario para ser considerado válido y la cantidad de target específico no alcanza a ser detectada. Un resultado indeterminado puede ser debido a los reactivos, fallas en el sistema o error de operación.

Para el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación específicamente para la Dirección de Inocuidad de los resultados de este estudio son de suma importancia, debido a que se tomará como base científica para poder generar e implementar el Plan Nacional de Muestreo en el componente huevo. Este plan deberá incluir un control y monitoreo de la bacteria *salmonella spp*, en huevo producido de granjas autorizadas para el consumo humano. Dentro del plan se debe contemplar la metodología de la toma de muestra de las granjas, la codificación de las muestras, la utilización de muestras compuestas (pools) y el uso del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en ingles) en tiempo real.

La finalidad de implementar un plan oficial de muestreo, es generar historial microbiológico del control y verificación de las granjas autorizadas sobre este tipo de bacterias, para que en un futuro se facilite la apertura de mercados internacionales sobre la comercialización de este producto. Con este trabajo se tiene información inicial sobre las granjas que el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación autoriza para poder comercializar huevo para consumo humano, demostrando que cumplen con los requisitos oficiales que exige la legislación, Acuerdo gubernativo 969-99 reglamento para la inocuidad de alimentos.

La Unión Europea, por su parte, contempla un programa de monitoreo de Salmonella y otros agentes zoonóticos, tomando en cuenta desde la parvada de aves vivas hasta los huevos destinados al consumo, para ser oficialmente autorizados a exportar a la UE aves vivas, huevos para incubar o de mesa, los países de fuera de la UE deben contar con programas de control equivalentes. Tales aprobaciones están sujetas a la Decisión 2007/843/CE de la Comisión. Los alimentos exportados a la UE deben cumplir unos criterios de seguridad alimentaria y ofrecer garantías equivalentes en relación con los criterios de higiene del proceso.

E. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico a nivel descriptivo de los resultados obtenidos en la investigación de las 10 granjas sujetas a estudio el 100% presento ausencia de *salmonella spp*. en huevo para consumo humano, por tanto los 60 pools presentaron resultados negativos a la bacteria de *Salmonella spp*. Dentro del estudio se agregó un control positivo externo de Salmonella para verificar el buen funcionamiento del aparato de PCR, el cual dio positivo en el informe de resultados (ver anexo No. 3, informe de resultados de laboratorio). En el Cuadro 6 se presenta el análisis estadístico descriptivo de los resultados.

Cuadro 6. Resultados del análisis estadístico descriptivo

No. de granja	Código	POOLS	Análisis	Resultado	Estadística descriptiva
1	DIA-HC-21111701	01 al 06	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
2	DIA-HC-21111702	07 al 12	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
3	DIA-HC-22111703	13 al 18	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
4	DIA-HC-22111704	19 al 24	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
5	DIA-HC-22111705	25 al 30	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
6	DIA-HC-23111706	31 al 36	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
7	DIA-HC-24111707	37 al 42	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
8	DIA-HC-24111708	43 al 48	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
9	DIA-HC-27111709	49 al 54	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%
10	DIA-HC-28111710	55 al 60	<i>Salmonella Spp.</i>	Negativo	100%

En el cuadro se puede notar que el 100% de las muestras analizadas fueron negativas a *salmonella spp.* Este resultado es de importancia para el comercio nacional por que se determina que el huevo producido en Guatemala de las granjas autorizadas por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación es inocuo y cumplen con la legislación nacional. Además nos brinda información de la situación actual del huevo para consumo humano para futuras negociaciones de aperturas de mercado internacional.

Es importante mencionar que las granjas de producción de huevo para consumo humano autorizadas por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación deben cumplir ciertos requisitos, inspecciones de seguimiento y monitoreo para lograr su autorización de la Licencia Sanitaria de Funcionamiento en dos direcciones del Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones (VISAR-MAGA), estas son:

Dirección de Sanidad Animal: por medio del Programa de Sanidad Avícola (PROSA), se realizan inspecciones para verificar el sistema de bioseguridad de la granja, que debe incluir:

- Marco de desinfección de vehículos y personas
- Baños para el ingreso del personal
- Uniformes propios de la empresa
- Programa de control de plagas
- Programa de capacitación del personal
- Programa de salud de los colaboradores

