



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCIÓN: MEDICINA PREVENTIVA**

**PRESENCIA DE *SALMONELLA* Y  
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE HUEVOS  
DESTINADOS A CONSUMO HUMANO**

**Bqco: Mario Alberto Soria**

**Tesis para optar el grado de  
MASTER *SCIENTIAE* EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Esperanza, 2012**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**MENCIÓN: MEDICINA PREVENTIVA**

**PRESENCIA DE *SALMONELLA* Y CARACTERÍSTICAS  
FÍSICAS DE HUEVOS DESTINADOS A CONSUMO  
HUMANO**

**AUTOR: Bqco. Mario Alberto SORIA**

**DIRECTOR: Dr. Dante Javier BUENO**

**CODIRECTOR: Dr. Laureano Sebastián FRIZZO**

**Miembros del Jurado:**

**M. Sc. Vet. Norma RUSSI**

**Dr. Carlos A. VITULICH**

**Dr. Marcelo SIGNORINI**

**Tesis para optar el grado de:**

**MASTER *SCIENTIAE* EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Esperanza, 2012**

**Dedico este trabajo:**

**A Dios,**

**A mis abuelos Pedro, Gringa, Pini y Nena,**

**A mis padres Tere y Luis,**

**A mis hermanos y sobrinos,**

**A toda mi familia.**

## AGRADECIMIENTOS

**“Con constancia y tenacidad se obtiene lo que se desea; la palabra imposible no tiene significado”. Napoleón Bonaparte (1769-1821).**

A **Dios**, por darme las fuerzas necesarias para poder lograr mis metas.

A mis papás **Tere y Luis**, quienes siempre confiaron en mí, que con sus incansables consejos hicieron de mí, la persona que soy. ¡Gracias por sus ejemplos de constancia, dedicación y fortaleza!

Al **Dr. Dante J. Bueno**, director de este trabajo de tesis, por confiar en mí, por brindarme sus conocimientos y el apoyo necesario para poder concluir esta etapa de mi vida. ¡Gracias Dante por tus esfuerzos, tus consejos y tu experiencia!

Al **Dr. Laureano S. Frizzo**, codirector de este trabajo de tesis, por brindarme su ayuda, tiempo, apoyo y dedicación.

Al **Estado Argentino** por haberme brindado educación pública de excelencia a través de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

Al **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)** y en particular a la **Estación Experimental Agropecuaria de Concepción del Uruguay (EEA-C. del U.)** por permitirme utilizar sus instalaciones para que realice mi trabajo de tesis y por brindarme una beca que me dió el apoyo económico durante estos años.

A la cátedra de **Salud Pública** de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por facilitarme sus instalaciones para poder realizar parte de mis ensayos.

Al **Dr. Omar Faure** por su ayuda en el estudio estadístico en este trabajo de tesis.

A la **Dra. Raquel Terragno** por brindarme todos sus conocimientos y su tiempo para realizar la serotipificación de mis “*Salmonellas*”.

A la **Srta. Mabel Taljuk**, por su desinteresada colaboración en la búsqueda bibliográfica y especialmente por su amistad y por estar siempre presente. ¡Gracias Mabeluchi!

A la **Lic. Cecilia Soria**, la “CHECHU”, mi compañera y amiga incondicional, gracias por apoyarme y darme aliento en los momentos más difíciles, por compartir conmigo parte de mi vida. ¡Gracias Chechu y fuerza para terminar tu tesis doctoral!

Al **Dr. Oscar Sosa**, mi hermano y amigo del alma, gracias por todos tus consejos y aliento durante nuestra vida de facultad y luego profesional, por todos los momentos vividos extracurricularmente que fueron muchos y muy buenos. ¡Gracias Oscarcito por estar siempre presente!

A la **Bqca. Mónica Luna** y la **Srta. Romina Luna** por acompañarme y brindarme su amistad cada vez que viajaba a mis clases de maestría en Esperanza. ¡Gracias chicas!

A la **Srta. Carolina Gómez**, por brindarme su amistad principalmente y sus conocimientos de inglés que mucha falta me hicieron. ¡Gracias Caro!

A todos mis compañeros del **Laboratorio de Sanidad Aviar**, por brindarme su amistad y a todos los profesionales de otras áreas de la EEA-Concepción del Uruguay por estar presentes siempre.

Al **Sr. Aldo Costa** y al **Sr. Matías Chichi**, quienes estuvieron conmigo en mis primeros pasos de todo este trabajo, muchas gracias por su ayuda y su amistad!

A mis hermanos **Silvio, César, Rodrigo y Pedro**, por brindarme siempre su amistad, confianza, aliento y por haber realizado tantos esfuerzos y sacrificios para ayudarme a realizar mis estudios de grado.

A mis sobrinos **Agustina, Irina, Facundo, Lucía, Ignacio, Lautaro y Katerina**, que son la razón de mi lucha incansable por mejorar en todo aspecto de mi vida. ¡Gracias mis negritos hermosos!

Al **Sr. Asdrúbal Corbalán**, por estar conmigo en esta última etapa de mi tesis. Gracias por tu ayuda desinteresada, por brindarme tus conocimientos y por darme siempre aliento para terminar este trabajo, ¡Gracias Asdrúbal por estar presente siempre que lo necesité!

A todos **mis compañeros de la Maestría** que sin ellos hubiese sido difícil transitar tantas horas de estudio y otras tantas de momentos de diversión. ¡Gracias chicos y fuerza para que todos terminemos con esta etapa que nos propusimos alcanzar!

A todos mis amigos de la infancia, de la facultad y mis amigos de la vida, por estar siempre presentes brindandome su amistad desinteresadamente.

A todos mis amigos de la ciudad de **Concepción del Uruguay**, Entre Ríos, ya que sin Uds. hubiese sido muy difícil poder transitar todos estos años. ¡Gracias!

---

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Producción de huevo en Argentina .....	2
I.2. El huevo: Características, propiedades y percepción por el consumidor.....	3
I.3. Riesgo sanitario en la producción de huevos.....	6
I.4. Objetivos .....	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
II.1. Reseña histórica de la producción avícola.....	10
II.2. Huevo para consumo .....	11
II.2.1. Definición y formación .....	11
II.2.2. Composición, estructura y propiedades .....	13
II.2.3. Clasificación y calidad del huevo.....	18
II.3. <i>Salmonella</i> y salud pública .....	23
II.4. <i>Salmonella</i> en la producción avícola y huevo para consumo.....	24
II.5. Género <i>Salmonella</i> .....	31
II.5.1. Clasificación taxonómica.....	33

---

II.5.2. Estructura antigénica.....	35
II.5.3. Patogenicidad .....	36
II.5.4. Diagnóstico.....	37
II.5.5. Utilización del ADNr 16S en cepas de <i>Salmonella</i> spp. ....	45
II.5.6. Sensibilidad a los antimicrobianos .....	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
III.1. Muestreo de huevos en supermercados .....	52
III.2. Características físicas y pH del huevo para consumo.....	54
III.2.1. Peso del huevo de consumo (PHC) y área total del huevo para consumo (ATH) .....	54
III.2.2. Observación de la limpieza de la superficie de la cáscara y determinación del peso de cáscara (PC), % de cáscara (%C) y espesor de cáscara (EC) del huevo para consumo.....	55
III.2.3. Color de yema de huevo (CoY).....	56
III.2.4. Determinación de pH en pool de clara y/o yema .....	56
III.2.5. Análisis estadístico.....	56

---

III.3. Estudio comparativo entre métodos bacteriológicos y PCR para la detección de <i>Salmonella</i> spp. en pool de CY contaminados experimentalmente.....	577
III.3.1. Cepas de <i>Salmonella</i> utilizadas y control de pureza.....	577
III.3.2. Preparación del inóculo bacteriano .....	588
III.3.3. Obtención de las muestras de CY e inoculación experimental .....	59
III.3.4. Límite de detección de <i>Salmonella</i> spp. en pool de CY contaminadas experimentalmente .....	60
III.3.5. Extracción de ADN .....	622
III.3.6. PCR para gen <i>invA</i> .....	633
III.3.7. Criterios de capacidad discriminadora y límite de detección de las técnicas..	644
III.3.8. Análisis estadístico .....	666
III.4. Detección de <i>Salmonella</i> spp. en huevos para consumo .....	677
III.4.1. Muestras .....	67
III.4.2. Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. ....	70
III.4.3. Serotipificación de cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde huevos para consumo.....	71
III.4.3.1. Serotipificación somática (AgO) .....	72

---

III.4.3.2. Serotipificación flagelar (AgH).....	72
III.5. PCR en muestras de CY, CL y Y de huevos para consumo .....	755
III.5.1. Extracción de ADN .....	755
III.5.2. Especificidad de primers .....	755
III.5.3. Reacción en cadena de polimerasa para gen <i>invA</i> según Malorny <i>et al.</i> .....	766
III.5.4. Reacción en cadena de polimerasa para gen <i>invA</i> según Ferretti <i>et al.</i> .....	777
III.5.5. Reacción en cadena de polimerasa para gen <i>Sdf</i> según Agron <i>et al.</i> .....	777
III.5.6. Visualización de los productos de amplificación.....	788
III.6. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de pool de CL y Y de huevos para consumo .....	788
III.7. Amplificación del ADNr 16S de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas desde huevos para consumo y comparación de secuencias en bases de datos .....	799
III.7.1. Muestras y extracción de ADN y PCR para ADNr 16S .....	799
III.7.2. Purificación del producto de amplificación .....	80
III.7.3. Análisis de las secuencias .....	81
III.8. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.....	81
IV. RESULTADOS .....	844

---

IV.1 Características físicas y pH del huevo para consumo.....	855
IV.1.1. Muestreo de huevos en supermercados.....	855
IV.1.2. Características físicas del huevo .....	888
IV.1.2.1. PHC y ATH .....	899
IV.1.2.2. PC, EC, % C y limpieza de la cáscara .....	92
IV.1.3. Determinación de pH en el contenido de huevo para consumo.....	999
IV.2. Estudio comparativo entre métodos bacteriológicos y PCR para la detección de <i>Salmonella</i> spp. en pool de CY contaminadas experimentalmente.....	1033
IV.3. Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. en huevos para consumo .....	1133
IV.3.1. Serotipificación de los aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. obtenidos desde huevos para consumo .....	1177
IV.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de CL y Y de huevos para consumo comercializados en la provincia de Entre Ríos.....	1199
IV.4.1. PCR para el gen <i>invA</i> (producto de 284 pb).....	1199
IV.4.2. PCR para gen el <i>invA</i> (producto de 389 pb).....	12020
IV.4.3. PCR para el gen <i>Sdf</i> de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	12222

---

IV.5. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. en CL y Y de huevos para consumo.....	1233
IV.6. Amplificación del ADNr 16S de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas desde huevo para consumo y comparación de secuencias en bases de datos.....	12525
IV.7. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.....	1311
V. DISCUSIÓN.....	1399
V.1. Características físicas del huevo para consumo.....	14040
V.1.1. Características de calidad externa y envasado de huevos para consumo.....	14040
V.1.2. Color de la Yema y pH en pool de clara y/o yema.....	1433
V.2. Estudio comparativo entre dos métodos de cultivo bacteriológicos y molecular (PCR) para la detección de <i>Salmonella</i> spp en pool de CY contaminadas experimentalmente.....	1455
V.3. Aislamiento y detección de <i>Salmonella</i> en muestras de huevos para consumo...	1477
V.4. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en CL y Y de huevos para consumo.....	1555
V.5. Amplificación del ADNr 16S de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de huevo para consumo y comparación de secuencias en bases de datos.....	1566

V.6. Pruebas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos usados en medicina veterinaria y humana .....	1577
VI. CONCLUSIONES .....	1633
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	1666

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Componentes biológicamente activos presente en el contenido de huevo de gallina.....	18
Tabla 2. Números (N°) de serovariedades, especies y subespecies del género <i>Salmonella</i> .....	34
Tabla 3. Medios de Cultivos utilizados en los métodos de aislamiento de <i>Salmonella</i> .....	40
Tabla 4. Números (N°) de supermercados muestreados en las diferentes ciudades de la provincia de Entre Ríos.....	54
Tabla 5. Cepas de <i>Salmonella</i> utilizadas en la comparación de diferentes métodos de detección.....	58
Tabla 6. Número (N°) total y tipo de muestra analizadas en el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. en huevos para consumo humano tomados en diferentes departamentos de Entre Ríos.....	69
Tabla 7. Cepas de <i>Salmonella</i> y no- <i>Salmonella</i> usadas para determinar la especificidad de primers.....	76
Tabla 8. Cepas utilizadas en el estudio de presencia de inhibidores en CL y Y.....	79
Tabla 9. Antimicrobianos evaluados frente a diferentes cepas de <i>Salmonella</i> aisladas desde huevo para consumo de la provincia de Entre Ríos.....	82
Tabla 10. Número (N°) de maples de cartón distribuidos de acuerdo al etiquetado.....	86
Tabla 11: Distribución de los maples de cartón con huevos para consumo de acuerdo a la categoría por peso especificada en el rótulo y a su peso real.....	87

---

Tabla 12. Valores de las características físicas del huevo comercializados en supermercados de Entre Ríos en el total de huevos estudiados. ....	88
Tabla 13. Valores de rango y coeficientes de variación (CV) para pesos de huevos en muestra de seis huevos con respecto al color de cáscara.....	90
Tabla 14. Número de huevos con respecto a las categorías de peso del huevo y color de la cáscara.....	91
Tabla 15. Peso de huevo (PH) y área total del huevo (ATH) según el color de la cáscara de huevos muestreados en supermercados de la provincia de Entre Ríos. ....	93
Tabla 16. Porcentaje de cáscara (% C), peso de cáscara (PC) y espesor de cáscara (EC) según color de la cáscara de huevos muestreados en supermercados de la provincia de Entre Ríos. ....	94
Tabla 17. Porcentaje de huevos con superficie sucia de acuerdo al color de la cáscara.....	95
Tabla 18. Coeficiente de correlación (r) entre el peso de huevo y otros parámetros de calidad externa de acuerdo al color de la cáscara de huevos muestreados en diferentes ciudades de la provincia de Entre Ríos.....	96

---

Tabla 19. Coeficiente de correlación ( $r$ ) entre el peso del huevo y otras características externas del huevo según diferentes categorías de peso y color de la cáscara.....	98
Tabla 20. Valores de pH y color de yema en el contenido de huevos comercializados en Entre Ríos considerando el número ( $N^{\circ}$ ) total de huevos estudiados. ....	99
Tabla 21. Parámetros de calidad interna del huevo en diferentes ciudades de Entre Ríos, según el color de la cáscara.....	101
Tabla 22. Rango y Coeficientes de variación (CV) para color de yema en muestra de seis huevos con respecto al color de cáscara.....	102
Tabla 23. Sensibilidad y Precisión para los métodos bacteriológicos y de PCR para cada cepa de <i>Salmonella</i> en pool de clara y yema contaminadas experimentalmente.....	104
Tabla 24. Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para los métodos bacteriológicos y PCR para cada cepa en pool de clara y yema contaminada experimentalmente.....	106
Tabla 25. Coeficiente Kappa de las comparaciones entre los métodos de detección de <i>Salmonella</i> spp. empleados en pool de clara y yema contaminada experimentalmente....	107
Tabla 26. Límite de detección de cepas de <i>Salmonella</i> móviles inoculadas en pool de clara y yema (CY) para los métodos bacteriológicos y PCR estudiados.....	108

---

Tabla 27. Límite de detección de cepas de <i>Salmonella</i> inmóviles inoculadas en pool de clara y yema (CY) para los métodos bacteriológicos y PCR estudiados.....	109
Tabla 28. Aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. desde huevos para consumo por ciudad y tipo de muestra analizada.....	114
Tabla 29. Sensibilidad y Precisión de los medios selectivos y diferenciales empleados en el aislamiento de <i>Salmonella</i> en huevos para consumo según el día de siembra en caldo Tetracionato .....	116
Tabla 30. Serovariedades de <i>Salmonella</i> aisladas desde diferentes muestras de huevos para consumo en la provincia de Entre Ríos.....	117
Tabla 31. Comparación entre el cultivo en CTSH y la PCR en muestras de CY, CL y Y de huevos para consumo de la provincia de Entre Ríos.....	120
Tabla 32. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> en muestras de clara y yema pertenecientes a huevos comercializados en la provincia de Entre Ríos. ....	124
Tabla 33. Comparación entre dos métodos de tipificación usados para <i>Salmonella</i> sp. aisladas de huevos para consumo de la provincia de Entre Ríos. ....	128
Tabla 34. Aislamientos de <i>Salmonella</i> de huevos para consumo utilizados en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria.....	131
Tabla 35. Sensibilidad de 52 aislamientos de <i>S. Typhimurium</i> y 9 de <i>S. Enteritidis</i> frente a diferentes antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria .....	134
Tabla 36. Patrones de multiresistencia en <i>S. Enteritidis</i> aislada de huevos para consumo humano en la provincia de Entre Ríos.....	136

Tabla 37. Patrones de multiresistencia en *S. Typhimurium* aislada de huevos para consumo humano en la provincia de Entre Ríos..... 137

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Representación esquemática de los órganos reproductivos de la gallina y su contribución durante la formación del huevo.....	13
Figura 2. Representación esquemática de la estructura del huevo.....	17
Figura 3. Patogénesis de contaminación del huevo por <i>Salmonella</i> spp.....	28
Figura 4. Departamentos de la provincia de Entre Ríos (en color gris) donde se encontraban los supermercados utilizados para el muestreo realizado durante el período Marzo 2007- Noviembre 2009.....	53
Figura 5. Preparación del inóculo bacteriano a partir del cultivo puro de las cepas ensayadas.....	59
Figura 6. Preparación de las muestras de CY y control de contaminantes bacterianos y fúngicos en diferentes medios de cultivo. ....	60
Figura 7. Flujograma para la detección de <i>Salmonella</i> en pool de CY mediante técnicas basadas en FDA/BAM e ISO 6579. ....	62
Figura 8. Mmuestras utilizadas para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	70
Figura 9. Flujograma para la serotipificación de cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas desde huevos para consumo. ....	74

---

Figura 10. Diferentes presentaciones de huevos comprados en supermercados de la provincia de Entre Ríos.....	85
Figura 11. Productos de amplificación del gen <i>invA</i> por PCR para <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076.....	110
Figura 12. Productos de amplificación del gen <i>invA</i> por PCR para <i>S. Gallinarum</i> INTA 03/121.....	111
Figura 13. Productos de amplificación del gen <i>invA</i> por PCR para <i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311.....	112
Figura 14. Prueba de especificidad de primers para <i>Salmonella</i> spp.....	119
Figura 15. Prueba de especificidad de primers para gen <i>invA</i> en cepas de <i>Salmonella</i> spp. y no- <i>Salmonellas</i> .....	121
Figura 16. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en cepas de <i>Salmonella</i> spp. y muestras de huevos para consumo humano. ....	121
Figura 17. Prueba de especificidad de los primers para gen <i>Sdf</i> en cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis y <i>Salmonellas</i> no-Enteritidis .....	122
Figura 18. Presencia de inhibidores del crecimiento de <i>Salmonella</i> en muestras de clara y yema pertenecientes a huevos comercializados en la ciudad de Federal. ....	1244
Figura 19. Amplificación del ADNr 16S de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de huevos para consumo de la provincia de Entre Ríos.....	125

Figura 20. Sensibilidad a diferentes antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria en *S. Typhimurium* CUB 70/10. .... 1355

**ABREVIATURAS**

ADA	Asociación Dietética Americana
ATB	Antibiótico
CAA	Código Alimentario Argentino
CDC	Centro para el control y la Prevención de Enfermedades
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
NCCLS	Comité Nacional para la Normatización de Laboratorios Clínicos
RIPSyDOA	Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Animal
SA	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Agona
SK	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Kentucky
SD	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Derby
SE	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Enteritidis
SH	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Hadar
SHe	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Heidelberg
SI	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Infantis

SJ	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Javiana
SM	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Montevideo
SN	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Newport
SP	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Panama
SSt	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Stanley
ST	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Typhimurium
SV	<i>Salmonella enterica</i> subespecie <i>enterica</i> serovariedad Virchow

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis se difundieron parcialmente a través de las siguientes publicaciones:

➤ **PUBLICACIONES EN BASES DE DATOS:**

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum strain CUB 05/10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
Soria, M.A., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. and Bueno, D.J. (Accession number JN615011). 2011. GenBank Data library, NCBI. En prensa.
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strain CUB 21/10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
Soria, M.A., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. and Bueno, D.J. (Accession number JN615012). 2011. GenBank Data library, NCBI. En prensa.
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain CUB 23/10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
Soria, M.A., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. and Bueno, D.J. (Accession number JN615013). 2011. GenBank Data library, NCBI. En prensa.
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strain CUB 73/10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
Soria, M.A., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. and Bueno, D.J. (Accession number JN615014). 2011. GenBank Data library, NCBI. En prensa.

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain CUB 13/10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
Soria, M.A., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. and Bueno, D.J. (Accession number JN615015). 2011. GenBank Data library, NCBI. En prensa.
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain CUB 32/10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
Soria, M.A., Zbrun, M.V., Frizzo, L.S. and Bueno, D.J. (Accession number JN615016). 2011. GenBank Data library, NCBI. En prensa.

➤ **ARTÍCULOS EN REVISTAS INTERNACIONALES CON REFERATO**

- **Soria, M.A., D.J. Bueno and I.I.C. Bernigaud. 2012. Comparison of quality parameters in hen's eggs according to egg shell color. International Journal of Poultry Science (En prensa).**
- **Soria, M.A., M.C. Soria and D.J. Bueno. 2012. A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction for Salmonella detection in egg content. Poultry Science (En prensa).**

➤ **COMUNICACIONES A CONGRESOS CIENTÍFICOS DE LA ESPECIALIDAD**

- Congresos Nacionales: 6 (seis)
- Congresos Internacionales: 3 (tres)

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *Salmonella* spp. y las características físicas y pH del huevo para consumo humano y evaluar la sensibilidad de los aislamientos obtenidos frente a diferentes antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria. Las características físicas del huevo para consumo fueron evaluadas a través de las siguientes variables: el peso y el área total del huevo, observación macroscópica de la superficie; peso, porcentaje y espesor de la cáscara; el color de la yema y el pH del contenido de huevo. El aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó utilizando la metodología FDA/BAM (con modificaciones). La serotipificación de los aislamientos se realizó según el método de Kauffmann-White. Posteriormente, se evaluó la sensibilidad de cada cepa frente a los antimicrobianos. Los huevos de cáscara marrón y los de cáscara blanca mostraron diferencias en sus parámetros físicos y valores de pH. La prevalencia de *Salmonella* spp. fue del 1,8 % (29/1.643 muestras), encontrándose 8 serovariedades de *Salmonella* sp. las cuales fueron sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacinaa e imipenem que serían de elección en la terapia de infecciones causadas por este patógeno.

Palabras claves: Huevo de consumo, características físicas del huevo, *Salmonella* spp., antimicrobianos, Entre Ríos.

## SUMMARY

**Presence of *Salmonella* and physical characteristics of eggs for human consumption.** The aim of this study was to determine the presence of *Salmonella* spp. and physical characteristics and pH of eggs for human consumption. Furthermore, antimicrobial susceptibility of *Salmonella* was evaluated. The egg physical characteristics were evaluated as: egg weight and the total area, macroscopic surface observation, shell weight percentage and thickness, yolk color and pH of egg content. FDA/BAM (with modification) methodology was used for *Salmonella* spp., isolation. Serotyping of isolates was performed according to the Kauffmann-White method. Finally, the antimicrobial sensitivity test was made for each strain. Brown shell eggs and white shell eggs showed differences in their physical parameters and values of pH. The prevalence of *Salmonella* spp. was 1.8% (29/1,643 samples), and 8 different serotypes of *Salmonella* were founded. These were sensitive to amoxicillin/clavulanate, ciprofloxacin and imipenem which would be of choice in the treatment of infections caused by this pathogen.

Key words: Egg consumption, physical characteristics of eggs, *Salmonella* spp., antimicrobial, Entre Ríos.

# I. INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Producción de huevo en Argentina

La producción mundial de huevos asciende a 65 millones de t (2008), lo que implica un importante crecimiento comparado con el año 2000 donde se produjeron 51,7 millones de t. Se observa un fuerte liderazgo de China, a la cual le siguen EEUU, India, Japón, México, Rusia y Brasil. Con respecto a Argentina, ésta se encuentra en el puesto 23 (Anónimo, 2011; Lamelas *et al.*, 2011).

A nivel nacional, el sector avícola se perfila con perspectivas favorables, tanto para la producción de carne aviar como de huevos. El crecimiento ininterrumpido desde el año 2003 y la estrategia delineada para los próximos años permiten vislumbrar una actividad dinámica y en constante expansión, proveedora de alimentos tanto en el mercado local como en el internacional (Lamelas *et al.*, 2011).

La producción de huevos se realiza en granjas de ponedoras, en las que se cumplen las etapas de cría, recría y alimentación de las gallinas en producción y la recolección de huevos. Dicha producción posee básicamente dos finalidades: una de ellas es el consumo directo del huevo (huevos frescos) y la otra es la industrialización del mismo dando como resultado lo que se conoce como ovoproducto (Garzón *et al.*, 2010).

La producción avícola se desarrolla principalmente en las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires coincidente con las áreas productoras de cereales y oleaginosas utilizados para la alimentación de las aves. Con respecto a la producción de huevos, el 65,4% de la

producción nacional está representada por dos provincias, Buenos Aires (42,7 %) y Entre Ríos (22,7 %) (Lamelas *et al.*, 2011).

Durante el año 2010, la producción de huevos en Argentina mostró un crecimiento del 4% en relación al año 2009 y la demanda interna marcó un consumo interno de 218 huevos/hab/año (Lamelas *et al.*, 2011). Se estima que para el año 2015 el consumo de huevos/hab/año será de aproximadamente 230 (Nazar, 2009).

En el período Enero-Agosto de 2010, la producción de huevos de mesa en Entre Ríos fue de 798.864 cajones de 30 docenas cada uno en establecimientos de importancia comercial de la provincia de Entre Ríos. La producción aumentó en un 4,6 % respecto al mismo período del año anterior (2009) representado por 37.138 cajones de 30 docenas cada uno (Schell *et al.*, 2010).

## **I.2. El huevo: Características, propiedades y percepción por el consumidor**

El huevo presenta un valor alimentario que lo ubica en el tercer lugar, después del queso y de la leche y superior a la carne. Debido a su cantidad y calidad de nutrientes es considerado por la FAO, como uno de los alimentos más nutritivos de la naturaleza. Su densidad nutritiva lo hace de gran valor para el balance nutricional de la dieta y como una fuente económica de alta calidad proteica, un importante componente de la dieta de los ancianos, familias de bajos recursos, niños y personas que quieren bajar de peso (Mayer, 1986; Applegate, 2000; Sayar, 2009).

Dentro de nuestros alimentos es uno de los más ricos en calidad de vitaminas, tanto en los huevos de cáscara blanca como los de color (Quevedo, 2008). Además, es

considerado un alimento natural, envasado en origen, económico, fácil de conseguir, preparar y apto para toda la familia. El huevo es símbolo de vida y ha estado presente desde la antigüedad en la alimentación humana. El mismo aporta la proteína de mejor calidad, grasas saludables y la mayoría de las vitaminas y minerales. Además aporta sustancias esenciales que protegen la salud (Sayar, 2009).

Los principales componentes del huevo son agua (75%), proteínas (12%), lípidos (12%), carbohidratos y minerales. Las proteínas están distribuidas en todo el huevo, pero la gran mayoría las encontramos en la clara y yema del mismo, y una pequeña proporción en la cáscara y cutícula (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005).

El huevo posee sistemas de defensas físicas y biológicas que protegen al embrión frente a la invasión y multiplicación de microorganismos. La cáscara y la membrana testácea obstruyen físicamente la invasión de organismos, constituyendo la primera barrera de defensa. Por su parte, la albúmina contiene un número de proteínas, tales como lisozima, lactoferrina, etc, con actividad antimicrobiana demostrada. Estas proteínas pueden ejercer su función mediante diferentes mecanismos, incluyendo lisis bacteriana y unión a metales y vitaminas. Otros componentes presentes en la yema del huevo también poseen actividad antimicrobiana, tales como la inmunoglobulina Y (IgY), la cual es transferida desde la gallina al huevo para dar una inmunidad adquirida a su progenie (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005).

Los mismos componentes del huevo que forman parte del embrión, son responsables de ejercer acción antibacteriana, antiviral y de modulación del sistema inmune

en humanos. Es por ello que se destaca la importancia del consumo de huevos como parte de una dieta saludable orientada a prevenir enfermedades (Mazzuco, 2008).

Recientemente, la Cámara Argentina de Productores Avícolas (CAPIA), realizó un estudio sobre la imagen y el consumo de huevo. Algunas de las principales observaciones fueron que en la mayoría de los hogares hay huevos en la heladera, la mayor proporción de ellos son consumidos dentro de preparaciones o en comidas elaboradas. En lo que refiere a los hábitos de compra, el supermercado, almacén de barrio, verdulería y granja/pollería son los principales lugares de compra, donde la cercanía es el principal factor para la elección del lugar donde comprar el huevo, perdiendo importancia si es fresco o no (Anónimo, 2010). Los atributos más importantes del producto son la frescura, el tamaño, la higiene y el precio. En el área metropolitana de Buenos Aires los huevos más comprados son los blancos, mientras que en el interior se privilegian los huevos marrones. El envase de cartón es el preferido de todos los consumidores, aunque entre los de mejor situación socioeconómica aparece el envase de plástico como una variante, mientras que en los de peor situación socioeconómica la bolsa de polietileno gana importancia (Anónimo, 2010).

Desde el año 2000 el huevo es considerado como alimento funcional, ya que cumple con las definiciones de ser un alimento que va más allá de la nutrición brindando beneficios para la salud. De acuerdo a la categorización de la ADA los huevos son alimentos que se encuentran naturalmente enriquecidos con carotenoides, colina y sustancias antioxidantes (Sayar, 2009). Según esta asociación la ingesta de alimentos funcionales tiene un efecto

beneficioso en la salud cuando son consumidos como parte de una dieta variada (Hasler, 2000).

### **I.3. Riesgo sanitario en la producción de huevos**

El huevo puede ser invadido por diversos patógenos bacterianos que pueden afectar la salud humana, particularmente SE, la cual ha experimentado una notable expansión a nivel mundial, produciendo un alarmante aumento de la incidencia y severidad de los casos de enfermedad humana (Gast, 2003). Las infecciones producidas por estos microorganismos provocan gran variedad de enfermedades agudas y crónicas en la industria avícola. Esta enfermedad puede causar grandes pérdidas económicas en granjas debido a gastos en saneamiento de instalaciones infectadas, eliminación de aves, etc. A su vez, las aves representan uno de los reservorios mas importantes de estas bacterias que pueden ser transmitidas al humano (Gast, 2003).

Las aves pueden infectarse con *Salmonella* debido al consumo de alimento balanceado contaminado, cuyos ingredientes pueden ser de origen animal (expeller y harina de carne, hueso, pescado, entre los más importantes) o vegetal (maíz, expeller y harina y poroto de soja), siendo los ingredientes de origen animal la principal fuente de contaminación (Quiroz, 1987).

La contaminación bacteriana de los huevos frescos puede ser por transmisión transovárica, contaminación en la cloaca y contaminación posterior a la puesta, generalmente ambiental (Gast, 2003). Diversos factores extrínsecos e intrínsecos del huevo afectan la probabilidad de penetración de este patógeno en el huevo en inoculaciones

experimentales. Entre los primeros se destacan la cepa bacteriana, el diferencial de temperatura entre el huevo y la suspensión bacteriana, la humedad, el número de microorganismos en la suspensión o en las excretas, el pH de la suspensión bacteriana, y temperatura y humedad durante el almacenamiento después de la inoculación. Entre los factores intrínsecos se pueden mencionar las tres barreras de defensa física del huevo: la cutícula, la cáscara (calidad, porosidad y defectos) y las membranas testáceas (Messens *et al.*, 2005).

Howard *et al.* (2011) y Gama *et al.* (2003) hacen referencia a otros factores de riesgo que pueden estar implicados en la contaminación de las gallinas ponedoras y el huevo. Estos factores son el movimiento de las personas encargadas de las granjas, la exposición a roedores, los insectos, los animales domésticos, el agua y el alimento.

Cuando *Salmonella* se encuentra presente en las granjas, el uso de antimicrobianos ayuda a disminuir las pérdidas causadas por la mortalidad en las aves afectadas. Sin embargo, el uso periódico de antibióticos induce no solamente a resistencia por parte de este microorganismo, sino también a la formación de aves portadoras crónicas que eliminan *Salmonella* spp. en el medio ambiente y son quizá el principal foco de diseminación dentro de un lote (Botero Hoyos, 2007).

La información sobre la prevalencia de *Salmonella* en huevos en la provincia de Entre Ríos, es escasa, aisladas e incompletas, lo que complica la aplicación de estrategias de intervención para puntos críticos de control de la cadena productiva de aves de corral y sus productos alimenticios. La obtención de información relacionada a las características

físicas y la presencia de *Salmonella* spp. en huevos para consumo humano permitirá caracterizar al huevo y conocer la situación de este patógeno.

#### **I.4. Objetivos establecidos**

##### **Objetivo general:**

- Generar información sobre las características físicas y grado de contaminación microbiológica de los huevos para consumo humano.

##### **Objetivos específicos:**

- Determinar las características físicas y pH de los huevos para consumo.
- Evaluar distintas técnicas para el aislamiento y detección de *Salmonella* spp. a partir de huevo.
- Determinar la prevalencia de la contaminación microbiológica de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis y otras serovariedades en huevos comercializados en supermercados de Entre Ríos.
- Estudiar la sensibilidad antimicrobiana de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de huevo a diferentes antibióticos, utilizados tanto en avicultura como en medicina humana.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1. Reseña histórica de la producción avícola

Cuenta la historia que el origen de la avicultura en Argentina vino de la mano del general Justo José de Urquiza, quién fundó la Colonia San José en el año 1857 junto a un número importante de inmigrantes (suizos, franceses e italianos), quienes habrían traído las primeras aves de corral al país (Garzón *et al.*, 2010).

La evolución de la avicultura se daría en tres etapas más o menos definidas, cada una de ellas influenciada por los avances de la ciencia y la tecnología. La primera etapa se caracterizó por la crianza de pollos y gallinas en libertad (producción a campo). El trabajo se realizaba con aves criollas y en esta etapa su producción era escasa (Garzón *et al.*, 2010). La comercialización estaba organizada a través de acopios y consignaciones representadas por personas u organizadas en cooperativas. El grueso de los productos acopiados convergía en el Mercado Concentrador de Aves y Huevos de la Capital Federal, en donde se clasificaba y seleccionaba el huevo para consumo. En general los consumos no se medían, pero se estima que había un consumo de menos de 80 huevos por persona/año. Con leve crecimiento y una progresiva organización en la producción, esta estructura se extendió hasta el comienzo de los años 60 del siglo pasado (Anónimo, 2007).

La segunda etapa comenzaría con la primera importación de aves de raza, la cual se caracterizó por mejoras importantes en los procesos productivos de las granjas, pasando la crianza a realizarse en condiciones de semi-cautiverio (Garzón *et al.*, 2010). Alrededor de 1960 se considera el nacimiento de la avicultura industrial en Argentina. Con las líneas de

aves híbridas (Tompson, Arbor Acres, Cobb, Pilch, Ross, Hyline, Queen, Shaver) llegaron los planos para la construcción de los galpones y las jaulas donde alojarlas (Anónimo, 2007). La alimentación de las aves pasó a basarse en mezcla de granos (Garzón *et al.*, 2010).

La última etapa corresponde a la actual, aunque no existe una fecha establecida de su inicio. Entre 1976 y 1983, comenzó el proceso de integración vertical. La tecnología cambió a nivel mundial llevada por la genética de las aves, de manera que los productos (carne de pollo y huevos) se posicionaron como las proteínas animales de más bajo precio al público (Anónimo, 2007). Desde entonces, la avicultura se ha transformado en una verdadera cadena de producción avícola que abarca desde la materia prima (cereales) para alimentar a las aves hasta el procesamiento del pollo o del huevo para ser ofrecido como producto final al mercado interno y externo (Anónimo, 2007).

En este momento las granjas trabajan con animales híbridos de alta producción de carne y huevos. La alimentación se basa en alimentos balanceados que satisfacen los requerimientos orgánicos de las aves. De esta manera se logra obtener una mayor producción tanto en huevos como en carne de pollo (Garzón *et al.*, 2010).

## **II.2. Huevo para consumo**

### **II.3.1. Definición y formación**

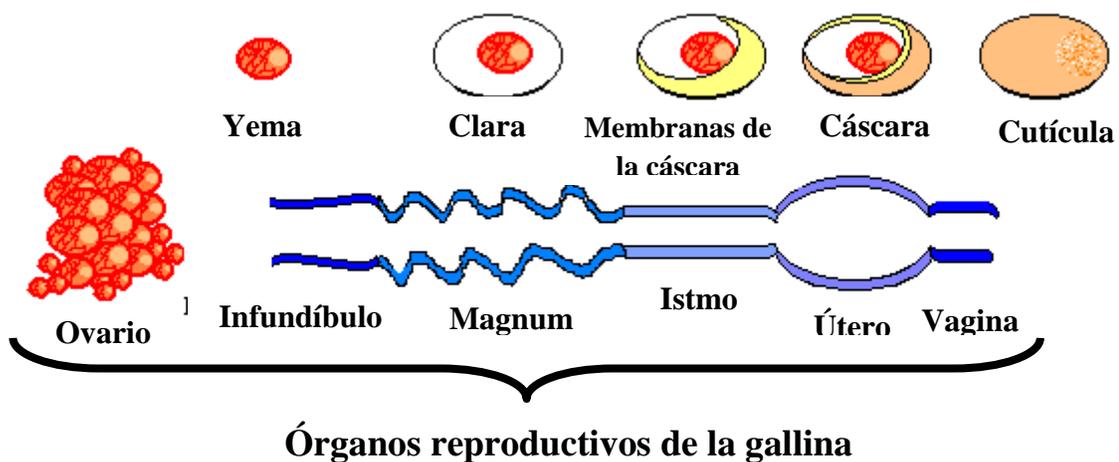
Se define al huevo como el óvulo de la gallina (*Gallus gallus*) completamente evolucionado, fecundado o no, con sus correspondientes reservas de sustancias nutritivas y su revestimiento calcáreo (RIPSYDOA, 1968). Por otra parte, se entiende por huevo fresco

aquel que no ha sido sometido a ningún procedimiento de conservación, con excepción de la climatización del ambiente por un lapso máximo de 30 d a una temperatura no mayor a 15 °C y una humedad relativa comprendida entre 70 y 90 %, libre de olores y sabores extraños (RIPSyDOA, 1968; CAA, 1994).

Las aves producen huevos para su reproducción y para que ello acontezca deben ser fecundados. Si esto no ocurre, la postura se realiza de igual manera y el hombre, en ambas circunstancias, los aprovecha para su consumo. Los huevos de gallinas son los que más se consumen. Los mismos tienen un polo más obtuso que el otro, pesan entre 50 a 70 g siendo la cáscara, en general blanca, amarilla o morena de superficie lisa (Mayer, 1986).

El ciclo de puesta completo dura de 26 a 28 h. La ovulación suele efectuarse por la mañana, unos 30-60 min de la ovoposición anterior. Los rayos rojos visibles de la luz solar o eléctrica que inciden en el ojo, estimulan la secreción de la hormona foliculoestimulante (FSH) la cual juega un rol fundamental en la formación del huevo. Esta hormona es transportada por la sangre hasta el ovario. Cuando un óvulo es estimulado por la hormona FSH comienza a desarrollarse hasta alcanzar el saco que encierra a la yema en desarrollo; luego este saco se rompe y se produce la ovulación. Este óvulo cae al infundíbulo (Figura 1), donde tiene o no lugar la fecundación. A continuación la yema u óvulo llega hasta el magnum (por movimientos peristálticos) donde es rodeada por una espesa clara de huevo o albumina. Luego continua su recorrido hasta el istmo en donde se añaden agua, algunas sales y las llamadas membranas testáceas. Luego, el óvulo con sus membranas es desplazado hacia la parte inferior del oviducto, lo cual hace que la clara se refuerce en los

extremos de la yema, formando las llamadas chalazas. En el útero se forma la capa caliza de la cáscara y también se secreta clara fluida y sales que penetran por ósmosis a través de las membranas de la cáscara. El huevo completo pasa a través de la vagina, donde recibe una capa de mucina lubricante (cutícula), luego llega a la cloaca y finalmente sale al exterior (Torrent Mollevi, 1982; Mountney y Parkhurst, 2001).



**Figura 1.** Representación esquemática de los órganos reproductivos de la gallina y su contribución durante la formación del huevo (De Buck, 2004).

### II.2.2. Composición, estructura y propiedades

El huevo aporta la proteína de mejor calidad, grasas saludables y la mayoría de las vitaminas (vitaminas A, D y del grupo B).y minerales (especialmente hierro, calcio, sodio, potasio y fósforo). Un huevo mediano (50 g) aporta 75 calorías, 6 g de proteína y 5 g de grasa, de las cuales sólo la tercera parte contiene ácidos grasos saturados y el resto son ácidos grasos insaturados (Sayar, 2009). Además, el contenido del huevo puede ser manipulado a través de la dieta o de la inmunización para ciertos beneficios, actuando la

gallina como un biorreactor para la producción de sustancias de importancia médica (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005).

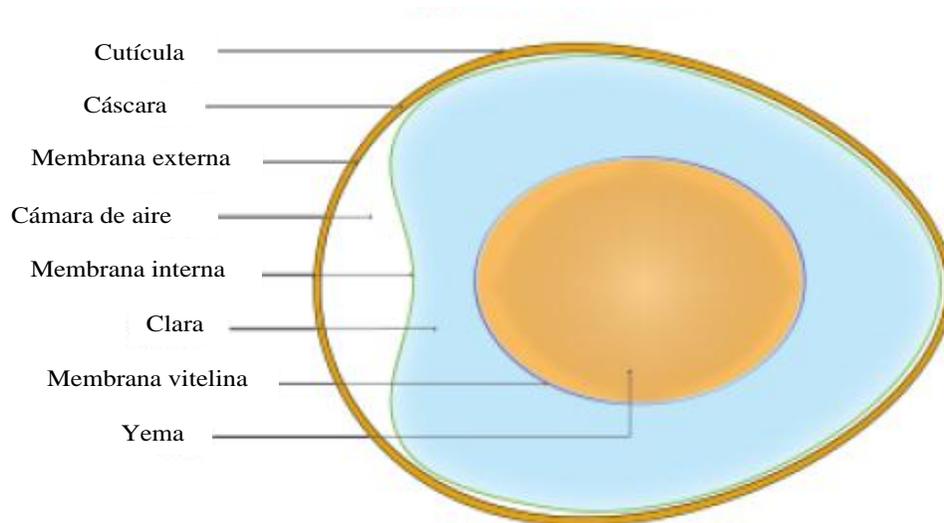
En cuanto a su estructura, el huevo posee tres partes fundamentales (Figura 2):

- **Cáscara:** (11,5 % del peso total del huevo): Es una estructura mineralizada altamente especializada. La misma provee protección contra el daño físico y contra microorganismos y pequeños predadores. Está formada por carbonato de calcio (94%), carbonato de magnesio (1%), fosfato de calcio (1%) y materia orgánica (4%) (Mine *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2005). La cáscara contiene entre 7.000 y 15.000 poros y esta separada de la albúmina por las membranas de la cáscara. Una vez que el huevo es puesto, se enfría a temperatura ambiente, el contenido se contrae y las membranas de la cáscara se separan formando la cámara de aire. La membrana externa se pega a la cáscara mientras que la membrana interna se une a la albúmina (Jacob *et al.*, 2008). La cáscara cumple un importante papel en el intercambio gaseoso entre el embrión en desarrollo y el medio externo (Hunton, 2005). En la industria comercial del huevo, la cáscara provee un perfecto envase para un importante tipo de alimento, y al igual que cuando esta fecundado, evita la contaminación del contenido de manera que el huevo llegue al consumidor libre de bacterias, virus y otros patógenos (Hunton, 2005). La cutícula es secretada inmediatamente antes de la postura y es la primera barrera de defensa que poseen los huevos (Howard *et al.*, 2011).

- Clara: corresponde al 58,3% del peso total del huevo, donde los principales constituyentes son agua (85 %) y proteínas (13 %). También contiene vitaminas y minerales principalmente niacina, riboflavina, magnesio y potasio, entre otros (Sayar, 2009). La clara se divide en cuatro capas: capa delgada externa, clara gruesa externa, clara delgada interna y capa espesa interna o chalazífera. Esta última está en contacto directo con la yema y posee dos cuerdas blanquecinas llamadas chalazas (Mayer, 1986; Mountmy y Parkhurst, 2001). Dentro de las proteínas se encuentran la ovoalbúmina, ovotransferrina, ovomucoide, ovomucina (responsable de la viscosidad de la clara), lisozima, avidina, cistatina, ovoinhibidor y ovomacroglobulina (ovostatina). Muchas de estas sustancias poseen efecto antimicrobiano producido por lisis de la célula bacteriana, unión a metales y vitaminas, entre otros. También se han descrito propiedades antiadhesivas de bacterias, antioxidantes, inmunomoduladora, anticancerígena, antihipertensiva, inhibidora de proteasa y ligando bioespecífica (Tabla 1). Las proteínas ovoalbúmina, ovomucoide y ovotransferrina son de alto valor biológico conteniendo los 9 aminoácidos esenciales para el organismo humano. Su valor biológico es de 93,7% y es usada como proteína de referencia para medir la calidad de las proteínas de otros alimentos (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005).
- Yema: corresponde al 30,2% del peso total del huevo. Los principales componentes son agua (48 %), proteínas (17,5 %), lípidos (32,5 %),

minerales (2 %), y vitaminas. La yema consta de capas concéntricas claras y oscuras, incluidas dentro de la membrana vitelina, la latebra y el disco germinal. Este último es el punto donde empieza a desarrollarse el embrión en los huevos fértiles y está presente aún cuando el huevo no esté fertilizado. La membrana vitelina mantiene la integridad de la yema. Las capas de yema (clara y oscura) son bandas visibles de color blanco y amarillo resultantes de la secreción de diferentes cantidades de pigmentos durante la formación de la yema. La latebra mantiene el disco germinal flotando hacia arriba (Mountney y Parkhurst, 2001). Los lípidos mayoritariamente están presentes como lipoproteínas y pueden ser separados en una fracción granular y una fracción plasma. Los gránulos contienen  $\alpha$ - y  $\beta$ -lipovitelininas (lipoproteínas de alta densidad), fosvitina y lipoproteínas de baja densidad. El plasma puede ser dividido en la fracción de lipoproteína de baja densidad y la fracción soluble en agua, que contiene livetinas. Estas últimas corresponden a proteínas globulares, entre ellas la  $\gamma$ -livetina, también conocida como inmunoglobulina de yema de huevo (Ig Y) (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005). Se han descrito diversas actividades biológicas de la yema del huevo, dentro de ellas tenemos actividad antimicrobiana por unión, inmovilización y posterior inhibición del crecimiento y replicación de diversos patógenos. También se han descrito actividad antiadhesiva frente a patógenos virales (Rotavirus) y bacterianos (*Salmonella* y *E. coli*), propiedades antioxidantes dada por la presencia de la fosfovitina. Los derivados generados por su

hidrólisis trípica mejora la capacidad de unión al calcio inhibiendo la formación de fosfato de calcio insoluble (Tabla 1). Los carotenoides son los principales pigmentos de la yema, los cuales le confieren un color amarillo característico. Posee principalmente carotenos y xantófilas (luteína, criptoxantina y zeaxantina). Además, la yema de huevo aporta importantes nutrientes y los lípidos de la misma no resultan en un incremento del colesterol plasmático, indicando que puede ser utilizada con seguridad en la dieta de los niños (Applegate, 2000; Mine y Kovacs-Nolan, 2006; Anton, 2007).



**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura del huevo (Gantois *et al.*, 2009).

**Tabla 1.** Componentes biológicamente activos presentes en el contenido de huevo de gallina (Mine y Kovacs-Nolan, 2006).

Actividad biológica	Componentes biológicamente activos	
	Clara o Albúmina	Yema
Antimicrobiana	Lisozima	Inmunoglobulina de yema (IgY)
	Péptidos de ovoalbúmina	
	Ovotransferrina	Lipoproteínas
	Avidina	
	Péptidos derivados de ovomucina	
Antiviral	Lisozima	-
	Ovotransferrina	
	Péptidos derivados de ovomucina	
Anti-adhesiva	Glicopéptidos de Ovomucina	Lipoproteínas de alta densidad (HDL) y sus péptidos
Inmunomoduladora	Ovoalbúmina	-
	Péptidos derivados de ovomucina	
	Lisozima	
	Ovotransferrina	
	Cistatina	
Anticancerígena	Lisozima	-
	Ovomucina	
Antihipertensiva	Péptidos de ovoalbúmina	-
	Ovomucina	
Antioxidante	Péptidos de albúmina	Fosfovítina

### II.2.3. Clasificación y calidad del huevo

Para su comercialización, en Argentina los huevos se clasifican por tamaño, peso, color, forma y por la gravedad o severidad de las manchas, según lo establecido por el CAA (1994). De esta manera, los huevos frescos pueden clasificarse sanitariamente y de acuerdo a su peso expresado en gramos por unidad o por docena.

La clasificación sanitaria de los huevos se realiza de acuerdo a que reúnan las siguientes condiciones comprobadas macroscópicamente o al ovoscopio o por otros medios físicos de acuerdo al CAA (1994):

- Calidad A: Es aquel que posee cáscara naturalmente limpia, sana, fuerte y de forma normal. La cámara de aire de hasta 5 mm de profundidad, fija y sana. La yema casi invisible de contorno difuso, céntrica, fija y de color uniforme. Clara o albúmina traslúcida de consistencia firme y de aspecto homogéneo. Cicatrícula o germen invisible y sin sangre.
- Calidad B: Es aquel que posee cáscara naturalmente limpia, sana, fuerte y de forma normal. La cámara de aire de hasta 8 mm de profundidad, fija y sana. La yema ligeramente visible de contorno ligeramente visible, céntrica, puede ser algo móvil y de color uniforme. Clara o albúmina traslúcida de consistencia firme y de aspecto homogéneo. Cicatrícula o germen ligeramente visible y sin sangre.
- Calidad C: Es aquel que posee cáscara ligeramente sucia (no mayor al 15 % de su superficie), pudiendo no ser muy fuerte y su forma podrá ser anormal. La cámara de aire de hasta 10 mm de profundidad, puede ser móvil y debe ser sana. La yema visible de contorno visible, ubicación variable y su color puede ser abigarrado. Clara o albúmina traslúcida ligeramente fluida y de aspecto homogéneo. Cicatrícula o germen sin sangre puede hallarse desarrollada hasta 8 mm.

- Calidad D: Es aquel que posee cáscara sucia, cascada sin pérdida de sustancia, débil y/o su forma anormal. La cámara de aire de hasta 15 mm de profundidad, puede ser móvil y/o espumosa. La yema puede ser muy visible de contorno visible, neto e irregular, móvil y hallarse asentada sin estar adherida y su color puede ser abigarrado. Clara o albúmina translúcida puede ser muy fluida y de aspecto homogéneo. Cicatricula o germen puede hallarse desarrollada hasta 10 mm y se admite un pequeño anillo de sangre.

Según el peso que posean, los huevos se clasifican en diferentes grados de acuerdo a la siguiente escala cuyos valores se toman como mínimos según el CAA (1994) y el Decreto N° 4238/68 (Anónimo, 1968):

- Grado 1S o “extra grande”:  $\geq 62$  g por unidad y 744 g por docena.
- Grado 1 o “grande”: entre 54 y 61 g por unidad y 648 g por docena.
- Grado 2 o “mediano”: entre 48 y 53 g por unidad y 576 g por docena.
- Grado 3 o “chico”: entre 42 y 47 g por unidad y 504 g por docena.

La calidad ha sido definida por Kramer en 1951 como las propiedades que los alimentos poseen y que tienen influencia en la aceptación o rechazo del mismo por el consumidor (Coutts y Wilson, 2007). Hoy en día, los consumidores tomaron conciencia acerca de los alimentos saludables y cambió la percepción pública del “huevo sano”, desde la limpieza de la cáscara, propiedades físicas como así también su inocuidad microbiana (De Reu *et al.*, 2006). Otros consumidores definen calidad de huevo en términos físicos y visibles (por ejemplo tamaño de la cámara de aire, color de la yema, peso de la albúmina,

etc), mientras que otros consumidores expresan su preocupación acerca de la carga microbiana (Jones *et al.*, 2002).

El monitoreo de la calidad del huevo es una característica importante en términos de producción, y estuvo dedicado especialmente a la calidad de la cáscara debido a que cuando éstas presentan fisuras producen pérdida en los productores de huevo (Zita *et al.*, 2009). Sin embargo, la calidad del huevo incluye otras características como el espesor y el peso de la cáscara, la gravedad específica del huevo, la textura y el color, entre otras (Sabri *et al.*, 1999). Otro factor a tener en cuenta es la genética de la gallina ponedora, ya que afecta principalmente al peso del huevo y a las características de la cáscara (Zita *et al.*, 2009).

La calidad de huevo en términos generales se refiere a varios parámetros los cuales definen la calidad interna y externa del huevo. La calidad externa esta enfocada en: limpieza de la cáscara, textura y forma de la cáscara, peso de la cáscara, etc., mientras que la calidad interna hace referencia a la clara (limpieza y viscosidad), tamaño de la cámara de aire, forma y firmeza de la yema, etc. (Coutts y Wilson, 2007).

Respecto al tamaño del huevo de gallina, en general posee un peso promedio entre 60-61 g en todo el mundo. Sin embargo, hay preferencias regionales que pueden influenciar fuertemente en la elección de una determinada línea genética de gallina que produzca huevos que sean más grandes o más pequeños que el promedio mundial (Arthur y O'Sullivan, 2005). En cuanto al peso del huevo de consumo (PHC), es una característica importante que influye tanto en su calidad como en su clasificación (Sekeroğlu y Altuntaş, 2009). Es un parámetro que puede ser determinado sin romper el huevo, mientras que la

información de los demás parámetros de calidad (peso de cáscara, espesor de cáscara, peso de yema y albúmina) son determinados luego de su ruptura (Khurshid *et al.*, 2003).

La cáscara del huevo intacta y limpia es importante para asegurar los requerimientos del consumidor y una dieta saludable, y además podría tener un impacto económico significativo en la industria (Yang *et al.*, 2008). Otra característica importante en la calidad de huevo de consumo es el color de la cáscara, la cual está determinada principalmente por la genética de la gallina ponedora. Las gallinas con plumaje blanco ponen huevos con cáscara blancas (CB) mientras que gallinas con plumaje marrón ponen huevos de cáscara marrón (CM) (Jacob *et al.*, 2008). La razas de gallinas ponedoras principalmente utilizadas en nuestro país son Hy-Line, Lohmann y H&N (Aho y Wright, 2010).

En el caso de huevos de CM, el color de la cáscara es una característica relevante para la percepción del consumidor. En general, un huevo con CM homogéneo es más requerido sobre aquellos con cáscaras irregulares o pálidas. Esto hace que el color de la misma sea un parámetro de calidad importante (Wei y Bitgood, 1990). Los huevos de CM son percibidos por el consumidor como más naturales y saludables que los de CB (Scott y Silversides, 2000).

Beardsworth y Hernández (2004) indicaron que el color es un aspecto clave en la calidad de los alimentos que no debe subestimarse, ya que estudios recientes realizados en los países de Europa confirmaron que el color de la yema (CoY) es uno de los principales parámetros de calidad juzgado por el consumidor. Éste está determinado principalmente por el contenido y perfil de pigmentos carotenoides presentes en el alimento que consumen las gallinas, los cuales provienen fundamentalmente de materias primas como el maíz.

Existen factores que pueden afectar la calidad interna del huevo. Kirunda y Mc Kee (2000) informaron que durante el almacenamiento, la calidad disminuye con el tiempo, y está fuertemente influenciada por la temperatura y humedad de almacenamiento así como por la manipulación de los huevos. Además, estos autores encontraron que cuando disminuye la resistencia de la membrana vitelina, se incrementa el valor de pH tanto de la yema como de la clara.

### **II.3. *Salmonella* y salud pública**

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial. Epidemiológicamente, las infecciones por *Salmonella* pueden causar pequeños brotes en la población en general, sin embargo el 60 – 80 % de los casos son esporádicos. A veces se producen grandes brotes en hospitales, jardines maternos, geriátricos, restaurantes, etc. (Caffer y Terragno, 2008).

*Salmonella* se detecta en productos avícolas, aunque también se han descrito brotes de salmonelosis causados por el consumo de productos de la pesca, leche, ensaladas, etc. El agua es uno de los vehículos de transmisión de este patógeno como así también las personas que trabajan en el procesado y servicio de alimentos (Yousef y Carlstrom, 2006).

Se sabe que los productos de origen avícola, tales como huevos, carne entera o picada de pollo y carne entera o picada de pavo, son una fuente importante de contaminación por *Salmonella* en humanos (USDA, 2008).

Desde 1985 a 1999, en el 80 % de los casos de infecciones esporádicas producidas por SE informado por el CDC, los huevos o alimentos que contenían huevos fueron confirmados como el vehículo de infección (Patrick *et al.*, 2004). Por su parte, en la Unión Europea, SE fue identificada en el 62,5 % y ST en el 12,9 % de los casos de infección en

humanos. Con menos del 2 % de los casos, se identificaron otros serovares como ser SI, SV, SN, SH, SSt, SD, SA y SK (Gantois *et al.*, 2009).

Por su parte el CDC, identificó a SE, ST, SN, SJ, SHe, SSt, SM, SMo y SI como las serovariedades más comúnmente aislados en infecciones de humanos producidas por *Salmonella* en los Estados Unidos. Éstas serovariedades combinadas representan la mayoría (75,2 %) de las infecciones humanas transmitidas por alimentos (ETAs) según notificaciones de la Red de Vigilancia Activa en el 2010 (Food Safety and Inspection Service, 2011).

La infección por este microorganismo, a pesar de no ser una enfermedad de notificación obligatoria en Argentina, constituye una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) en el país y es uno de los patógenos más frecuentemente aislados en infecciones de transmisión alimentaria. En los últimos 20 años, la serovariedad más frecuente en infecciones humanas fue ST quién desplazó a SE del primer lugar en aislamientos de origen humano (Caffer *et al.*, 2010).

Dado al uso generalizado del huevo no sólo como fuente nutritiva, sino como ingrediente esencial en la industria alimenticia por sus propiedades funcionales (capacidad de emulsificar, formar espuma y contribuir con el color y sabor) la inocuidad de este alimento es muy importante (Howard *et al.*, 2011).

#### **II.4. *Salmonella* en la producción avícola y huevo para consumo**

En el sector avícola, tras la introducción en la década de 1960 del método intensivo de explotación de las aves, los casos de salmonelosis aviar estuvieron causados por SP y SG, causantes de la pullorosis y tifosis aviar, respectivamente. Ambas causaban, y aún hoy

causan una alta tasa de mortalidad entre los animales afectados. La disminución de estos dos biovares mediante vacunación, supuso la aparición a partir de la década de 1980 de una nueva infección que se inició principalmente en manadas de reproductoras de la línea de producción de carne, causada por SE, que luego fue aislada de reproductoras de la línea de producción de huevo (Sandoval *et al.*, 1989; Sandoval y Terzolo, 1989).

La Comisión Europea considera dentro de su legislación el control de SE, ST, SH y SV en ponedoras comerciales (Williams, 2008). Chousalkar *et al.* (2010) hacen referencia a la avicultura de Australia, la cual es considerada libre de SE. Sin embargo, se informaron casos de SI, siendo la serovariedad más frecuente en la industria del huevo en ese país.

Con respecto a huevos, en Gran Bretaña se analizaron 4.753 muestras de pool de 6 huevos comercializados en diferentes comercios encontrándose un 0,34 % de prevalencia de *Salmonella*. Todas las cepas (10) fueron aisladas de cáscara, siendo 7 de ellas pertenecientes a SE (Food Standards Agency, 2004). Por otro lado, el Sistema de Alerta Rápido para los Alimentos de la Unión Europea informó a *Salmonella* y sus subespecies como las bacterias más prevalentes (57%) en las notificaciones entre Julio de 2003 a Junio de 2007 y SE estuvo presente en las 2/3 partes de los 27 informes sobre contaminaciones microbianas en productos de huevo (Kleter *et al.*, 2009).

Martínez *et al.* (2005) realizaron un estudio en huevo de consumo en la ciudad de México, analizando 400 huevos limpios y sin fisuras comprados en mercados de diferentes zonas de la ciudad de México. Estos autores aislaron una sola serovariedad en yema de huevo la cual correspondió a SE, aunque encontraron 11 géneros bacterianos contaminantes que podrían llegar a representar un riesgo en la salud pública.

En Argentina sólo existen algunas investigaciones sobre la contaminación de *Salmonella* en huevos y sus empaques. Viora *et al.* (1993) encontraron *Salmonella* en el 50 % de los empaques analizados, siendo SE el serovar presente en todos los aislamientos. De Franceschi y Barrios (1999) analizaron 7.760 huevos provenientes de granjas de la provincia de Buenos Aires, los cuales fueron negativos para este microorganismo y demostraron que huevos de menos de 4 días de puestos serían poco sensibles a la penetración de este patógeno. Además, indicaron que la clara del huevo impediría la multiplicación de *Salmonella*, actuando como bactericida hasta los 7 días y como bacteriostático hasta los 15 días de postura, no siendo la lisozima la responsable de este efecto.

En otro estudio realizado en Argentina por Amer *et al.* (1999) fueron analizadas 220 cáscaras de huevos frescos de gallina, 44 muestras de contenido del huevo y 24 muestras de comidas elaboradas con mayonesa casera. En todas las muestras analizadas no aislaron bacterias pertenecientes al género *Salmonella*.

La contaminación bacteriana de los huevos frescos puede darse por contaminación vertical o contaminación horizontal (Figura 3) (Gast, 2003; Gantois *et al.* 2009; Howard *et al.* 2011). La contaminación horizontal puede deberse a la penetración del microorganismo a través de la cáscara desde el intestino de las aves infectadas o por materia fecal contaminada durante o después de la ovoposición (Gantois *et al.*, 2009). Luego de la postura los huevos están expuestos a una gran variedad de áreas contaminadas, y el alto nivel de materia orgánica húmeda puede permitir la supervivencia y desarrollo de *Salmonella* por proveer protección, así como también una fuente de nutrientes necesarios

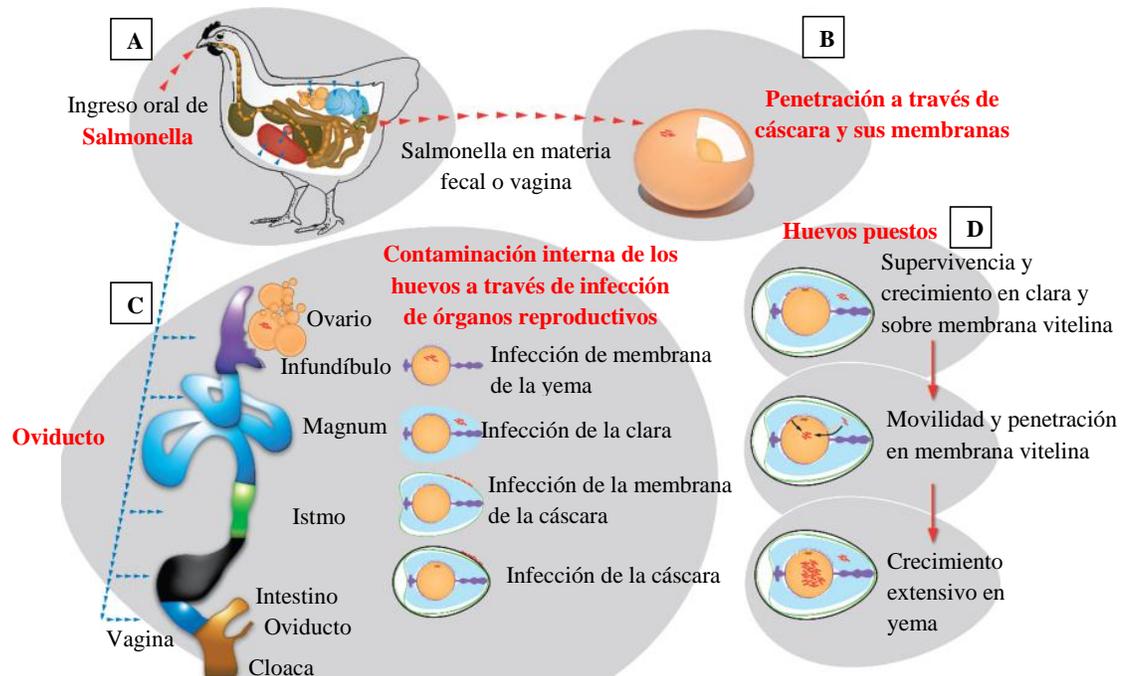
para su desarrollo (Howard *et al.*, 2011). Sin embargo, *Salmonella* también puede permanecer en ausencia de contaminación, principalmente a bajas temperaturas y humedad relativa (Messens *et al.*, 2005).

La contaminación vertical ocurre por contaminación directa de la yema, clara, membranas de la cáscara o cáscara antes de la ovoposición, debido a la infección presente en los órganos reproductivos de la gallina (Gantois *et al.*, 2009). Existen discordancias entre autores con respecto a qué vía de contaminación de huevos es la más frecuente. Barrow y Lovell (1991) afirman que la transmisión horizontal es la forma más importante de contaminación de huevos, mientras que Guard-Pitter (2001) afirma que lo es la transmisión vertical.

Diferentes géneros y especies de bacterias poseen diferentes capacidades para penetrar la cáscara del huevo y de esa manera contaminar el contenido del mismo (Howard *et al.*, 2011). De Reu *et al.* (2006) compararon la capacidad de 7 especies bacterianas aisladas del contenido de huevos y encontraron que *Pseudomonas* sp., SE y *Alcaligenes* sp. poseían un gran potencial para penetrar la cáscara.

Humphrey *et al.* (1991) en su estudio con aves contaminadas naturalmente, observaron que numerosas serovariedades de *Salmonella* como SE, ST y SH fueron aisladas desde cáscara de huevo, aunque sólo SE fue aislada desde el contenido del mismo, y solamente un huevo fue positivo en ambos sitios, sugiriendo que es más probable que ocurra la contaminación interna durante su formación que por penetración a través de la cáscara. Howard *et al.* (2011) reportaron que ST es capaz de sobrevivir dentro del huevo y

presentar un crecimiento neto durante 8 semanas de almacenamiento bajo ciertas condiciones de refrigeración.



**Figura 3.** Patogénesis de contaminación del huevo por *Salmonella* spp. A- Ingreso de *Salmonella* por vía oral. B- Penetración de *Salmonella* a través de la cáscara y sus membranas. C- Contaminación directa de la yema, clara, cáscara y sus membranas. D-Supervivencia y crecimiento de *Salmonella* dentro del huevo (Gantois *et al.*, 2009).

Gast *et al.* (2005) indicaron que el ovario a menudo es colonizado por SE más que el oviducto. En este caso SE podría ser capaz de interactuar con las células del folículo antes de la ovulación, aunque también se observó su unión a las células de la granulosa (Howard *et al.*, 2011).

Gantois *et al.* (2008) encontraron que SE aparentemente posee ciertas características que otras serovariedades no poseen, ya que colonizaría el ovario y los folículos mucho más rápido, con la excepción de ST que también sería capaz de colonizar el ovario. La contaminación de la vagina, el istmo o el magnum podría llevar a la incorporación de *Salmonella* dentro de la cáscara, las membranas o la clara (Howard *et al.*, 2011). Estudios experimentales realizados por Gast y Holt (2001) sugieren que *Salmonella* es más probable que se deposite sobre la membrana vitelina que dentro de la yema durante la colonización en el ovario.

Gantois *et al.* (2008) demostraron que SE, ST y SHe fueron capaces de sobrevivir en el medio ambiente hostil de la clara por 24 h, mientras que SV y SH fueron más susceptibles. Esto podría explicar la razón por la cual SV y SH no estarían asociadas con huevos. Por otra parte, numerosos estudios mostraron que el crecimiento de SE en la clara a temperatura ambiente indicaría que esta serovariedad posee características intrínsecas para contrarrestar el ataque de los componentes antibacterianos presentes en la clara (Gantois *et al.*, 2009).

Cogan *et al.* (2001) inocularon SE en la clara de huevos enteros y observaron un crecimiento más rápido que en la clara sola. Además detectaron un gran número de SE en la yema, demostrando que había una migración hacia la misma. Se cree que las bacterias que son depositadas en la clara, son capaces de migrar, penetrar a través de la membrana vitelina en huevos post-postura alcanzando la yema y adquirir los nutrientes necesarios para su crecimiento y supervivencia en huevos que han sido almacenados a temperatura

ambiente. Esto se debería al envejecimiento de la membrana vitelina durante el almacenamiento lo cual genera fuga de nutrientes hacia la albúmina (Gantois *et al.*, 2009).

La presencia de flagelos es un componente necesario para la migración hacia la membrana vitelina en huevos enteros (Gantois *et al.*, 2009). En las cepas no móviles, como SG y SP, se observó que no fueron capaces de crecer en el contenido del huevo, indicando que la motilidad es un factor importante para poder migrar hacia la fuente de nutrientes (Cogan *et al.*, 2004). De todas maneras, la presencia del flagelo es importante pero no imprescindible, ya que estos dos biovares también pueden contaminar el huevo por transmisión vertical.

Messens *et al.* (2004) observaron que a 20 °C, después de la inoculación con 39 UFC/ml de cepas de *Salmonella* en la clara, SE y serovariedades no-SE fueron capaces de crecer hasta más de 10<sup>6</sup> UFC/ml. En estudios posteriores SE mostró un crecimiento mas lento en la clara a 20 °C y 30 °C, mientras que la mayoría de las otras serovariedades no crecieron, solo sobrevivieron en la clara (Gantois *et al.*, 2009). Por otra parte, ST mostró una baja frecuencia en la invasión a la yema (Gantois *et al.*, 2008), lo que contrasta con los hallazgos de Cogan *et al.* (2004) quienes informaron un gran crecimiento de esta serovariedad en la yema. Debido a la gran variabilidad entre experimentos, la asociación epidemiológica con SE en huevos se asume que no es causada por una estrategia específica de multiplicación de esta serovariedad en los huevos post-postura, porque la mayoría de las serovariedades de *Salmonella* son capaces de multiplicarse en el huevo (Gantois *et al.*, 2009).

## II.5. Género *Salmonella*

Daniel E. Salmon (1850-1914) informó el primer aislamiento de *Salmonella* en cerdos en 1885 y llamó al organismo como *Bacterium choleraesuis*, hoy conocida como *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Choleraesuis (Bhunja, 2008). Éste aislamiento fue realizado junto a su colaborador Theobald Smith (1859-1934) quien trabajó en el USDA. Sin embargo, existe evidencia epidemiológica previa a la identificación de este agente, al cual se lo había asociado al consumo de agua y leche productores de fiebre tifoidea (Mølbac *et al.*, 2006).

El género *Salmonella* causa la salmonelosis, enfermedad de distribución mundial que afecta a humanos y animales de sangre caliente y fría presentando una variación en la morbilidad y mortalidad según la especie y hésped intervinientes. Posee una distribución ubicua y habita el tracto intestinal de animales vertebrados e invertebrados, y su excreción da como resultado la contaminación del agua, alimentos y medio ambiente (Tunes y Vigo, 2007).

Aunque en la salmonelosis está implicada una gran lista de alimentos, la mayoría de los casos son consecuencia del consumo de carne de mamíferos, carne de aves, alimentos marinos, ovoproductos y leche en polvo entre otros. Debido a la gran contaminación ambiental, algunos productos alimenticios están contaminados con *Salmonella* de forma accidental y pueden ser consumidos causando salmonelosis. Entre éstos se encuentran los cereales, la harina de soja, el cacao, el chocolate, el coco y la pimienta entre otros. Los bebés, niños menores de 5 años, ancianos y personas inmunodeprimidas son los individuos más expuestos (Mossel *et al.*, 2002).

Este género bacteriano pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que está formada por 41 géneros y más de 100 especies. Las propiedades que definen a esta familia pueden ponerse en evidencia para afirmar que la cepa es una enterobacteria mediante la identificación bioquímica, estudiando el metabolismo proteico (presencia de ureasa, producción de indol, degradación de triptófano), el metabolismo glucídico (fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, etc), la utilización del citrato como única fuente de carbono, la presencia de enzimas descarboxilasas y desaminasas, la producción de hidrógeno sulfurado, entre las características mas importantes (Tobías y Pantozzi, 2007).

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, de 0,7 a 1,5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, móviles por flagelos peritricos, a excepción de SP y SG que son inmóviles (Tunes y Vigo, 2007). Las colonias presuntivas de *Salmonella* spp. en los medios de aislamiento utilizados se confirman mediante pruebas bioquímicas: desarrollo en agar hierro-tres-azúcares (TSI), utilización de urea de Christensen, determinación de lisina y ornitina descarboxilasa y de arginina dehidrolasa, prueba de la beta-galactosidasa (ONPG), prueba del rojo de metilo, reacción de Voges-Proskauer, prueba de fermentación de la dulcita y utilización del malonato (Terragno *et al.*, 2008).

Este grupo bacteriano son microorganismos quimioorganotróficos con capacidad para utilizar una gran variedad de sustratos orgánicos y metabolizar nutrientes por vía respiratoria y fermentativa. Son oxidasa negativa y catalasa positiva. Generalmente producen sulfuro de hidrógeno, descarboxilan lisina y ornitina y no hidrolizan urea. Aislamientos típicos de *Salmonella* spp. pueden producir ácido y gas a partir de glucosa en TSI y podrían no utilizar la lactosa o sacarosa en el mismo medio o medios selectivos

agarizados, tales como agar verde brillante (VB), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar entérico Hektoen (H) (Montville y Mathews, 2008).

### **II.5.1. Clasificación taxonómica**

*Salmonella* ha sido agrupada en base a sus antígenos somáticos (AgO), flagelar (AgH) y capsular (AgVi). Existen más de 2.400 serovariedades (Tabla 2) las cuales se encuentran agrupadas en tres especies: *Salmonella enterica* (contiene 2.443 serovariedades), *Salmonella bongori* (contiene 20 serovariedades) (Bhunia, 2008; Montville y Mathews, 2008) y *Salmonella* subterránea (Shelobolina *et al.* 2004). Esta última fue aislada de sedimentos de subsuelo, que mediante análisis de secuencia del ADNr 16S indicó un porcentaje del 96% de identidad con *Salmonella bongori* y *Enterobacter cloacae* y mediante análisis fisiológicos y filogenéticos sugirieron que este aislamiento pertenece al género *Salmonella* y representa una nueva especie.

Otro sistema de tipificación de *Salmonella* ha sido basado en su susceptibilidad a bacteriófagos (fagotipificación). Más de 200 fagotipos diferentes (DT) han sido informados. Estos incluyen fagotipo PT 1, 4, 8, DT 104, 108, etc. Otra forma de clasificarlos se basa en la resistencia a antibióticos (Bhunia, 2008) y a técnicas de hibridización del ADN de la bacteria (Terragno *et al.*, 2008).

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* (subespecie I) y llevan un nombre por lo general relacionado con el lugar geográfico donde se aislaron por primera vez. Las serovariedades pertenecientes a las subespecies restantes y a *Salmonella bongori* son de

baja incidencia en enfermedades humanas o animales y se designan con el nombre de la subespecie seguido de su fórmula antigénica (Terragno *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista epidemiológico las cepas del género *Salmonella* pueden clasificarse en 3 grupos (Terragno *et al.*, 2008):

- Las que afectan tanto al hombre como a los animales (la mayoría de las serovariedades responsables de las salmonelosis).
- Las que afectan sólo al hombre (*Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A y C).
- Las que están adaptadas a especies animales (*S. Abortusovis*, *S. Abortusequi*, SG, SP).

**Tabla 2.** Número de serovariedades, especies y subespecies del género *Salmonella* (Shelobolina *et al.*, 2004; Grimont y Weill, 2007).

Especies de <i>Salmonella</i>	Subespecies de <i>Salmonella</i>	Nº de serovariedades
<i>Salmonella enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1.454
	<i>salamae</i> (II)	489
	<i>arizonae</i> (IIIa)	94
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	324
	<i>houtenae</i> (IV)	70
	<i>indica</i> (VI)	12
<i>Salmonella bongori</i> (V)	-	20
<i>Salmonella subterranea</i>	-	1
<b>TOTAL</b>		<b>2.464</b>

### II.5.2. Estructura antigénica

La base de la serotipificación para todas las enterobacterias es similar, ya que se pone en evidencia la presencia de los diferentes antígenos (Terragno *et al.*, 2008).

- Antígeno somático O (AgO, de pared celular): es un polisacárido, termoestable, tipo-específico, presentes en todas las especies y formado por cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS). La cadena de polisacárido del AgO es un polímero de unidades repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena, determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Esta estructura es la que difiere entre las serovariedades. A su vez, los Ags O se dividen en factores mayores (los que identifican el grupo antigénico) y factores menores. Estos últimos pueden ser de dos tipos: a) los que tienen poco o ningún valor discriminativo porque siempre están asociados a otro factor (ej. O12, siempre esta asociado a los factores O2, O4 y O9) y b) los que surgen como consecuencia de una modificación química de los Ags O mayores (Terragno *et al.*, 2008; Tunes y Vigo, 2007).
- Antígeno flagelar H (AgH): es un Ag proteico que posee dos fases diferenciables por medio de aglutinación en tubos. El flagelo es una estructura compleja que consiste en un cuerpo basal, un segmento de unión (“hook”) y un filamento. Este último esta constituido por flagelina, proteína de alto peso molecular y es el que se usa en la serotipificación por su alta

especificidad. En *Salmonella* se han encontrado más de 60 especificidades antigénicas flagelares. Las diferencias antigénicas surgen debido a variaciones en la estructura primaria (contenido en aminoácidos y orden de ubicación) de las distintas moléculas de la flagelina. Estos antígenos son sensibles al calor (Terragno *et al.*, 2008; Tunes y Vigo, 2007).

- Antígeno capsular Vi (AgVi): El antígeno capsular es un polisacárido, constituido por ácido N-acetilglucosaminourónico. Entre los antígenos capsulares de las Enterobacterias, el Vi es el más importante en el género *Salmonella*. Se encuentra sólo en tres serovariedades: *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y en algunas cepas de *S. Dublin*. Es termolábil y le confiere a la bacteria resistencia a la fagocitosis (Terragno *et al.*, 2008; Tunes y Vigo, 2007).

### **II.5.3. Patogenicidad**

La infección por *Salmonella* depende de la capacidad de la bacteria de colonizar (adhesión) e ingresar (invasión) a las células intestinales, de replicar en el interior de las células y de resistir la digestión de los fagocitos, lo que facilita su difusión en el organismo (Montville y Mathews, 2008).

Los genes de virulencia se encuentran localizados en 12 islas de patogenicidad (SPI, por sus siglas en inglés), algunas de ellas localizadas cerca de los genes del ARNt (Ácido ribonucleico de transferencia). Se cree que algunas SPIs son adquiridas por transferencia horizontal, mientras que otros genes son altamente conservados. Los genes de virulencia implicados en la fase intestinal de la infección están localizados en las SPI 1 y SPI 2; los restantes son necesarios para producir la infección sistémica, supervivencia intracelular,

expresión de las fimbrias, resistencia a antibióticos y absorción de hierro e iones  $Mg^{2+}$  (Bhunia, 2008).

La SPI 1 es un segmento que fue adquirido por transferencia horizontal de genes durante la evolución y contiene 31 genes (responsables para la invasión de células no fagocíticas) y el componente de secreción tipo III (TTSS, por sus siglas en inglés) designado como el aparato de secreción Inv/Spa-Type III. Algunos de los genes implicados son: *invA*, *invB*, *invF*, *invG*, *hilA*, *sipa*, *sipC*, *sipD*, *spar*, *orgA*, *sopB* y *sopE* (Bhunia, 2008). Los genes presentes en las SPIs son blancos moleculares utilizados para la detección de *Salmonella* en alimentos mediante técnicas de biología molecular (Montville y Mathews, 2008).

#### **II.5.4. Diagnóstico**

Se debe destacar que existen muchos procedimientos distintos para el aislamiento de *Salmonella*. El método ideal debe tener una alta sensibilidad y especificidad, y ser al mismo tiempo simple, rápido y económico. Ningún método cumple con todos los criterios y ninguno es óptimo para todas las condiciones. Por lo tanto, es aconsejable consultar la literatura antes de elegir un método para un determinado propósito y es recomendable la comparación frecuente de los métodos de cada laboratorio con los nuevos métodos que surjan (Caffer y Terragno, 2008).

El análisis de éste microorganismo se basa en determinar su presencia o ausencia, utilizándose, por regla general, los métodos de detección más que los recuentos en placas. Esto se debe a dos cuestiones básicas: por un lado, estos microorganismos suelen estar en bajo número y acompañados por una flora variada y numerosa que dificulta su aislamiento

y, por otra, la sola presencia de este microorganismo en una muestra representa un problema sanitario o de salud pública. Así, la detección se basa en las propiedades de cultivo, bioquímica y serológica de este microorganismo (Yousef y Carlstrom, 2006).