Por parte de la sanidad aviar, deben cumplir un plan de monitoreo de sangrado de aves, donde el inspector oficial visita la granja y realiza muestreos para el diagnóstico de cuatro enfermedades reguladas a nivel nacional que son:

- Influenza Aviar
- Newcastle
- Salmonelosis (*S. gallinarum* *S. pullorum*)
- Laringotraqueítis Infecciosa Aviar

Este programa se encarga del registro de las granjas avícolas, emisión de licencias de funcionamiento de ave viva, monitoreo y erradicación de enfermedades, emisión de licencias de transporte de ave viva (aves de descarte), pollito de un día y gallinaza para el comercio.

Dirección de Inocuidad: por medio del componente huevo se realizan inspecciones para determinar el estatus higiénico-sanitario de las granjas productoras de huevo para consumo humano, se verifica las instalaciones donde se manipula el huevo, desde la recepción del huevo que viene de las galeras, clasificación, empaque, almacenamiento y transporte. Dentro de los requisitos que debe cumplir son:

- Ubicación y alrededores
- Construcción e instalaciones
- Limpieza y desinfección
- Salud del personal
- Instalaciones sanitarias
- Control de plagas
- Bodegas de almacenamiento
- Manejo del producto
- Capacitación del personal
- Registros de microbiología y calidad del agua

El componente huevo tiene a su cargo verificación de los sistemas de inocuidad que incluyen las buenas prácticas de manufactura (BPM), procedimientos estándar de somatización (POES), los análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) y las empresas que tengan implementado otros sistemas internacionales de gestión como sistemas de calidad (ISO 9001) y sistemas internacionales de Inocuidad de alimentos (ISO 22000).

Para el comercio nacional de huevo es importante tener resultados de bacterias que pueden causar problemas en la salud de los consumidores y que puedan adquirir alimentos inocuos, las 10 granjas donde se tomaron muestras en este estudio, representan un 39% de la producción de huevo a nivel nacional, lo que evidencia el control y verificación de los sistemas de inocuidad que se exigen en las granjas autorizadas para vender huevo para consumo humano. Hasta el momento la producción de huevo en cáscara para consumo solo es a nivel nacional, tener una base científica e implementar el plan nacional de muestreo facilitara en un futuro poder abrir nuevos mercados.

V. CONCLUSIONES

- Se determinó ausencia de *salmonella spp*, en el 100% de las muestras analizadas de granjas autorizadas del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.
- Para el plan de muestreo se realizaron pools de 5 huevos del mismo tamaño y de la misma granja, se definieron 10 empresas autorizadas, ubicadas en el departamento de Guatemala por medio del Sistema Integrado Inocuidad Alimentos (SIIA).
- Para la Dirección de Inocuidad del Ministerio de Agricultura, Ganadería y alimentación es de suma importancia los resultados de este estudio por que se tomaran de base para implementar el plan nacional de monitoreo en huevo para consumo humano.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda extender la línea de estudio de presencia de *salmonella spp*, en huevo en cáscara destinado para consumo humano en diferentes departamentos del país, para completar la información científica a nivel nacional.
- Con base a los resultados de este estudio, que el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación implemente el Plan Nacional de Residuos Químicos y Sustancias Prohibidas en huevo.
- Realizar estudios de *salmonella spp*, en huevo en cáscara destinado para consumo humano en granjas no autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Carrillo, Leonor; Audisio, Carina. 2007. *Manual de microbiología de los alimentos*. Argentina. San salvador. 186 págs.

El sitio avícola. 2011. *Análisis del mercado mundial del huevo y ovoproductos*. <http://www.elsitioavicola.com/articles/2044/analisis-del-mercado-mundial-del-huevo-y-ovoproductos/>. Fecha de consulta 12 febrero de 2017.

Espinosa, Laura. *Guía práctica sobre técnicas de PCR*. <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/530/cap17.pdf>. Fecha de consulta 28 enero de 2017. 517-540

Espinoza, Edy; Revollo, Susana y Espada, Angélica. 2007. *Identificación de Salmonella sp mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidado (NESTED PCR) y técnicas convencionales en huevos recolectados en los principales mercados de la ciudad de la Paz*. Madrid. <http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/vc/v1n2/v01n2a03.pdf>. Fecha de consulta 13 febrero de 2017.