Los métodos de detección pueden ser variados, dentro de los cuales tenemos:

- Aislamiento: La detección de este microorganismo en muestras donde las células están estresadas debido a un daño físico o químico o muestras de alimentos, materia fecal y órganos de animales sin síntomas de enfermedad, requiere seguir el siguiente procedimiento:
  - a) pre-enriquecimiento no selectivo (provee nutrientes para la multiplicación de *Salmonella* y otros microorganismos de la flora acompañante, repara la célula dañada, rehidrata y diluye sustancias inhibitoras o tóxicas), b) enriquecimiento selectivo (permite el crecimiento de *Salmonella* inhibiendo la flora acompañante. Se les puede adicionar inhibidores como antibióticos por ejemplo novobiocina), c) Siembra en medios agarizados selectivos y diferenciales, d) caracterización bioquímica y e) confirmación serológica. Todo el procedimiento requiere de 5 a 7 días para completarse (Herrera, 2001; Bell y Kyriakides, 2002; Riemann y Cliver, 2006; Bhunia, 2008). Los medios utilizados en este procedimiento se detallan en la Tabla 3. En muestras de animales o humanos con síntomas, donde el número de células viables en la muestra es elevado y donde el tiempo es un factor crítico, podría

realizarse una siembra directa en medios agarizados selectivos y diferenciales (Riemann y Cliver, 2006). Diferentes procedimientos que utilizan diferentes combinaciones de pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo y medios agarizados de aislamientos se encuentran disponibles por una serie de organismos de establecimientos de normas (Herrera, 2001; Riemann y Cliver, 2006) tales como la norma ISO (International Organization of Standardization), AOAC/FDA (Asociation of Official Analytical Chemists/Food and Drug Administration/Bacteriological Analytical Manual), APHA (American Public Health Association), NMKL (Nordic Committee on Food Analysis), IDF (International Dairy Federation), BSI (British Standards) etc.

**Tabla 3.** Medios de Cultivos utilizados en los métodos de aislamiento de *Salmonella* (Bell y Kyriakides, 2002).

<b>Pre-enriquecimiento</b>	<b>Enriquecimiento Selectivo</b>	<b>Medios Selectivos-Diferenciales</b>
Caldo Lactosa (CL)	Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV)	Agar Hektoen Enterico (H) Agar Sulfito de Bismuto (SBi)
Caldo Tripteína de Soja (TSB)	Caldo peptona de soja Rappaport-Vassiliadis (RVPB)	Agar Xílosa lisina desoxicolato (XLD) Agar Desoxicolato-Citrato (DC)
Caldo Nutritivo (CN)	Caldo Muller-Kauffmann Tetrionato (MKTT)	Harlequin Salmonella ABC Agar sacarosa desoxicolato citrato lactosa (DLCS)
Agua Peptona Bufferada (BPW)	Caldo Selenito-Cistina (SC)	Agar Rambach (AR) Agar cromogénico SM-ID
	Caldo Selenito F (CSF)	Agar Xílosa lisina tergitol 4 (XLT4) Agar Salmonella Shigella (SS) Agar Sulfito de Bismuto (ASBi) Agar Mac Conkey (MC)
	Agar semi-sólido Rappaport Vassiliadis modificado (MSRV)	Agar Verde brillante cristal violeta lisina manitol (MLCB) Agar Verde Brillante (VB)

La serotipificación es probablemente el mejor sistema de tipificación fenotípica bacteriana. Tiene un alto poder discriminatorio y provee información con significado epidemiológico, desde el punto de vista de la vigilancia basada en el laboratorio. La disponibilidad y el costo de antisueros de alta calidad es un problema en algunos países y regiones (Terragno *et al.*, 2008). Este procedimiento es útil para determinar la fórmula antigénica completa de aislamientos individuales de *Salmonella* spp. (Montville y Mathews, 2008). La serotipificación basado en los antígenos AgO, AgH y AgVi de acuerdo al esquema de Kauffmann-White, permite determinar más de 2.400 serovariedades reconocidas por el WHO Collaborating Centre for *Salmonella* Serotyping (Popoff, 2001). El AgO va seguido de números arábigos separados por comas, por ej. ST O:1,4,5,12; SE O:1,9,12. Con respecto al AgH, unas pocas serovariedades de *Salmonella* poseen una sola fase flagelar; esas cepas se llaman monofásicas, SE (9,12:g,m:-), *Salmonella* Typhi (9,12 [VI]:d:-). En el ejemplo la única fase flagelar está dada por los factores g,m y d, respectivamente y el signo (-) indica ausencia de la segunda fase flagelar. Sin embargo, la gran mayoría de las serovariedades tienen dos fases flagelares o sea son cepas difásicas; por ej., ST (1,4,5,12:i:1,2) y SH (6,8:z<sub>10</sub>:e,n,x), que expresan la fase 1 constituida en los ejemplos por los antígenos: i ó z<sub>10</sub> y la fase 2 por

los antígenos: 1,2 y e,n,x respectivamente (Montville y Mathews, 2008; Caffer y Terragno, 2008).

De acuerdo a esto, las especies y subespecies se designan con letra itálica, no así las serovariedades. La primera letra de la designación de serovariedad va en mayúscula. Una nomenclatura internacional ha sido aceptada para *Salmonella* en base a las recomendaciones de la WHO Collaborating Centre. El uso solo del género y la serovariedad ha sido aceptado (Brenner *et al.*, 2000).

- Métodos rápidos: en esta metodología, también se necesita enriquecer las muestras. Estas técnicas permiten ahorrar tiempo cuando se aplican en la investigación de un gran número de muestras para excluir las que son negativas a *Salmonella*. Los resultados positivos de estos análisis necesitan una confirmación posterior por métodos convencionales. Las técnicas rápidas consisten en métodos moleculares e inmunológicos (Yousef y Carlstrom, 2006). Dentro de estos métodos tenemos: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), separación inmunomagnética, aglutinación en placa, inmunocromatografía, técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fingerprinting, RT-PCR, etc. (Bell y Kyriakides, 2002).

El desarrollo de estos últimos métodos ha reducido el tiempo de detección a 18-24 h, pero ninguno de estos métodos puede detectar *Salmonella* spp. en un producto alimenticio al instante, por lo que esto sigue siendo un objetivo muy deseado. El obstáculo

fundamental en estos métodos es el número de microorganismos necesarios, los cuales deben estar en un rango entre  $10^4$  o  $10^5$  para poder ser detectados (Riemann y Cliver, 2006).

El genoma de *Salmonella* consiste en una variedad de elementos genéticos móviles que pueden jugar un rol en la evolución de este patógeno. Muchos determinantes de virulencia de este microorganismo residen en profagos, integrones, islas de patogenicidad y plásmidos y la evolución de *Salmonella* en bacteria patógena responde a la adquisición de estos elementos que contribuyen a la capacidad de virulencia de este organismo (Kelly *et al.*, 2009).

La tecnología de la PCR representa un procedimiento rápido con alta sensibilidad y especificidad para detectar *Salmonella* en una gran variedad de alimentos. Numerosos ensayos de PCR fueron diseñados para varios genes de esta bacteria, tales como el ARNr 16S, *agfA* y plásmidos asociados a la virulencia de este microorganismo. El gen *invA* es el más usado en una gran variedad de alimentos ya que es específico para el género *Salmonella* (Chiu y Ou, 1996; Loongyai *et al.*, 2010).

El gen *invA* forma parte de la isla de patogenicidad I (IPS-I) y codifica una proteína (InvA) que forma parte del sistema de secreción tipo III involucrado en la interacción inicial e invasión de células epiteliales intestinales (Malorny *et al.*, 2003 a).

Existen numerosos trabajos reportando la amplificación de genes específicos para la identificación rápida de *Salmonella* spp. Rahn *et al.* (1992) usaron primers seleccionados desde la secuencia del gen *invA* de *Salmonella*. Estos autores evaluaron 630 cepas, de las cuales 4 cepas de dos serovariedades de la subespecie I fueron falsos negativos. Galán y Curtis (1991) observaron que miembros de la subespecie III son deficientes en el operón

*invABC*, necesario para la invasión en las células del epitelio intestinal, y no se sabe si esta deficiencia influye en la detección de esta subespecie por PCR.

Los avances en la tecnología de biología molecular, particularmente de PCR permitieron una identificación confiable del microorganismo y su vigilancia. Esta técnica se ha vuelto una herramienta para la investigación de enfermedades transmitidas por alimentos e identificación del agente etiológico responsable (Riyaz-UI-Hassan *et al.*, 2004).

Un análisis de la evolución del género *Salmonella* reveló que se origina de un mismo antecesor (origen monofilético) y que durante su evolución las serovariedades de *Salmonella* adquirieron muchos genes por fagos o plásmidos mediado por transferencia horizontal. Estos genes distinguen este género de otras bacterias por lo que son buenos candidatos para el desarrollo de métodos basados en ADN para la identificación de las serovariedades (Bäumler *et al.*, 1997).

Recientemente, los ensayos de PCR dirigidos a secuencias de ADN específicas de *Salmonella* han mejorado con respecto a la rapidez, sensibilidad y especificidad. Estos incluyen ensayos basados en la amplificación de los genes *invA*, *agfA*, *iagAB*, *spvR*, *ompC*, *oriC*, etc, y la principal diferencia entre estos ensayos radica en su especificidad (Bäumler *et al.*, 1997).

Numerosos juegos de primers han sido publicados para la amplificación de ADN de *Salmonella* spp. sin embargo todos difieren en su sensibilidad, precisión y aplicabilidad (Malorny *et al.*, 2003 a).

Soumet *et al.* (1999) desarrollaron una PCR múltiple para la identificación de ST y SE de hisopados del medio ambiente de granjas de pollos, donde desarrollaron dos sets de primers específicos que permitieron identificar a estas dos serovariedades. Dichos primers amplifican los genes *fliC* (en ST) y *sefA* (en SE). En contraposición a los hallazgos realizados por estos autores, Malorny *et al.* (2003 a) indicaron que el gen *sefA* es único para *Salmonella* serogrupo D como SG, SP, SD, etc; por lo que no sería específico para detectar SE.

Malorny *et al.* (2007) desarrollaron un par de primer que amplifica el gen Prot6E (Prot6e-5 y Prot6e-6), el cual codifica una fimbria de superficie específica de SE que estaría implicada en alterar la interacción con los componentes de la albúmina. Dichos primers mostraron una gran sensibilidad para detectar SE, y más aún cuando estas cepas son rugosas.

#### **II.5.5. Utilización del ADNr 16S en cepas de *Salmonella* spp.**

Los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados que en bacterias poseen un coeficiente de sedimentación 70S y puede disociarse en dos subunidades la 50S (subunidad grande) y la 30S (subunidad pequeña), esta última subunidad es la que posee el ARNr 16S (Rodicio y Mendoza, 2004). Los genes que codifican los ARNr están organizados en operones, donde cada operón ribosómico (*rrn*) incluye genes para los ARNr 23S, 16S y 5S, separados por regiones espaciadoras o intergénicas (IG) (Pérez Luz *et al.*, 1998).

El ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. El ARNr 16S también llamado ADNr 16S, es codificado

por el gen *rrs*, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. El análisis de estas secuencias de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características denominadas “secuencias firmas”, las cuales aparecen en todos (o en la mayor parte) de los miembros de un determinado grupo filogenético, por lo que pueden utilizarse estas secuencias para ubicar cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio y Mendoza, 2004).

El número de copias del operón ribosómico por genoma bacteriano varía considerablemente, siendo constante a nivel de especie, género e incluso familia. De esta manera, se sabe que por ejemplo *Bacillus subtilis* posee 10 operones, *E. coli* y *Salmonella* sp. poseen 7, *Clostridium perfringens* posee 9, etc. (Rodicio y Mendoza, 2004; Tsai-Hsin *et al.*, 2005).

Los primers universales dirigidos a secuencias conservadas del gen ARNr 16S y a regiones variables pueden ser usados para amplificar una porción de este gen. El producto de PCR luego puede ser secuenciado y la especie bacteriana ser identificada mediante la realización de búsquedas de homologías con bases de datos de secuencias de ADN (Fratamico y Kawasaki, 2008). Recientemente el gen ARNr 16S ha sido usado para el diseño de sondas de ADN y primers específicos para algunos géneros de bacterias tales como *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Bacillus cereus* (Yu-Cheng *et al.*, 2006). Esta metodología es muy usada y con buenos resultados en bacterias lácticas (Kim *et al.*, 2006).

Los primers diseñados a partir de secuencias del ARNr 16S bacteriano obtenido de la base de datos en un banco de genes, no pueden permitir la detección de todas las cepas de una especie bacteriana. A veces es difícil encontrar sitios específicos sobre el ARNr 16S para la identificación de bacterias a nivel de especie (Yu-Cheng *et al.*, 2006).

### **II.5.6. Sensibilidad a los antimicrobianos**

Los ATB son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias y hongos) o sintetizados por métodos de laboratorio, cuya función es inhibir el crecimiento o destruir a otros microorganismos. Estos compuestos difieren en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismos de acción y espectro antimicrobiano (Patiño, 2003).

Los ATB son usados en medicina humana y veterinaria para el tratamiento y prevención de enfermedades. También pueden ser utilizados como agentes profilácticos en el agua de las aves sanas y como promotores del crecimiento en concentraciones sub-terapéuticas en la alimentación. Bacitracina, clortetraciclina, tilosina, neomicina, oxitetraciclina, virginiamicina y otros se utilizan para estos fines (Phillips *et al.*, 2004; Apata, 2009). Las clases de antibióticos usados como terapéuticos en avicultura incluyen: aminoglucósidos, tetraciclinas,  $\beta$ -lactámicos, fluorquinolonas, macrólidos, polipéptidos, sulfonamidas y trimetoprima (Stolker y Brinkman, 2005).

En animales de granja tratados con ATB, los residuos de estos compuestos son eliminados en el medio ambiente, lo cual genera una presión selectiva sobre la población bacteriana generando resistencia (Helmuth, 2000). La manutención de animales en

condiciones de crianza intensiva, bajo presión quimioterápica, es la forma ideal de generar resistencias. Este hecho fue demostrado por primera vez en 1957 por Smith, en cerdos tratados con tetraciclinas en la dieta. En esa época, la actividad promotora del crecimiento de los antibióticos fue descubierta y utilizada en forma masiva (Errecalde, 2004).

En las granjas avícolas, los ATB son usados en gran escala como promotores del crecimiento ya que mejoran la velocidad de crecimiento de las aves disminuyendo el moco de la membrana intestinal, favoreciendo la absorción, aumentando la asimilación, entre otros. Además, otorgan un ambiente favorable para microorganismos benéficos, dañando bacterias patógenas y reduciendo la formación de toxinas (Casawell *et al.*, 2003; Nisha, 2008; Alm El Dein y Elhearon, 2010).

En medicina veterinaria existen casos bien documentados de bacterias del género *Salmonella* y otras entéricas Gram negativas como *Escherichia coli* que pueden afectar también al hombre. Un importante elemento de riesgo es el enorme potencial de intercambio genético que existe en el intestino, esta es una de las causas que explican que sean estos dos géneros Gram negativos los que representen los mayores riesgos de transferencia zoonótica de resistencias (Errecalde, 2004).

Alcaine *et al.* (2007) informaron que de las 10 serovariedades comúnmente informadas por el CDC, aisladas de infecciones humanas en los Estados Unidos, al menos 8 aislamientos mostraron resistencia a 5 o más ATB. Se observó que ST presentó 1 o 2 patrones de multiresistencia incluyendo resistencia a AMP-K-S-SXT-TE y a AMP-C-S-SXT-TE Para SHe se observo multiresistencia a AMP-AMC-KF-Ceftiofur. Esta

multirresistencia también fue identificada en otras serovariedades de importancia epidemiológica tales como SA, SD, SH y SSenf.

Recientemente fue aislada del ganado una cepa multirresistente de ST, la cual es muy patógena tanto para otros organismos como para el hombre. Esta es una cepa, al parecer originada en Inglaterra y difundida luego a todos los continentes. La misma pertenece al fagotipo DT 104 y causa enfermedad severa en aves, bovinos y cerdos. Este microorganismo es el más utilizado en la argumentación sobre uso de antibióticos en animales y desarrollo de resistencias que puedan causar enfermedad en el hombre (Errecalde, 2004).

Los ATB que antes resultaban eficaces frente a diferentes cepas bacterianas se muestran hoy muchas veces totalmente ineficaces. Se sabe que la subdosificación más o menos continua de cualquier ATB termina generando una población microbiana resistente, que se perpetúa en el ecosistema (Colusi, 1994). Una ruta eficiente en la adquisición de resistencia es a través de elementos genéticos, incluido plásmidos, transposones e integrones (Cabrera *et al.*, 2006). Las cepas multirresistentes resultantes por la adquisición de estos elementos genéticos han sido encontradas en todo el mundo y son una gran preocupación en la salud pública y la inocuidad de los alimentos (Alcaine *et al.*, 2007).

La detección y monitoreo de la multirresistencia es importante para modificar la selección de los ATB para el tratamiento de la salmonelosis y para evaluar el riesgo de expansión de cepas multirresistentes (Yang *et al.*, 2002; Grazziani *et al.*, 2007). Existe gran variedad de técnicas de laboratorio que permiten evaluar la sensibilidad de bacterias *in vitro*, dentro de éstas se encuentran las pruebas de difusión en discos y pruebas

de dilución en caldo y agar, las cuales están normatizadas y recomendadas por el NCCLS (Mantilla *et al.*, 2010).

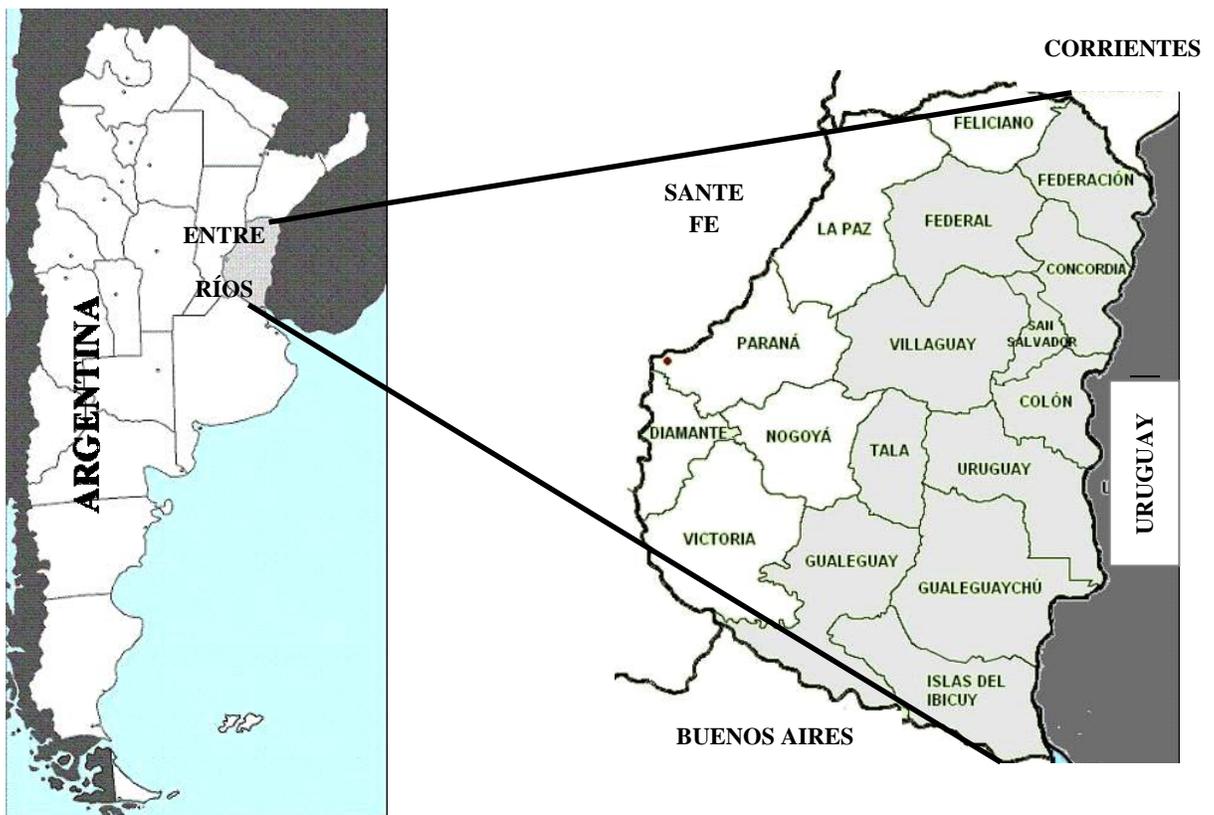
## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **III.1. Muestreo de huevos en supermercados**

Se tomaron un total de 5.424 huevos almacenados a temperatura ambiente, desde 113 supermercados pertenecientes a 14 ciudades (11 departamentos) del centro-este de la provincia de Entre Ríos (Tabla 4). El período de estudio fue de Marzo de 2007 a Noviembre de 2009 (Figura 4).

El número de supermercados muestreados por ciudades fue obtenido por relevamiento de información a través de páginas de internet, personas que vivían y/o conocían las respectivas ciudades y agencias de extensión del INTA. De esta manera, se tomó el 100% de los supermercados de las 14 ciudades muestreadas. Se consideró como supermercado a los que cumplían con la definición propuesta por la Real Academia Española, quien define al mismo como un “establecimiento comercial de venta al por menor en el que se expenden todo género de artículos alimenticios, bebidas, productos de limpieza, etc., y en el que el cliente se sirve a sí mismo y paga a la salida”.



**Figura 4.** Departamentos de la provincia de Entre Ríos (en color gris) donde se encontraban los supermercados utilizados para el muestreo realizado durante el período Marzo 2007- Noviembre 2009.

Se tomaron el 50% de huevos de cáscara blanca (CB) y el 50% de huevos de cáscara marrón (CM). Cuando no hubo huevos de CB y/o CM para la cantidad de muestras necesarias, se tomaron los huevos del color disponible en el supermercado. De cada supermercado se tomaron 10 muestras de 6 huevos en diferentes envases (maple de cartón, maple de telgopor, bolsa de polietileno y papel de diario). Los mismos fueron transportados a temperatura ambiente hasta el laboratorio de Sanidad Aviar de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Concepción del Uruguay. En aquellos supermercados donde no había

envases de 6 huevos, se tomaron 2 maples de 30 huevos. Para el análisis se tomaron 8 pooles de 6 huevos o 4 muestras de 6 huevos de cada maple de 30 huevos.

**Tabla 4.** Números (N°) de supermercados muestreados en las diferentes ciudades de la provincia de Entre Ríos.

Departamentos de Entre Ríos	Ciudades	N° supermercados muestreados
	Colón	5
Colon	San José	5
	Villa Elisa	12
Concordia	Concordia	17
Federación	Federación	6
Federal	Federal	5
Galeguay	Galeguay	9
Galeguaychú	Galeguaychú	12
Islas del Ibicuy	Villa Paranacito	3
San Salvador	San Salvador	7
Tala	Rosario del Tala	3
	Basavilbaso	5
Uruguay	Concepción del Uruguay	15
Villaguay	Villaguay	9
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>14</b>

### III.2. Características físicas y pH del huevo de consumo

#### III.2.1. Peso del huevo de consumo (PHC) y área total del huevo para consumo (ATH)

Los huevos fueron pesados individualmente en condiciones de esterilidad con balanza electrónica, escala 0,1 g (Precisa 3000 D, Zurich, Suiza). De acuerdo a los pesos obtenidos fueron clasificados en 1S (extra grande,  $\geq 62$  g), 1 (grande, 54-61 g), 2 (medianos, 48-53 g) y 3 (pequeños, 42-47 g), según lo propuesto por el Código Alimentario

Argentino (1994) y el Decreto N° 4238/68 (1968). La homogeneidad del peso del huevo se midió por el coeficiente de variación (CV) de pools de 6 huevos.

El ATH fue calculado en  $\text{cm}^2$  según la fórmula propuesta por Peebles y Mc Daniel (2004):

$$ATH = 3,9782 \times PH^{0,7056}$$

### **III.2.2. Observación de la limpieza de la superficie de la cáscara y determinación del peso de cáscara (PC), % de cáscara (%C) y espesor de cáscara (EC) del huevo para consumo**

Los datos de PC, % C y EC fueron calculados en el 50%, 50% y 44% de los huevos analizados respectivamente.

El porcentaje de huevos con superficie sucia se determinó por observación macroscópica y se clasificaron según lo propuesto por el Código Alimentario Argentino (1994) y el Decreto N° 4238/68 (1968).

$$\% \text{ huevos con superficie sucia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ huevos con superficie sucia}}{\text{N}^\circ \text{ total de huevos analizados}} \times 100$$

Las cáscaras fueron pesadas después de la ruptura del huevo y separado su contenido (clara y yema) en condiciones de esterilidad, en balanza electrónica, escala 0,1 g (Precisa 3000 D, Zurich, Suiza). El % C fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% C = \frac{PC}{PH} \times 100$$

El EC fue determinado en cáscaras, incluidas sus membranas testáceas, que fueron desinfectadas como se describe más adelante, mediante especímetro, escala 0,01 mm (Schwyz, Argentina). Se tomaron 4 valores en diferentes zonas de la cáscara y se obtuvo un promedio de la medida del espesor, según lo propuesto por Anderson *et al.*, 2004.

### **III.2.3. Color de yema de huevo (CoY)**

Los huevos fueron quebrados en esterilidad, y el CoY fue determinado por comparación visual con los colores del abanico colorimétrico de la escala de DSM (ex-Roche, Suiza). El rango de colores del mismo va desde 1 (amarillo pálido) a 15 (naranja fuerte) (Vuilleumier, 1969).

### **III.2.4. Determinación de pH en pool de clara y/o yema (CY, CL y Y)**

El contenido del huevo se obtuvo desinfectando la cáscara por inmersión en alcohol etílico al 70% por 10 min. A su término, los huevos se sumergieron en agua destilada a 100 °C por 5 s. (Gast, 1993; Himathongkham *et al.*, 1999). Luego, los huevos fueron quebrados en esterilidad, la cáscara fue conservada para determinar el EC y el contenido (en pools de 6 huevos) fue dividido en mezcla de CY, CL ó Y dentro de bolsas estériles. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas en un homogeneizador (Stomacher 400 circulator, Seward, Inglaterra) durante 2,5 min a 2500 rpm. El pH fue determinado con un peachímetro (OAKTON, Singapur).

### **III.2.5. Análisis estadístico**

Los resultados fueron informados como el promedio de la media aritmética  $\pm$  el desvío estándar. Las diferencias de medias para PHC, ATH, PC, %C, EC, CoY, pH de CY,

---

CL y Y fueron evaluadas por el análisis de la varianza (ANOVA). Los resultados fueron significativamente diferente con valores de  $P < 0,05$  (Rossman y Chance, 1998). La diferencia entre los coeficientes de correlación entre PHC y PC, PHC y %C y entre PHC y ATH fueron analizados mediante una prueba de hipótesis para diferentes proporciones utilizando el programa OCTAVE, desarrollado por el Grupo de Métodos Numéricos de la Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional de Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina (Proyecto 25D041).

### **III.3. Estudio comparativo entre métodos bacteriológicos y PCR para la detección de *Salmonella* spp. en pool de CY contaminadas experimentalmente**

#### **III.3.1. Cepas de *Salmonella* utilizadas y control de pureza**

Se utilizaron 8 cepas de *Salmonella* spp, de las cuales 4 fueron cepas móviles (SE, ST, S y SH) y 4 fueron cepas inmóviles (dos SP y dos SG). Las serovariedades, origen y nomenclatura de los cultivos de colección se detallan en la Tabla 5. Se utilizaron cepas pertenecientes a las colecciones de cultivos de Estados Unidos (ATCC), del laboratorio de Sanidad Aviar de la EEA-Concepción del Uruguay y del Laboratorio de Bacteriología-EEA Balcarce. Las cepas fueron activadas desde agar nutritivo (AN) (Acumedia, Lansing, Michigan) en caldo tripteína de soja (CTS, Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 h a 37 °C. A su término fueron sembradas en placas de agar xilosa lisina desoxicolato (XLD, Oxoid, Basingtoke, Hampshire, England) y agar tripteína de soja (ATS, Acumedia, Lansing, Michigan) en estrías por agotamiento e incubadas 24 h a 37 °C para confirmar la pureza de los cultivos.

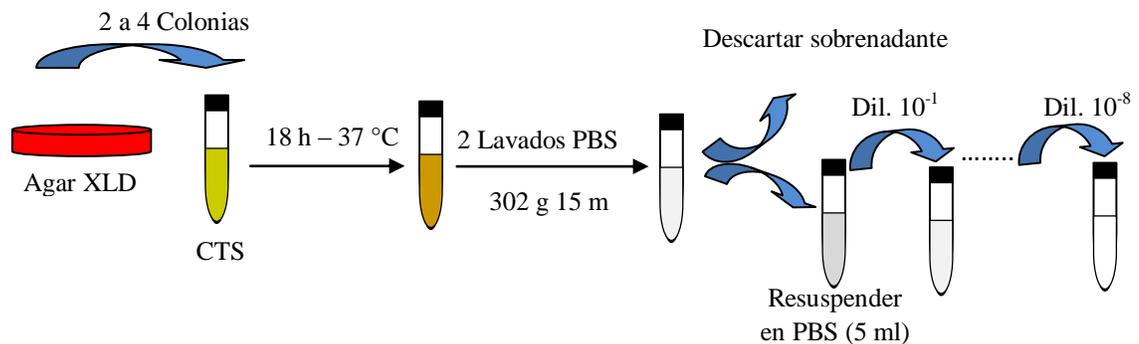
**Tabla 5.** Cepas de *Salmonella* utilizadas en la comparación de diferentes métodos de detección.

<b>Cepas de <i>Salmonella</i></b>	<b>Colección de cultivo</b>	<b>Origen</b>
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	ATCC*	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	ATCC*	Heces humanas
<i>Salmonella</i> Infantis CUB 05/08	EEA INTA C. del Uruguay	Carne de pollo
<i>Salmonella</i> Hadar CUB 13/08	EEA INTA C. del Uruguay	Cáscara de huevo
<i>Salmonella</i> Pullorum ATCC 13036	ATCC*	Huevo
<i>Salmonella</i> Pullorum INTA 90/142	EEA INTA Balcarce	Aves
<i>Salmonella</i> Gallinarum INTA 03/121	EEA INTA Balcarce	Aves
<i>Salmonella</i> Gallinarum CUB 05/10	EEA INTA C. del Uruguay	Clara y Yema

\*ATCC: American Type Culture Collection.

### III.3.2. Preparación del inóculo bacteriano

Se tomaron de 2 a 4 colonias de las serovariedades antes descritas desde placas de XLD y se resuspendieron en CTS, incubándolas durante  $18 \pm 2$  h a  $37^\circ\text{C}$ . A su término, se hicieron 2 lavados en buffer fosfato pH 7,4 (PBS). Luego, se resuspendieron al volumen original (5 ml) con el mismo buffer y a partir de allí se realizaron diluciones decimales en agua peptonada 0,1%. (Figura 5).



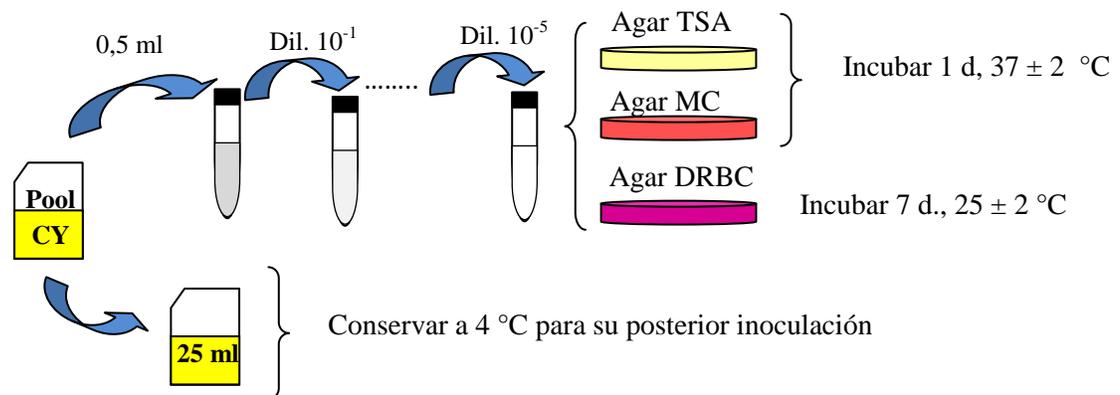
**Figura 5.** Preparación del inóculo bacteriano a partir del cultivo puro de las cepas ensayadas. XLD: Agar xilosa lisina desoxicolato; CTS: Caldo triptéina de soja; PBS: Buffer fosfato.

### III.3.3. Obtención de las muestras de CY e inoculación experimental

Para cada cepa ensayada, se utilizaron 24 huevos tomados de supermercados de la ciudad de Concepción del Uruguay, Entre Ríos. El contenido de los mismos se obtuvo de la misma manera que la descrita en el punto III.2.4. Antes de realizarse la inoculación en CY, se determinó el total de bacterias, enterobacterias y hongos en ATS, agar Mac Conkey (MC, Acumedia, Lansing, Michigan) y agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC, Oxoid, Basingtoke, Hampshire, Inglaterra) respectivamente. Para ello se tomaron 0,5 ml del total del pool de CY y se hicieron diluciones decimales en agua peptonada 0,1 %. Posteriormente se sembraron (todas las diluciones) en los medios de cultivos antes mencionados y se incubaron 24 h a 37 °C en los medios ATS y MC. En el DRBC se incubó a  $25 \pm 2$  °C durante 7 días.

Se tomaron 25 ml del pool de CY en bolsas estériles individuales para ser inoculadas con las diferentes concentraciones de *Salmonella* (figura 6). Se inocularon desde

$5 \times 10^0$  a  $6,2 \times 10^6$  UFC/25 ml para cepas móviles y de  $5 \times 10^0$  a  $1,3 \times 10^6$  UFC/25 ml para cepas inmóviles. El ensayo se hizo por triplicado.



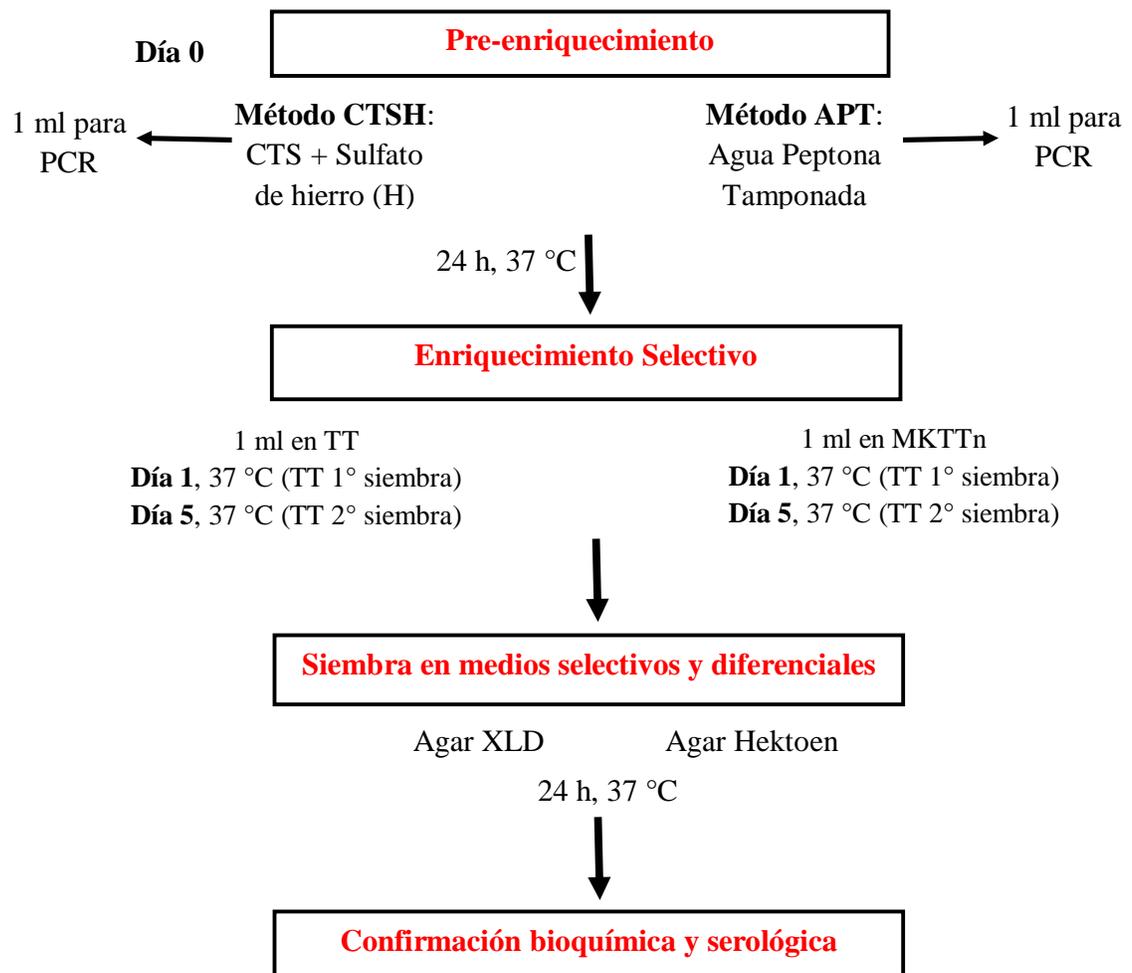
**Figura 6.** Preparación de las muestras de CY y control de contaminantes bacterianos y fúngicos en diferentes medios de cultivos. TSA: Agar tripteína de soja; MC: Agar Mac Conkey; DRBC: Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol.

### III.3.4. Límite de detección de *Salmonella* spp. en pool de CY contaminadas experimentalmente

La detección de *Salmonella* en muestras de CY contaminadas experimentalmente se determinó en base a los procedimientos propuestos por el Manual Analítico de Bacteriología (FDA/BAM, Wallace y Hammack, 2011) y la Norma ISO 6579 (2002). Con respecto a la técnica de BAM, sólo se utilizó como medio de enriquecimiento selectivo el caldo Tetratiano base (TT, Acumedia, Lansing, Michigan) adicionado con 20 ml/l de solución de iodo-ioduro de potasio (Anedra, Argentina), 40 mg/ml de novobiocina (N, Sigma, Steinheim, Alemania) y de solución de verde brillante al 0,1 % (p/v) (Sigma, Steinheim, Alemania). Con respecto a la Norma ISO 6579, se utilizó solo como medio de

enriquecimiento selectivo al caldo Mueller-Kauffmann Tetracionato/Novobiocina (MKTTn, OXOID, Basingtoke, Hampshire, Inglaterra). La figura 7 muestra el flujograma de trabajo para ambos métodos.

Para el método basado en BAM, las muestras de CY contaminadas con diferentes concentraciones de este microorganismo fueron pre-enriquecidas en 225 ml de CTS adicionado con 35 µg/ml de sulfato de hierro II (Anedra, Argentina). La mezcla fue incubada a 37 °C, 24 h. A su término 1 ml del caldo incubado fue tomado para PCR (PCR-CTSH) y 1 ml fue transferido a 10 ml de caldo TT e incubado a 37 °C durante 5 días. Para el método basado en la norma ISO 6579, las muestras de CY contaminadas experimentalmente fueron pre-enriquecidas en Agua Peptona Tamponada (APT, Merck, Darmstadt, Alemania) e incubadas a 37 °C, 24 h. Luego, 1 ml de este caldo fue tomado para PCR (PCR-APT) y 1 ml fue transferido a 10 ml de MKTTn e incubado a 37 °C durante 5 días. Al día 1 (1° siembra) y 5 (2° siembra) se tomó con ansa de ambos medios de enriquecimientos selectivos y se sembraron en agar XLD y agar H (Acumedia, Neogen, Lansing, Michigan) y fueron incubados a 37 °C, 24 h. Las colonias presuntivas de *Salmonella* fueron confirmadas mediante pruebas bioquímicas en agar TSI (Acumedia, Lansing, Michigan) y agar LIA (Merck, Darmstadt, Alemania), prueba de la β-galactosidasa (ONPG, Britania, Argentina) y serológicas con antisuero polivalente somático OS-A y OS-B (Difco™, Beckton Dickinson, Maryland).



**Figura 7.** Flujograma para la detección de *Salmonella* en pool de CY mediante técnicas basadas en FDA/BAM e ISO 6579.

CTSH: caldo tripteína de soja adicionado con sulfato de hierro. APT: Agua peptona tamponada. TT: Caldo tetratonato. MKTTn: Caldo Mueller Kauffmann Tetratonato/ Novobiocina.

### III.3.5. Extracción de ADN

Las células bacterianas fueron recuperadas desde 1 ml del caldo pre-enriquecimiento (PCR-CTSH y PCR-APT) por microcentrifugación (Eppendorf Centrifuge

5415 R, Alemania) a 4.000 g durante 15 min a 4 °C y lavado dos veces en agua destilada estéril. El pellet fue resuspendido en 500 µl de agua destilada estéril. El ADN fue liberado de las células bacterianas por calentamiento a 100 °C en baño seco (Labnet D1 100, Labnet International Inc., Edison, Estados Unidos) y luego centrifugado a 9.300 g durante 1 min a 4 °C. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano fue fraccionado en microtubos y conservado a -70 °C hasta su uso.

### III.3.6. PCR para gen *invA*

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Alemania), amplificando el gen *invA*. Este gen permite la detección de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* y la técnica de detección ha sido validada en ensayos interlaboratorios (Malorny *et al.*, 2003 b). Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 µl que contenían 0,25 µl de cada primers 0,1 mM (Operon Biotechnologies GmbH, Alemania), 2,5 µl de tampón 10X (Fermentas), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Fermentas), 0,5 µl de cada uno de los dDNTTP 0,2 mM (Fermentas), 0,2 µl de *Taq*DNA polimerasa 5 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción.