Food & drug administration, FDA. 2010. USA. *Comunicado de prensa de la FDA. Se retiran huevos del mercado urgentemente en todo el país*. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2010/ucm223537.htm>. Fecha consultada 20 enero de 2017.

Food & drug administration. 2016. *Seguridad con los huevos*. <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM278447.pdf>. Fecha de consulta 13 febrero de 2017.

Foodsafety.gov. *Retirada del mercado y alertas*. <https://espanol.foodsafety.gov/4n4z/retiradas>. Fecha de consulta 15 febrero de 2017.

Galiano, Lesbia. 2005. *Determinación de Salmonella sp. en la parte interna y externa de huevos de gallina procedentes de granjas reproductoras*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de ciencias químicas y farmacia. 45 Págs.

García, Francisco. 2015. *Huevo incubable: Contaminación y consecuencias*. <https://avicultura.info/huevo-incubable-contaminacion-y-consecuencias/>.

Fecha de consulta 10 febrero de 2017.

García, María. España. *Salmonelosis y huevos*. Departamento de sanidad animal, facultad de veterinaria. Universidad complutense, Madrid. <http://www.colvema.org/PDF/Salmonela.pdf>. Fecha consultada 17 enero de 2017.

García, Radamés. 2013. Manual de teoría, microbiología veterinaria II. Nicaragua.

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://repositorio.una.edu.ni/2471/1/nl70g216.pdf>. Fecha consultada 14 mayo de 2017.

Gaskin, J; Wilson, H.R; Mather, F.B y Garcia,J.C. *Enfermedades de las aves transmisibles a los humanos*. Universidad de Florida. <http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/IR/00/00/16/18/00001/AN09900.pdf>. Fecha de consulta 15 febrero de 2017.

Gil, Ángel. 2013. *Microbiología del huevo*. <https://dietalimenta.wordpress.com/2013/10/09/microbiologia-del-huevo/>.

Fecha de consulta 10 de febrero de 2017.

Greif, Gonzales. *Unidad de biología molecular, instituto Pasteur Montevideo. PCR: reacción en cadena de la polimerasa*. [http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso tb mico bacterias/reaccion en cadena polimerasa.pdf](http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso%20tb%20mico%20bacterias/reaccion%20en%20cadena%20polimerasa.pdf). Fecha de consulta 30 de enero de 2017.

González, José, *et al.* 2010. *Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección*. Colombia. <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewFile/5458/4766>.

Fecha de consulta 31 de julio de 2017.

Healthday. 2010. *La FDA encuentra roedores y acumulaciones de estiércol en las granjas involucradas en la retirada de huevos*. <https://consumer.healthday.com/vitamins-and-nutrition-information-27/food-poisoning-news-319/la-fda-encuentra-roedores-y-acumulaciones-de-esti-acute-rcol-en-las-granjas-involucradas-en-la-retirada-de-huevos-642666.html>. Fecha de consulta 11 febrero de 2017.

Instituto de nutrición e higiene de los alimentos. Revista cubana alimentaria. 2010. Determinación de Salmonella y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina.

http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali03296.htm. Fecha de consulta 06 de febrero de 2017.

Instituto de estudios del huevo. Madrid. 2009. *El gran libro del huevo*. Editorial Everest, S.A. 168 págs.

Investigación de discapacidad. 2013. *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. México. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>. Fecha consultada 25 enero de 2017.

Jarquín, et al. 2015. *Salmonella en Aves crudas en mercados minoristas en Guatemala: niveles, susceptibilidad a los antibióticos y la distribución de los serotipos*. Journal of Food Protection, vol. 78 No. 9. Página 1642-1650.

Jara, Mónica; Villarroel, Oriasis. 2009. *Estudio de prevalencia de salmonella en huevos del bioterio del Instituto de salud pública de Chile (ISP) para producción interna*. Chile. <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2013/05/Salmonella%20en%20huevos%202009.pdf>. Fecha consultada 18 julio de 2017.

K.M Dyce; W.O. Sack; C.J.G. Wensing. 2007. *Anatomía veterinaria*. 3ª edición. México. Manual moderno, S.A de C.V. 907 págs.