Los primers usados para este propósito fueron P139 (5'→3': GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA) y P141 (5'→3': TCATCGCACCGTCAAAGGAACC). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron como

control positivo las cepas que fueron inoculadas y como control negativo cepas de *Citrobacter* sp.

El producto de amplificación de ~284 pb fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa. Un volumen de 10 µl se sembró en agarosa al 2 % (BioRad, España) en buffer TBE (Tris-Acido bórico-EDTA), y se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los productos de amplificación fueron visualizados con un transiluminador UV (Model M-20, UVP inc., Upland, California). El marcador de pb usado contenía bandas de ADN entre 100 y 2080 pb (PB-L Products Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina).

### **III.3.7. Criterios de capacidad discriminatoria y límite de detección de las técnicas**

El límite de detección de los métodos se definió como la menor dilución donde cada cepa de *Salmonella* fue recuperada. La precisión, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) fueron calculados para cada método (Soria *et al.*, 2011). Las muestras que fueron positivas en cualquiera de los medios agarizados selectivos-diferenciales utilizados (H o XLD), fue considerada positiva. En base a esto, los datos de capacidad discriminatoria fueron obtenidos usando las siguientes definiciones y fórmulas:

- **Verdaderos positivos (VP):** la muestra fue definida como VP cuando *Salmonella* fue detectada en muestras donde había sido inoculada experimentalmente.
- **Verdaderos negativos (VN):** la muestra fue definida como VN cuando *Salmonella* no fue detectada en muestras donde no había sido inoculada experimentalmente.

- **Falso positivo (FP):** una muestra fue definida como FP cuando *Salmonella* fue detectada en una muestra donde no había sido inoculada experimentalmente.
- **Falso negativo (FN):** una muestra se definió como FN cuando *Salmonella* no fue detectada en una muestra donde había sido inoculada experimentalmente.
- **Precisión (Pr):** es una medida de la capacidad de un método para clasificar correctamente muestras conteniendo *Salmonella* como positiva, y muestras que no contienen *Salmonella* como negativa para este microorganismo.

$$P = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

- **Sensibilidad (Se):** es una medida de la capacidad de un método para clasificar una muestra conteniendo *Salmonella* como positiva para este microorganismo.

$$S = \frac{VP}{VP + FN}$$

- **Especificidad (Esp):** es una medida de la capacidad de un método para clasificar una muestra que no contiene *Salmonella* como negativa para este microorganismo.

$$E = \frac{VN}{VN + FP}$$

- **Valor predictivo positivo (VPP):** es una medida de probabilidad que una muestra positiva a la prueba para *Salmonella* sea correctamente determinada.

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

- **Valor predictivo negativo (VPN):** es una medida de probabilidad que una muestra con resultado negativo para *Salmonella* sea correctamente determinada.

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

Siendo todas las muestras de CY contaminadas con *Salmonella* spp. en diferentes concentraciones (salvo los controles negativos), ninguna técnica fue considerada de “oro” o “estándar” . Esto permitió poder seleccionar la técnica de aislamiento y detección por PCR con mayores valores para los parámetros estudiados.

### III.3.8. Análisis estadístico

Para comparar los resultados de todos los ensayos, se usó el test de hipótesis para diferencia de proporciones, asumiendo que todos los valores son igualmente probables. Cada valor de Pr, Se, Esp, VPP y VPN de la prueba fueron informados con sus respectivos intervalos, con un nivel de confianza del 95%. Los datos fueron analizados mediante el programa OCTAVE, desarrollado por el Grupo de Métodos Numéricos de la Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina (Proyecto 25D041). Los valores informados definieron el límite de un intervalo que, con un 95 % de seguridad, contiene los verdaderos valores de Pr, Se, VPP y VPN. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con un valor de  $P < 0,05$ .

La concordancia entre los métodos bacteriológicos y la PCR para la detección de *Salmonella* en pool de CY fue evaluado mediante el estadístico Kappa ( $\kappa$ , Martin, 1977). Este fue calculado para evaluar el grado de concordancia de los métodos para clasificar las

muestras como positivas o negativas más allá del azar (Dawson y Trapp, 2005). El nivel de concordancia se determinó comparando el valor obtenido con la escala de valores predeterminados: 1,00 a 0,93 (excelente concordancia); 0,92 a 0,81 (muy buena concordancia); 0,80 a 0,61 (buena concordancia); 0,60 a 0,41 (débil concordancia); 0,40 a 0,21 (ligera concordancia); 0,20 a 0,01 (pobre concordancia) y menor a 0,01 (ninguna concordancia).

### **III.4. Detección de *Salmonella* spp. en huevos para consumo**

#### **III.4.1. Muestras**

Para tomar el número de muestras para *Salmonella* se utilizó la siguiente fórmula (Thrusfield, 1990):

$$n = (1 - (1 - \alpha)^{1/d})(N - d/2) + 1$$

Donde:

n: tamaño de la muestra necesaria

$\alpha$ : nivel de confianza deseado (probabilidad de encontrar al menos un caso positivo en la muestra). Se consideró un nivel de confianza del 0,95.

d: número de muestras positivas en la población. Esto es dependiente de la prevalencia de *Salmonella* en huevos. Se consideró una prevalencia de huevos contaminados con *Salmonella* spp. entre el 0,1 y 0,5%, basándose en datos publicados por

otros autores en otros países (Castillo *et al.*, 1996; Anónimo, 2003). Esto se debe a que no se cuentan con datos de prevalencia de huevos en Argentina.

N: tamaño de la población: Se consideró la población de huevos en las 14 ciudades más importantes del centro-este de la provincia de Entre Ríos. Esta información fue obtenida en base a la población probable en las diferentes ciudades de Entre Ríos (Censo 2001 y ajustado con el censo 2010), y teniendo en cuenta el consumo de huevo/hab/año para cada uno de los años que se realizó el muestreo (Schell *et al.*, 2010). Como no se disponía de este último dato a nivel de cada ciudad, se tomaron los valores de consumo de huevo a nivel nacional. Dado que la presentación más común de huevos en supermercados es en envases de 6 huevos, se consideró como una muestra igual a 6 huevos y ajustados los cálculos para ello. De esta manera, la población de huevos fue de 44.925 (6 huevos cada una).

El tamaño de muestra dio entre 598 y 2.995 muestras. Para llegar a ese número de muestras se tomaron 8 pooles de 6 huevos de cada uno de los 113 supermercados de las 14 ciudades muestreadas. La mitad de los pooles se analizaron para muestras de envase y cáscara y la otra mitad para contenido de huevo. La localización de los supermercados a muestrear se obtuvo por relevamiento de información a través de páginas de internet, personas que vivían y/o conocían las respectivas ciudades y agencias de extensión del INTA. Se consideró como supermercado a los que cumplían con la definición propuesta por la Real Academia Española, quien define al mismo como un “establecimiento comercial de venta al por menor en el que se expenden todo género de artículos alimenticios, bebidas,

productos de limpieza, etc., y en el que el cliente se sirve a sí mismo y paga a la salida”. Con esto se obtuvo un total de 903 muestras lo que correspondió a una prevalencia teórica superior al 0,33%.

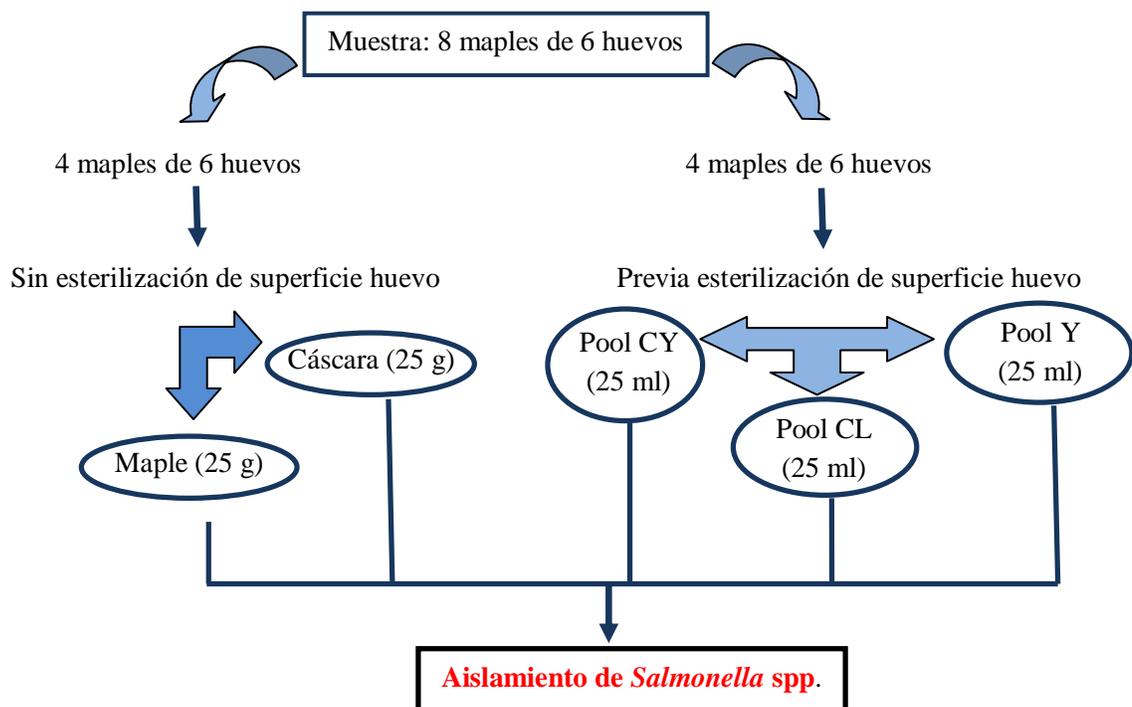
Se analizaron 1.643 muestras. En la tabla 6 se detalla el número total y el tipo de muestras analizadas en diferentes departamentos de la provincia de Entre Ríos.

**Tabla 6.** Número (N°) total y tipo de muestra analizadas en el aislamiento de *Salmonella* spp. en huevos para consumo humano tomados en diferentes departamentos de Entre Ríos.

Departamentos de Entre Ríos	Ciudades	N° total de muestras	N° por tipo de muestra analizada				
			Pool Envase* (6 huevos)	Pool Cáscara	Pool Clara y yema	Pool Clara	Pool Yema
	Colón	64	20	20	20	2	2
Colón	San José	64	20	20	20	2	2
	Villa Elisa	176	48	48	48	16	16
Concordia	Concordia	204	68	68	68	-	-
Federación	Federación	96	24	24	24	12	12
Federal	Federal	80	20	20	20	10	10
Galeguay	Galeguay	144	36	36	36	18	18
Galeguaychú	Galeguaychú	192	48	48	48	24	24
Islas del Ibicuy	V. Paranacito	48	12	12	12	6	6
San Salvador	San Salvador	112	28	28	28	14	14
Tala	R. del Tala	48	12	12	12	6	6
Uruguay	Basavilbaso	80	20	20	20	10	10
	C. del Uruguay	191	60	60	59	6	6
Villaguay	Villaguay	144	36	36	36	18	18
<b>TOTAL</b>		1.643	452	452	451	144	144

(\*): Incluye las diferentes presentaciones del huevo de consumo disponibles al público (maple de cartón, maple de telgopor, papel de diario y bolsa de polietileno de 6 huevos y maple de cartón de 30 huevos).

En cada supermercado, se seleccionaron 8 maples con 6 huevos (Figura 8). Desde 4 maples se obtuvieron 4 muestras de pool de maples (M) y 4 muestras de pool de cáscara (C) sin esterilización de la superficie del huevo. De los 4 maples restantes, previa esterilización de la superficie del huevo como se explicó en el punto III.2.4, se obtuvieron 4 muestras de pool de CY, dos muestras de pool de CL y dos de pool de Y en bolsas estériles. Posteriormente las muestras fueron homogeneizadas a 2500 rpm durante 2 min.



**Figura 8.** Muestras utilizadas para el aislamiento de *Salmonella* spp.

CY: clara y yema. CL: clara. Y: yema.

### III.4.2. Aislamiento de *Salmonella* spp.

El aislamiento de *Salmonella* spp. se basó en la metodología propuesta por FDA/BAM (Wallace y Hammack, 2011). Veinticinco gramos de maple, cáscara y 25 ml de

CY, CL y Y fueron colocados en bolsas estériles. Las muestras fueron pre-enriquecidas en 225 ml de CTSH. La mezcla fue incubada a 37 °C, 24 h. A su término 1 ml del caldo incubado fue conservado para PCR (PCR-CTSH) y 1 ml fue transferido a 10 ml de caldo TT adicionado con novobiocina (40 mg/ml) y de verde brillante (0,1 %), e incubado a 37 °C durante 5 días. Al día 1 (1° siembra) y 5 (2° siembra) se tomó con ansa desde el enriquecimiento selectivo y se sembraron en estrías por agotamiento en agar XLD y H, incubando a 37 °C durante 24 h. Las colonias presuntivas de *Salmonella* fueron confirmadas mediante pruebas bioquímicas en TSI, LIA, agar SIM (Merck, Darmstadt, Alemania), ONPG y pruebas serológicas con antisueros somáticos polivalentes OS-A y OS-B (Difco, Becton Dickinson y Co., Sparks, Maryland, Estados Unidos). Los aislamientos positivos fueron conservados en agar nutritivo (Acumedia, Lansing, Michigan) para su posterior serotipificación. La sensibilidad, especificidad y precisión de los métodos selectivos y diferenciales empleados en el aislamiento de *Salmonella* spp. en los huevos para consumo en caldo TT fueron calculados como se indica en el apartado III.3.7.

#### **III.4.3. Serotipificación de cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde huevos para consumo**

La serotipificación se realizó en el Instituto “Dr. Carlos G. Malbrán” según la metodología propuesta por Caffer y Terragno (2008). En primer lugar, se activaron los cultivos en placas de SS, incubando a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se observó las características y pureza de las colonias en la placa. A partir de allí, se sembró en ATS y se

incubó a 37 °C, durante 24 h. La caracterización del AgO se realizó sobre una placa de vidrio, mientras que la del AgH se realizó en tubo.

#### **III.4.3.1. Serotipificación somática (AgO)**

A partir del cultivo en ATS se verificó que el cultivo se encuentre en forma lisa en solución salina al 2%. Las cepas que correspondieron a colonias lisas (sin aglutinación) se colocaron sobre una placa de vidrio junto a 20 µl de los antisueros polivalentes OS-A y OS-B (los cuales nos permiten detectar alrededor del 98 % de las serovariedades aisladas del hombre y animales). Luego, se mezcló cuidadosamente con palillo durante 2 min para observar presencia o ausencia de aglutinación bajo luz indirecta. En cepas que mostraron aglutinación positiva para alguno de los antisueros polivalentes, se continuó la serotipificación con los factores del Ag somático O (Figura 9).

#### **III.4.3.2. Serotipificación flagelar (AgH)**

La serotipificación flagelar se realizó a partir de un cultivo en caldo flagelar. Los medios de cultivo y reactivos para este procedimiento se detallan a continuación.

A- Caldo flagelar (CF): Caldo triptona de soja 15,2 g, triptona 13,3 g, agua destilada c.s.p.1000 ml. Fraccionar 5 ml por tubo de ensayo y esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 min.

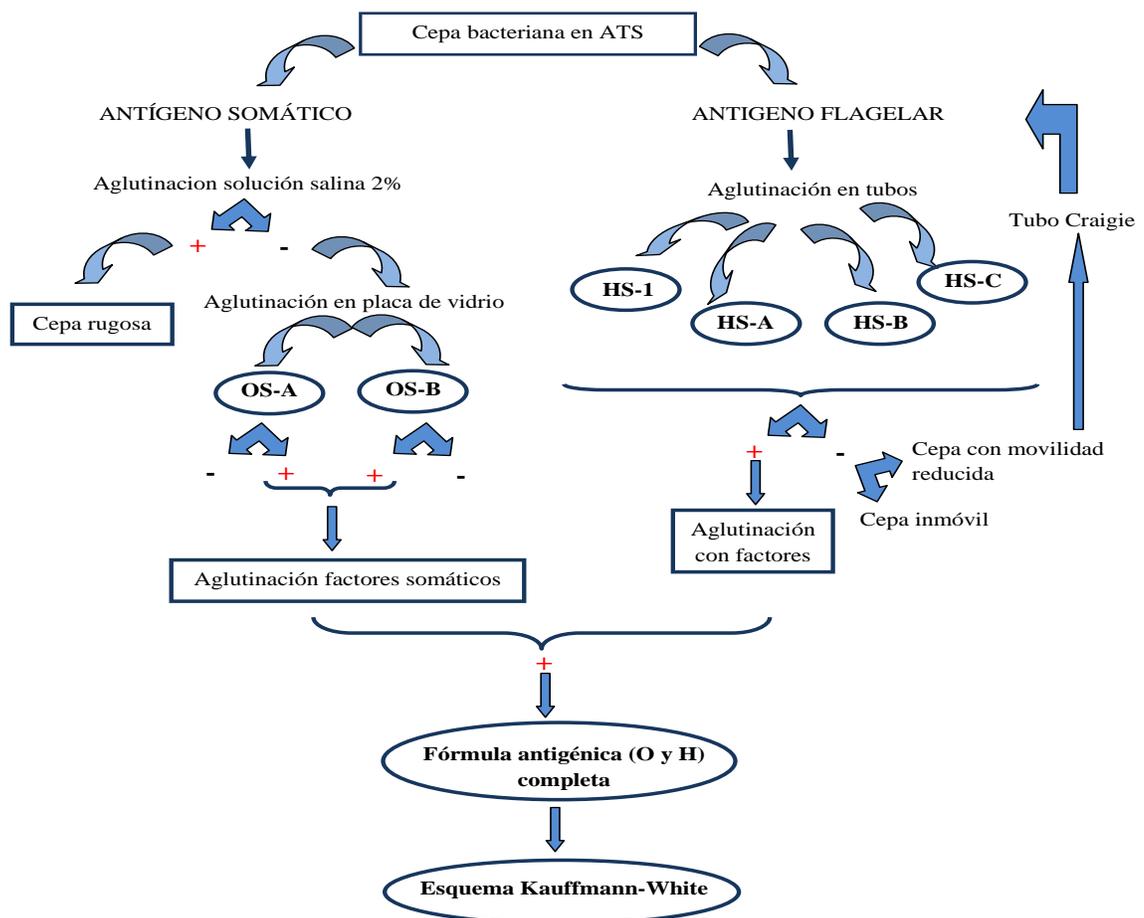
B- Agar movilidad (Craigie): Peptona 10 g, extracto de carne 3 g, cloruro de sodio 5 g, agar 5 g, agua destilada c.s.p. 1000 ml. Ajustar el pH a 7,4. Luego colocar 5 ml del agar en tubos de 10 x 60 mm con tapa rosca con una varilla de vidrio hueca de 8 cm aproximadamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 min.

C- Solución fisiológica formolada: Cloruro de sodio 8,5 g, formalina (37-40 %) 10 ml, agua destilada c.s.p. 1000 ml.

Desde el cultivo en ATS se sembró el CF e incubó a 37 °C durante 18-24 h. A partir de éste se preparó una alícuota de 0,5 ml en tubo estéril con tapa rosca y conservó a temperatura ambiente. Al resto de CF se agregaron 5 ml de solución fisiológica formolada al 1 % incubando 1 h a temperatura ambiente. En cuatro tubos de ensayo se colocaron 50 µl de los antisueros flagelares polivalentes (HS-1, HS-A, HS-B y HS-C). Luego se agregó 0,5 ml del caldo formolado incubando durante 1 h a 50 °C en baño de agua. A su término, se observó presencia o ausencia de flóculos bajo luz indirecta. En cepas que fueron positivas a uno o más sueros polivalentes H (expresión de una o dos fases) se continuó la serotipificación con los factores del antígeno flagelar H (Figura 9).

Aquellas cepas que mostraron aglutinación solo con uno de los AgH polivalente, y por los resultados de la aglutinación frente al AgO se consideraron que se trataba de una serovariedad difásica, fueron evaluadas mediante el método de inversión de fase, para evidenciar la fase que no fue expresada. Para ello, el AgH ya expresado fue enmascarado en placa de petri (60 mm de diámetro) con 50 µl del antisuero mezclado con 10 ml de agar semisólido (0,7 %). Sobre el centro de la superficie de este medio fue sembrado con ansa el cultivo sin formolar e incubado a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, la parte externa del crecimiento bacteriano fue recolectada y su serotipificación se continuó con el antisuero de la fase esperada.

Las cepas que fueron negativas a los antisueros polivalentes H, pero positivas a la aglutinación somática, fueron tipificadas como inmóviles. En cepas que presentaron una movilidad reducida, se exaltó su movilidad mediante pasajes sucesivos en tubos de Craigie. La cepa se sembró en el interior del tubo hasta la mitad del agar e incubó a 37 °C durante 24 h. A su término, se tomó el crecimiento bacteriano presente por fuera del tubo central fue tomado y sembrado en CF a los fines de iniciar nuevamente la serotipificación flagelar.



**Figura 9.** Flujograma para la serotipificación de cepas de *Salmonella* spp. aisladas desde huevos para consumo.

### **III.5. PCR en muestras de CY, CL y Y de huevos para consumo**

Se analizaron 739 muestras de pool de CY, CL y Y de huevos para consumo. Las técnicas de PCR empleadas estaban dirigidas hacia el blanco molecular correspondiente al gen *invA* el cual es específico de género. Para ello se estudiaron dos técnicas: a- Técnica de Malorny *et al.* (2003 b) y b- Técnica de Ferreti *et al.* (2001). A las muestras que dieron positivas a cualquiera de estas dos reacciones se les realizó PCR para *S. Enteritidis* (Agron *et al.*, 2001).

#### **III.5.1. Extracción de ADN**

A partir de 1 ml del caldo del pre-enriquecimiento en CTSH, se realizó la extracción de ADN por ebullición como se explica en el punto III.2.5. Una vez obtenido el templado de ADN se conservó a -70 °C hasta su uso.

#### **III.5.2. Especificidad de primers**

Para cada reacción de PCR se determinó la especificidad de los primers ensayados en este trabajo. Para ello se utilizaron diferentes cepas de *Salmonella* como controles positivos y cepas no-*Salmonella* como controles negativos (Tabla 7). Las condiciones de reacción para cada uno de los primers evaluados se detallan en los puntos III.5.3, III.5.4 y III.5.5.

**Tabla 7.** Cepas de *Salmonella* y no-*Salmonella* usadas para determinar la especificidad de primers.

<i>Cepas Salmonella</i>	<i>Cepas no-Salmonella</i> (N)	<b>Primers evaluados</b>
<i>S. Muenchen</i> CUB 26/07	<i>Citrobacter</i> spp. (9)	P139
	<i>Proteus</i> spp. (2)	P141
<i>S. Enteritidis</i> CUB 22/10		
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311		
<i>S. Gallinarum</i> INTA 88/322		
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	<i>Citrobacter</i> spp. (12)	Salm3
<i>S. Pullorum</i> INTA 90/142		Salm4
<i>S. Gallinarum</i> INTA 93/10		
<i>S. Typhimurium</i> INTA 06/11		
<i>S. Hadar</i> CUB 13/08		
<i>S. Pullorum</i> INTA 90/142		
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036		
<i>S. Gallinarum</i> INTA 88/322		
<i>S. Gallinarum</i> INTA 93/10	<i>Citrobacter</i> spp. (1)	Sdf1 SE F
<i>S. Infantis</i> CUB 05/08		Sdf1 SE R
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311		
<i>S. Enteritidis</i> CUB 22/10		
<i>S. Enteritidis</i> CUB 45/10		

(N): Número de cepas utilizadas en el ensayo.

### III.5.3. Reacción en cadena de polimerasa para gen *invA* según Malorny *et al.* (2003 b)

La PCR fue realizada en iguales condiciones que las descritas en el punto III.3.6. Como control positivo se usó la cepa SH CUB 13/08 y como control negativo una cepa de *Citrobacter* spp.

### III.5.4. Reacción en cadena de polimerasa para gen *invA* según Ferretti *et al.* (2001)

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Argentina) amplificando el gen *invA* que permite la detección del género *Salmonella*. Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 µl que contenía 0,25 µl de cada primers 0,1 mM (Ruralex, Argentina), 2,5 µl de tampón 10X (Fermentas), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Fermentas), 0,3 µl de cada uno de los dNTP 0,125 mM (Fermentas), 0,25 µl de *Taq*DNA polimerasa 5 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción.

Los primers usados en este punto fueron Salm 3 (5'-GCTGCGCGGAACGGCGAAG-3') y Salm 4 (5'-TCCCGGCAGAGTTCCCATT-3'). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron controles positivo (SP ATCC 13036) y negativo (*Citrobacter* spp.).

### III.5.5. Reacción en cadena de polimerasa para gen *Sdf* según Agron *et al.* (2001)

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Ivema T-18, Argentina) amplificando el gen *Sdf* que permite la detección de SE. Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 µl que contenía 0,25 µl de cada cebador 0,1 mM (Ruralex, Argentina), 2,5 µl de tampón 10X (Fermentas), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Fermentas), 0,5 µl de cada uno de los dNTP 0,2 mM (Fermentas), 0,125 µl de *Taq*DNA polimerasa 5 U/µl (Fermentas) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción.

Los primers empleados para este propósito fueron *Sdf* 1 SE 1063 Forward (5'-TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG-3') y *Sdf* 1 SE Reverse (5'-CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC-3'). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN, el cual fue reemplazado por agua bidestilada estéril. Se incluyeron controles positivo (SE ATCC 13076) y negativo (*Citrobacter* spp.).

### **III.5.6. Visualización de los productos de amplificación**

El producto de amplificación, de ~284 pb para PCR según Malorny *et al.* (2003 b), de ~389 pb para la PCR según Ferretti *et al.* (2001) y de ~293 pb para la PCR según Agron *et al.* (2001) fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa. Un volumen de 10 µl fue sembrado en agarosa al 2 % (BioRad, España) en tampón TBE (Tris-Acido bórico-EDTA) y se tiñó con GelRed™ (Biotium, Hayward, California). Los productos de amplificación fueron visualizados con un transiluminador UV (Model M-20, UVP inc., Upland, California). El marcador de pb usado fue 100-bp Ladder (PB-L Products Biológicos, Buenos Aires, Argentina).

### **III.6. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* spp. en muestras de pool de CL y Y de huevos para consumo**

Las muestras de CL y Y ensayadas fueron las que se obtuvieron al realizar el aislamiento de *Salmonella* sp. en el punto III.2.4. La detección de sustancias inhibidoras presentes en CL y Y se realizó en agar Mueller-Hinton (Britania, Argentina). Las cepas ensayadas se detallan en la tabla 8. Como control del ensayo se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

**Tabla 8.** Cepas utilizadas en el estudio de presencia de inhibidores en CL y Y.

<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b>Colección de cultivo</b>
<i>Salmonella</i> Enteritidis INTA PT 1	Aves	EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Typhimurium INTA 06/11	Aves	EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Pullorum INTA 90/142	Aves	EEA INTA Balcarce
<i>Salmonella</i> Gallinarum INTA 03/121	Aves	EEA INTA Balcarce
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	ATCC

ATCC: American Type Culture Collection

Todos los microorganismos fueron sembrados en CTS e incubados a 37 °C durante 16-18 h hasta lograr una concentración de  $10^8$  UFC/ml. Las placas con cada una de las cepas ensayadas, fueron sembradas con hisopo estéril y secadas durante 15 min, posteriormente las mismas fueron inoculadas con 200  $\mu$ l de muestras de CL o Y en pocillos de 10 mm de diámetro e incubadas a 37 °C durante 24 h. Las zonas alrededor de los pocillos que mostraron ausencia de crecimiento bacteriano (halo de inhibición) fueron cuantificadas. La prueba fue considerada positiva cuando existían halos mayores a 1 mm de diámetro.

### **III.7. Amplificación del ADN<sub>r</sub> 16S de cepas de *Salmonella* aisladas desde huevos para consumo y comparación de secuencias en bases de datos**

#### **III.7.1. Muestras y extracción de ADN y PCR para ADN<sub>r</sub> 16S**

El ADN<sub>r</sub> 16S de 34 aislamientos compatibles con *Salmonella* spp. fue amplificado mediante PCR. Antes de realizar la amplificación, las cepas fueron sembradas en placas de

SS e incubadas a 37 °C durante 24 h. A su término se realizó la extracción del ADN por ebullición como se explica en el punto III.3.5.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (MJ, Research). Los templados de ADN (4,8 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 60 µl el cual contenía 3,6 µl de cada primers 0,1 µM, 12 µl de mix de reacción (Promega) conteniendo buffer para *Taq* Polimerasa 5X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada uno de los dDNTTP (Promega) y 0,48 µl de *Taq*DNA polimerasa 2 U/µl (Promega), y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción. Los primers usados para este propósito fueron 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3').

El producto de amplificación de ~1.500 pb fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa. Un volumen de 5 µl fue sembrado en agarosa al 1 % en buffer TBE (Tris-Acido bórico-EDTA) y teñido con GelRed™ (Biotium, Hayward, California). Los productos de amplificación fueron observados en transiluminador UV (DyNA Light UV Transiluminator, LabNet). El marcador de pb usado fue 100-bp Ladder (PB-L Products Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina).

### **III.7.2. Purificación del producto de amplificación**

Los productos de amplificación fueron purificados con un kit de purificación (Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados fueron sembrados en gel de agarosa 1 % y visualizados con transiluminador UV (DyNA, LabNet). El marcador de pb usado fue 100-bp Ladder (PB-L Products Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina).

El producto de amplificación purificado fue conservado en agua destilada estéril a -70 °C hasta ser enviado para su secuenciación a Macrogen Inc. (República de Corea).

### **III.7.3. Análisis de las secuencias**

Las secuencias obtenidas se analizaron en BIOEDIT versión 5.0.9™ (Hall, 1999). Las comparaciones con las secuencias presentes se hizo en las bases de datos de acceso público con la herramienta de búsqueda de alineamientos locales básica (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) provista por GenBank.

### **III.8. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos**

Se utilizó el método de difusión en placa según las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (2008 y 2010). Se evaluaron 25 antibióticos (OXOID, Inglaterra) de los cuales 10 son de uso en medicina veterinaria y 15 de uso en medicina humana (Tabla 9). Para controlar la precisión y la exactitud de las pruebas de difusión se usó como cepa control del ensayo *Escherichia coli* ATCC 25922.

A partir de 2 a 5 colonias bacterianas aisladas se preparó una suspensión en CTS, se incubó a 37 °C de 2 a 4 h hasta alcanzar la turbidez del estándar equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. La placas de agar Mueller-Hinton (MH; Difco, Estados Unidos) fueron sembradas con hisopo estéril en todas las direcciones de manera de obtener un crecimiento bacteriano en césped. Se dejaron secar aproximadamente de 3 a 5 min y luego se colocaron los discos a ensayar con pinza estéril ejerciendo una leve presión en el agar MH. A su término fueron incubadas a 37 °C durante 24 h.

**Tabla 9.** Antimicrobianos evaluados frente a diferentes cepas de *Salmonella* aisladas desde huevo para consumo de la provincia de Entre Ríos.

Grupo de Antimicrobiano	Antimicrobiano	Concentración (µg/disco)
<b>β-lactámicos</b>	AMP**†	10
<b>B-lactámicos /Inhibidores de β-lactamasas</b>	AMC*	30
<b>Quinolonas</b>	NA*	30
	CIP*	5
	ENR**	5
	NOR**	10
<b>Tetraciclinas</b>	DO**	30
	TE**	30
<b>Fenicoles</b>	C*	30
	FFC**	30
<b>Aminoglucósidos</b>	AK*	30
	S*	300
	CN*	10
	K**	30
	N**	30
<b>Cefalosporinas</b>	KF**	30
	CFM*	5
	CTX*	30
	FOX*	30
	CAZ*	30
<b>Carbapenemes</b>	IMP*	10
<b>Inhibidores de la vía del folato</b>	SXT*	25
<b>Glicilciclinas</b>	TGC*	15
<b>Polimixinas</b>	CT**	10
<b>Fosfonatos</b>	FOS**	50

\*Antimicrobianos usados en medicina humana. \*\*Antimicrobianos usados en medicina veterinaria. †Ampicilina es representativa para Amoxicilina

Referencias: AMP: Ampicilina, AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico, NA: Ácido nalidíxico, CIP: Ciprofloxacina, ENR: Enrofloxacina, NOR: Norfloxacina, DO: Doxiciclina, TE: Tetraciclina, C: Cloranfenicol, FFC: Florfenicol, AK: Amicacina, S: Estreptomina, CN: Gentamicina, K: Kanamicina, N: Neomicina, KF: Cefalotina, CFM: Cefixima, CTX: Cefotaxima, FOX: Cefoxitima, CAZ: Ceftazidima, IMP: Imipenem, SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprima, TGC: Tigeciclina, CT: Colistina, FOR: Fosfomicina.

Para la lectura de los halos se tuvo en cuenta el área que no mostró desarrollo obvio a simple vista; esto no incluye velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas sólo con mucha dificultad en el borde de la zona de inhibición (Galas y Pasterán, 2008). El diámetro del halo de inhibición de crecimiento fue medido con una regla (escala 1 mm) y la sensibilidad fue determinada según las recomendaciones del NCLSI (2008 y 2010). En base a ello los microorganismos fueron clasificados como cepas sensibles, cepas con sensibilidad intermedias o cepas resistentes.

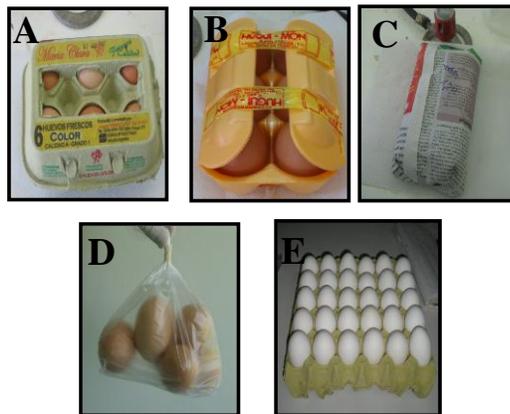
## **IV. RESULTADOS**

## IV. RESULTADOS

### IV.1 Características físicas y pH del huevo para consumo

#### IV.1.1. Muestreo de huevos en supermercados

El 64 % de los huevos muestreados fueron de CB y el 36 % fueron de CM. Respecto al envase de los huevos (figura 10), el maple de cartón de 6 huevos fue el más frecuentemente encontrado (60,6 %) seguido por la bolsa de polietileno con 6 huevos (17,7 %), los envueltos en papel de diario con 6 huevos (10,2 %), el maple con 30 huevos (6,2 %) y los maples de telgopor con 6 huevos (5,3 %).



**Figura 10.** Diferentes presentaciones de huevos comprados en supermercados de la provincia de Entre Ríos. A: Maple de cartón de 6 huevos, B: Maple de telgopor de 6 huevos, C: Papel de diario con 6 huevos; d: Bolsa de polietileno con 6 huevos y D: Maple de cartón de 30 huevos

Tabla 10. Número (N°) de maples de cartón distribuidos de acuerdo al etiquetado

Ciudades de Entre Ríos	N° de muestras de maple de cartón de acuerdo a su etiquetado			Total
	Sin marca	Sólo con marca	Marca y categoría de peso	
Basavilbaso	8	0	0	8
Concepción del Uruguay	64	16	16	96
Colón	12	15	13	40
Concordia	8	32	24	64
Federación	28	4	0	32
Federal	4	16	4	24
Gualeguaychú	28	52	8	88
Gualeguay	0	53	15	68
San José	8	0	8	16
San Salvador	8	0	0	8
Rosario del Tala	0	8	8	16
Villaguay	0	16	40	56
Villa Elisa	8	0	0	8
Villa Paranacito	0	24	0	24
<b>Total</b>	176	236	136	548
<b>Porcentaje (%)</b>	32,1	43,1	24,8	-

El 32,1 % de los maples de cartón de 6 huevos no presentaron ningún tipo de etiqueta. Sólo el 24,8 % de los maples presentaron etiqueta con marca y categoría, según peso del huevo (1 o 2) (Tabla 10).

Con respecto a los maples que presentaron etiquetado y especificación de la categoría de peso de huevo (Tabla 11), 132 envases pertenecieron a la categoría 1 y 4 a la categoría 2. Sólo el 15,9 % de los envases etiquetados como categoría de peso de huevo 1, contenían realmente huevos a dicha categoría. Por otro lado, el 22,7 %, 25,8 %, 9,1 %, 16 %, 4,5 % y 5,3 % de los envases etiquetados con categoría de peso 1, tuvieron 1, 2, 3, 4, 5 o 6 huevos que no correspondían a dicha categoría de peso, respectivamente. Sólo el 25 % de los envases que presentaron etiqueta de categoría de huevo 2 contenían huevos realmente de esa categoría. Por otro lado 1, 2 o 5 huevos estuvieron fuera de dicha categoría.

**Tabla 11:** Distribución de los maples de cartón con huevos para consumo de acuerdo a la categoría por peso especificada en el rótulo y a su peso real.

Clasificación por peso según el rótulo	N° total maples	N° de huevos que no correspondían a la categoría especificada en el maple / N° total de huevo del maple (%)						
		0/6	1/6	2/6	3/6	4/6	5/6	6/6
<b>Categoría 1</b>	132	21 (15,9%)	30 (22,7%)	34 (25,8%)	12 (9,1%)	22 (16,7%)	6 (4,5%)	7 (5,3%)
<b>Categoría 2</b>	4	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	0	0	1 (25%)	0

Con respecto a los maples de telgopor, sólo 24 maples, correspondientes a la ciudad de Villa Elisa, presentaron la marca y la categoría de peso de huevo (50 g cada uno), pero el peso etiquetado no correspondió al peso real de los huevos envasados. En general, los mismos fueron más pesados. Por otro lado, los huevos envasados en papel de diario, bolsa de polietileno o en maple de 30 huevos no presentaron ningún tipo de etiqueta o marca.

#### IV.1.2. Características físicas del huevo

Se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto a las características físicas entre los huevos de CB y los de CM, considerando el número total de huevos analizados (Tabla 12). Los valores de PHC, PC, EC y ATH fueron mayores en huevos de CM comparados con los de CB.

**Tabla 12.** Valores de las características físicas del huevo comercializados en supermercados de Entre Ríos en el total de huevos estudiados. Los valores representan el promedio  $\pm$  el desvío estándar.

Características externas del huevo	N° total de huevos	Valores de acuerdo al color de la cáscara			
		N° huevos	Cáscara blanca	N° huevos	Cáscara marrón
PHC (g)	5.424	3.475	59,3 $\pm$ 6,1 <sup>a</sup>	1.949	61,0 $\pm$ 6,5 <sup>b</sup>
PC (g)	2.712	1.764	6,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	948	7,0 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>
EC (mm)	2.376	1.440	0,40 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	936	0,50 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
% C	2.712	1.764	11,5 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	948	11,6 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>
ATH (cm <sup>2</sup> )	5.424	3.475	71,0 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>	1.949	72,0 $\pm$ 5,3 <sup>b</sup>

PH: peso de huevo; PC: peso de cáscara, EC: espesor de cáscara; %C: porcentaje de cáscara; ATH: área total del huevo.

El PC, % C y EC fueron evaluados en el 50% 50 %, and 44 % de los huevos estudiados respectivamente.

<sup>a,b</sup>Letras distintas en la misma fila indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ ).

#### IV.1.2.1. PHC y ATH

En la tabla 13 se observa que el PHC fue muy variable, presentando valores entre 36,2 g y 92,1 g para los huevos de CB y entre 34,0 g y 89,6 g para los huevos de CM. El ATH presentó valores entre 50,0 cm<sup>2</sup> y 96,8 cm<sup>2</sup> para los huevos de CB y entre 47,9 cm<sup>2</sup> y 95 cm<sup>2</sup> para los huevos de CM.

De acuerdo al PHC, el 32 %, 53 %, 14 % y 1% correspondieron a las categorías 1S, 1, 2 y 3 respectivamente. Comparando el color de la cáscara y las categorías del PHC el 58 %, 67 %, 72 % y 87 % de los huevos de CB correspondieron a las categorías 1S, 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 14). Por otra parte en los huevos de CM el 42 %, 33 %, 28 % y 13 % correspondieron a las categorías 1S, 1, 2 y 3, respectivamente (Tabla 14).

La mayoría de los huevos provenientes de las ciudades de Basavilbaso, Concordia, Federal y San Salvador correspondieron a huevos de clase 1S. De acuerdo al color de la cáscara, se observó que la mayoría de los huevos en Basavilbaso y Concordia fueron blancos, mientras que en Federal y San Salvador fueron de color marrón. Los huevos de clase 1 predominaron en las ciudades de Colón, Concepción del Uruguay, Gualaguay, Gualaguaychú, Rosario del Tala, San José, Villa Elisa, Villa Paranacito y Villaguay, siendo la mayoría de ellos huevos de CB. La mayor cantidad de huevos de clase 2 se encontraron en la ciudad de Federación, siendo la mayoría de ellos de CB. El coeficiente de variación (CV) en muestras de 6 huevos fue de 4,7 % y 6,3 % para el PHC en huevos de CB y CM, respectivamente. Sin embargo el rango estuvo entre 0,4 % y 32,2 % para los huevos de CB y 1,1 % y 21,6 % para los de CM.