Loaiza, Juliana; Sánchez, Miryan; Henao, Santiago y Cardona, Castro. 2011. *Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área metropolitana*. Medellín. 28 págs.

Lluque, Ángela, et al. 2010. *Comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para Escherichia Coli enteropatogénica (EPEC)*. Perú. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292010000200003&script=sci_arttext. Fecha de consulta 22 de julio de 2017.

Menchú, Teresa y Méndez Humberto. 2011. *Análisis de la situación alimentaria en Guatemala*. Guatemala. 57 págs.

Molina, E, et al. 2007. *Cross-pooled faecal culture and individual faecal PCR for paratuberculosis herd level monitoring*. Proceedings of 9ICP – 2007. España. 98-101.

Mora, Xavi. 2016. *Salmonella: quién la vio y quién la ve*. <https://avicultura.info/salmonella-quien-la-vio-quien-la-ve/>. Fecha de consulta 11 de febrero de 2017.

M.J. Shively. 2003. *Anatomía veterinaria básica, comparativa y clínica*. México. Manual moderno, S.A. de C.V. 377 págs.

Organismo Mundial de Sanidad Animal OIE. 2008. *Manual de la OIE sobre animales terrestres. Salmonelosis* http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf. Fecha de consulta 23 de marzo de 2017.

Organización mundial de la salud, OMS. 2015. *Inocuidad de los alimentos, nota descriptiva No. 399*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>. Fecha de consulta 15 febrero de 2017.

Organización Mundial de la Salud, OMS. 2013. Ginebra. Centro de Prensa. *Salmonella (no tifoidea)*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>. Fecha consultada 15 enero de 2017.

Randall, Singer, et al. 2006. *Use of pooled samples for the detection of Salmonella in feces by polymerase chain reaction*. J Vet Diagn Invest 319-325.

Rincón, Diana, et al. 2001. *Transmisión de Salmonella entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. España*. <http://www.redalyc.org/html/3438/343835702008/>. Fecha de consulta 20 julio de 2017.

Rojas, Rafael; González, Tania. 2006. *Artículo de revisión biología molecular, Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa*. México. <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2006/bq062e.pdf>. Fecha de consulta 10 febrero 2017.

Sanchez, Maria. 2013. *Determinación de la prevalencia de la enterobacterias del genero Salmonella spp. En huevos frescos de gallinas de empresas avícolas de la provincia de Tungurahua*. Tesis Universidad de Ecuador. 59 págs.

Soria, Mario. 2012. *Presencia de Salmonella y características físicas de huevo destinados a consumo humano*. Tesis de maestría Universidad nacional de Litoral. 195 págs.

Schneides, Sheryl. 2009. FAO. *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. <http://www.fao.org/3/a-i0480s/i0480s04.pdf>. Fecha de consulta el 02 febrero de 2017.

Stanchi, Nestro 2007. *Microbiología veterinaria*. Buenos Aires, Argentina. inter-medica. págs. 572.

Uribe, Catalina; Suárez, Martha. 2006. *Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar*. Colombia. <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v37n2/v37n2a10>. Fecha de consulta 05 de febrero de 2017.

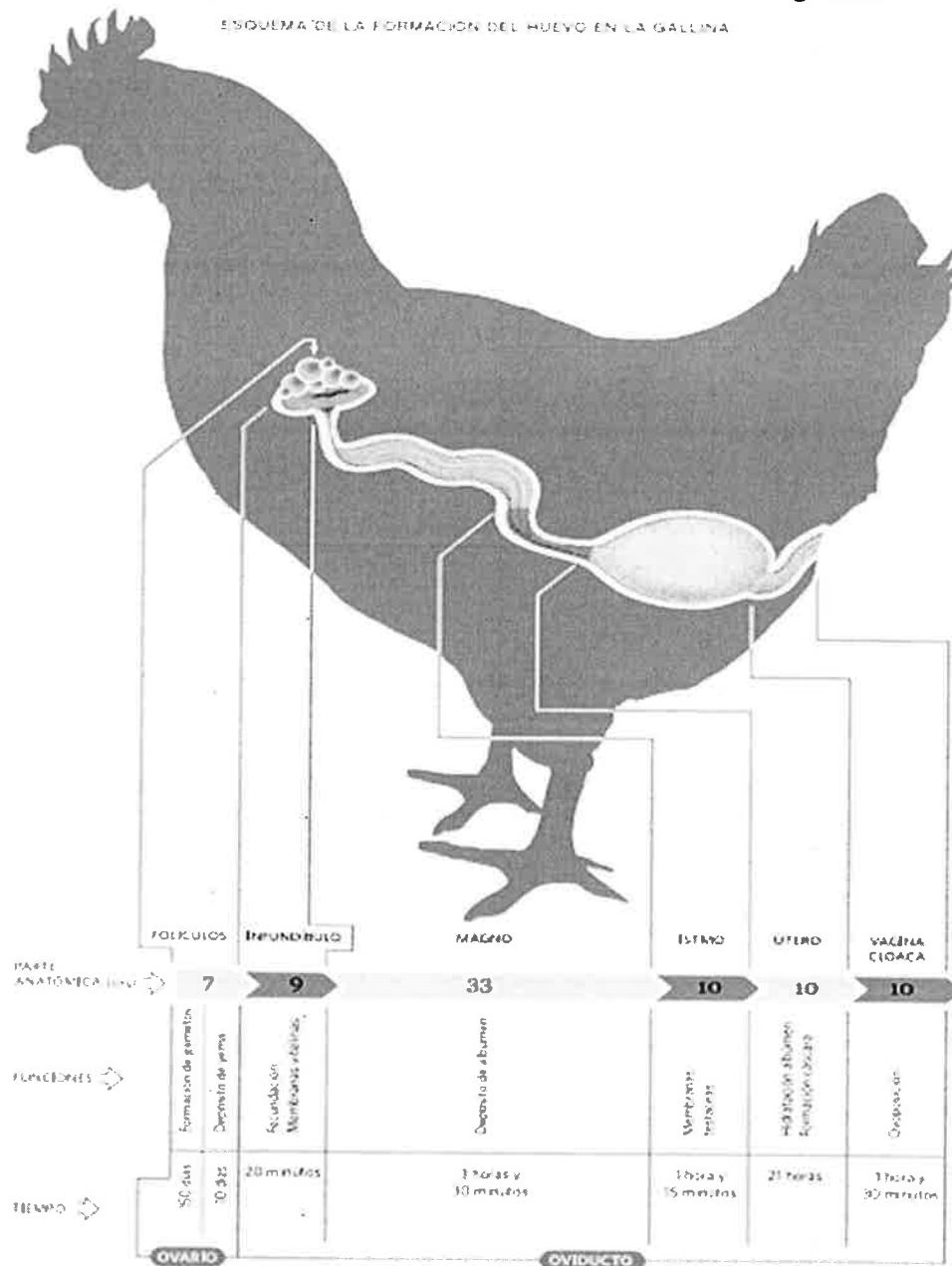
Velásquez, Elsa. 2006. *Determinación de Salmonella sp. en carne de pollo que se venden los mercados de la ciudad de Guatemala*. Tesis Universidad de san Carlos de Guatemala. 51 págs.

Vélez, Patricia. 2008. *Técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa)*. Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias médicas, inmunología y microbiología médica. 04 Págs.

Yáñez, Edna, et al. 2008. *Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba*. Asociación colombiana de infectología. Argentina. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n4/v12n4a03.pdf>. Fecha de consulta 29 de julio de 2017.

VII. APÉNDICE

Apéndice 1. Esquema de la formación del huevo en la gallina



Fuente: (Instituto de Estudios del Huevo. 2009)

Apéndice 2. Boleta de toma y envío de muestras

"Boleta de toma y envío de muestras"

Fecha de toma de muestra	
Hora de la toma de muestra	
Empresa (codigo)	
Nombre del producto	
Lugar de toma de la muestra	

Nombre del Laboratorio	
Fecha y hora de recepción de la muestra	
Nombre de la persona que recibe la muestra en el laboratorio	