**Tabla 13.** Valores de rango y coeficientes de variación (CV) para pesos de huevos en muestra de seis huevos con respecto al color de la cáscara.

Ciudades de Entre Ríos	Huevo de cáscara blanca			Huevo de cáscara marrón		
	Rango (g)	Coefficiente de variación en muestra 6 huevos (%)	Rango (g)	Promedio $\pm$ DE <sup>1</sup>	Rango (g)	Coefficiente de variación en muestra 6 huevos (%)
<b>Basavilbaso</b>	48,7-76,9	6,0 $\pm$ 1,7	3,2-11,0	51,2-65,3	6,2 $\pm$ 1,8	4,6-7,7
<b>Colón</b>	46,4-66,8	3,9 $\pm$ 1,2	2,0-6,2	41,6-69,8	5,2 $\pm$ 1,9	1,4-7,9
<b>Concepción del Uruguay</b>	40,4-80,4	4,7 $\pm$ 2,2	1,4-11,3	51,7-86,5	7,6 $\pm$ 4,4	3,3-21,6
<b>Concordia</b>	44,4-92,1	4,9 $\pm$ 2,0	0,4-12,8	43,0-82,3	5,9 $\pm$ 2,5	1,1-11,5
<b>Federación</b>	42,4-80,1	5,0 $\pm$ 1,9	1,7-8,7	34,0-80,9	7,2 $\pm$ 4,0	2,8-17,9
<b>Federal</b>	50,4-78,0	6,0 $\pm$ 3,2	2,2-13,9	48,2-78,4	7,6 $\pm$ 3,1	1,3-14,9
<b>Guaileguay</b>	36,2-68,1	5,5 $\pm$ 4,0	2,0-32,2	39,3-67,5	5,0 $\pm$ 3,4	1,2-16,0
<b>Guaileguaychú</b>	40,0-73,4	5,2 $\pm$ 2,4	1,2-13,2	50,0-89,6	6,0 $\pm$ 3,6	2,5-21,3
<b>Rosario del Tala</b>	51,8-64,4	4,9 $\pm$ 1,2	2,9-7,4	51,4-69,2	4,7 $\pm$ 2,0	2,5-9,7
<b>San José</b>	47,1-68,0	4,2 $\pm$ 1,6	1,5-9,4	SD <sup>2</sup>	SD	SD
<b>San Salvador</b>	50,4-84,0	6,1 $\pm$ 2,6	2,5-10,8	48,2-85,8	7,0 $\pm$ 2,4	2,6-11,3
<b>Villa Elisa</b>	46,7-70,3	4,5 $\pm$ 1,7	1,4-11,0	48,8-87,1	8,5 $\pm$ 3,3	3,8-16,6
<b>Villa Paranacito</b>	48,5-74,4	5,4 $\pm$ 3,0	2,0-14,3	51,2-76,0	6,3 $\pm$ 3,2	2,7-13,9
<b>Villaguay</b>	49,7-65,7	4,0 $\pm$ 1,2	1,4-6,0	46,7-66,1	4,5 $\pm$ 2,1	1,6-12,5
<b>Total</b>	36,2-92,1	4,7 $\pm$ 2,8	0,4-32,2	34,0-89,6	6,3 $\pm$ 3,3	1,1-21,6

<sup>1</sup>DE: Desvío estándar. <sup>2</sup>SD: Sin datos.

**Tabla 14.** Número de huevos con respecto a las categorías de peso del huevo y color de la cáscara.

Ciudades de Entre Ríos	N° huevos con respecto a las categorías de peso <sup>1</sup> y color de cáscara											
	1S			1			2			3		
	CB	CM	T	CB	CM	T	CB	CM	T	CB	CM	T
Basavilbaso	133	8	141	74	14	88	9	2	11	0	0	0
Colón	31	31	62	89	58	147	23	6	29	1	1	2
Concepción del Uruguay	135	48	183	363	44	407	111	4	115	13	0	13
Concordia	243	179	422	264	75	339	42	6	48	3	4	7
Federación	37	40	77	48	45	93	94	10	104	13	1	14
Federal	52	66	118	32	61	93	11	18	29	0	0	0
Gualedguay	9	23	32	152	121	273	73	39	112	12	3	15
Gualedguaychú	66	70	136	216	112	328	75	16	91	21	0	21
Rosario del Tala	7	7	14	61	58	119	4	7	11	0	0	0
San José	72	0	72	142	0	142	26	0	26	0	0	0
San Salvador	75	119	194	31	87	118	2	22	24	0	0	0
Villa Elisa	118	104	222	207	91	298	32	21	53	3	0	3
Villa Paranacito	5	7	12	74	37	111	17	4	21	0	0	0
Villaguay	25	32	57	151	150	301	22	51	73	0	1	1
<b>Total</b>	1.008	734	1.742	1.904	953	2.857	541	206	747	66	10	76
<b>Porcentaje<sup>2</sup> (%)</b>	58	42	-	67	33	-	72	28	-	87	13	-

<sup>1</sup>Clasificación de huevo por peso: 1S (extra grande >62g), 1 (grande, 54-61 g), 2 (mediano, 48-53 g) y 3 (pequeño, 42-47 g); <sup>2</sup>El porcentaje fue determinado sobre el total de cada clase de peso de huevo. CB: huevos de cáscara blanca, CM huevos de cáscara marrón; T: total

Los datos de las características físicas del huevo en las diferentes ciudades de Entre Ríos se muestran en las tablas 15 y 16. Sólo hubo diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en todos los parámetros estudiados en la ciudad de Concepción del Uruguay, mientras que en las otras ciudades se presentaron diferencias significativas en sólo algunos de los parámetros evaluados. El PHC mostró diferencias significativas de acuerdo a su color de cáscara en 9 ciudades. El PHC fue mayor en los huevos de CM respecto a los de CB en 7 ciudades, mientras que en 3 ciudades se observó lo contrario.

El ATH fue significativamente diferente en 10 ciudades, los huevos con CM fueron más grandes que los huevos de CB en 7 ciudades muestreadas.

#### **IV.1.2.2. PC, EC, %C y limpieza de la cáscara**

El PC estuvo entre 4,1 g y 10,4 g para los huevos de CB y entre 4,9 g y 9,6 g para los huevos de CM. El % C estuvo entre 7,5 % y 16,9 % para huevos de CB, mientras que para los huevos de CM estuvo entre 7,7 % y 17,0 %. Por otro lado, el EC estuvo entre 0,3 mm y 0,6 mm para ambos tipos de cáscara.

Por otro lado, el PC mostró diferencias significativas en 9 ciudades con respecto al color de la cáscara. Los marrones tuvieron un PC mayor con respecto a los huevos de cáscara marrón en 8 de estas 9 ciudades. El EC fue significativamente diferente en 8 ciudades con respecto al color de la cáscara (Tabla 16). Los huevos de CM tuvieron un EC mayor que los huevos de CB en esas ciudades. Por otro lado, se observó diferencias significativas en el % C en 9 ciudades con respecto al color de la cáscara.

**Tabla 15.** Peso de huevo (PH) y área total del huevo (ATH) según el color de la cáscara de huevos muestreados en supermercados de la provincia de Entre Ríos. Los valores son el promedio  $\pm$  desvío estándar.

Ciudades de Entre Ríos	Valores de parámetros físicos según el color de la cáscara del huevo			
	Peso de huevo (g)		Área total del huevo (cm <sup>2</sup> )	
	Cáscara blanca	Cáscara marrón	Cáscara blanca	Cáscara marrón
<b>Basavilbaso</b>	63,3 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	60,0 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	74,5 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	71,5 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>
<b>Colón</b>	58,3 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	59,8 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	70,0 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	71,4 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>
<b>Concepción del Uruguay</b>	58,3 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	63,4 $\pm$ 7,2 <sup>b</sup>	70,2 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>	72,8 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>
<b>Concordia</b>	62,0 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>	64,0 $\pm$ 6,0 <sup>b</sup>	73,0 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	75,0 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup>
<b>Federación</b>	55,4 $\pm$ 7,8 <sup>a</sup>	60,7 $\pm$ 6,2 <sup>b</sup>	67,4 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	72,0 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>
<b>Federal</b>	62,9 $\pm$ 7,0 <sup>a</sup>	61,0 $\pm$ 6,0 <sup>b</sup>	73,8 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	72,3 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>
<b>Gualeday</b>	55,0 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	57,0 $\pm$ 4,0 <sup>b</sup>	67,3 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	68,8 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>
<b>Gualedaychú</b>	58,0 $\pm$ 5,0	59,0 $\pm$ 6,0	69,8 $\pm$ 4,4	70,5 $\pm$ 5,2
<b>Rosario del Tala</b>	57,2 $\pm$ 3,6	57,4 $\pm$ 4,0	69,4 $\pm$ 2,4	69,5 $\pm$ 2,6
<b>San José</b>	59,2 $\pm$ 4,3	SD <sup>1</sup>	71,0 $\pm$ 3,6	SD
<b>San Salvador</b>	65,8 $\pm$ 7,1	63,2 $\pm$ 7,0	76,2 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	74,1 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>
<b>Villa Elisa</b>	59,7 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	63,3 $\pm$ 8,2 <sup>b</sup>	71,3 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	74,1 $\pm$ 6,7 <sup>b</sup>
<b>Villa Paranacito</b>	56,7 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	57,0 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	68,6 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	70,0 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>
<b>Villaguay</b>	57,6 $\pm$ 3,4	57,5 $\pm$ 3,9	69,5 $\pm$ 3,0	69,4 $\pm$ 3,4

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en la misma fila para cada parámetro físico indican diferencia significativa (P<0,05). SD: Sin datos

**Tabla 16.** Porcentaje de cáscara (% C), peso de cáscara (PC) y espesor de cáscara (EC) según color de la cáscara de huevos muestreados en supermercados de la provincia de Entre Ríos. Los valores son el promedio  $\pm$  desvío estándar.

Ciudades de Entre Ríos	Valores de parámetros físicos según el color de la cáscara del huevo					
	Porcentaje de Cáscara (%)		Peso de cáscara (g)		Espesor de cáscara (mm)	
	Cáscara blanca	Cáscara marrón	Cáscara blanca	Cáscara marrón	Cáscara blanca	Cáscara marrón
<b>Basavilbaso</b>	10,7 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	11,4 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	6,7 $\pm$ 0,6	6,9 $\pm$ 0,7	0,42 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,49 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>Colón</b>	11,5 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	12,0 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	6,8 $\pm$ 0,8	7,0 $\pm$ 0,5	0,44 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,04
<b>Concepción del Uruguay</b>	11,4 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	11,8 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	6,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	7,4 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	0,39 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,44 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>Concordia</b>	11,4 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	11,6 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	7,0 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	0,44 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,46 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>Federación</b>	12,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	11,5 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	6,6 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	7,1 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	0,43 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,03
<b>Federal</b>	11,3 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	11,6 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	7,0 $\pm$ 0,7	7,1 $\pm$ 0,8	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
<b>Guaaleguay</b>	11,9 $\pm$ 1,0	11,9 $\pm$ 1,0	6,6 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 0,6	0,45 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,04
<b>Guaaleguaychú</b>	11,8 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	12,1 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	6,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	7,4 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	0,41 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
<b>Rosario del Tala</b>	11,1 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	12,0 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	6,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
<b>San José</b>	11,6 $\pm$ 1,0	SD <sup>1</sup>	6,9 $\pm$ 0,7	SD	0,44 $\pm$ 0,03	SD
<b>San Salvador</b>	11,0 $\pm$ 1,3	11,1 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	0,40 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,03
<b>Villa Elisa</b>	11,7 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 1,3	7,0 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	7,2 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>	0,45 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<b>Villa Paranacito</b>	11,2 $\pm$ 1,1	11,5 $\pm$ 1,1	6,3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	0,40 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
<b>Villaguay</b>	11,0 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	11,5 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	6,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	6,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	0,44 $\pm$ 0,05	0,45 $\pm$ 0,04

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en la misma fila para cada parámetro físico indican diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>SD: Sin datos.

Con respecto a la limpieza de la cáscara, la mayoría de los huevos vendidos en supermercados de la provincia de Entre Ríos estaban limpios (Tabla 17). El 1,1 % de los huevos de CB y el 1,7 % de los huevos con CM presentaron su superficie sucia.

**Tabla 17.** Porcentaje de huevos con superficie sucia de acuerdo al color de la cáscara.

<b>Color de la cáscara</b>	<b>N° de huevos</b>	<b>N° de huevos con superficie sucia (%)</b>
<b>Blanco</b>	3.475	39 (1,12)
<b>Marrón</b>	1.949	34 (1,74)
<b>Total</b>	5.424	73 (1,35)

Los coeficientes de correlación entre PHC y PC; PHC y %C; PHC y EC se muestran en la tabla 18. En general los coeficientes de correlación entre PHC y EC; PHC y PC fueron positivos, independientemente del color de la cáscara, pero fueron negativos entre PHC y %C tanto para los huevos de CB como para los huevos de CM. No hubo una correlación significativa entre PHC y PC en las ciudades de Villa Paranacito (para ambos colores de cáscara) y Basavilbaso (para huevos de CM). Por el contrario, los coeficientes fueron estadísticamente significativos ( $P < 0,01$ ) para ambos tipos de huevos en 11 ciudades de las 14 analizadas. En Basavilbaso y San José esta diferencia fue observada solamente en los huevos de CB.

**Tabla 18.** Coeficiente de correlación (r) entre el peso de huevo de consumo y otros parámetros de calidad externa de acuerdo al color de la cáscara de huevos muestreados en diferentes ciudades de la provincia de Entre Ríos.

Ciudades de Entre Ríos	Color de cáscara					
	Peso de huevo de consumo de cáscara blanca			Peso de huevo de consumo de cáscara marrón		
	Coeficiente de correlación			Coeficiente de correlación		
	Peso de Cáscara	% Cáscara	Espesor de cáscara	Peso de cáscara	% Cáscara	Espesor de cáscara
<b>Basavilbaso</b>	0,536**	-0,422**	0,999**	0,404	-0,572	0,999**
<b>Colón</b>	0,743**	0,205	0,846**	0,542**	-0,542**	0,838**
<b>Concepción del Uruguay</b>	0,710**	-0,201**	0,928**	0,735**	-0,324*	0,710**
<b>Concordia</b>	0,736**	-0,211**	0,968**	0,614**	-0,496**	0,978**
<b>Federación</b>	0,693**	-0,579**	0,999**	0,638**	-0,366*	0,999**
<b>Federal</b>	0,690**	-0,533**	0,999**	0,750**	-0,056	0,999**
<b>Gualedguay</b>	0,407**	-0,417**	0,999**	0,478**	-0,391**	0,999**
<b>Gualedguaychú</b>	0,719**	-0,305**	0,999**	0,459**	-0,169	0,999**
<b>Rosario del Tala</b>	0,550**	-0,127	0,999**	0,488**	-0,372*	0,999**
<b>San José</b>	0,499**	-0,237**	0,999**	SD <sup>1</sup>	SD	SD
<b>San Salvador</b>	0,485**	-0,458**	0,999**	0,799**	-0,074	0,999**
<b>Villa Elisa</b>	0,505**	-0,227**	0,027	0,598**	-0,517**	0,848**
<b>Villa Paranacito</b>	0,145	-0,432**	0,999**	0,166	-0,560**	0,999**
<b>Villaguay</b>	0,526**	-0,290**	0,999**	0,516**	-0,303**	0,999**

<sup>1</sup>SD: Sin datos; \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01

Los coeficientes de correlación entre PHC y %C no fueron estadísticamente significativos en las ciudades de Colón y Rosario del Tala (para huevos de CB), Basavilbaso, Federal, Gualeguaychú y San Salvador (para huevos de CM). En lo que respecta al coeficiente de correlación observado entre PHC y EC, éste fue estadísticamente significativo en 13 de las 14 ciudades analizadas.

El coeficiente de correlación fue significativamente positivo entre PHC y PC; PHC y ATH, pero este fue significativamente negativo entre PHC y %C, independientemente de la categoría por peso y del color de la cáscara (Tabla 19). Estos coeficientes no mostraron diferencia estadística entre PC y %C para los huevos de la categoría 1, y entre PHC y PC para los huevos de CB pertenecientes a la categoría 2. Sin embargo no pudo determinarse este parámetro para los de categoría 3 debido al bajo número de muestras.

**Tabla 19.** Coeficiente de correlación (r) entre el peso del huevo y otras características externas del huevo según diferentes categorías de peso y color de la cáscara.

		<b>Coefficientes de correlación según categoría de peso y color de cáscara</b>							
<b>Características externas del huevo</b>		<b>1S (&gt; 62 g)</b>	<b>1 (54-61 g)</b>	<b>2 (48-53 g)</b>	<b>3 (42-47 g)</b>				
		<b>Cáscara blanca</b>	<b>Cáscara marrón</b>	<b>Cáscara blanca</b>	<b>Cáscara marrón</b>	<b>Cáscara blanca</b>	<b>Cáscara marrón</b>		
<b>Peso de cáscara</b>		0,405**	0,438**	0,407**	0,384**	0,102	0,289**	0,200	NC
<b>% de Cáscara</b>		-0,293**	-0,410**	-0,046	-0,033	-0,269**	-0,013	-0,141	NC
<b>Área total del huevo</b>		0,915**	0,892**	0,636**	0,814**	0,493**	0,291**	0,520**	NC

NC: No calculado debido al bajo número de muestras; \*\*: P <0,01

### IV.1.3. Determinación de pH en el contenido de huevo para consumo

Los valores de pH para pool de clara y yema (CY); pool de clara (CL) y pool de yema (Y) se muestran en la tabla 20.

**Tabla 20.** Valores de pH y color de yema en el contenido de huevos comercializados en Entre Ríos considerando el número (N°) total de huevos estudiados. Los valores representan el promedio  $\pm$  el desvío estándar.

Características de calidad interna	Valores según color de cáscara			
	N	Huevos de cáscara blanca	N	Huevos de cáscara marrón
<b>Color de yema</b>	1.728	6,4 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	948	6,7 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
<b>pH pool CY</b>	540	7,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	280	7,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
<b>pH pool CL</b>	83	8,9 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	61	9,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
<b>pH pool Y</b>	83	6,3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	61	6,5 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Letras distintas en la misma fila indican diferencia estadística (P<0.05).

CY: pool clara y yema; CL: pool de clara; Y: pool de yema

Los valores promedios de pH fueron de 9, 8 y 6 para el pool de CL, CY y Y en huevos de CB y CM. Por otro lado, el color de yema (CoY) mostró un valor promedio de 6 para huevos de CB y de 7 para huevos de CM. Sólo se observó diferencias significativas en el CoY y pH de CY entre los huevos blancos y marrones (P <0,05). Los huevos de CM mostraron valores más altos para estos parámetros con respecto a los huevos de CB.

La tabla 21 muestra los valores obtenidos en aquellos parámetros internos analizados. En general, no hubo diferencias significativas en los valores de pH entre los huevos de CB y los de CM. Se observaron diferencias significativas en los valores de pH de pool de CY en los huevos muestreados en la ciudad de Colón y en el valor de pH de pool de CL entre huevos de CB y CM muestreados en Villaguay. El CoY fue significativo en 8 ciudades de la provincia de Entre Ríos. Este parámetro presentó valores mayores en huevos de CB en las ciudades de Concordia, Federación, Gualeguaychú y Villa Paranacito. Por otro lado, en las ciudades de Federal, Gualeguay, San Salvador y Villa Elisa el CoY presentó valores mayores en los huevos de CM.

El rango del CoY estuvo entre 2-11 y 2-14 para los huevos de CB y CM, respectivamente (Tabla 22). Los huevos muestreados en Villa Paranacito mostraron un bajo rango, mientras que los muestreados en las ciudades de Basavilbaso, Gualeguaychú y Villa Elisa mostraron un amplio rango en el CoY. Los coeficientes de variación de las muestras de 6 huevos para este parámetro fueron en promedio del 10%, pero el rango de valores estuvo entre 0 % y 40 % para los huevos de CB y entre 0 % y 31 % para los huevos de CM.

**Tabla 21.** Parámetros de calidad interna del huevo en diferentes ciudades de Entre Ríos, según el color de la cáscara. Los valores representan el promedio  $\pm$  el desvío estándar.

Ciudades de Entre Ríos	pH											
	Pool de clara y yema			Pool de clara			Pool de yema			Color de la yema		
	Cáscara blanca	Cáscara marrón	SD <sup>1</sup>	Cáscara blanca	Cáscara marrón	SD	Cáscara blanca	Cáscara marrón	SD	Cáscara blanca	Cáscara marrón	SD
<b>Basavilbaso</b>	7,7 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,2	9,2 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,1	6,8 $\pm$ 1,5	5,5 $\pm$ 1,2				
<b>Colón</b>	7,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	7,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	SD <sup>1</sup>	SD	SD	SD	5,5 $\pm$ 0,8	5,4 $\pm$ 0,7				
<b>Concepción del Uruguay</b>	7,5 $\pm$ 0,8	7,6 $\pm$ 0,1	9,1 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,0	6,4 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,1	5,6 $\pm$ 0,9	5,4 $\pm$ 1,0				
<b>Concordia</b>	7,6 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2	SD	SD	SD	SD	6,6 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	5,7 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>				
<b>Federación</b>	7,8 $\pm$ 0,1	7,8 $\pm$ 0,3	9,1 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,1	7,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	6,5 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>				
<b>Federal</b>	7,7 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,2	8,8 $\pm$ 0,5	9,0 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	8,6 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>				
<b>Guaaleguay</b>	7,9 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 0,9	6,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	7,5 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>				
<b>Guaaleguaychú</b>	7,8 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,2	9,2 $\pm$ 0,1	9,1 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,5	6,4 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>				
<b>Rosario del Tala</b>	8,5 $\pm$ 0,5	8,2 $\pm$ 0,1	9,5 $\pm$ 0,2	9,3 $\pm$ 0,6	6,4 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,8	6,9 $\pm$ 0,8				
<b>San José</b>	7,5 $\pm$ 0,2	SD	9,0 $\pm$ 0,0	SD	6,1 $\pm$ 0,0	SD	6,0 $\pm$ 1,0	NC				
<b>San Salvador</b>	7,7 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,4	9,2 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	9,5 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>				
<b>Villa Elisa</b>	7,6 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,3	8,8 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 0,2	6,4 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	8,6 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>				
<b>Villa Paranacito</b>	8,0 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,7	9,4 $\pm$ 0,2	9,4 $\pm$ 0,0	7,2 $\pm$ 0,9	6,8 $\pm$ 0,1	7,0 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>				
<b>Villaguay</b>	7,7 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,2	9,0 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	8,9 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 0,3	6,4 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,8	5,8 $\pm$ 1,3				

a,b: Letras diferentes indican diferencia significativa entre los parámetros de calidad interna ( $P < 0,05$ ), <sup>1</sup>SD: Sin datos. NC: No calculado

Tabla 22. Rango y Coeficientes de variación (CV) para el color de yema en muestras de seis huevos con respecto al color de cáscara.

Ciudades	Color de yema en huevos de cáscara blanca		Color de yema en huevos de cáscara marrón	
	Rango	Coeficiente de variación en muestras de 6 huevos (%) Promedio ± DE <sup>1</sup>	Rango	Coeficiente de variación en muestras de 6 huevos (%) Promedio ± DE
<b>Basavilbaso</b>	3,0-10,0	13,0 ± 8,1	0,0-31,6	0,0-31,6
<b>Colon</b>	4,0-8,0	11,2 ± 5,2	0,0-20,0	0,0-20,0
<b>Concepcion del Uruguay</b>	4,0-8,0	11,2 ± 5,2	0,0-20,0	0,0-20,0
<b>Concordia</b>	4,0-10,0	8,7 ± 4,2	0,0-20,5	0,0-20,5
<b>Federación</b>	5,0-8,0	3,6 ± 4,0	0,0-12,2	0,0-12,2
<b>Federal</b>	6,0-10,0	5,6 ± 4,1	0,0-12,3	0,0-12,3
<b>Gualeguay</b>	5,0-8,0	7,1 ± 3,8	0,0-14,4	0,0-14,4
<b>Gualeguaychú</b>	3,0-10,0	10,4 ± 4,1	0,0-19,4	0,0-19,4
<b>Rosario del Tala</b>	4,0-8,0	8,0 ± 7,0	0,0-21,1	0,0-21,1
<b>San José</b>	2,0-8,0	11,8 ± 9,8	0,0-40,4	0,0-40,4
<b>San Salvador</b>	5,0-11,0	6,8 ± 3,1	0,0-11,2	0,0-11,2
<b>Villa Elisa</b>	2,0-9,0	18,7 ± 7,7	5,0-37,3	5,0-37,3
<b>Villa Paranacito</b>	6,0-8,0	7,6 ± 1,6	5,7-11,0	5,7-11,0
<b>Villaguay</b>	4,0-7,0	9,2 ± 5,7	0,0-19,4	0,0-19,4
<b>Total</b>	2-11	10,2 ± 6,9	0,0-40,4	0,0-40,4

IDE: Desvío estándar; <sup>1</sup>SD: Sin datos.

#### **IV.2. Estudio comparativo entre métodos bacteriológicos y PCR para la detección de *Salmonella* spp. en pool de CY contaminadas experimentalmente**

Las muestras de CY usadas en este ensayo no presentaron crecimiento bacteriano ni crecimiento de hongos antes de la inoculación.

La recuperación de *Salmonella* spp. desde el caldo TT y MKTTn fue igual tanto para el día 1 (1° siembra) como para el día 5 (2° siembra). Los resultados expresados en este apartado corresponden a los obtenidos en el día 1. La especificidad fue de 1 en los métodos bacteriológicos y PCR estudiados. Los métodos bacteriológicos ensayados (método CTSH y método APT), presentaron el mismo valor de Se y Pr tanto en cepas móviles como inmóviles (Tabla 23). Por otro lado, en el método de PCR-CTSH y en el método de PCR-APT, las serovariedades *S. Enteritidis*, *S. Hadar* y *S. Gallinarum* 03/121 (cepa inmóvil) mostraron valores mayores de sensibilidad y precisión con respecto a las otras serovariedades estudiadas.

Por otro lado, el VPP y VPN fue de 1 para todas las cepas ensayadas en ambos métodos bacteriológicos estudiados (Tabla 24).

**Tabla 23.** Sensibilidad y Precisión para los métodos bacteriológicos y de PCR para cada cepa de Salmonella en pool de clara y yema contaminadas experimentalmente. Valores entre paréntesis indican el 95% de confianza en los intervalos para los respectivos parámetros.

Cepas ensayadas	Sensibilidad de los métodos			Precisión de los métodos				
	CTSH	PCR- CTSH	APT	PCR-APT	CTSH	PCR- CTSH	APT	PCR-APT
<i>S. Enteritidis</i>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,83 <sup>a,2</sup> (0,60-0,94)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,85 <sup>a,2</sup> (0,60-0,94)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,86 <sup>a,2</sup> (0,65-0,94)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,86 <sup>a,2</sup> (0,65-0,94)
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Infantis</i>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Hadar</i>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	1 <sup>a,3</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,72 <sup>b,3</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	1 <sup>a,3</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,76 <sup>b,3</sup>
<i>CUB 13/08</i>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,06 <sup>b,1</sup> (0,01-0,26)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,19 <sup>b,1</sup> (0,07-0,40)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Pullorum</i>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,67 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	1 <sup>a,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,71 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	1 <sup>a,2</sup>
<i>INTA 90/142</i>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Gallinarum</i> INTA 03/121	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 05/10	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0 <sup>b,1</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,95-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)

<sup>a,b</sup>: Valores con diferentes letras en la misma fila indican diferencia estadística (P < 0,05).

<sup>1,2,3</sup>: Valores con diferentes números en la misma columna indican diferencia estadística (P < 0,05).

CTSH: Pre-enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con hierro. APT: Pre-enriquecimiento en agua peptona bufferada.

Para PCR-CTSH, el VPP fue de 1 para 4 de las cepas ensayadas. Para las restantes cepas fue indeterminado. En PCR-APT, se observaron resultados similares para la mayoría de las cepas ensayadas, a diferencia de SP ATCC 13036 que presentó VPP indeterminado para este método.

El VPN fue 1 en PCR-CTS para SH, mientras que para las restantes cepas estuvo entre 0,14 y 0,50. Por otro lado, en el método PCR-APT, se observaron resultados similares para la mayoría de las cepas ensayadas, siendo de 1 en *S. Gallinarum* INTA 03/121.

Cuando se compararon los métodos ensayados se observó que hubo una excelente concordancia entre los métodos bacteriológicos usados tanto en cepas móviles como inmóviles (Tabla 25). Sin embargo, cuando se analizó la concordancia entre cultivo vs. PCR-CTSH y cultivo vs. PCR-APT los valores de  $\kappa$  estuvieron entre 0,05 y 0,19, lo que indica una concordancia pobre entre los métodos analizados, tanto para cepas móviles como inmóviles. Cuando se evaluó la concordancia entre PCR-CTSH vs. PCR-APT, la concordancia fue buena y muy buena para las cepas inmóviles y móviles, respectivamente.

**Tabla 24.** Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para los métodos bacteriológicos y PCR para cada cepa de *Salmonella* en pool de clara y yema contaminada experimentalmente. Los valores entre paréntesis indican el 95% de confianza en los intervalos para los respectivos parámetros.

Cepas ensayadas	VPP				VPN			
	CTSH		APT		CTSH		APT	
	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR	Cultivo	PCR
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,79-0,98)	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,79-0,98)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,50 <sup>b,1</sup> (0,18-0,81)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,50 <sup>b,2</sup> (0,18-0,81)
<i>S.</i> <i>Typhimurium</i> ATCC 13311	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,35)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,2</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Infantis</i> CUB 05/08	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,2</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Hadar</i> CUB 13/08	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,77-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	1 <sup>a,2</sup> (0,40-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,38 <sup>b,2</sup> (0,14-0,70)
<i>S. Pullorum</i> ATCC 13036	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,16-0,98)	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,15 <sup>b,1</sup> (0,05-0,36)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,2</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Pullorum</i> INTA 90/142	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,2</sup> (0,05-0,34)
<i>S. Gallinarum</i> INTA 03/121	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,75-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,30 <sup>b,1</sup> (0,12-0,65)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)
<i>S. Gallinarum</i> CUB 05/10	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,82-1,00)	0 <sup>b,2</sup>	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,1</sup> (0,05-0,34)	1 <sup>a,1</sup> (0,40-1,00)	0,14 <sup>b,2</sup> (0,05-0,34)

<sup>a,b</sup>: Valores con diferentes letras en la misma fila indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ ) para cada parámetro.

<sup>1,2</sup>: Valores con diferentes números en la misma columna indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ ).

CTSH: Pre-enriquecimiento en caldo tripeína de soja adicionado con hierro. APT: Pre-enriquecimiento en agua peptona bufferada.

**Tabla 25.** Coeficiente Kappa de las comparaciones entre los métodos de detección de *Salmonella* spp. empleados en pool de clara y yema contaminada experimentalmente.

<b>Cepas de <i>Salmonella</i></b>	<b>Comparación entre métodos</b>	<b>Coeficiente Kappa</b>
<b>Móviles</b>	CTSH vs. PCR-CTSH	0,19*
	APT vs. PCR-APT	0,14*
	CTSH vs. APT	1,00*
	PCR-CTSH vs. PCR-APT	0,87*
<b>Inmóviles</b>	CTSH vs. PCR-CTSH	0,05
	APT vs. PCR-APT	0,09*
	CTSH vs. APT	1,00*
	PCR-CTSH vs. PCR-APT	0,72*

\* Indica que el coeficiente kappa es significativamente diferente de cero ( $P < 0,05$ ).

CTSH: Pre-enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con hierro. APT: Pre-enriquecimiento en agua peptona bufferada.

La tabla 26 y 27 muestran los límites de detección observados tanto en las técnicas bacteriológicas como de PCR para las cepas ensayadas. Las técnicas bacteriológicas fueron útiles para detectar la dilución más baja en que fueron inoculadas la mayoría de las cepas móviles e inmóviles estudiadas. Esto no sucedió para el caso de SE ATCC 13076 y SP ATCC 13036 donde el límite de detección fue de 54 y 58 UFC/25 ml, respectivamente. Por otro lado, en la técnica de PCR se observó variabilidad en los resultados. Sólo se pudo detectar SE (figura 11) y SH CUB 13/08, siendo su límite de detección de 54 y 6 UFC/25 ml, respectivamente. Con respecto a las cepas inmóviles, SG CUB 05/10 se pudo detectar en la dilución más baja que se inoculó (5 UFC/25 ml), mientras que para SG INTA 03/121 el límite de detección fue de 10 UFC/25 ml (figura 12) y en SP ATCC 13036 fue de  $5,8 \times 10^4$  para PCR-CTSH y de  $5,8 \times 10^5$  para PCR-APT. Las cepas ST, SI y SP INTA 90/142 (figura 13) no pudieron detectarse por PCR con ninguno de los métodos empleados.

**Tabla 26.** Límite de detección de cepas de *Salmonella* móviles inoculadas en pool de clara y yema (CY) para los métodos bacteriológicos y PCR estudiados.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Rango de inoculación (UFC/25ml)	Metodología para detectar <i>Salmonella</i> en pool de CY contaminados experimentalmente (N° de muestras positivas/N° total de muestras)			
		Cultivo		PCR	
		CTSH <sup>1</sup>	APT <sup>2</sup>	CTSH	APT
<b>S. Enteritidis</b> <b>ATCC 13076</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	5,4 x 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,4 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,4 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,4 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,4 x 10 <sup>5</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
<b>S. Typhimurium</b> <b>ATCC 13311</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	5	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,4 x 10	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,4 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,4 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,4 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
<b>S. Infantis</b> <b>CUB 05/08</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	5	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,0 x 10	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,0 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,0 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,0 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
<b>S. Hadar</b> <b>CUB 13/08</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	6	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,2 x 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,2 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,2 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,2 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	6,2 x 10 <sup>5</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3

<sup>1</sup>CTSH: Pre-enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con hierro.

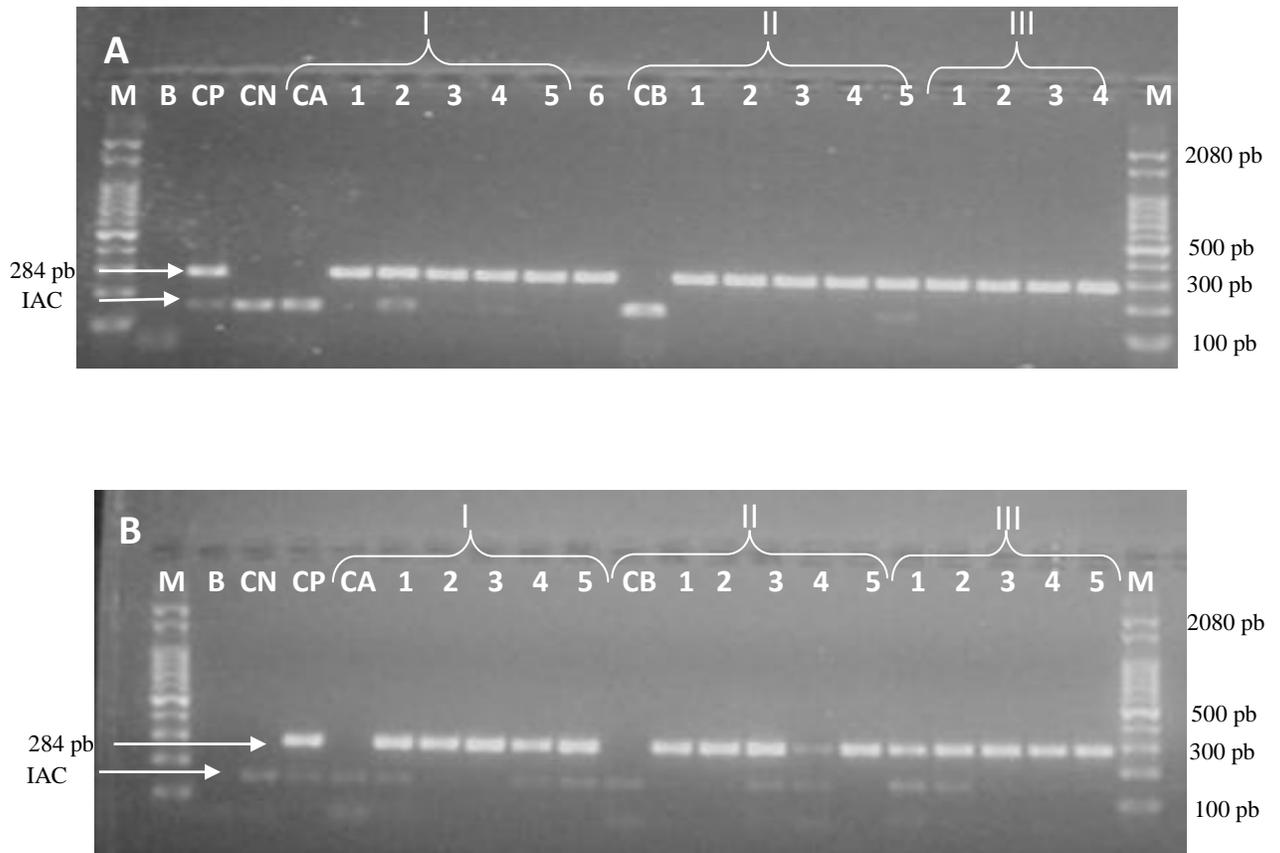
<sup>2</sup>APT: Pre-enriquecimiento en agua peptona bufferada.

**Tabla 27.** Límite de detección de cepas de *Salmonella* inmóviles inoculadas en pool de clara y yema (CY) para los métodos bacteriológicos y PCR estudiados.

Cepas de <i>Salmonella</i>	Rango de inoculación (UFC/25ml)	Metodología para detectar <i>Salmonella</i> en pool de CY contaminados			
		(N° de muestras positivas/N° total de muestras)			
		Cultivo		PCR	
		CTSH <sup>1</sup>	APT <sup>2</sup>	CTSH	APT
<b><i>S. Pullorum</i> ATCC 13036</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	6	0/3	0/3	0/3	0/3
	5,8 x 10	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,8 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,8 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	5,8 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	1/3	0/3
	5,8 x 10 <sup>5</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
<b><i>S. Pullorum</i> INTA 90/142</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	1,3 x 10	3/3	3/3	0/3	0/3
	1,3 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	1,3 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	1,3 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	1,3 x 10 <sup>5</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
	1,3 X 10 <sup>6</sup>	3/3	3/3	0/3	0/3
<b><i>S. Gallinarum</i> INTA 03/121</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	1 x 10	3/3	3/3	0/3	3/3
	1 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	0/3	3/3
	1,0 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	1,0 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	1,0 x 10 <sup>5</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	1,0 x 10 <sup>6</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
<b><i>S. Gallinarum</i> CUB 05/10</b>	0	0/3	0/3	0/3	0/3
	5	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10 <sup>2</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10 <sup>3</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10 <sup>4</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3
	5,2 x 10 <sup>5</sup>	3/3	3/3	3/3	3/3

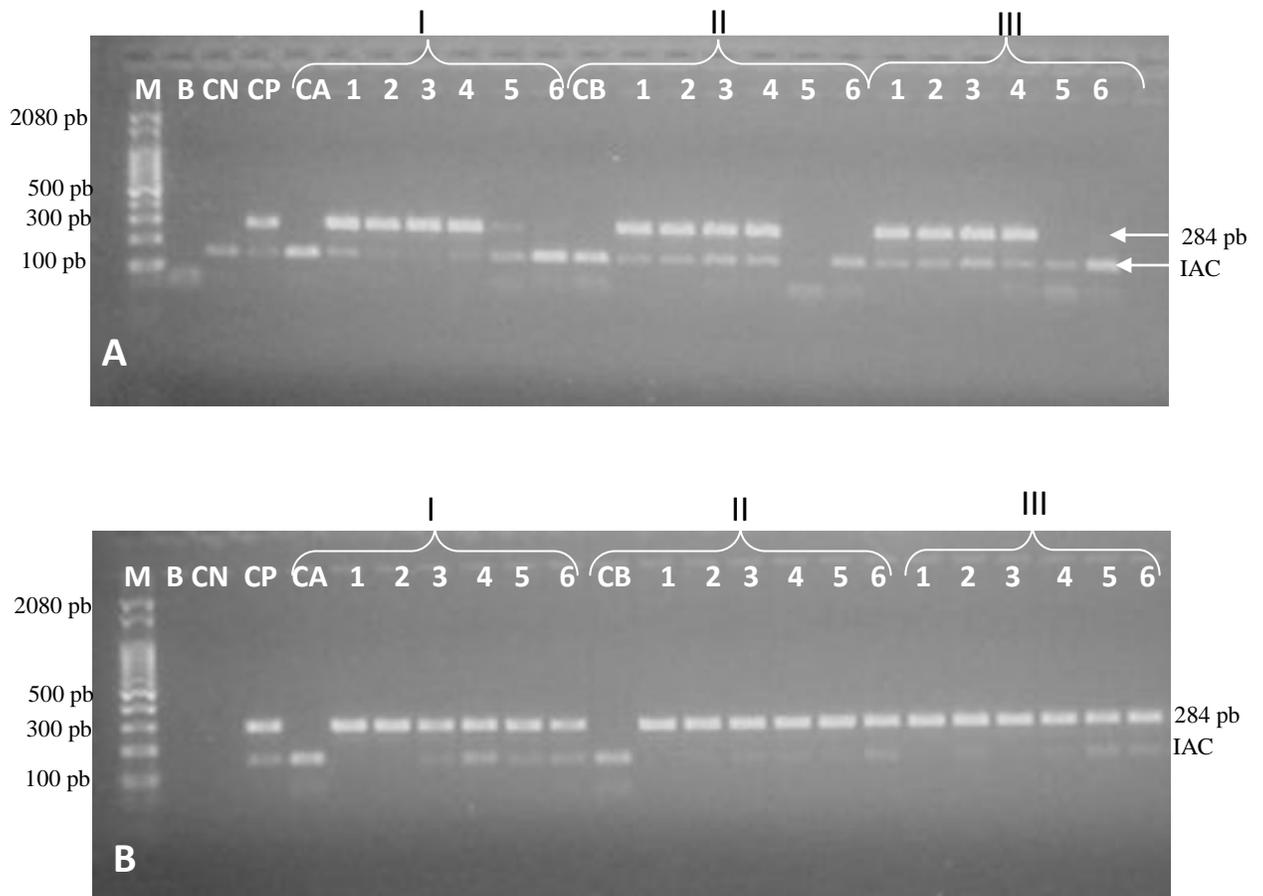
<sup>1</sup>CTSH: Pre-enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con hierro.