Análisis solicitado

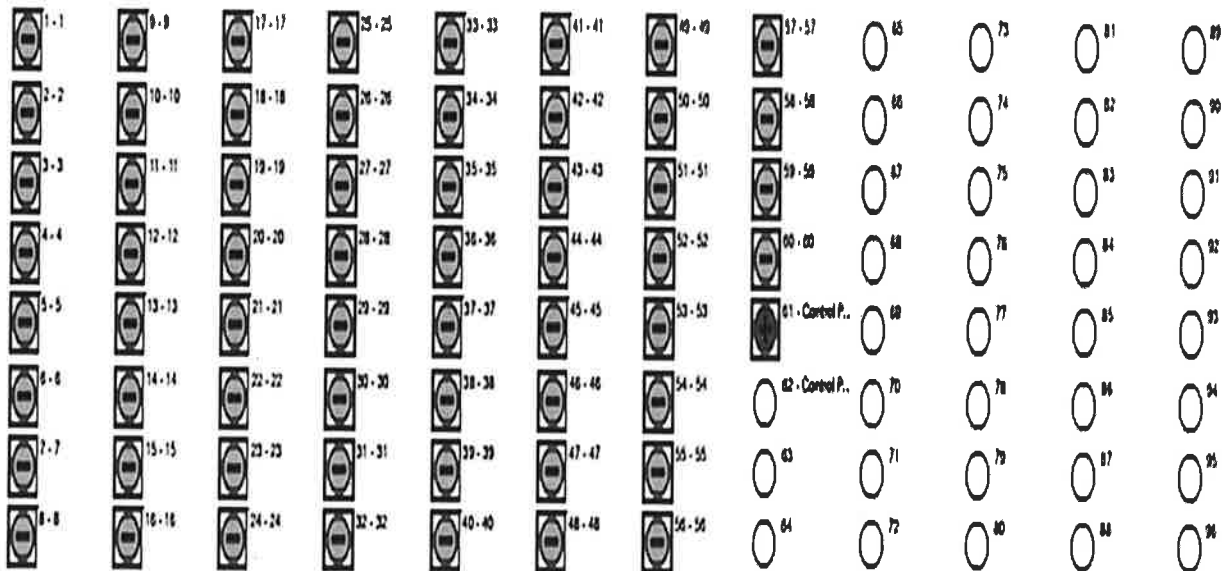
MICROBIOLOGIA	Salmonella spp	<input type="checkbox"/>
	E. Coli	<input type="checkbox"/>
	Otros	
Residuos Químicos	Antibióticos	<input type="checkbox"/>
	Otros	
OTROS		

Observaciones _____

Apéndice 3. Informe de resultados de Laboratorio

File: Salmonella en huevo Kevin Mauricio 07.12.17.

Rack Name: Tesis Huevos
 Accession: 68
 Rack Status: Rack processing completed normally.
 Rack Description:
 Operator: Kevin Mauricio
 Original Data File: Salmonella en huevo Kevin Mauricio 07.12.17
 Time of Verification: N/A
 Time of PCR Run:
 Time of Detection: 12/07/2017 18:12:36
 Time of Analysis: 12/07/2017 18:16:27, SW ver: 3.6 b6005, Analysis ver: 3.6.6005



Apéndice 4. Método USDA MLG 4C.07



United States
Department of
Agriculture

Food Safety
and Inspection
Service

Office of
Public Health
Science

Laboratory QA Staff
950 College Station Road
Athens, GA 30605

Laboratory Guidebook Notice of Change

Chapter new, revised, or archived: MLG 4C.07

Title: FSIS Procedure for the Use of a Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Screening *Salmonella* in Meat, Poultry, Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges

Effective Date: 01/02/2017

Description and purpose of change(s):

FSIS Laboratories extended this method to Ready-to-Eat (RTE) Siluriformes (fish).

The FSIS Laboratories validated a 1:4 enrichment broth to sample ratio (1 part sample in 3 parts enrichment broth) for the analysis of RTE products for the presence of *Salmonella* (MLG 4 and 4C).

The methods described in this guidebook are for use by the FSIS laboratories. FSIS does not specifically endorse any of the mentioned test products and acknowledges that equivalent products may be available for laboratory use. Method validation is necessary to demonstrate the equivalence of alternative tests as detailed in the document titled "FSIS Guidance for Evaluating Test Kit Performance" available on the FSIS website.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 4C.07	Page 1 of 4	
Title: FSIS Procedure for the Use of a Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Screening <i>Salmonella</i> in Meat, Poultry, Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges		
Revision: .07	Replaces: .06	Effective: 1/2/17

Procedure Outline

- 4C.1 Introduction
- 4C.2 Safety Precautions
- 4C.3 Quality Control Procedures
- 4C.4 Equipment, Reagents, and Media
- 4C.5 Sample Preparation and Primary Enrichment
- 4C.6 The BAX[®] System for Screening *Salmonella* Test Procedure
- 4C.7 Interpretation of Results
- 4C.8 Completion of Testing if BAX[®] Unavailable
- 4C.9 Selected References

4C.1 Introduction

This method describes the use of a commercial PCR-based screening procedure as described in MLG 4, Section 4.5 to screen test Ready-to-Eat (RTE) meat and poultry products, egg products, raw meat, carcass and environmental sponges, whole bird and parts rinses, and raw and RTE Siluriformes (fish) products for *Salmonella*. All samples identified as potentially positive for the presence of *Salmonella* by this test are subject to cultural confirmation as described in MLG 4. Unless otherwise stated all measurements cited in this method have a tolerance range of $\pm 2\%$.

4C.2 Safety Precautions

CDC guidelines for the handling of BioSafety Level 2 organisms should be followed whenever live cultures of *Salmonella* are used. The Safety Data Sheet (SDS) may be obtained from the manufacturer for the media, chemicals, reagents, and microorganisms used in the analysis. The personnel who will handle the material should read the SDS prior to startup.

4C.3 Quality Control Procedures

Use the method controls described in MLG 4 Section 4.3.1.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 4C.07	Page 2 of 4	
Title: FSIS Procedure for the Use of a Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Screening <i>Salmonella</i> in Meat, Poultry, Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges		
Revision: .07	Replaces: .06	Effective: 1/2/17

4C.4 Equipment, Reagents, and Media

In addition to equipment, reagents and media used in analysis of samples as described in MLG 4, the following materials will be needed.

- a. PCR tube holder (Qualicon)
- b. Cell lysis tube cooling block (Qualicon) held at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- c. Techne DB-2A, or equivalent, heating block set at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- d. Techne DB-2A, or equivalent, heating block set at $95 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- e. Repeating pipettor to deliver $200 \pm 20 \mu\text{l}$, and sterile tips
- f. Pipettor to deliver $5 \pm 1 \mu\text{l}$, and sterile disposable filtered tips
- g. Pipettor to deliver $150 \pm 15 \mu\text{l}$, and sterile disposable filtered tips
- h. Eight channel pipettor to deliver $50 \pm 5 \mu\text{l}$, and sterile disposable tips
- i. 12 X 75 mm Falcon 352063, or equivalent, tubes
- j. Cell lysis tubes and caps, cell lysis tube rack and box (Genemate 8 strip tubes, ISC Bioexpress, T-3120-5)
- k. Pipettor and 5 ml pipettes
- l. BAX[®] System PCR Assay for Screening *Salmonella* kit (Qualicon) held at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$

4C.5 Sample Preparation and Primary Enrichment

Sample preparation and enrichment incubation times may vary by matrix and/or program. Refer to MLG 4, Section 4.5 for additional sample preparation and enrichment details. After incubation in enrichment broth, proceed to Section 4C.6.

4C.6 The BAX[®] System for Screening *Salmonella* Test Procedure

Following incubation, perform the rapid screen using $5 \mu\text{l}$ of sample enrichment for all matrices except raw beef poultry mixes. Follow the current BAX[®] System User's Guide for preparing reagents, performing the remainder of the PCR test, and reading the results.

Following incubation of raw beef mixes containing poultry, a centrifuge step must be performed prior to BAX[®] screening:

- Dispense $200 \pm 20 \mu\text{l}$ lysis reagent to each cell lysis tube.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 4C.07	Page 3 of 4	
Title: FSIS Procedure for the Use of a Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Screening <i>Salmonella</i> in Meat, Poultry, Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges		
Revision: .07	Replaces: .06	Effective: 1/2/17

- Heat the filled lysis tubes for 20 ± 1 minute at $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Aseptically transfer 1 ml of the poultry mix enrichment sample to a sterile 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Centrifuge at a setting of 1,500 x g for 1 minute (at speed) to pellet large debris. Supernatant will still not be clear at this low speed but should no longer have large particles of meat suspended.
- Transfer the supernatant to a new sterile 1.5 ml microcentrifuge tube. It is essential to ensure that none of the pelleted debris is carried over with the supernatant.
- Centrifuge supernatant at 10,000 x g for 5 minutes.
- Discard the supernatant from the centrifuge tube, leaving a little of the supernatant if necessary so the pellet is not disturbed during this step.
- Suspend the pellet in 100 μl of PCR grade water either by vortexing or using the pipet tip.
- Add 5 μl of the suspension directly to the pre-heated lysis buffer that was prepared during the initial steps.
- Heat the inoculated lysis tubes for 10 ± 1 minute at $95 \pm 3^\circ\text{C}$. Perform remainder of the PCR test according to manufacturer's instructions.