<sup>2</sup>APT: Pre-enriquecimiento en agua peptona bufferada.



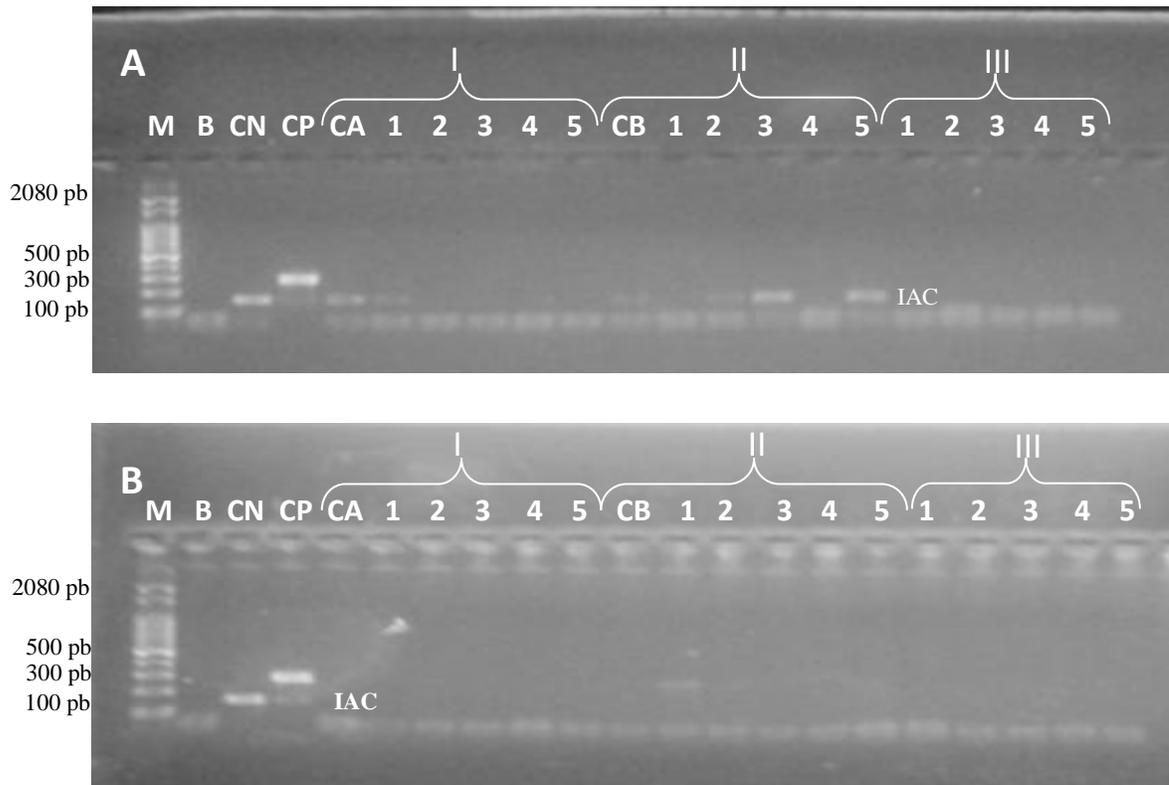
**Figura 11.** Productos de amplificación del gen *invA* por PCR para *S. Enteritidis* ATCC 13076.

I, II, III: Ensayo con su duplicado y triplicado, respectivamente. A: Técnica PCR-CTSH; B: Técnica PCR-APT; IAC: Control interno de amplificación. M: marcador de pares de bases; B: blanco de reacción; CN: control negativo (*Citrobacter* sp); CP: control positivo (SE ATCC 13076); CA: control ensayo A; CB: control ensayo B; Calles 1 a 5 corresponden a las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ .



**Figura 12.** Productos de amplificación del gen *invA* por PCR para *S. Gallinarum* INTA 03/121.

I, II, III: Ensayo con su duplicado y triplicado, respectivamente. A: Técnica PCR-CTS; B: Técnica PCR-APT; IAC: Control interno de amplificación. M: marcador de pares de bases; B: blanco de reacción; CN: control negativo (*Citrobacter* sp); CP: control positivo (SG INTA 03/121); CA: control ensayo A; CB: control ensayo B; Calles 1 a 6 corresponden a las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ .



**Figura 13.** Productos de amplificación del gen *invA* por PCR para *S. Typhimurium* ATCC 13311.

I, II, III: Ensayo con su duplicado y triplicado, respectivamente. A: Técnica PCR-CTS; B: Técnica PCR-APT; IAC: Control interno de amplificación.; M: marcador de pares de bases; B: blanco de reacción; CN: control negativo (*Citrobacter* sp); CP: control positivo (ST ATCC 13311); CA: control ensayo A; CB: control ensayo B; Calles 1 a 5 corresponden a las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ .

### **IV.3. Aislamiento de *Salmonella* spp. en huevos para consumo**

Se analizaron un total de 1.643 muestras. Del total de muestras analizadas, 29 fueron positivas a *Salmonella* spp. Cinco muestras fueron positivas en maples, 5 en cáscara, 6 en CY, 6 en CL y 7 en Y (Tabla 28). Se obtuvieron 67 aislamientos compatibles con *Salmonella* spp., de los cuales solo pudieron serotipificarse 62 cepas.

Los aislamientos de *Salmonella* spp. obtenidos desde maples de 6 huevos pertenecían a 4 ciudades de las 14 muestreadas (Tabla 28). En Concepción del Uruguay, se obtuvieron 3 aislamientos de los 60 maples analizados, donde 2 pertenecieron a la misma muestra y fueron dos serovariedades distintas. En las ciudades de Colón, Gualeguaychú y Rosario del Tala sólo se obtuvo 1 aislamiento en cada una de ellas en el total de maples analizados. Por otro lado, en 4 ciudades se obtuvieron aislamientos de *Salmonella* en las muestras de cáscara analizadas (Tabla 28). De un total de 68 muestras de pool de cáscara pertenecientes a la ciudad de Concordia sólo 2 muestras fueron positivas, mientras que en las ciudades de San Salvador, Rosario del Tala y Basavilbaso se obtuvo un aislamiento en cada una de ellas en un total de 28, 12 y 20 muestras, respectivamente. Las cepas aisladas desde maple y cáscara pertenecientes a la ciudad de Rosario de Tala fueron obtenidas en diferentes muestreos.

**Tabla 28.** Aislamientos de *Salmonella* spp. desde huevos para consumo distribuidos por ciudad y tipo de muestra analizada.

Departamentos	Ciudades	N° total de muestras	N° muestras positivas /N° muestras analizadas				
			Envases (6 huevos)	Cáscara	<sup>1</sup> CY	<sup>2</sup> CL <sup>3</sup> Pool Y	
Colón	Colón	64	1/20	0/20	0/20	0/2	0/2
	San José	64	0/20	0/20	0/20	0/2	0/2
	Villa Elisa	176	0/48	0/48	0/48	0/16	0/16
Concordia	Concordia	204	0/68	2/68	0/68	-	-
Federación	Federación	96	0/24	0/24	0/24	0/12	0/12
Federal	Federal	80	0/20	0/20	0/20	0/10	0/10
Guaiguay	Guaiguay	144	0/36	0/36	0/36	0/18	0/18
Guaiguaychú	Guaiguaychú	192	1/48	0/48	1/48	0/24	0/24
Islas del Ibicuy	Villa Paranacito	48	0/12	0/12	0/12	0/6	0/6
San Salvador	San Salvador	112	0/28	1/28	4/28	6/14	7/14
Tala	Rosario del Tala	48	1/12	1/12	0/12	0/6	0/6
Uruguay	Basavilbaso	80	0/20	1/20	0/20	0/10	0/10
	Concepción del Uruguay	191	2/60	0/60	1/59	0/6	0/6
Villaguay	Villaguay	144	0/36	0/36	0/36	0/18	0/18
<b>TOTAL</b>		1.643	5/452	5/452	6/451	6/144	7/144

<sup>1</sup>CY: clara y yema ; <sup>2</sup>CL: clara; <sup>3</sup>Y: yema

Las muestras de CY fueron positivas solo en tres ciudades (Tabla 28). El mayor número de aislamientos (4 de 28 muestras) se observó en huevos provenientes de San Salvador, mientras que sola una muestra de 58 y una muestra de 59 resultaron positivas en Gualeguaychú y Concepción del Uruguay, respectivamente. Las muestras de CL y Y fueron positivas en 14 muestras obtenidas en la ciudad de San Salvador.

Cuando se evaluó la siembra al 1° y 5° día después del enriquecimiento selectivo en TT según el tipo de muestra y los dos medios agarizados selectivos y diferenciales utilizados, se observaron diferencias significativas en la variable sensibilidad para los medios selectivos y diferenciales XLD y H (Tabla 29). La precisión no se vió afectada por el tiempo de incubación en TT. La especificidad fue de 1 para ambos medios.

La sensibilidad del método de aislamiento en muestras de envases de huevos no sufrió modificaciones ( $P > 0,05$ ) en relación al tipo de medio agarizado empleado o al tiempo de incubación en TT. Con respecto a las muestras de C, el medio que presentó mejor sensibilidad fue el XLD en el día 1 de siembra (0,60), mientras que ésta se vió afectada en el día 5 de siembra ( $P < 0,05$ ). Por otra parte la sensibilidad del método en el medio H no sufrió modificaciones.

Cuando se evaluaron las muestras de CY, la sensibilidad para ambos medios utilizados fue de 0,43 para H y 0,57 para XLD manteniéndose constante en ambos días de siembra. En CL, se observó que la sensibilidad del medio H aumentó significativamente en el día 5 de siembra con respecto al día 1 ( $P < 0,05$ ), mientras que para XLD, la sensibilidad fue de 1 en ambos días de siembra. Comparando los medios en el día 1 de siembra, se

observó que XLD tuvo mejor sensibilidad con respecto a H ( $P < 0,05$ ). En las muestras de Y, se observa que la sensibilidad del medio H aumentó significativamente en el día 5 con respecto al día 1.

**Tabla 29.** Sensibilidad y Precisión de los medios selectivos y diferenciales empleados en el aislamiento de *Salmonella* en huevos para consumo según el día de siembra en caldo Tetracionato (TT día 1° o TT día 5°). Los valores entre paréntesis indican el 95% de confianza en los intervalos para los respectivos parámetros.

Tipo de muestra	Medio selectivo	Sensibilidad		Precisión	
		TT día 1°	TT día 5°	TT día 1°	TT día 5°
Envase (6 huevos)	H	0,80 <sup>a,1</sup> (0,354-0,956)	0,60 <sup>a,1</sup> (0,223-0,881)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,988-0,999)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,984-0,998)
	XLD	0,60 <sup>a,1</sup> (0,223-0,881)	0,40 <sup>a,1</sup> (0,118-0,777)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,984-0,998)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,980-0,997)
Cáscara	H	0,0 <sup>a,1</sup> (0,004-0,459)	0,40 <sup>a,1</sup> (0,118-0,777)	0,98 <sup>a,1</sup> (0,974-0,995)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,980-0,997)
	XLD	0,60 <sup>a,2</sup> (0,223-0,881)	0,0 <sup>b,1</sup> (0,004-0,459)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,980-0,997)	0,98 <sup>a,1</sup> (0,974-0,995)
Pool Clara Yema	H	0,43 <sup>a,1</sup> (0,157-0,755)	0,43 <sup>a,1</sup> (0,157-0,755)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,977-0,996)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,977-0,996)
	XLD	0,57 <sup>a,1</sup> (0,245-0,843)	0,57 <sup>a,1</sup> (0,245-0,843)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,980-0,997)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,980-0,997)
Pool Clara	H	0,0 <sup>a,1</sup> (0,004-0,410)	0,66 <sup>b,1</sup> (0,290-0,901)	0,96 <sup>a,1</sup> (0,912-0,980)	0,98 <sup>a,1</sup> (0,951-0,996)
	XLD	1,0 <sup>a,2</sup> (0,590-0,996)	1,0 <sup>a,1</sup> (0,590-0,996)	1,0 <sup>a,2</sup> (0,975-0,999)	1,0 <sup>a,1</sup> (0,975-0,999)
Pool Yema	H	0,29 <sup>a,1</sup> (0,085-0,650)	1,0 <sup>b,1</sup> (0,630-0,996)	0,96 <sup>a,1</sup> (0,921-0,985)	1,0 <sup>a,1</sup> (0,975-0,999)
	XLD	0,71 <sup>a,1</sup> (0,349-0,915)	0,81 <sup>a,1</sup> (0,473-0,968)	0,98 <sup>a,1</sup> (0,951-0,996)	0,99 <sup>a,1</sup> (0,962-0,998)

<sup>a,b</sup>Valores con diferentes letras en la misma fila para cada parámetro indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ ).

<sup>1,2</sup>Valores con diferentes números en la misma columna para cada parámetro indican diferencia estadística ( $P < 0,05$ ).

H: Agar entérico Hektoen. XLD: Agar xilosa lisina desoxicolato.

### IV.3.1. Serotipificación de los aislamientos de *Salmonella* spp. obtenidos desde huevos para consumo

Los resultados de la serotipificación se muestran en la tabla 30. Los 67 aislamientos de *Salmonella* spp. fueron obtenidos desde 29 muestras. La prevalencia de *Salmonella* en huevos para consumo fue del 1,8% (29/1.643) en la zona centro-este de la provincia de Entre Ríos. Todas las cepas fueron ingresadas al cepario del laboratorio de Sanidad Aviar de la EEA Concepción del Uruguay.

**Tabla 30.** Serovariedades de *Salmonella* aisladas desde diferentes muestras de huevos para consumo en la provincia de Entre Ríos.

Tipo de muestra	Serovariedades de <i>Salmonella</i> (N° de muestras positivas)	Fórmula antigénica
<b>Envase (6 huevos)</b>	<i>S. Muenchen</i> (1)	6,8,d,1,2,[z <sub>67</sub> ]
	<i>S. Westhampton</i> (1)	3,{10},{15},{15,34},g,s,t,[z <sub>37</sub> ]
	<i>S. Agona</i> (2)	4,[5],f,s
	<i>S. Enteritidis</i> (2)	9,m.-
<b>Cáscara</b>	<i>S. Enteritidis</i> (1)	9,m.-
	<i>S. Montevideo</i> (1)	6,7,[14],g,m,[p],s,[1,2,7]
	<i>S. Brandenburg</i> (1)	4,[5],v,z <sub>15</sub>
	<i>S. Typhimurium</i> (2)	4,[5],i,2
<b>Clara y Yema</b>	<i>S. Gallinarum</i> (1)	9,-,-
	<i>S. Enteritidis</i> (1)	9,m.-
	<i>S. Typhimurium</i> (4)	4,[5],i,2
<b>Clara</b>	<i>S. Typhimurium</i> (6)	4,[5],i,2
<b>Yema</b>	<i>S. Typhimurium</i> (7)	4,[5],i,2

De todos los aislamientos de *Salmonella* encontrados en envases, 5 correspondieron a envases de cartón de 6 unidades, mientras que sólo uno correspondió a una muestra de envase de 30 huevos. En las 5 muestras de C positivas a *Salmonella* spp., se observó que 2 muestras correspondieron a envase de cartón de 6 unidades, 1 correspondió a bolsa de polietileno y 2 correspondieron a envases de 30 huevos.

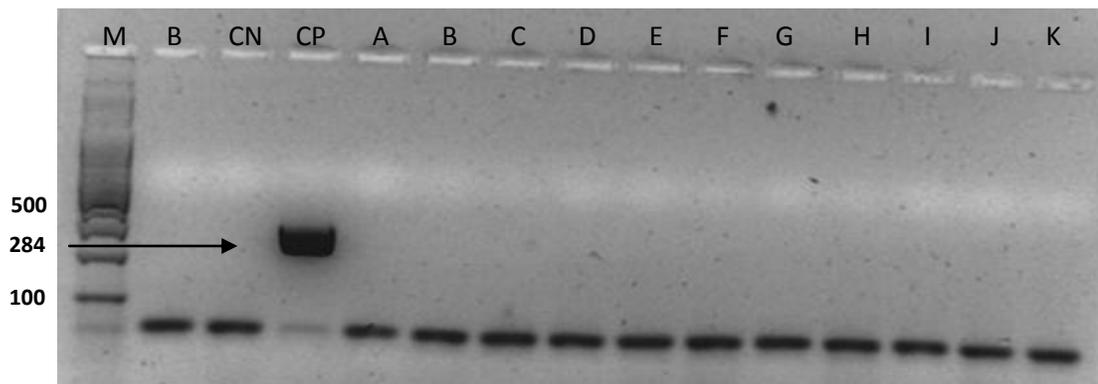
Las cepas de SW y uno de los de las cepas de SA fueron encontradas en la misma muestra de envase, siendo una de ellas aisladas en el 1° día de siembra en agar selectivo mientras que la otro serovariedad se aisló al día 5°, respectivamente.

En el contenido de huevo se obtuvieron aislamientos de SE, SG y ST. Ésta última serovariedad fue aislada en 4 oportunidades desde CL y Y pertenecientes a la misma muestra. Una única muestra de CY fue positiva al igual que su correspondiente muestra de pool de CL, mientras que los demás aislamientos sólo se encontraron en un único tipo de muestra. La cepa de SE sólo pudo ser aislada desde CY. Aunque se observó que la superficie del huevo de la misma muestra presentaba suciedad, la cáscara fue negativa al aislamiento.

#### IV.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de CL y Y de huevos para consumo comercializados en la provincia de Entre Ríos

##### IV.4.1. PCR para el gen *invA* (producto de 284 pb)

La amplificación del gen *invA* fue específica para el género *Salmonella* ya que en las cepas no-*Salmonella* ensayadas no se observaron productos de amplificación (Figura 14).



**Figura 14.** Prueba de especificidad de primers para *Salmonella* spp.

M: marcador de pares de bases; B: blanco de reacción; CN: control negativo (*Citrobacter freundii*); CP: control positivo (*Salmonella* Muenchen CUB 26/07). Calles A y G corresponden a cepas de *Proteus* spp. y las calles B,C,D,E,F,H,I,J y K corresponden a cepas de *Citrobacter freundii*.

En la tabla 31 se muestran los resultados de la PCR obtenidos en las muestras de CY, CL y Y de huevos comercializados en la provincia de Entre Ríos, comparados con los aislamientos bacteriológicos. El número de muestras positivas a la PCR fue menor con respecto al aislamiento bacteriológico. Sin embargo 2 muestras de CY positivas a PCR fueron negativas al aislamiento y 3 muestras de CL positivas a PCR fueron negativas al

aislamiento. Las cepas que fueron positivas a ambos métodos correspondieron a las serovariedades SG (CY) y ST (1 de CY y 1 de CL).

**Tabla 31.** Comparación entre el cultivo en CTSH y la PCR en muestras de CY, CL y Y de huevos para consumo de la provincia de Entre Ríos.

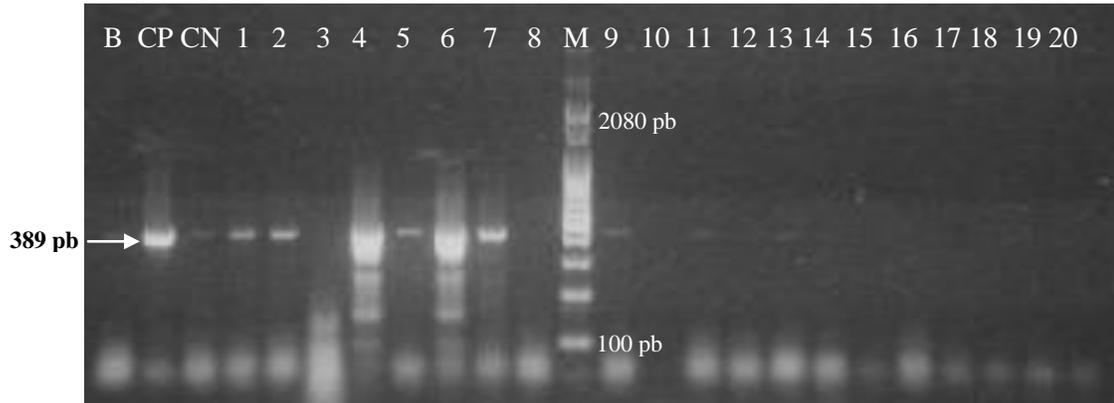
Muestras	N° total de muestras	Cultivo		PCR-CTSH	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
<b>Pool CY</b>	451	6	445	4*	447
<b>Pool CL</b>	144	6	138	4**	140
<b>Pool Y</b>	144	7	137	0	144

\* 2 muestras fueron negativos al cultivo. \*\* 3 muestras fueron negativos al cultivo. PCR-CTSH: reacción en cadena de la polimerasa del pre-enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con sulfato de hierro.

#### IV.4.2. PCR para el gen *invA* (producto de 389 pb)

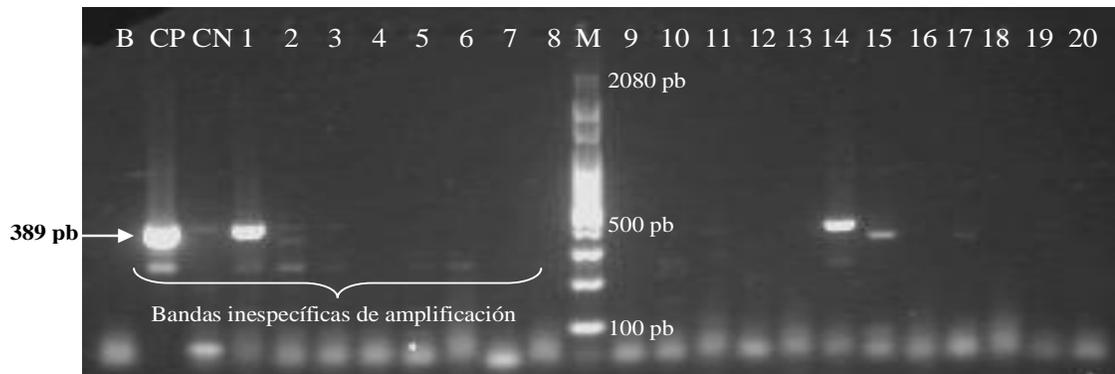
Las serovariedades SG INTA 88/322 y SH CUB 13/08 no amplificaron para esta PCR. Además, la PCR amplificó cepas no-*Salmonella* y se observaron bandas inespecíficas en algunas de las cepas de *Salmonella* amplificadas (Figura 15).

Al evaluar este par de primers en las muestras de CY, CL y Y de huevos para consumo de las ciudades de Entre Ríos, se observó presencia de bandas inespecíficas (Figura 16).



**Figura 15.** Prueba de especificidad de primers para gen *invA* en cepas de *Salmonella* spp. y no-*Salmonella*.

B: Blanco de reacción. CP: Control positivo (*S. Enteritidis* ATCC 13076). CN: Control negativo (*Citrobacter* sp.). M: Marcador de pb. Calle 1: SE CUB 22/10. Calle 2: ST ATCC 13311. Calle 3: SG INTA 88/322. Calle 4: SP ATCC 13036. Calle 5: SP INTA 90/142. Calle 6: SG INTA 93/10. Calle 7: ST INTA 06/11. Calles 8 a 14 y 16 a 20: *Citrobacter* sp. Calle 15: SH CUB 13/08.



**Figura 16.** Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) en cepas de *Salmonella* spp. y muestras de huevos para consumo humano.

B: Blanco de reacción. CP: Control positivo (*S. Pullorum* ATCC 13036). CN: Control negativo (*Citrobacter* sp.). M: Marcador de pb. Calle 1: ST INTA 06/11. Calle 2: SP INTA 90/142, Calle 3: SE INTA PT1. Calle 4: SG INTA 88/322.: Calle 5: SG INTA 93/10. Calle 6: SI CUB 05/08. Calle 7: ST ATCC 13311. Calle 8: Cáscara 99. Calle 9: Cáscara 435. Calle 10: CY 7; Calle 11: CY 85; Calle 12: CY 304; Calle 13: CL 408; Calle 14: CL 511; Calle 15: CL 831 (1); Calle 16: CL 831 (2); Calle 17: CY 822; Calle 18: CL 751; Calle 19: CL 863; Calle 20: M 204.

De los dos juegos de primers usados para la amplificación del gen *invA*, se observó que el propuesto por Malorny *et al.* (2003) presentó una mejor especificidad para detectar las cepas de este género. Por el contrario los primers propuestos por Ferretti *et al.* (2001) amplificaron con cepas de *Salmonella* y no-*Salmonella*. Además se obtuvieron bandas inespecíficas de amplificación.

#### IV.4.3. PCR para el gen *Sdf* de *Salmonella* Enteritidis

En la PCR para *S. Enteritidis* se evaluaron aquellas muestras que fueron positivas para gen *invA* (~ 284 pb) pero que no se conocía a que serovariedad correspondían (8 muestras).

La amplificación del gen *Sdf* fue específica para la serovariedad Enteritidis en las muestras controles utilizadas (Figura 17). Las muestras incógnitas evaluadas fueron negativas a esta PCR. La cepa de SE aislada desde pool de CY (Tabla 30) no fue evaluada mediante esta metodología debido a que la PCR para el gen *invA* realizada en la muestra de CY fue negativa.



**Figura 17.** Prueba de especificidad de los primers para el gen *Sdf* en cepas de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* no-Enteritidis

B: Blanco de reacción. CP: Control positivo (SE ATCC 13076). CN: Control negativo (*Citrobacter* sp.). M: Marcador de pb. Calle 1: SP 90/142. Calle 2: SP ATCC 13036. Calle 3: SG 88/322. Calle 4: SG 93/10. Calle 5: SI CUB 05/08. Calle 6: ST ATCC 13311. Calle 7: SE CUB 22/10. Calle 8: SE CUB 45/10.

#### **IV.5. Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* spp. en CL y Y de huevos para consumo**

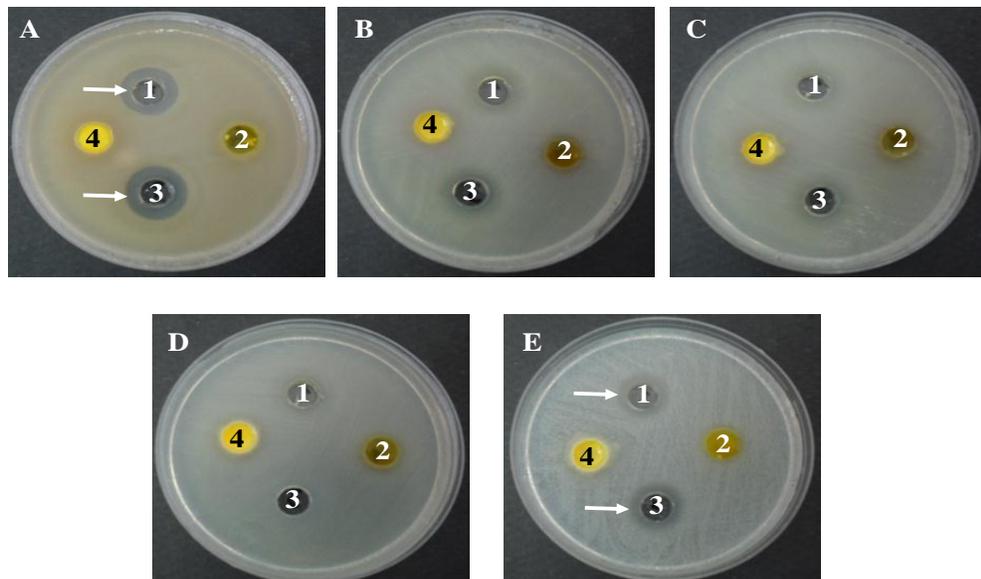
Los resultados se muestran en la tabla 32 y figura 18. Mientras que la sensibilidad de la cepa control del ensayo (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) fue del 100 % para las muestras de CL analizadas fue del 0 % para las muestras de Y.

Con respecto a las serovariedades inmóviles se observó que SP no presentó inhibición del crecimiento para ninguna de las muestras ensayadas. Sin embargo, SG presentó inhibición de crecimiento tanto en muestras de CL (39,30 %) como de Y (19,64 %). Por otro lado, las serovariedades móviles presentaron inhibición de crecimiento pero en bajo porcentaje. Mientras que el crecimiento de ST fue inhibido en ambos tipos de muestras, con un porcentaje de 3,60 % y 1,80 % para las muestras de CL y Y, respectivamente, SE mostró inhibición de su crecimiento sólo en muestras de CL (1,80 %).

Las cepas aisladas en el presente trabajo desde muestras de CL y Y correspondieron principalmente a cepas móviles (SE y ST) las cuales presentaron un bajo porcentaje de inhibición frente a estos componentes del huevo. Sin embargo la cepa inmóvil aislada desde el pool de CY (SG) presentó el mayor porcentaje de inhibición frente a CL y Y.

**Tabla 32.** Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* en muestras de clara y yema pertenecientes a huevos comercializados en la provincia de Entre Ríos. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 fue utilizada como cepa control del ensayo.

Cepas	N° de muestras positivas/N° total de muestras	
	Clara	Yema
<i>S. Typhimurium</i> INTA 06/11	4/112	2/112
<i>S. Gallinarum</i> INTA 03/121	44/112	22/112
<i>S. Pullorum</i> INTA 90/142	0/112	0/112
<i>S. Enteritidis</i> INTA PT1	2/112	0/112
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	112/112	0/112

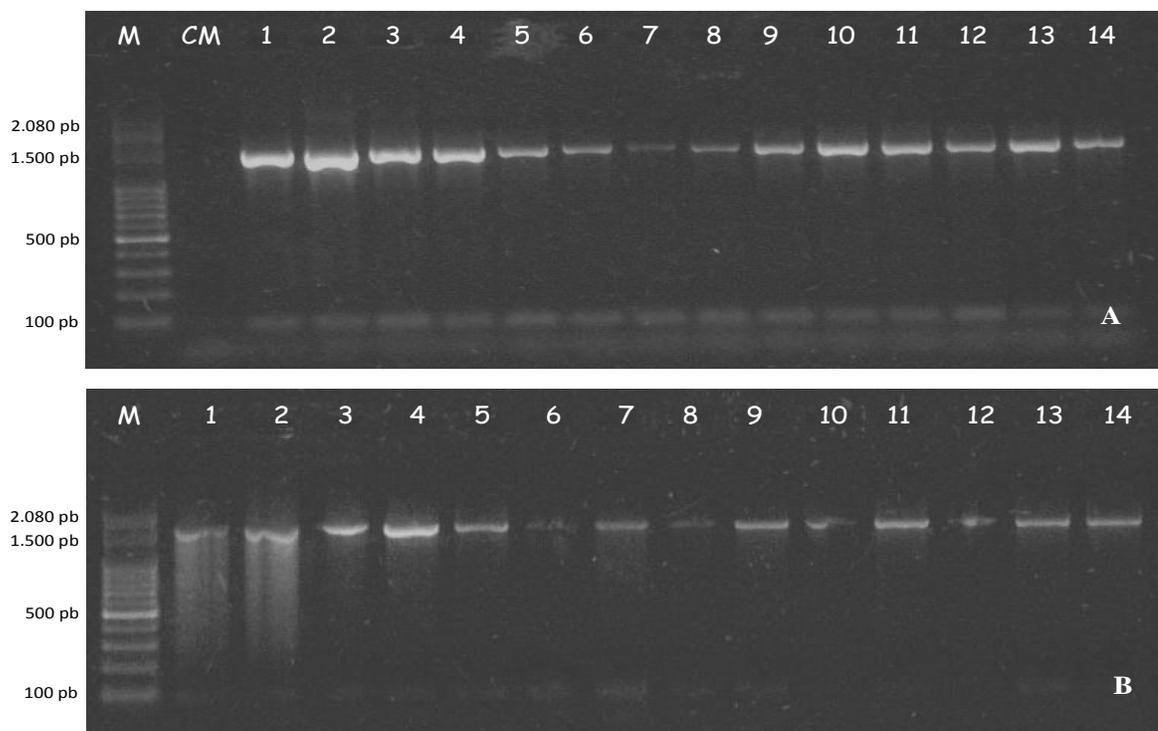


**Figura 19.** Presencia de inhibidores del crecimiento de *Salmonella* en muestras de clara y yema pertenecientes a huevos comercializados en la ciudad de Federal.

A: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; B: ST INTA 06/11, C: SE INTA PT1, D: SP INTA 90/142, E: SG INTA 03/121. Los pocillos 1 y 3 corresponden a muestras de clara y los pocillos 2 y 4 a muestras de yema.

#### IV.6. Amplificación del ADNr 16S en cepas de *Salmonella* aisladas desde huevos para consumo y comparación de secuencias en bases de datos

La secuenciación se realizó en 34 cepas (*Salmonella* y no-*Salmonella*) aisladas desde huevo para consumo de la provincia de Entre Ríos. La figura 19 muestra la amplificación antes y después de la purificación.



**Figura 19.** Amplificación del ADNr 16S de cepas de *Salmonella* aisladas de huevos para consumo de la provincia de Entre Ríos, antes (A) y después (B) de la purificación.

M: marcador de pb; CM: control mix de reacción; Calle 1: *S. Gallinarum* CUB 05/10; Calle 2: *S. Enteritidis* CUB 21/10; Calle 3: Cepa 389; Calle 4: ST CUB 61/10; Calle 5: ST CUB 31/10; Calle 6: SE CUB 45/10; Calle 7: ST CUB 17/10; Calle 8: ST CUB 64/10; Calle 9: ST CUB 65/10; Calle 10: ST CUB 66/10; Calle 11: ST CUB 67/10; Calle 12: ST CUB 70/10; Calle 13: ST CUB 71/10; Calle 14: ST CUB 72/10.

La tabla 33 muestra el porcentaje de identidad de los aislamientos en relación con los encontrados en la base de datos. De los aislamientos analizados, se observó que con la serotipificación (Kauffmann-White) se pudo determinar la serovariedad de cada uno de ellos, mientras que al comparar las secuencias del ADNr 16S en la base de datos en el GenBank, no se pudo discriminar entre las diferentes serovariedades.

Cuando se analizaron los aislamientos de envases de huevos, se observó que los 2 aislamientos de SE (CUB 21/10 y CUB 45/10) presentaron un % de identidad muy variable con su respectiva serovariedad (desde 88 % hasta un 99 %). Además hubo otras serovariedades que presentaron un alto % de identidad con dichos aislamientos (Tabla 33). Por otro lado, los aislamientos de SM (CUB 26/07) y SW (CUB 31/10) presentaron un % de identidad del 99% con más de 1 serovariedad. Sin embargo, ninguna de las secuencias analizadas de estas serovariedades correspondió con la serovariedad tipificada por el esquema de Kauffmann-White. Con respecto al análisis de las secuencias de los dos aislamientos de SA, se observó un % de identidad diferente, de 87 % y 99 % con su respectiva serovariedad para las cepas CUB 37/08 y CUB 07/10, respectivamente, pero además presentaron alta homología con otras 4 serovariedades. Por otro lado, se analizaron dos aislamientos que presentaban un perfil bioquímico compatible con *Salmonella* sp. pero sin producción de H<sub>2</sub>S en TSI y LIA. Estos presentaron un 99 % de identidad con *Enterobacter* sp.

De las cepas aisladas desde cáscara, se observó que solo una cepa de ST (CUB 72/10) presentó un 100 % de identidad con la serovariedad tipificada por serología. La cepa de SB (CUB 08/10) no presentó identidad con su respectiva serovariedad a diferencia de SE

(CUB 73/10) que presentó un % de identidad muy variable con su respectiva serovariedad. Por otro lado, ST (CUB 17/10) presentó un 99 % de identidad con serovariedades como *S. Enteritidis*, *S. Dublin* y *S. Gallinarum*, mientras que con su respectivo serovar se observó un 98 % de identidad.

En las muestras de CY, *S. Gallinarum* (CUB 05/10), presentó un 99% de identidad con su respectiva serovariedad, aunque también se observó el mismo porcentaje con las serovariedades *S. Dublin*, *S. Enteritidis* y *Salmonella* sp. Los 17 aislamientos de ST tipificados por serología en muestras de CY, CL y Y, presentaron un 99 % de identidad con las serovariedades *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Agona*, *S. Paratyphi B* y *S. enterica* subespecie *enterica*.

Las cepas CUB 60/10, CUB 61/10, CUB 63/10, CUB 64/10 y la cepa 389 presentaron un perfil bioquímico compatible con *Salmonella* spp. y fueron positivas para el gen *invA* según la metodología de Malorny *et al.*, (2003). Aunque no pudieron ser tipificadas por serología, se observó que presentaron un 100% y 99% de identidad con *S. Typhimurium* y con otras serovariedades *S. Dublin*, *S. Agona*, *S. Paratyphi B* y *S. enterica* subespecie *enterica*.

**Tabla 33.** Comparación entre dos métodos de tipificación usados para *Salmonella* sp. aisladas de huevos para consumo de la provincia de Entre Ríos.

Origen	Cepa	Comparación entre tipificación	
		Kauffmann-White	ADNr 16S (% de identidad)
	CUB 26/07	S. Muenchen	S. Typhi (99), S. Enteritidis (99), S. Paratyphi C (99), S. Agona (99), S. Schwarzengrund (99), S. Heidelberg (99)
	CUB 31/08	S. Westhampton	S. Paratyphi C (99), S. Paratyphi A (99), S. Schwarzengrund (99), S. Paratyphi B (99), S. Agona (99)
	CUB 37/08	S. Agona	S. Paratyphi C (87), S. Paratyphi C (87), S. Heidelberg (87), S. Paratyphi B (87), S. Agona (87), S. Choleraesuis (87)
	CUB 07/10	S. Agona	S. Agona (99), S. Paratyphi A,B,C (99), S. Choleraesuis (99), S. Typhimurium (99)
<b>Envase de cartón</b>	CUB 21/10	S. Enteritidis	S. Enteritidis (98), S. Dublin (98), S. Paratyphi A (98), S. Paratyphi B (98), S. Typhimurium (97)
	CUB 45/10	S. Enteritidis	<i>Salmonella</i> sp. (88), S. Enteritidis (88), S. Typhimurium (88), S. Gallinarum (88), S. Dublin (88)
	-	No tipificable	<i>Enterobacter</i>
	-	No tipificable	<i>Enterobacter</i>
	CUB 08/10	S. Brandenburg	S. Typhimurium (99), S. Schwarzengrund (99), S. Heidelberg (99), S. Newport (99), S. Paratyphi B (99), S. Dublin (99)
<b>Cáscara</b>	CUB 73/10	S. Enteritidis	<i>Salmonella</i> sp. (99), S. Enteritidis (99), S. Gallinarum (99), S. Dublin (99), S. Typhimurium (99)
	CUB 17/10	S. Typhimurium	S. Enteritidis (99), S. Dublin (99), S. Paratyphi C (99), S. Gallinarum (99), S. Typhimurium (98)
	CUB 72/10	S. Typhimurium	S. Typhimurium (100), S. Dublin (99), S. Agona (99), S. Paratyphi B (99)

Tabla 33. ( Continuación)

Origen	Cepa	Comparación entre tipificación	
		Kauffmann-White	ADNr 16S (% de identidad)
	Cepa 389	No tipificable	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 02/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 05/10	<i>S. Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> sp. (99), <i>S. Enteritidis</i> (99), <i>S. Gallinarum</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99)
	CUB 10/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 18/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
<b>Clara y Yema</b>	CUB 19/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 23/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 28/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 46/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 70/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 71/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 31/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
<b>Clara</b>	CUB 32/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 63/10	No tipificable	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)

Tabla 33. (Conyinuación)

Origen	Cepa	Comparación entre tipificación	
		Kauffmann-White	ADN r 16S (% de identidad)
<b>Clara</b>	CUB 64/10	No tipificable	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 66/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 13/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
<b>Yema</b>	CUB 03/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 60/10	No tipificable	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 61/10	No tipificable	<i>S. Typhimurium</i> (99), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 65/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)
	CUB 67/10	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> (100), <i>S. Dublin</i> (99), <i>S. Agona</i> (99), <i>S. Paratyphi B</i> (99)

#### IV.7. Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

La sensibilidad a diferentes antimicrobianos fue evaluada en 67 aislamientos de *Salmonella* de huevo para consumo (Tabla 34).