4C.7 Interpretation of Results

- a. Samples that test BAX[®]-negative will be reported as negative. Cultural analysis will continue as per MLG 4, Section 4.6, for a sample enrichment that tests BAX[®]-positive, BAX[®]-indeterminate, or has a BAX[®] signal-error result. Alternatively, for samples with BAX[®]-indeterminate or BAX[®] signal-error result the laboratory may review the cause and perform a correction. Based on the findings, the laboratory may:
 - repeat the BAX[®] analysis from the rack loading step or
 - prepare new BAX[®] tubes and repeating the analysis.
- b. In analytical runs where the positive control tests BAX[®]-negative, indeterminate, or has a signal-error result, the entire batch of samples is affected and a review of the cause and a correction shall be performed. Based on the findings the laboratory may:
 - repeat the BAX[®] analysis from the rack loading step
 - prepare new BAX[®] tubes and repeating the analysis or
 - analyze all of the samples culturally.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

MLG 4C.07	Page 4 of 4	
Title: FSIS Procedure for the Use of a Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Screening <i>Salmonella</i> in Meat, Poultry, Egg, and Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges		
Revision: .07	Replaces: .06	Effective: 1/2/17

If reanalysis is unsuccessful then prepare fresh analytical portions from the sample reserve or discard the sample.

4C.8 Completion of Testing if BAX[®] Unavailable

If circumstances (e.g. a power outage or equipment failure) do not allow testing using the BAX[®] system, the laboratory shall, if possible, continue cultural analysis of all samples by proceeding with isolation and purification steps as per MLG 4, Section 4.6.

4C.9 Selected References

Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health (CDC/NIH). 2007 BioSafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. also found on the internet at: <http://www.cdc.gov/biosafety/>

BAX[®] System PCR Automated Detection for Bacterial Screening User Guide, Dupont Qualicon.

Apéndice 5. ATCC® 14028™




ATCC

Product Sheet

Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC® 14028™)

Please read this FIRST




Storage Temp.

Frozen: -80°C or colder

Freeze-Dried: 2°C to 8°C

Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level

2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (ATCC® 14028™)*.

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800 535 8997 or 703 565 2700
Fax: 703 565 2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Description

Designation: CDC 6516-60
Deposited Name: *Salmonella typhimurium* (Loeffler) Castellani and Chalmers
Antigenic Properties: 1,4,5,12:1,2 (Determined by depositor)
Product Description: Formerly *Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis serovar Typhimurium*
Preparatory test control: Used in media testing. This strain is recommended by ATCC® for use in the tests described in U.S. Pharmacopeia, 23rd rev., <2021>, p. 2180, 1995, where only the taxon is specified.

Propagation

Medium
ATCC® Medium 3; Nutrient agar or nutrient broth

Growth Conditions
Temperature: 37°C
Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #3 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate an additional broth tube, a #3 agar slant and/or a plate.
5. Incubate all tubes and plate at 37°C for 24 hours.

Notes

Colonies on #3 agar are smooth, low convex, glistening, translucent, and entire to slightly undulate. Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.

References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.

Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from



ATCC

Product Sheet


***Salmonella enterica subsp.
enterica serovar
Typhimurium* (ATCC®
14028™)**

the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC Web site at www.atcc.org.
© ATCC 2017. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection (ATCC).

Please read this FIRST




Storage Temp.

Frozen: -30°C or colder

Freeze-Dried: 2°C to 8°C

Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level

2

Intended Use

This product is intended for research use only; it is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (ATCC® 14028™).

American Type Culture Collection
PO Box 1543
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800 828 6897 or 703 265 2700
Fax: 703 265 2700
Email: Info@atcc.org