**Tabla 34.** Aislamientos de *Salmonella* de huevos para consumo utilizados en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria.

Serovariedades	N° Aislamientos
<i>S. Typhimurium</i>	47
<i>S. Enteritidis</i>	9
<i>S. Agona</i>	2
<i>S. Gallinarum</i>	1
<i>S. Muenchen</i>	1
<i>S. Brandenburg</i>	1
<i>S. Westhampton</i>	1
Cepas no serotipificadas*	5
<b>TOTAL</b>	<b>67</b>

\*Cepas que no pudieron tipificarse por serología pero que fueron positivas a *Salmonella* spp. mediante PCR y que por secuenciación del ADNr 16S mostraron entre un 99% y 100% de identidad con *Salmonella* Typhimurium. A los fines prácticos los resultados de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos de los aislamientos no tipificados (5) serán mostrados junto con los de los aislamientos de ST (47) haciendo un total de 52 aislamientos.

Los aislamientos de ST y SE presentaron diferentes sensibilidades a los antimicrobianos ensayados (Tabla 35, figura 20). Dentro del grupo de los  $\beta$ -lactámicos y  $\beta$ -lactámicos + inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas, el 100 % de los aislamientos fueron sensibles a AMC. Por el contrario, el 46,2 % de los aislamientos de ST fueron sensibles a AMP mientras que el 77,8 % de los aislamientos de SE fueron sensibles al mismo antimicrobiano (Tabla 35).

Con respecto al grupo de las quinolonas (NA, NOR, CIP, ENR), la mayoría de los aislamientos fueron sensibles a los antibióticos de este grupo. El 100 % de los aislamientos de ambas serovariedades fueron sensibles a CIP. El 88,5 %, 92,3 % y 98,1 % de los aislamientos de ST fueron sensibles a ENR, NA y NOR, respectivamente. Sin embargo, el 100 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a NOR y el 88,9 % a NA y ENR.

Los aislamientos de ST presentaron un alto patrón de resistencia a las tetraciclinas, donde el 67,3 % fue resistente a DO y el 94,3 % a TE. Por otra parte el 100 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a TE y el 55,6 % a DO. Con respecto a los fenicoles (C y FFC), más del 94 % de los aislamientos de ST fueron sensibles a C, mientras que el 100 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a FFC y el 88,9 % a C.

En el grupo de los aminoglucósidos, todas los aislamientos (ST y SE) fueron sensibles a CN (100 %), mientras que el 80,8 % de los aislamientos de ST y el 88,9 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a AK. El 66 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a K, mientras que solo el 37 % de los aislamientos de ST fueron sensibles al mismo antimicrobiano. Más del 66 % de los aislamientos de ST y SE mostraron una

sensibilidad intermedia a N. Mientras que el 98,1 % de los aislamientos de ST fueron resistentes a S, el 100 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a dicho antimicrobiano.

En el grupo de las cefalosporinas, se evaluaron las de 1° generación (KF), 2° generación (FOX) y 3° generación (CAZ, CTX y CFM). El 50 % de los aislamientos de ST y el 55,5 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a KF. Sin embargo, el 33 % de los aislamientos de SE fueron resistentes ha dicho antimicrobiano. El 88,5 % y el 100 % de los aislamientos de ST y SE, respectivamente, fueron sensibles a FOX. El 69 % de los aislamientos de ambas serovariedades fueron sensibles a CFM y CAZ. Menos del 23 % de los aislamientos de ambas serovariedades fueron sensibles a CTX y el 44,4 % de aislamientos de SE fueron resistentes a ese antimicrobiano.

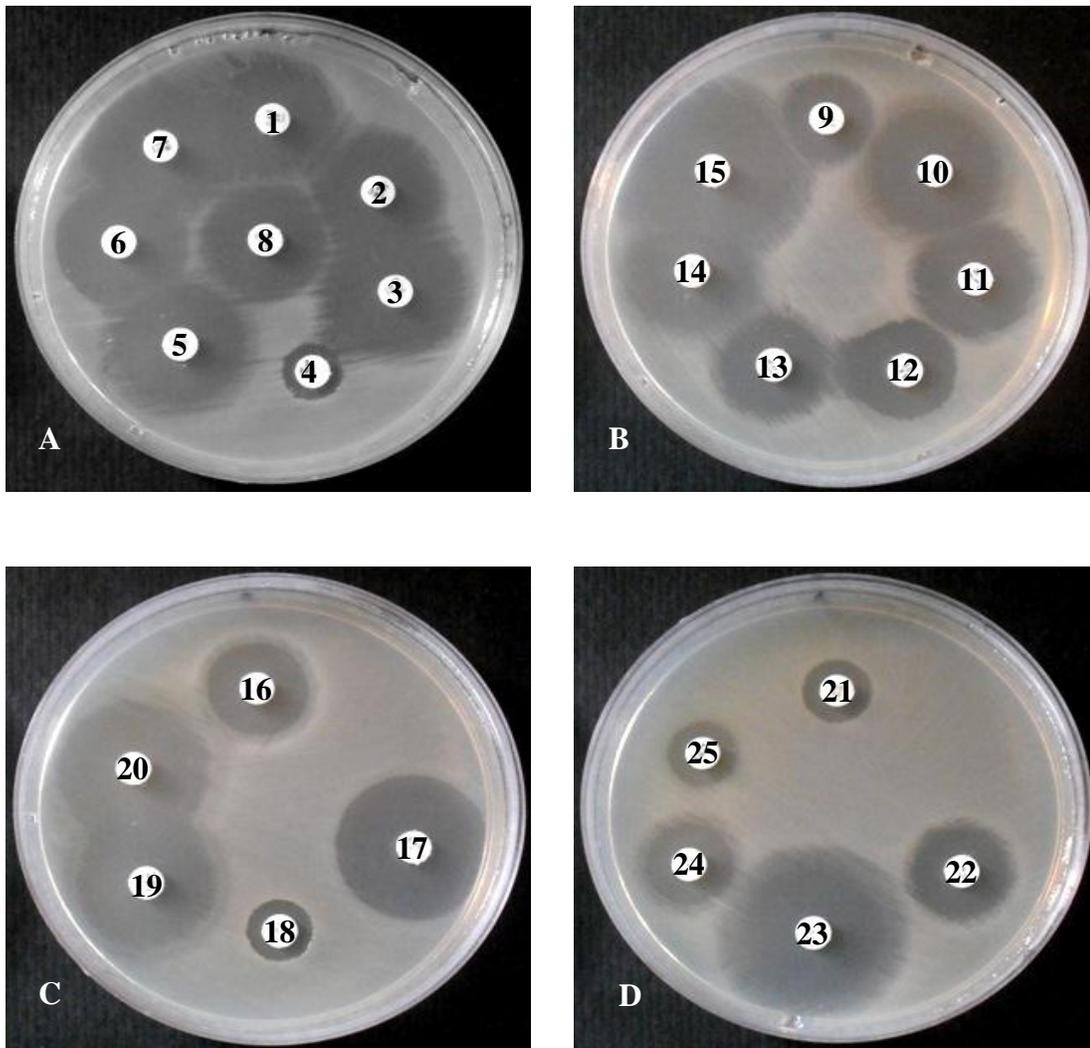
En el grupo de carbapenemes, el 100 % de los aislamientos de ambas serovariedades fueron sensibles a IMP. En el grupo de los inhibidores de la vía del folato, el 78,8 % de los aislamientos de ST y el 100 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a SXT. Para los grupos de glicilciclinas (TGC) y fosfonatos (FOS), más del 88 % de los aislamientos de ambas serovariedades fueron sensibles. En el grupo de las polimixinas, el 51,9 % y el 46,2 % de los aislamientos de ST fueron sensibles o mostraron sensibilidad intermedia a CT, respectivamente. El 100 % de los aislamientos de SE fueron sensibles a este antimicrobiano.

**Tabla 35.** Sensibilidad de 52 aislamientos de *S. Typhimurium* y 9 de *S. Enteritidis* frente a diferentes antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria.

Grupo de Antimicrobianos	Antimicrobiano	Porcentajes de cepas Sensibles (S), Intermedias (I) y Resistentes (R)					
		<i>Salmonella Typhimurium</i>			<i>Salmonella Enteritidis</i>		
		S	I	R	S	I	R
<b>β-lactámicos</b>	AMP**†	46,2	40,4	13,4	77,8	11,1	11,1
<b>B-lactámicos /Inhibidores de β-lactamasas</b>	AMC*	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
<b>Quinolonas</b>	NA*	92,3	1,9	5,8	88,9	11,1	0,0
	CIP*	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	ENR**	88,5	11,5	0,0	88,9	11,1	0,0
	NOR**	98,1	0,0	1,9	100,0	0,0	0,0
<b>Tetraciclinas</b>	DO**	0,0	32,7	67,3	55,6	22,2	22,2
	TE**	3,8	1,9	94,3	100,0	0,0	0,0
<b>Fenicoles</b>	C*	94,2	0,0	5,8	88,9	0,0	11,1
	FFC**	98,1	1,9	0,0	100,0	0,0	0,0
<b>Aminoglucósidos</b>	AK*	80,8	15,4	3,8	88,9	0,0	11,1
	S*	0,0	1,9	98,1	100,0	0,0	0,0
	CN*	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	K**	36,5	55,8	7,7	66,7	22,2	11,1
	N**	3,8	78,8	17,4	11,1	66,7	22,2
<b>Cefalosporinas</b>	KF**	50,0	42,3	7,7	55,5	11,2	33,3
	CFM*	75,0	9,6	15,4	77,8	0,0	22,2
	CTX*	21,2	55,7	23,1	22,3	33,3	44,4
	FOX*	88,5	7,7	3,8	100,0	0,0	0,0
	CAZ*	69,2	23,1	7,7	88,9	11,1	0,0
<b>Carbapenemes</b>	IMP*	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
<b>Inhibidores de la vía del folato</b>	SXT*	78,8	19,3	1,9	100,0	0,0	0,0
<b>Glicilciclinas</b>	TGC*	98,1	1,9	0,0	88,9	0,0	11,1
<b>Polimixinas</b>	CT**	51,9	46,2	1,9	100,0	0,0	0,0
<b>Fosfonatos</b>	FOS**	98,1	1,9	0,0	88,9	0,0	11,1

\*Antimicrobianos usados en medicina humana. \*\*Antimicrobianos usados en medicina veterinaria. †Ampicilina es representativa para Amoxicilina

Referencias: AMP: Ampicilina, AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico, NA: Ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, ENR: Enrofloxacina, NOR: Norfloxacina, DO: Doxiciclina, TE: Tetraciclina, C: Cloranfenicol, FFC: Florfenicol, AK: Amicacina, S: Estreptomina, CN: Gentamicina, K: Kanamicina, N: Neomicina, KF: Cefalotina, CFM: Cefixima, CTX: Cefotaxima, FOX: Cefoxitima, CAZ: Ceftazidima, IMP: Imipenem, SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprima, TGC: Tigeciclina, CT: Colistina, FOR: Fosfomicina.



**Figura 20.** Sensibilidad a diferentes antimicrobianos de uso en medicina humana (A y B) y veterinaria (C y D) en *S. Typhimurium* CUB 70/10.

1: CAZ, 2: AMC, 3: CTX 4: S, 5: CN, 6: NA, 7: IPM, 8: TGC, 9:AMP, 10: C, 11: CFM, 12: SXT, 13: AK, 14: FOX, 15: CIP, 16: KF, 17:ENR, 18: CT, 19: FFC, 20: FOS, 21: DO, 22: K, 23: NOR, 24: N, 25: TE.

El aislamiento de *Salmonella* Gallinarum fue sensible a la mayoría de los antibióticos ensayados sólo mostrando una sensibilidad intermedia a CTX. Por otro lado, el aislamiento de *S. Brandenburg* fue resistente a FFC y mostró sensibilidad intermedia a TGC, ENR, N y K. El aislamiento de *S. Westhampton* mostró sensibilidad intermedia a un gran número de antibióticos (CAZ, AK, CFM, FOS, CT, ENR, DO, TE y NOR) y fue resistente a CTX, NA, S, N y K. El aislamiento de *S. Muenchen* fue resistente a CTX, FOX, AK, N y K y mostró sensibilidad intermedia a CAZ, AK y DO.

Uno de los aislamientos de *S. Agona* presentó resistencia a CTX, DO, N y K, mientras que el otro aislamiento presentó sensibilidad intermedia a DO, CT, KF, AK y CAZ.

El 96 % de los aislamientos de ST y en el 55,6 % de los aislamientos de SE ensayadas mostraron multirresistencia a dos o más antimicrobianos pertenecientes al mismo o a diferentes grupo de antimicrobiano. Cinco patrones de multirresistencia fueron observados en los aislamientos de SE (Tabla 36).

**Tabla 36.** Patrones de multirresistencia en *S. Enteritidis* aislada desde huevos para consumo humano en la provincia de Entre Ríos.

<b>N° Antibióticos</b>	<b>Patrón de resistencia</b>	<b>N° de cepas</b>
<b>2</b>	CTX,K	1
<b>3</b>	CTX,TGC,N	1
	AK,KF,N	1
<b>4</b>	AMP,CFM,KF,DO	1
	C,CFM,KF,FOS	1
<b>TOTAL</b>		<b>5</b>

En los aislamientos de ST, se observaron 27 patrones de multirresistencia, donde el más prevalente fue el patrón S-DO-TE (Tabla 37).

**Tabla 37.** Patrones de multirresistencia en *S. Typhimurium* aislada desde huevos para consumo humano en la provincia de Entre Ríos.

N° Antibióticos	Patrón de resistencia	N° de cepas
2	CTX,S	1
	S,N	2
	S,TE	4
3	S,AMP,TE	1
	S,CT,TE	1
	CTX,S,TE	3
	S,DO,TE	13
4	CTX,S,CFM,TE	1
	S,KF,DO,TE	1
	CAZ,S,DO,TE	1
	S,DO,TE,N	1
	CTX,S,DO,TE	1
	S,DO,TE,K	2
	S,AMP,DO,TE	3
5	CTX,S,DO,TE,K	1
	S,AK,DO,TE,N	1
	S,C,CFM,DO,TE	1
	CAZ,NA,S,DO,TE	1
	S,AMP,KF,DO,TE	1
	CTX,S,DO,TE,N	2
6	CAZ,CTX,S,AK,CFM,TE	1
	S,AMP,KF,DO,TE,N	1
	S,C,CFM,SXT,DO,TE	1
	CAZ,CTX,S,DO,TE,N	1
7	CTX,S,FOX,C,CFM,DO,TE	1
	S,C,CFM,SXT,KF,DO,TE	1
	NA,S,AMP,FOX,CFM,DO,TE	1
<b>TOTAL</b>		<b>46</b>

AMP: Ampicilina, AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico, NA: Ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, ENR: Enrofloxacin, NOR: Norfloxacin, DO: Doxiciclina, TE: Tetraciclina, C: Cloranfenicol, FFC: Florfenicol, AK: Amicacina, S: Estreptomicina, CN: Gentamicina, K: Kanamicina, N: Neomicina, KF: Cefalotina, CFM: Cefixima, CTX: Cefotaxima, FOX: Cefoxitima, CAZ: Ceftazidima, IMP: Imipenem, SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprima, TGC: Tigeciclina, CT: Colistina, FOR: Fosfomicina.

Los aislamientos compatibles con *Salmonella* spp. que no pudieron tipificarse (5), que fueron informados dentro del grupo de los aislamientos de ST, presentaron patrones de multirresistencias. Tres aislamientos presentaron dos patrones de multirresistencia similares a los observados en los aislamientos de ST, los cuales correspondieron a S-TE en un aislamiento y S-DO-TE en los otros dos aislamientos.

## V. DISCUSIÓN

## V. DISCUSIÓN

### V.1. Características físicas del huevo para consumo

#### V.1.1. Características de calidad externa y envasado de huevos para consumo

En este estudio se describen algunas características de calidad externa e interna de los huevos comercializados en el centro-este de la provincia de Entre Ríos. A pesar de la gran variedad de huevos disponibles en el mercado, el consumidor debe tener en cuenta que las características de los mismos no son iguales (Jones *et al.*, 2010). Los consumidores poseen una confusión entre calidad de huevo y tamaño del huevo. Algunas personas creen que cuanto más grande es el huevo es de mejor calidad (Jacob *et al.*, 2008). Por otro lado, el envase de los huevos está vinculado al tipo de consumidor (Anónimo, 2009) y en nuestro estudio diferentes tipos de envases fueron analizados. El papel de diario es comúnmente utilizado por las personas de Entre Ríos para envolver los huevos en paquetes de 6 para su posterior venta al público. Las diferentes áreas de Entre Ríos en donde fueron realizados los muestreos presentaron una gran variedad de envases de huevos. Similares resultados fueron encontrados por Koelkebeck *et al.* (2001) en diferentes estados de Estados Unidos.

Con respecto a la limpieza de la superficie de los huevos, la mayoría de ellos se encuentran limpios cuando son puestos por la gallina, pero pueden contaminarse posteriormente con materia fecal u otro material extraño (Jacob *et al.*, 2008). Incluso, implementando buenas prácticas de manejo en las granjas y manteniendo un extremo cuidado, un pequeño porcentaje de huevos presentan, de todas maneras, su superficie sucia. Los productores deberían tener en cuenta que los huevos sucios están cubiertos con bacterias que podrían causar su deterioro si ingresan dentro del mismo. Por ello, se

recomienda que los huevos sucios estén separados de los huevos limpios, los cuales deberían ser envasados en materiales limpios. Tanto en el sitio de producción como de procesamiento, el lavado del huevo podría realizarse a fines de minimizar el ingreso de bacterias a través de la cáscara (United State Department of Agriculture, 2000). Afortunadamente, los huevos con cáscara sucia que estaban en venta al público en la provincia de Entre Ríos eran escasos. Sin embargo, no sabemos si los huevos fueron o no lavados antes de ser envasados.

Se conoce que el PHC está genéticamente vinculado a los tres componentes principales del huevo: cáscara, clara y yema. Zita *et al.* (2009) y Shi *et al.* (2009) informaron que el PHC incrementa en todos los genotipos de gallinas ponedoras con la edad, la nutrición y el medio ambiente, los cuales están relacionados con la calidad de la cáscara. Por otro lado, Wall *et al.* (2010) demostraron que el PHC no estaba afectado por la dieta o el genotipo de la gallina ponedora. Bell *et al.* (2001) compararon huevos tradicionales marrones y blancos y no encontraron diferencias para PHC. En nuestro estudio, no se conocía la edad de las gallinas ponedoras, su nutrición y su medio ambiente, pero observamos que el PHC, PC y EC fueron mayores en los huevos de CM que en los de CB. Resultados similares fueron informados por Jones *et al.* (2010) en diferentes tipos de huevos comercializados en un mismo establecimiento en ciudades de Estados Unidos. Además, demostraron que el CV del PHC en muestras de 6 huevos presentaba valores bajos indicando que no había una buena homogeneidad. En nuestro estudio se observó que en los huevos analizados el rango en los CV del PHC fue amplio lo que concuerda con lo informado por Jones *et al.* (2010). Por otro lado, menos del 30% de los envases rotulados

contenían huevos pertenecientes a la categoría informada, por lo que sería adecuado implementar y/o mejorar el proceso de clasificación de los huevos para consumo y establecer un control más estricto del PHC antes de que sean puestos a la venta en los supermercados de Entre Ríos.

Şekeroğlu y Altuntaş (2009) describieron que la correlación entre PHC y la calidad de cáscara era inconstante, con rango de valores que van de negativos a positivos. En el estudio de esta tesis se observó que la correlación entre PHC y EC y entre PHC y ATH fue positiva, mientras que la correlación entre PHC y %C fue negativa. Esto implica que a medida que aumenta el PHC aumenta el EC y el ATH, mientras que el % C disminuye.

Con respecto a la clasificación del huevo por su peso, este puede variar según el país. En Canadá, el tamaño de los huevos (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003) es clasificado en pequeño (42,0-48,9 g), medio (49,0-55,9 g), grande (56,0-63,9 g), extra grande (64,0-69,9 g) y jumbo ( $\geq 70,0$  g). Esta clasificación es muy similar a la usada en Estados Unidos (United State Department of Agriculture, 2000), donde los huevos son clasificados en cuanto a su peso en medio (49-56 g), grande (56-65 g), extra grande (65-70 g) y jumbo ( $\geq 70$  g). Los huevos de tamaño medio, grande y extra grande son los más comúnmente disponibles. Esto concuerda con lo encontrado en este trabajo de tesis, ya que la mayoría de los huevos disponibles en los supermercados del centro-este de Entre Ríos correspondieron a los tamaños grande (grado 1S) y medio (grado 1).

La calidad de la cáscara puede ser determinada por la gravedad específica de la cáscara, PC o EC (Messens *et al.*, 2005). Estas características han sido difíciles para

establecer debido a la naturaleza variable de los huevos (Jones y Musgrove, 2005). Generalmente se cree que las gallinas ponedoras de huevos de CM son más pesadas que las ponedoras de huevos de CB, y que ponen huevos más grandes y con mejor calidad de la clara, pero con cáscara más delgada. Scott y Silversides (2000) demostraron que huevos de CM fueron más pesados que los de CB, debido a que los primeros tenían más cáscara y clara. Los resultados en este trabajo de tesis fueron similares a los encontrados por estos autores, aunque para el EC fue mayor en los huevos de CM que en los de CB.

### **V.1.2. Color de Yema y pH en pool de clara y/o yema**

La calidad interna del huevo puede verse afectada por las condiciones del medio ambiente, tales como temperatura y humedad de almacenamiento, afectando algunas características del huevo. Estos cambios incluyen pérdida de agua y de dióxido de carbono con el subsecuente aumento de pH en el contenido del huevo (Akyurek y Okur, 2009). Biladeau y Keener (2009) demostraron que el pH de la CL y de la Y se incrementaba o se mantenía en el tiempo entre valores de 8,0 y 9,5 y 5,9 y 6,3, respectivamente, lo cual concuerdan con los resultados de este trabajo de tesis. Además, Scott y Silversides (2000) mostraron que el pH de la CL es el misma en ambos tipos de huevos (CM y CB), al igual que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis. Akyurek y Okur (2009) observaron que el incremento de pH de la CL (de 7,9 a 9,2) y Y (de 5,8 a 6,2) se debe a la temperatura y tiempo de almacenamiento, y que este incremento del pH fue mayor a 20 °C que a 4 °C. Esta alcalinización de la CL asegura la protección del contenido del huevo contra la contaminación bacteriana (Reijrink *et al.*, 2008).

El CoY ha sido considerado como una importante característica de la calidad del huevo. En efecto, los consumidores tienden a asociar el CoY de color amarillo fuerte a naranja con buena salud (Wall *et al.*, 2010). Debido a que el maíz es usado en la dieta de las gallinas ponedoras en muchos países, como en el nuestro, el consumidor a menudo percibe los huevos por el color de la yema. En las gallinas ponedoras, el CoY es una consecuencia de los pigmentos consumidos en el alimento y a la transferencia de pigmentos acumulados en la piel y patas cuando las aves son inmaduras (Leeson and Summers, 2005).

La pigmentación de la Y depende de la acumulación de carotenoides, tales como xantófilas (Wall *et al.*, 2010). El maíz contiene mayor concentración de este pigmento comparado con otros cereales, aunque altos niveles de pigmentación se pueden lograr con ingredientes naturales, mediante la alimentación con alfalfa o harina de gluten de maíz. Al consumidor lo que más le interesa es el CoY para la preparación de determinados platos, sobre todo en aquellos en donde la Y es claramente visible tales como huevos fritos o hervidos (Hernandez *et al.*, 2002). Las preferencias del consumidor para el CoY varían entre países y a veces entre regiones de un mismo país. Por ejemplo, en los Estados Unidos, el rango de CoY va de 7 a 10 en la escala de color de DSM, mientras que en otros países como Europa o Asia, prefieren valores de CoY más elevados, entre 10 a 14 (Galobart *et al.*, 2004). En este trabajo de tesis se observó diferencias significativas en el CoY con respecto al color de la cáscara. El rango de CoY fue muy variado según la escala de DSM, desde 2 a 14, pero el promedio estuvo entre 6 y 7.

Por otro lado, Hernandez *et al.* (2002) estudiaron la percepción del consumidor europeo y encontraron que el CoY es importante para la mayoría de los consumidores en los países encuestados, y que todos los huevos de un mismo envase o aquellos que se venden al mismo tiempo poseían el mismo o similar CoY. Es por eso que ellos consideraron a la homogeneidad como un indicador de buena calidad. En este trabajo se observó que en una misma muestra (6 huevos) el CV promedio para el CoY fue del 10% indicando una buena homogeneidad. Sin embargo, el rango de CV fue amplio por lo que es de esperar que el CoY no posea una buena homogeneidad en algunos de los envases de huevo puestos a la venta para el consumidor.

## **V.2. Estudio comparativo entre dos métodos de cultivo bacteriológicos y molecular (PCR) para la detección de *Salmonella* spp. en pool de CY contaminadas experimentalmente**

Con respecto a los métodos bacteriológicos empleados (métodos CTSH y método APT), se observó una recuperación de todas las diluciones inoculadas en las muestras ensayadas, y comparando ambos métodos se obtuvo un índice  $\kappa$  de 1, lo que nos indica una excelente concordancia entre ambos métodos. Es por ello que se podría utilizar cualquiera de ellos en la recuperación de diferentes serovariedades de *Salmonella* en pool de contenido de huevo. En nuestro caso, esta comparación fue de utilidad para escoger el método de búsqueda de *Salmonella* en huevos de supermercados siendo el método CTSH el elegido para este fin. Eyigor *et al.* (2010) compararon las técnicas ISO 6579 y FDA/BAM con una RT-PCR (real time PCR, por sus siglas en inglés) pero en una matriz diferente (carne roja y

de aves contaminadas naturalmente), y demostraron que ambas técnicas bacteriológicas fueron similares, independiente del tipo de carne.

Bansal *et al.* (2006) investigaron la precisión y aplicación de ensayos basados en PCR que puedan ser usados después del enriquecimiento en APT para examinar de rutina alimentos contaminados naturalmente por *Salmonella* spp. Ellos encontraron que los resultados de PCR estuvieron en perfecto acuerdo con los resultados obtenidos en los métodos de cultivo estándares. Píknová *et al.* (2002) encontraron resultados positivos a PCR desde 1 a 10 UFC/25g en muestras de alimentos contaminadas artificialmente con SP, lo que se correspondió con los resultados obtenidos por el método de cultivo tradicional. Pérez *et al.* (2008) evaluaron dos métodos de PCR en pool de clara y yema contaminadas con SE, ST, SP y *Salmonella Choleraesuis*, y observaron que todas las muestras inoculadas fueron positivas al cultivo, mientras que de 14 muestras inoculadas, 5 fueron negativas a PCR. Ellos atribuyen estos resultados a la presencia de inhibidores o interferentes de la amplificación de ADN en la muestra, como puede ser el exceso de proteínas. Por ello recomendaron un paso específico inicial de desnaturalización de las proteínas en la extracción del templado. En este trabajo de tesis, en la PCR se observó que, independientemente de la serovariedad (móvil o inmóvil), hubo falsos negativos en las muestras inoculadas con ST ATCC 13311, SI CUB 05/08 y SP 90/142, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Pérez *et al.* (2008). Li y Mustapha (2002) evaluaron 4 métodos de extracción de ADN (uno por ebullición y 3 métodos comerciales) pero en una matriz diferente a la usada en nuestro ensayo y encontraron que el templado de ADN podía obtenerse adecuadamente desde los cultivos puros de ST, pero que la calidad de éste

variaba dependiendo del tipo de alimento evaluado (carne picada o de pollo). Estos autores concluyeron que los constituyentes de los alimentos, tales como compuestos orgánicos, fenólicos, glucógeno, grasa y  $\text{Ca}^{+2}$ , podrían interferir con la reacción de PCR.

Oliveira *et al.* (2002) evaluaron la detección e identificación de *Salmonella* por PCR en muestras avícolas en cultivos mixtos. A partir del caldo de enriquecimiento (Rappaport Vassiliadis) realizaron la PCR y determinaron el límite de detección, siendo para ST de 2 UFC/25 ml, para SE de 5 UFC/25 ml, para SG de  $1,1 \times 10^3$  UFC/25 ml y SP de  $1,8 \times 10^5$  UFC/25 ml. En este trabajo de tesis, si bien la matriz fue diferente y se tomaron muestras para PCR del caldo de pre-enriquecimiento (CTSH y APT), el límite de detección en 25 ml de CY contaminadas con diferentes serovariedades de *Salmonella* fue de 54 UFC para SE, de  $5,8 \times 10^4$  UFC para SP ATCC 13036 y de 5 UFC para SG CUB 05/10 en ambas PCR. El límite de detección para SG INTA 03/121 fue de  $1 \times 10^3$  UFC en PCR-CTSH y de 10 UFC en PCR-APT. Lo antes mencionado permite afirmar que las técnicas de aislamiento convencionales tuvieron mejor sensibilidad y precisión para detectar las cepas inoculadas en contenido de huevo comparadas con la técnica de PCR.

### **V.3. Aislamiento y detección de *Salmonella* en muestras de huevos para consumo**

Gast y Holt (1995) demostraron que la detección de SE en pooles de huevos inoculados con bajo número de esta serovariedad e incubados en caldo de enriquecimiento permite maximizar su detección. Por otro lado, observaron que el contenido de pooles de huevos suplementados con sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) mejora la detección de esta serovariedad en el contenido de huevo. En este trabajo de tesis se aislaron no sólo SE del contenido de

huevo, sino también otras serovariedades como SG y ST, usando un medio de pre-enriquecimiento adicionado con  $\text{FeSO}_4$ .

Betancor *et al.* (2010) estudiaron la presencia de *Salmonella* spp. en 620 pooles de 20 huevos cada uno. Cincuenta y ocho pooles de contenido fueron positivos para *Salmonella*, lo que indicó una prevalencia del 9,3%. Dichos aislamientos pertenecieron a diferentes serovariedades tales como SD (39 aislamientos), SG (9 aislamientos), SE (8 aislamientos), y SP (2 aislamientos). Además, observaron que en 5 de las 13 granjas se aislaron más de una serovariedad y que SD fue la serovariedad más frecuente en todos sus aislamientos aunque no lograron explicar a que se debe la alta prevalencia de esta serovariedad. En este trabajo de tesis se aisló *Salmonella* en 19 pooles de contenido de huevo, los cuales pertenecieron a las serovariedades ST (17 aislamientos), SE (1 aislamiento) y SG (1 aislamiento). A diferencia de los resultados obtenidos por Betancor *et al.* (2010) la serovariedad mas frecuentemente aislada en las muestras de contenido de huevo analizadas en este trabajo de tesis fue ST. Datos similares fueron informados por Begum *et al.* (2010) quienes aislaron ST y SE del contenido de huevos de granja y de consumo.

Mancera Martínez *et al.* (2005) analizaron 400 huevos de 10 marcas comerciales, donde sólo obtuvieron una muestra positiva para SE en Y de huevo. Por otro lado, Alexandre *et al.* (2000) evaluaron la detección de SE en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Region Metropolitana de Chile, donde analizaron Y y C. Sólo obtuvieron una muestra de Y positiva a dicha serovariedad y todas las muestras de C fueron negativas al aislamiento bacteriológico. Datos similares fueron observados en este trabajo

de tesis, ya que sólo se obtuvo una muestra positiva en el contenido de huevo (CY) para SE. A diferencia de estos resultados, Radkowski (2001) investigó la frecuencia de *Salmonella* spp. en huevos para consumo en 1.200 huevos en Polonia y no obtuvo aislamientos en el contenido de los mismos.

Del total de envases analizados en este trabajo de tesis, se observó que el 1,3% de los mismos fueron positivos al aislamiento de *Salmonella*, correspondiendo antigénicamente a 4 serovariedades distintas (SM, SW, SA y SE), y en una muestra de envase se aislaron dos serovariedades distintas (SM y SW), teniendo en cuenta el día de siembra de TT (día 1 o día 5). Por su parte Viora *et al.* (1993) encontraron que el 50% de los envases de los 100 analizados fueron positivos a *Salmonella* sp., correspondiendo antigénicamente a SE todas las cepas aisladas.

Al analizar las muestras de cáscara, De Franceschi *et al.* (1999) estudiaron 7.760 huevos provenientes de granjas de la zona oeste del Gran Buenos Aires y no encontraron *Salmonella* sp. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chousalkar *et al.* (2010) quienes evaluaron 500 huevos y no detectaron este microorganismo tanto en el contenido de huevo como en la cáscara, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, donde se encontró un 1,1% de muestras positivas para dicho microorganismo en muestras de cáscara. García *et al.* (2009) evaluaron la presencia de *Salmonella* sp. en hisopados cloacales, heces y huevos de gallinas ponedoras, obteniendo un total de 65 muestras positivas, de las cuales 46 correspondieron a heces, 2 a hisopados y 17 a cáscara de huevo, evidenciando el riesgo de contaminación horizontal (suelo, heces, ambiente, almacenamiento inapropiado, etc). Todos estos aislamientos correspondieron a SE.

Murchie *et al.* (2007) evaluaron 5.018 muestras de 6 huevos donde sólo 2 muestras de cáscara (0,04%) fueron positivas a *Salmonella* sp., siendo SI y SM las serovariedades aisladas. Los resultados de serotipificación de los aislamientos de cáscara en este trabajo de tesis, revelaron la presencia de ST (2 muestras), SE, SB y SMO.

Ahktar *et al.* (2010) aislaron SE (8 aislamientos) y otras serovariedades (2 aislamientos) en el contenido de huevo. En contraste con los resultados obtenidos por estos autores, en este trabajo de tesis se aislaron 3 serovariedades diferentes en el contenido de huevo (ST, SE y SG), siendo ST la serovariedad más frecuente.

Gantois *et al.* (2008) demostraron que tanto SE como ST pueden colonizar el tejido del tracto reproductivo e infectar los huevos en formación en el oviducto, previa a la ovoposición. Pero una característica importante que puede contribuir a la asociación epidemiológica de SE con huevos es su capacidad para sobrevivir en la clara a 42 °C. Si bien en nuestro estudio, obtuvimos un mayor número de aislamientos de ST, esta serovariedad está asociado en menor grado con el huevo, respecto a SE.

Por otro lado, a pesar de que la tasa de transmisión vertical cumple un papel significativo en la epidemiología de la enfermedad producida por SG, se sabe que la presencia de la bacteria en huevos provenientes de gallinas infectadas es relativamente baja. Se ha encontrado que sólo alrededor de un 3% de los huevos puestos por gallinas infectadas estaban contaminados (Chacana y Terzolo, 2003; Oliveira *et al.*, 2005). En este trabajo de tesis sólo se obtuvo un aislamiento en pool de CY de las 451 muestras analizadas, lo que concuerda con la baja incidencia expuesta por dichos autores.

Los métodos de detección directa de los genes de virulencia de *Salmonella* pueden resultar útiles para la identificación del patógeno. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* poseen el gen *invA* lo que le confiere la capacidad para invadir las células epiteliales (Chia-Ling *et al.*, 2007). En este trabajo de tesis la amplificación del gen *invA* permitió incluir dentro de este género a aquellos aislamientos que no pudieron ser serotipificados.

Zahraei Salehi *et al.* (2005) evaluaron la especificidad de primers (139-141) que amplifican el gen *invA* en aislamientos de *Salmonella* de carcasas de parrilleros. Los 30 aislamientos probados y el control positivo fueron positivos a la PCR. Además estos investigadores evaluaron otros géneros bacterianos (*Citrobacter freundii*, *Shigella boydii*, *E. coli* O<sub>2</sub> K<sub>12</sub> y *Proteus mirabilis*) los cuales dieron negativos a PCR. Resultados similares fueron obtenidos por Jeniková *et al.* (2000) quienes evaluaron en muestras de alimentos la especificidad de otros primers (*invA1-invA2*) dirigidos al mismo gen *invA*. Para ello utilizaron 4 géneros no-*Salmonella* (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae*) y 17 serovariedades diferentes de *Salmonella*. Ellos demostraron que las especies no-*Salmonella* fueron negativas a la reacción mientras que todas las serovariedades de *Salmonella* fueron positivas. Resultados similares fueron obtenidos en este trabajo de tesis, cuando evaluamos la especificidad de los primers con cepas de *Proteus* sp. y *Citrobacter freundii*, ya que ninguna de estas especies generó el producto de amplificación.

Una de las limitaciones de los métodos de PCR, para la detección de patógenos alimentarios, es la inhibición de la enzima *Taq* polimerasa por los componentes del mismo y la presencia de bajo número de microorganismos blanco por g de alimento, lo cual puede generar resultados FN. Este problema fue superado por la incorporación de caldos de enriquecimiento que permiten recuperar bacterias dañadas y diluir algunas sustancias inhibitorias presentes en la matriz incrementando de esta manera la sensibilidad de la reacción (Saroj *et al.*, 2008). En contraposición, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis mostraron un gran número de FN en muestras pre-enriquecidas analizadas por PCR lo cual estuvo fuertemente relacionado con el tipo de serovariedad inoculada experimentalmente.

Loongyai *et al.* (2010) evaluaron muestras de huevos provenientes de diferentes tipos de granja para la detección de *Salmonella* en contenido de huevo (39) y de cáscara (39) por métodos bacteriológicos y PCR usando el par de primer 139-141. Ellos observaron que todas las muestras dieron negativas al aislamiento, mientras que por PCR obtuvieron dos muestras de cáscara positivas. En este trabajo de tesis, nuestros resultados demuestran que el mayor número de aislamientos en las muestras de CY, CL y Y fueron positivas por cultivo a diferencia de los resultados obtenidos por PCR a partir del pre-enriquecimiento (CTSH) utilizando el mismo par de primers.

Oliveira *et al.* (2002, 2003) evaluaron por PCR 103 muestras de campo para detectar *Salmonella* a nivel de género con el par de primer 139-141 y compararon en paralelo el método convencional de aislamiento vs. PCR-RV (PCR de caldo Rappaport

Vassiliadis). Estos investigadores observaron que 41 muestras fueron positivas a PCR-RV mientras que al aislamiento solo lo fueron positivas 18 muestras. En contraposición, en nuestro trabajo de tesis se obtuvieron un mayor número de muestras positivas por aislamiento que por PCR, aunque algunas muestras sólo fueron positivas a PCR. Oliveira *et al.* (2002, 2003) obtuvieron un mayor número de muestras positivas a PCR, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

La sensibilidad de la PCR varía de acuerdo a los diferentes métodos de obtención del templado de ADN, ya sea por una incompleta lisis de la célula o debido a pérdidas del templado entre los pasos de obtención del mismo. Por ello los métodos basados en ADN para la detección de *Salmonella* necesitan adaptarse a los tipos de muestra y a la variación de niveles de contaminantes específicos y no específicos presentes en la muestra (Riyaz-UI-Hassan *et al.*, 2004). Esto explicaría en cierto modo el bajo número de muestras positivas en este trabajo de tesis. Existen otros primers, los cuales amplifican el gen *invA*, pero dando un producto de amplificación distinto al par de primer 139-141 (Malorny *et al.*, 2003b). Ferretti *et al.* (2001) desarrollaron un método basado en PCR para la detección de *Salmonella* sp. en alimento, donde utilizaron los primers Salm3-Salm4, que amplifican una región del gen *invA*, dando un producto de amplificación de 389 pb. Ellos evaluaron este juego de primers en muestras de salame y observaron que los mismos pueden detectar diferentes serovariedades de *Salmonella* y que la sensibilidad del método no se incrementó después de 8 h de enriquecimiento de la muestra en APT. En nuestro trabajo de tesis, al utilizar este juego de primers observamos que algunas cepas de *Salmonella* no amplificaron.

Ziemer y Steadham (2003) evaluaron la especificidad de primers de *Salmonella* en varias especies de bacterias intestinales, entre los cuales utilizaron los primers Salm3-Salm4 y observaron productos de amplificaciones no específicas en muestras de materia fecal y en bacterias asociadas al intestino. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por estos autores, ya que al evaluar la especificidad de estos primers, se observaron productos de amplificación inespecíficos en cepas de *Salmonella* y además se observó reacción positiva con cepas de *Proteus* spp.

Los juegos de primers evaluados (130-141 y Salm3-Salm4) nos permiten identificar al género *Salmonella* sin poder determinar la serovariedad. Existen primers que permiten identificar la serovariedad involucrada directamente en una muestra problema. Agron *et al.* (2001) analizaron tres juegos de primers Sdf I, Sdf II y Sdf III para la detección de SE y observaron que el primer Sdf I no amplificó en 73 cepas no-SE. Sin embargo las 14 cepas de SE generaron el producto de amplificación esperado (~300 pb). También fue determinada su especificidad con otras cepas ATCC no-*Salmonella* como *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* y *Providencia rengerii* y ninguna de estas cepas dieron reacción positiva a la PCR. Nuestros resultados fueron altamente comparables con los obtenidos por Agron *et al* (2001), ya que sólo observamos amplificación en las cepas de SE en las cepas utilizadas como controles positivos. Al analizar las muestras que habían dado positivas al gen *invA*, no se observó producto de amplificación para los primers utilizados. Todo ello sugiere que dichas muestras positivas al gen *invA* contenían material genético pertenecientes a otros serovares distintos a SE.

#### **V.4. Presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en CL y Y de huevos para consumo**

Los efectos de inhibición del crecimiento bacteriano pueden deberse a la presencia de sustancias inhibidoras propias del huevo o bien a residuos de ATB. De Franceschi *et al.* (1999) evaluaron el efecto inhibidor de la CL y Y de huevo en un cultivo de SE. Ellos observaron que la CL inhibió la multiplicación de SE actuando como bactericida hasta los 7 días de postura y como bacteriostático hasta los 15 días de postura, mientras que en las muestras de Y no se observó dicho efecto. En este trabajo de tesis mostramos que el efecto de inhibición de crecimiento fue dependiente de la serovariedad ensayada tanto en CL como en Y. Además, los resultados obtenidos para la cepa de SE ensayada concuerdan con lo informado por De Franceschi *et al.* (1999) en muestras de Y.

Los ATB poseen diferente distribución en el contenido del huevo. Se conoce que el grupo de las tetraciclinas pueden encontrarse tanto en CL como en Y (Roudaut *et al.*, 1989; Kan y Petz, 2000). Por otra parte, el grupo de los macrólidos, quinolonas y nitrofuranos muestran mayores niveles en la CL (Kan y Petz, 2000; Alm El Dein y Elbearon, 2010). Además, se sabe que tanto la CL como la Y poseen un gran número de proteínas con efecto antimicrobiano (Kovacs-Nolan *et al.*, 2005). Si bien en este trabajo de tesis no se determinó el tipo de sustancia inhibidora presente en el contenido del huevo, se observó que la CL presentó mayor efecto inhibitorio que la Y frente a las cepas ensayadas.

### **V.5. Amplificación del ADNr 16S de cepas de *Salmonella* aisladas de huevos para consumo y comparación de secuencias en bases de datos**

Lin and Tsen (1996) utilizaron primers para la detección específica de *Salmonella* basados en el gen ARNr 16S los cuales no resultaron ser específicos para este género, ya que hibridizaban con *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*. Trkov y Avguštin (2003) mejoraron la especificidad de estos primers para la detección de *Salmonella* spp. Tasi-Hsin *et al.* (2005) diseñaron un par de primers a partir de las secuencias IG para la detección específica de *Salmonella*, y observaron que dichas regiones podrían ser usadas para el diseño de sondas o primers para PCR específicos en la detección de *Salmonella*, ya que esa secuencia no fue encontrada en otros géneros estrechamente relacionados tales como *Citrobacter*, *Shigella*, *Enterobacter*, etc. En este trabajo de tesis, al realizar la secuenciación del ADNr 16S (primers 27F-1492R) en cepas de *Salmonella* aisladas de huevos para consumo, las cuales estaban tipificadas según el esquema de Kauffmann-White, observamos que hubo cepas que poseían una identidad mayor al 99 % y en otros casos del 87 % y 88 %. Sin embargo, a pesar que no se pudo determinar la serovariedad por medio de esta técnica, todas las cepas secuenciadas presentaban identidad con el género *Salmonella*. Cuando se evaluaron las secuencias de dos aislamientos no tipificadas que no producían H<sub>2</sub>S en TSI, ambas dieron una identidad del 99% con cepas del género *Enterobacter*.

La comparación de genomas completos aporta la exactitud de las relaciones evolutivas. Rodicio y Mendoza (2004) plantean que cepas con menos del 97 % de identidad en las secuencias de sus ADNr 16S es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel

especie. Esto implica que la secuenciación del ADNr 16S no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie. Sin embargo, los resultados de este trabajo de tesis muestran que distintas serovariedades de *Salmonella* comparten un % de identidad entre el 87 % y el 88 % para un mismo aislamiento. A pesar que la secuenciación del ADNr 16S se está utilizando cada vez más para la identificación de bacterias en laboratorios de microbiología, no existen directrices aceptadas para el uso de la técnica o para la interpretación de los datos de las secuencias. Dadas las limitaciones de la técnica para algunos taxones, las bases de datos de secuencias en constante expansión y complejidad taxonómica y la imprecisión en algunas bases de datos, existen algunas recomendaciones para el uso de la secuenciación del ADNr 16S en la identificación de bacterias. El uso de la secuenciación del ADNr 16S es frecuentemente elegido en aquellas cepas que no pueden ser identificadas con precisión mediante pruebas fenotípicas en laboratorios de microbiología. Sin embargo, como se sabe que ciertos grupos de bacterias presentan dificultades para la identificación por secuenciación del ADNr 16S, estas bacterias deben ser excluidas (Woo *et al.*, 2008).

#### **V.6. Pruebas de sensibilidad a diferentes antimicrobianos usados en medicina humana y veterinaria**

En el grupo de  $\beta$ -lactámicos, Ruiz B *et al.* (2006) evaluaron la susceptibilidad a AMP y AMP/Sulbactam en diferentes cepas del género *Salmonella* aisladas en granjas de gallinas ponedoras comerciales observando un 100% de sensibilidad. Suresh *et al.* (2006) encontraron resistencia a AMP en el 100 % de las cepas de *Salmonella* aisladas en huevo. Esaki *et al.* (2004) observaron que aproximadamente el 20% de las diferentes

serovariedades de *Salmonella* aisladas en alimentos para animales (vacuno, porcino y aves), mostraron una resistencia del 30,5% a AMP. En este trabajo de tesis el 50% de los aislamientos de ST y el 70% de los aislamientos de SE fueron sensibles a AMP., mientras que, el 100 % fue sensible a AMC. Hoszowski y Wasyl (2002) observaron un 60,6% de resistencia a AMP en cepas de ST aisladas de animales y alimentos , mientras que sólo el 3,2% de SE fueron resistentes al mismo antimicrobiano.

Para el grupo de las quinolonas, Akoachere *et al.* (2009) y Esaki *et al.* (2004) informaron una marcada susceptibilidad a este grupo de antimicrobianos en cepas del género *Salmonellas* aisladas desde alimentos para aves y animales de producción. Esto concuerda con nuestro resultado tanto para ST como para SE. En contra posición, Hoszowski y Wasyl (2002) observaron un 45,5% y 12,8% de resistencia a NA y ENR, respectivamente en ST, mientras que en aislamientos de SE observaron un 22,1% y 8,4% de resistencia a NA y ENR, respectivamente. Ambas serovariedades fueron susceptibles a CIP. Suresh *et al.* (2006) encontraron un 40% de cepas de SE resistentes a NA.

Por otro lado, Ruiz B *et al.* (2006) y Suresh *et al.* (2006) observaron una sensibilidad del 100% para TE en cepas de SE aisladas de huevos , lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Por otra parte, más del 90 % de los aislamientos de ST fueron resistentes a TE, igual que lo informado por Hoszowski y Wasyl (2002) y Miko *et al.* (2005). Mantilla *et al.* (2010) observaron un 35% de cepas resistentes a DO. Similares resultados observamos en los aislamientos de SE (22,2 %), mientras que, ST presentó un alto porcentaje de cepas resistentes a este antimicrobiano (67,3 %).

Los resultados en este trabajo de tesis concuerdan con los obtenidos por Ruiz B *et al.* (2006) para C, a diferencia de lo encontrado por Khan *et al.* (2000), Hoszowski y Wasyl (2002), Esaki *et al.* (2004) y Miko *et al.* (2005). Además, Kahn *et al.* (2000) observaron que cepas que fueron resistentes a C también lo fueron para FFC. Por su parte, Mantilla *et al.* (2010) encontraron en cepas móviles del grupo D aisladas en gallinas ponedoras comerciales, que sólo una cepa fue resistente a C mientras que 13 (65%) fueron resistentes a FFC. Por otra parte, Yang *et al.* (2002) observaron que ningún aislamiento de ST y SE presentaron resistencia a FFC.

Diversos autores encontraron una sensibilidad cercana o igual al 100% para AK y CN (Hoszowski y Wasyl, 2002; Esaki *et al.*, 2004; Miko *et al.*, 2005; Musgrove *et al.*, 2006; Ruiz B *et al.*, 2006; Suresh *et al.* 2006; Graziani *et al.*, 2007), lo que concuerda con los hallazgos en este trabajo de tesis.. Además, Graziani *et al.* (2007) encontraron una alta resistencia a S. Por su parte, Hoszowski y Wasyl (2002) observaron un alto porcentaje de cepas de ST resistentes a S mientras que en SE el porcentaje de resistencia fue menor al 9%. En este trabajo de tesis observamos un bajo porcentaje de aislamientos de ST y SE resistentes a K, lo que concuerda con lo encontrado por Hoszowski y Wasyl (2002). Por su parte, Mantilla *et al.* (2010) informaron un 30% de cepas resistentes al mismo antimicrobiano. Suresh *et al.* (2006) detectaron un 100% de cepas sensibles a N en diferentes serovariedades de *Salmonella*, a diferencia de lo encontrado en este trabajo de tesis (alto porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia).

Ruiz B *et al.* (2006) encontraron una sensibilidad del 100% para CAZ y CTX en *Salmonella* no Typhimurium, a diferencia de lo observado en este trabajo, donde el 88,9 % y 22,3% de los aislamientos de SE fueron sensibles a los mismos antibióticos, respectivamente. Esaki *et al.* (2004) observaron una alta sensibilidad para el grupo de las cefalosporinas en cepas de *Salmonella* spp.

Todas las cepas de *Salmonella* estudiadas fueron sensibles al grupo de los carbapenemes de manera similar a los lo informado por Ruiz B *et al.* (2006). Por otra parte, Akoachere *et al.* (2009) describieron alta resistencia a SXT en cepas de ST, mientras que, Miko *et al.* (2005) observaron un alto porcentaje de cepas resistentes a sulfametoxazol en diferentes serovariedades de *Salmonella*. Estos resultados no concuerdan con los observados en este trabajo, ya que el 78% de los aislamientos fueron sensibles a este antimicrobiano. Resultados similares a los nuestros fueron informados por Hoszowski y Wasyl (2002), Esaki *et al.* (2004), Ruiz B *et al.* (2006), Suresh *et al.* (2006), Graziani *et al.* (2007) y Mantilla *et al.* (2010).

En este trabajo de tesis no se encontró multirresistencia en los aislamientos de SA a diferencia de lo informado por Learn-Han *et al.* (2008) quienes de un total de 48 aislamientos de esta serovariedad (tanto de aves como de diferentes vegetables), 34 aislamientos mostraron resistencia a E seguido, de mayor a menor % de resistencia, a TE, S, NA, AMP, C, SXT, CTX, KF, CN y CIP. Diferentes combinaciones de resistencia a estos antimicrobianos fueron dieron lugar a 12 perfiles de multirresistencia informados por los autores antes mencionados.

Mantilla *et al.* (2010), evaluaron la sensibilidad a diferentes antimicrobianos de 11 cepas de SG aisladas en gallinas ponedoras comerciales, las cuales presentaron una resistencia mayor al 40% para Amoxicilina, DO, FFC y TE mientras que para S presentaron un 100% de resistencia. Además más del 45 % de las cepas fueron sensibles a CTX, C, FOS, K y SXT. Estos resultados difieren de los obtenidos en este trabajo de tesis, ya que se donde se observó que el aislamiento de SG fue sensible a casi todos los antimicrobianos ensayados, solo se observó sensibilidad intermedia a CTX. Para obtener una información mas confiable sobre el estado de resistencia de las cepas de SG en la zona de estudio, sería necesario realizar una evaluación de un mayor número cepas de este biovar.

La detección y monitoreo de la multirresistencia de ST y SE es importante para mejorar la elección del antimicrobiano adecuado para el tratamiento de salmonelosis y para evaluar el riesgo de expansión de cepas multirresistentes (Yang *et al.*, 2002). Por lo mencionado anteriormente, es importante estudiar los perfiles de resistencia de ST tanto de origen humano como animal, ya que permitirá una mayor comprensión de la epidemiología de los clones involucrados (Grazziani *et al.* 2007). En este trabajo de tesis se observó un alto porcentaje de cepas de ST multirresistentes (96%). Resultados similares fueron observados por Akoachere *et al.* (2009) quienes observaron el fenómeno de multirresistencia en 38 cepas de 75 aislamientos de esta misma serovariedad. Grazziani *et al.* (2007) observaron multiresistencia en ST tanto de origen humano como de origen animal.

Además en nuestro trabajo de tesis informamos 5 patrones de multirresistencia en aislamientos de SE. Resultados similares fueron informados por Suresh *et al.* (2006) quienes encontraron 6 patrones diferentes de multiresistencia en 26 cepas de SE aisladas en cáscara de huevo y 3 patrones diferentes en cepas de SE aisladas en huevos almacenados.

## **VI. CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

- Los valores de PHC, PC, EC, %C, ATH, CoY y pH de pool de CY en el total de huevos estudiados fueron diferentes entre los huevos de CM y de CB.
- Los dos métodos bacteriológicos analizados no presentaron diferencias entre si en cuanto a la capacidad discriminatoria y el límite de detección para *Salmonella*, pero si presentaron diferencias con la técnica de PCR utilizadas. Por ello, los métodos de aislamiento resultaron más adecuados par la detección de *Salmonella* spp.
- La prevalencia de *Salmonella* spp. en el total de los diferentes tipos de muestras analizadas en la provincia de Entre Ríos fue del 1,8 % (29/1.643 muestras), mientras que en el total de muestras (24/903) la prevalencia fue del 6,65%, aislándose 8 serovariedades de *Salmonella* sp. El 66 % de las muestras positivas a *Salmonella* spp. correspondieron a ST, mientras que el 14 % a SE.
- La prevalencia de *S. Enteritidis* en el total de tipos de muestras analizadas fue del 0,55% (9/1.643), mientras que en total de muestras fue de 1,00% (9/903).
- Aunque hay diferentes regiones del gen *invA* que se utilizan para la detección de *Salmonella* spp. por PCR, no todas muestran la misma especificidad.
- La prueba de PCR para la detección de SE, dirigida al gen *Sdf*, mostró una buena especificidad.

- La amplificación y secuenciación del ADNr 16S de las cepas de *Salmonella* permite la identificación a nivel de género, pero no de serovariedad.
- La presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano en el contenido del huevo fue mas frecuente en la CL que en la Y, lo cual puede deberse a la diferente distribución de dichas sutancias.
- Los antimicrobianos de elección para la terapia de infecciones causadas por *Salmonella* spp. son AMC, CIP e IMP.

# **VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRON, P.G.; WALKER, R.L.; KINDE, H.; SAWYER, S.J.; HAYES, D.C.; WOLLARD, J. & ANDERSEN, G.L. (2001). Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4984-4991.

AHO, P. & WRIGHT, C. (2010). La sustentabilidad y la industria avícola. *Ind. Avic.* Enero: 12-38.

AKHTAR, F.; HUSSAIN, I.; KHAN, A. & RAHMAN, U. (2010). Prevalence and antibiogram studies of *Salmonella* Enteritidis isolated from human and poultry sources. *Pakistan Vet. J.* 30:25-28.

AKOACHERE J-F.T.K., TANIH, N.F., NDIP, L.M. & NDIP, R.N. (2009). Phenotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from food-animals and abattoir drains in Buea, Camerron. *J. Health Popul. Nutr.* 27:612-618.

AKYUREK, H. & OKUR, A.A. (2009). Effect of storage time, temperature an hen age on egg quality in free-range layer hens. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 8:1953-1958.

ALCAINE, S.D.; WARNICK, L.D. & WIEDMANN, M. (2007). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *J. Food Prot.* 70:780-790.

ALEZANDRE, M.; POZO, C.; GONZÁLEZ, V.; MARTÍNEZ, M.C.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J. & HEITMANN, I. (2000). Detection of

---

*Salmonella* Enteritidis in samples of poultry products for human consumption in the Chilean Metropolitan Area. Rev. Med. Chile. 128:1075-1083.

ALM EL DEIN, A.K. & ELBEARON, E.R. (2010). Antibiotic residue in eggs of laying hens following injection with gentamicin. New York Scie. J. 3:135-140.

AMER, L., VON SPETCH, M, MAUBECIN, E. & BARGARDI, S. (1999). Incidencia de *Salmonella* en huevos de gallinas y mayonesa artesanal. Rev. Ciencia Tecnol. 2:43-49.

ANDERSON, K.E., THARRINGTON, J.B., CURTIS, P.A. & JONES, E.T. (2004). Shell characteristics of eggs from historic strains of single comb white leghorn chickens and relationship of egg shape to shell strength. Int. J Poult. Sci. 3:17-19.

ANÓNIMO. (1968). Capítulo XXII: Huevos en Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de origen animal. SENASA.

ANÓNIMO. (2003). Report of the survey of salmonella contamination of uk produced shell eggs on retail sale. <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis5004report.pdf>

ANÓNIMO. (2007). Evolución de la avicultura en Argentina desde 1857 al 2007. <http://www.cadenaavicola.com.ar/index.asp?id=117&ver=2>.

ANÓNIMO. (2009). Egg cartons, our link with the consumer. Egg Ind. 114: 4-7.

ANÓNIMO. (2010). Imagen y consumo de huevo. CAPIA Informa. N° 241. p: 26-28.

ANÓNIMO. (2011). Watt Executive Guide 2011. Wyatt Publishing. England. [http://www.itpnews.com/files/images/watt2011\\_ITP.pdf](http://www.itpnews.com/files/images/watt2011_ITP.pdf). Acceso Noviembre de 2011.

ANTON, M. (2007). Composition and structure of hen egg yolk. En: Bioactive eggs compounds. HUOPALAHTI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M. & SCHADE, R. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. p. 1-6.

APATA, D.F. (2009). Antibiotic resistance in poultry. Int. J. Poult. Sci.8:404-408.

APPLEGATE, E. (2000). Introduction: nutritional and functional roles of eggs in the diet. J. Am. Coll. Nutr. 19 5 Suppl.: 495S-498S.

ARTHUR, J. A. & O'SULLIVAN, N. (2005). Breeding chickens to meet egg quality needs. Int. Hatchery Pract. 19:7-9.

BANSAL, N.S.; GRAY, V. & McDONELL, F. (2006). Validated PCR assay for the routine detection of *Salmonella* in food. J. Food Prot. 69:282-7.

BARROW, P.A. & LOVELL, M.A. (1991). Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. Avian Pathol. 20:335-348.

BÄUMLER, A.; HEFFRON, F. & REISSBRODT, R. (1997). Rapid detection of *Salmonella* enterica with primers specific for *iroB*. J. Clin. Microbiol. 35:1224-1230.

BEARDSWORTH, P.M. & HERNÁNDEZ, J.M. (2004). Yolk colour – an important egg quality attribute. Int. Poult. Product. 12:17-18.

BEGUM, K.; REZA, T.A.; HAQUE, M.; HOSSAIN, A.; KABIRUL HASSAN, F.M.; NAHID HASAN, S.; AKHTER, N.; AHMED, A. & BARUA, U. (2010). Isolation,

identification and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* spp. from chicken eggs, intestines and environmental samples. Bangladesh Pharm. J. 23:27.

BELL, C. & KYRIAKIDES, A. (2002). Test methods. En: *Salmonella: A practical approach to the organisms and its control of food*. Ed. Blackwell Science Ltd. París. France. p. 282-294.

BELL, D.D.; PATTERSON, P.H.; KOELKEBECK, K.W.; ANDERSON, K.E.; DARRE, M.J.; CAREY, J.B.; KUNEY, D.R. & ZIEDLER, G. (2001). Egg marketing in national supermarkets: eggs quality-Part 1. Poult. Sci. 80:383-389.

BETANCOR, L.; PEREIRA, M.; MARTÍNEZ, A.; GIOSSA, G.; FOOKES, M.; FLORES, K; BARRIOS, P.; REPISO, V.; VIGNOLI, R.; CORDEIRO, N.; ALGORTA, G.; THOMSON, N.; MASKELL, D.; SCHELOTTO, F. & CHABALGOITY, J.A. (2010). Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. J. Clin. Microbiol. 48:2413-2423.

BHUNIA, A.K. (2008). *Salmonella enterica*. En Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis. Ed.: Elsevier. New York, USA. p. 201-215.

BILADEAU, A.M. & KEENER, K.M. (2009). The effects of edible coatings on chicken egg quality under refrigerated storage. Poult. Sci. 88:1266-1274.

BOTERO HOYOS, L. A. (2007). Salmonelosis y su control. Engormix [http://www.ergomix.com/s\\_articles\\_view.asp?art=1483&AREA=AVG-165](http://www.ergomix.com/s_articles_view.asp?art=1483&AREA=AVG-165).

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R. & SWAMINATHAN, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38:2465-2467.

CABRERA, R.; RUIZ, J.; RAMÍREZ, M.; BRAVO, L.; FERNÁNDEZ, A.; ALADUEÑA, A.; ECHEITA, A.; GASCÓN, J.; ALONSO, P. & VILA, J. (2006). Dissemination of *Salmonella enterica* serotype Agona and multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Thyphimurium in Cuba. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74:1049-1053.

CAFFER, M.I. & TERRAGNO, R. (2008). Familia *Enterobacteriaceae*. En: Enterobacterias: Actualización diagnóstica. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina. p. 1-5.

CAFFER, M.I.; ALCAIN, A.; PANAGOPULO, M.; MORONI, M.; BRENGI, S. & TERRAGNO, R. (2010). Serovariedades de *Salmonella* spp. en Argentina, 2007-2009. Revista Argentina de Microbiología. 42:80.

CASAWELL, M., FRIIS, C.; MARCO, E.; McMULLIN, P. & PHILIPS, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. J. Antimicrob. Chemother. 52:159-161.

CASTILLO, V.L.; VALDÉS AMEY, E.; CISNEROS DESPAIGNE, E. & PÉREZ RODRÍGUEZ, O. (1996). Determinación de *Salmonella* y enterobacterias totales en huevos frescos de gallinas. Rev. Cubana Aliment. Nutr. 10:1-4.

CHACANA, P. & TERZOLO, H. (2003). Revisión sobre pullorosis y tifosis aviar: nuevos enfoques para viejos conceptos. Rev. Med. Vet. 84:14-20.

CHIA-LING, L.; CHENG-HSUN, CH.; CHISHIH, CH.; YHU-CHERING, H.; TZOU-YIEN, L. & OU, J.T. (2007). A multiplex polymerase chain reaction method for rapid identification of *Citrobacter freundii* and *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 40:222-226.

CHIU, C.H. & OU, J.T. (1996). Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* 34:2619-2622.

CHOUSALKAR, K.K.; FLYNN, P.; SUTHERLAND, M.; ROBERTS, J.R. & CHEETHAM, B.F. (2010). Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *Int. J. Food Microbiol.* 142:207-213.

CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. (1994). Actualización acumulada. Tomo I y III. Marzocchi Ediciones. Argentina.

COGAN, T.A., JØRGENSEN, F.H.; LAPPIN-SCOTT, M.; BENSON, C.E.; WOODWARD, M.J. & HUMPHREY, T.J. (2004). Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiology* 150:1063–1071.

COGAN, T.A.; DOMINGUE, G.; LAPPIN-SCOTT, H.M.; BENSON, C.E.; WOODWARD, M.J. & HUMPHREY, T.J. (2001). Growth of *Salmonella* Enteritidis in

artificially contaminated eggs: the effects of inoculums size and suspending media. *Int. J. Food Microbiol.* 70:131-141.

COLUSI, A. (1994). Antibióticos: Ventajas y riesgos. II Seminario Internacional de Ciencias Avícolas. Buenos Aires. p. 13-27.

COUTTS, J.A & WILSON, G.C. (2007). Optimum egg quality. A practical approach. <http://www.thepoultrysite.com/publications/1/optimum-egg-quality-a-practical-approach>  
Acceso Junio 2011.

DAWSON, B. & TRAPP, G. (2005). Bioestadística médica, Ed. El Manual Moderno. México.

DE BUCK, J. (2004). Interaction of *Salmonella* Enteritidis with the reproductive tract of the laying hen. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Gante. Bélgica. p. 24.

DE FRANCESCHI, M.; VIORA, S.; ANSELMO, R. & BARRIOS, H. (1999). *Salmonella* Enteritidis en huevos frescos. *Rev. Med. Vet.* 79:5-7.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, M.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. & HERMAN, L. (2006). Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* enteritidis. *Int. J. of Food Microbiol.* 112: 253–260.

ERRECALDE, J.O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. FAO Producción y sanidad animal. Roma. p. 26.

ESAKI, H; MORIOKA, A.; ISHIHARA, K.; KOJIMA, A.; SHIROKI, S.; TAMURA, Y. & TAKAHASHI, T. (2004). Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Programme. J. Antimicrob. Chemother. 53:266-270.

EYIGOR, A.; TEMELLI, S. & CARLI, T. (2010). Evaluation of ISO 6579 and FDA/BAM methods to complement Real-Time Polymerase Chain Reaction for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated poultry meat and red meat. Foodborne Pathog. Dis. 7:921-7.

FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L.C.; OMI, G. & CLEMENTI, F. (2001). Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. Appl. Environ. Microbiol. 67:977-978.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (2003). Egg marketing. A guide for the production and sale of eggs. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. (2011). Serotypes profile of *Salmonella* isolation from meat and poultry products. January 1998 through December 2010. [http://www.fsis.usda.gov/Science/Serotypes\\_Profile\\_Salmonella\\_Isolates/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Serotypes_Profile_Salmonella_Isolates/index.asp)

FOOD STANDARDS AGENCY. (2004).

<http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis2004branch/fsis5004eggs>. Acceso Junio de 2011

FRATAMICO, P.M. & KAWASAKI, S. (2008). Applications of the polymerase chain reaction for detection, identification, and typing of food-borne microorganisms. En: Microbial Food Contamination. WILSON, CH. Ed. CRC Press. p. 213-254.

GALÁN, J.E. & CRTISS, R. (1991). Distribution of the *invA*, -B, -C and -D genes of *Salmonella* Typhimurium among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella* Thyphi are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* 59:2901-2908.

GALAS, M. & PASTERÁN, F. (2008). Manual de procedimientos. Sensibilidad a los antimicrobianos en *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Centro Regional de Referencia WHO-Global Salm Surv para América del Sur. p. 1-44.

GALOBART, J.; SALA, R.; RINCÓN-CARRUYO, X.; MANZANILLA, E.G; VILA, B. & GASA, J. (2004). Egg yolk color as affected by saponification of different natural pigmenting sources. *J. Appl. Poult. Res.* 13:328–334.

GAMA, N.M.S.Q.; BERCHIERI, K.A. & FERNANDES, S.A. (2003). Occurrence of *Salmonella* sp. in laying hens. *Brazilian J. Poult. Sci.* 5:15-21.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F., GAST, R., HUMPHREY, T.J. & VAN IMMERSEEL, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:7118-738.

GANTOIS, I.; EECKHAUT, V.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. & VAN IMMERSSEEL, F. (2008). A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathol.* 37:399-406.

GARCÍA, C.; CATALÁ-GREGORIO, P.; SORIANO, J.M.; TUDÓN, A.L.; BENÍTEZ, V.; ANDREU, L. & GRANERO, I. (2009). *Salmonella* spp. en hisopos cloacales, heces y huevos de gallinas ponedoras: estudio preliminar. XLVI Simposium Científico de Avicultura. Zaragoza, España.

GARZÓN, JM; IZAGUIRRE, A & ZURITA, N. (2010). Aspectos productivos, comerciales y económicos de la Cadena Aviar en Argentina. Asociación del comercio, industria, producción y afines de Neuquén (ACIPAN). [http://www.acipan.org.ar/index.php?option=com\\_content&task=view&id=137&Itemid=49](http://www.acipan.org.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=137&Itemid=49)  
Acceso Julio de 2011.

GAST, R K. (1993). Immersion in boiling water to disinfect egg shells before culturing egg contents for *Salmonella* Enteritidis. *J. Food Protect.* 56: 533-535.

GAST, R.K. & HOLT, P.S. (1995). Differences in the multiplication of *Salmonella* Enteritidis strains in liquid whole egg. Implication for detecting contaminated eggs from commercial laying hens. *Poult. Sci.* 74:893-897.

GAST, R.K. & HOLT, P.S. (2001). Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk albumen. *Poult. Sci.* 80:997-1002.

GAST, R.K. (2003). Paratyphoid infections. In Diseases of Poultry. Y.M. SAIF, H.J. BARNES, A.M. FADLY, J.R. GLISSON, L.R. MCDUGALD, D.E. Swayne (eds.). Iowa State Press. USA. p. 583-599.

GAST, R.K.; HOLT, P.S. & MURASE, T. (2005). Penetration of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg into egg yolks in an in vitro contamination model. Poult. Sci. 84:621-625.

GRAZIANI, C., BUSANI, L., DIONISI, A.M., LUCARELLI, C., OWCZAREK, S., RICCI, A., MANCIN, M., CAPRIOLI, A. & LUZZI, I. (2007). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. Vet. Microbiol. 128:414-418.

GRIMONT, P. & WEILL, F.X. (2007). Antigenic formulas of the Salmonella serovars. 9<sup>th</sup> ed. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Instituto Pasteur. Francia. p. 1-166.

GUARD-PITTER, J. (2001). The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. Environ. Microbiol. 3:421-430.

HALL, J. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium. 41:95-98.

HASLER, CM. (2000). The changing face of functional foods. J. Am. Coll. Nutr. 19:499S-506S.

HELMUTH, R. (2000). Antibiotic resistance in *Salmonella*. p:89-106. En: *Salmonella* in domestic animals. WRAY, C. & WRAY, A. Ed: CAB International. UK.

HERNANDEZ, J.M.; SEEHAWER, J.; HAMELIN, C.; BRUNI, M. & WAKEMAN, W. (2002). Egg quality, the European consumer's perception. 51346, Roche Vitamins Europe Ltd., Switzerland.

HERRERA, A.G. (2001). *Salmonella*. En: Food Microbiology Protocols. SPENCER, J.F.T & SPENCER DE, A.J.R. Ed. Human Press. Totowa, New Jersey. p. 113-117.

HIMATHONGKHAM, S.; RIEMANN, H. & ERNST, R.. (1999). Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella* Enteritidis: implications for egg testing. Int. J. Food Microbiol. 49: 161-167.

HOSZOWSKI, A. & WASYL, D. (2001). *Salmonella* serovars found in animals and feeding stuffs in 2001 and their antimicrobial resistance. Bull. Vet. Inst. Pulaway. 46:165-178.

HOWARD, Z.; O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G. & RICKE, S.C. (2011). *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. Food Research International. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.030.

HUMPHREY, T.J.; WHITEHEAD, A.; GAWLER, A.H.L.; HENLEY, A. & ROWE, B. (1991). Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hen's eggs. Epidemiol. Infect. 106:489-496.

HUNTON, P. (2005). Research on eggshell structure and quality: An historical overview. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 7:67-71.

INDEC. Censo 2001. <http://www.indec.gov.ar/webcenso/index.asp>

ISO. (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of *Salmonella* sp. 4ta Ed. En: International Organization for Standardization (ISO 6579 2002E). Geneva, Switzerland. p. 1-27.

JACOB, J.P.; MILES, R.D. & BEN MATHER, F. (2008). Egg quality. Animal Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. PS24:1-12.

JENIKOVÁ, G.; PAZLAROVÁ, J. & DEMNEROVÁ, K. (2000). Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Internatl. Microbiol.* 3:225-229.

JONES, D.R., & MUSGROVE, M.T. (2005). Correlation of eggshell strength and *Salmonella* Enteritidis contamination of commercial shell eggs. *J. Food Protect.* 68:2035-2038.

JONES, D.R.; ANDERSON, K.E. & THESMAR, H.S. (2010). Physical quality and composition of retail shell eggs. *Poult. Sci.* 89:582-587.

JONES, D.R.; ANDERSON, K.E.; CURTIS, P.A. & JONES, F.T. (2002). Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poult. Sci.* 81:715-720.

KAN, C.A. & PETZ, M. (2000). Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J. Agric. Food. Chem.* 48:6397-6403.

KELLY, B.G., VESPERMANN, A. & BOLTON, D.J. (2009). The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food and Chemical Toxicology* 47: 951-968.

KHAN, A.A., NAWAZ, M.S., KHAN, S.A. & CERNIGLIA, C.E. (2000). Detection of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol. Letters* 182:355-360.

KHURSHID, A., FAROOQ, M., DURRANI, F.R., SARBILAND, K. & CHAND, N. (2003). Predicting egg weight, shell weight, shell thickness and hatching chick weight of Japanese quails using various egg traits as regressors. *Int. J. Poult. Scie.* 2:164-167.

KIM, P.I.; JUNG, M.Y.; CHANG, Y-H.; KIM, S.; KIM, S-J. & PARK, Y-H. (2006). Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1103-1111.

KIRUNDA, D.F.K. & McKEE, S.R. (2000). Relating Quality Characteristics of Aged Eggs and Fresh Eggs to Vitelline Membrane Strength as Determined by a Texture Analyzer. *Poult. Sci.* 79:1189-1193.

KLETER, G.A.; PRANDINI, A.; FILIPPI, L. & MARVIN, H.J.P. (2009). Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European

Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. Food Chem, Toxicol. 47:932-950.

KOELKEBECK, K.W.; BELL, D.D.; CAREY, J.B.; ANDERSON, K.E. & DARRE, M.J. (2001). Egg marketing in national supermarkets: Products, packaging and prices. Part-3. Poult. Sci. 80:396-400.

KOVACS-NOLAN, J., MARSHALL, P. & YOSHINORI, M. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 8421-8431.

LAMELAS, K; MAIR, G & BECZKKOWSKI, G. (2011). Boletín avícola: anuario 2010. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenos Aires, Argentina. 61:1-43.

LEARN-HAN, L.; YOKE-KQUEEN, CH.; SALLEH, N.A.; SUKARDI, S.; JIUN-HORNG, S.; CHAI-HOON, K. & RADU, S. (2008). Analysis of *Salmonella* Agona and *Salmonella* Weltevreden in Malasya by PCR fingerprinting and antibiotic resistance profiling. Antonie van Leeuwenhoek. 94:377-387

LEESON, S. & SUMMERS, J.D. (2005). Commercial poultry nutrition. Univeristy Books, Ontario, Canada.

LI, Y. & MUSTAPHA, A. (2002). Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. Lett. Appl. Microbiol. 35:508-512.

LIN, C.K. & TSEN, H.V. (1996). Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. J. Appl. Microbiol. 80:659-666.

LOONGYAI, W., PROMPHET, K., KANGSUKUL, N. & NOPPHA, R. (2010). Detection of *Salmonella* in egg shell and egg content from different housing systems for laying hens. World Academy of Science, Engineering and Technology. 65:121-123.

MALORNY, B.; BUNGE, C. & HELMUTH, R. (2003a). Detection of *Salmonella* spp. En: PCR detection of Microbial Pathogens. SACHSE, K. & FREY, J. Vol. 216. Ed. Human Press. p. 275-287.

MALORNY, B.; BUNGE, C. & HELMUTH, R. (2007). A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. J. Microbiol. Methods. 70:245-251.

MALORNY, B.; TASSIOS, P.T.; RÅDSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M. & HOORFAR, J. (2003b). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. Int. J. Food Microbiol. 83:39-48.

MANCERA MARTÍNEZ, A.; VÁZQUEZ NAVARRETE, J.; ONTIVERUS CORPUS, M.L.; DURÁN VALENCIA, S.; LÓPEZ HUIDOBRO, D. & TENORIO GUTIERREZ, V.R. (2005). Identification of *Salmonella* Enteritidis in table eggs in Mexico City. Tec. Pecu. Mex. 43:229-237.

MANTILLA, J.; PULIDO, M. & JAIME, J. (2010). Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. Rev. Med. Vet. Zoot. 57:168-177.

MARTIN, S.W. (1977). The evaluation of tests. Can. J. Comp. Med. 41:19-25.

MARTÍNEZ, A.M.; VÁZQUEZ NAVARRETE, J.; ONTIVERUS CORPUS, M.L.; DURÁN VALENCIA, S.; LÓPEZ HUIDOBRO, D. & TENORIO GUTIÉRREZ, V.R. (2005). Identificación de *Salmonella* Enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México. Téc. Pecu. Méx. 43:229-237.

MAYER, H.F. (1986). Bromatología: higiene y control de alimentos. Tomo 2. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

MAZZUCO, H. (2008). OVO: alimento funcional, perfeito a saude. Avicultura Industrial 2:12-16

MESSENS, W., GRIJSPEERDT, K., & HERMAN, L. 2005. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. Poult. Sci. 61:71-82.

MESSENS, W.; DUBOCCAGE, L.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRICK, M. & HERMAN, I. (2004). Growth of *Salmonella* serovars in hen´s egg albumen as affected by storage prior to inoculation. Food Microbiol. 21:25-32.

MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; DE REU, K.; DE KETELAERE, B.; MERTENS, K.; BAMELIS, F.; KEMPS, B.; DE BAERDEMAEKER, J.; DECUYPERE, E. & HERMAN,

L. (2007). Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J. Food Prot.* 70:623-628.

MIKO, A.; PRIES, K.; SCHROETER, A. & HELMUTH, R. (2005). Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:1025-1033.

MINE, Y & KOVACS-NOLAN, J. (2006). New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *W. Poult. Sci.* 62:87-95.

MINE, Y.; OBERLE, C & KASSAJFY, Z. (2003). Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. *J. Agric. Food Chem.* 51:249-253.

MØLBAC, K.; OLSEN, J.E. & WEGENER, H.C. (2006). *Salmonella* infections. En: *Foodborne infections and intoxications*. RIEMAN, H.P. & CLIVER, D.O. p. 57-115.

MONTVILLE, T.J. & MATHEWS, K.R. (2008). Gram-negative foodborne pathogenic bacteria. En: *Food Microbiology. An introduction*. Ed. American Society for Microbiology. Washington. p. 97-112.

MOSSEL, D.A.A.; MORENO, B. & STRUIJK, C.B. (2002). Enfermedades de origen microbiano transmitidas por los alimentos. En: *Microbiología de los alimentos*. Ed. Acribia. España. p. 137-237.

MOUNTNEY, G. & PARKHURST, C. (2001). *Tecnología de productos avícolas*. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

MURCHIE, L.; WHYTE, P.; XIA, B.; HERRIGAN, S.; KELLY, L. & MADDEN, R.H. (2007). Prevalence of *Salmonella* in grade A whole shell eggs in the Island of Ireland. J. Food Prot. 70:1238-1240.

MUSGROVE, M.T., JONES, D.R.; NORTH CUTT, J.K.; COX, N.A.; HARRISON, M.A., FEDORKA-CRAY, P.J. & LADELY, S.R. (2006). Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. Poult. Sci. 85:1665-1669.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; Approved standard, Third edition. CLSI document M31-A3.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (2010). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20, 30:1-153.

NAZAR, J. (2009). Modelo del negocio productivo de huevos de consumo. El caso Argentino. Memorias 1º curso Situación actual de la cadena avícola y salud humana. Foro de la Alimentación, la nutrición y la salud. Capital Federal. p. 19-32.

NISHA, A.R. (2008). Antibiotic residues-A global health hazard. Veterinary World. 1:375-377.

OLIVEIRA, S.D.; BERCHIERI JUNIOR, A. & FERNÁNDES, A.C. (2005). Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. Braz. J. Microbiol. 36:51-56.

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; CÉ, M.C.; ROCHA, S.L.S. & CANAL, C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 36:217-221.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P. & CANAL, C.W. (2002). Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87:25-35.

PATIÑO, D.C. (2003). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?. *Umbral Científico. Colombia.* p. 48-56.

PATRICK, M.E., ADCOCK, P.M., GÓMEZ, T.M., ALTEKRUSE, S.F., HOLLAND, B.H., TAUXE, R.V. & SWERDLOW, D.L. (2004). *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985-1999. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1-7.

PEEBLES, E.D. & MCDANIEL, C. (2004). A practical manual for understanding the shell structure of broiler hatching eggs and measurements of their quality. Office of Agricultural Communications, Mississippi State University. p. 1-16.

PÉREZ LUZ, S.; RODRÍGUEZ-VALERA, F.; LAN, R. & REEVES, P.R. (1998). Variation of the ribosomal operon 16S-25S gene spacer región in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *J. Bacteriol.* 180:2144-2151.

PÉREZ, C.M.; SÁNCHEZ, M.M.; HENAO, S. & CARDONA-CASTRO, N.M. (2008). Standarization of two polymerase chain reaction tests for the diagnosis of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* in eggs. *Arch. Med. Vet.* 40:235-242.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, CH.; JONES, R.; NIGHTINGALE, CH.; PRESTON, R. & WADDELL, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health?. A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* 53:28-52.

PIKNOVÁ, L.; ŠTEFANOVIČOVÁ, A.; DRAHOVSKÁ, H.; SÁSIK, M. & KUTCHA, T. (2002). Detection of *Salmonella* in food, equivalent to ISO 6579, by three-days polymerase chain reaction-based method. *Food Control.* 13:191-194.

POPOFF, M.Y. (2001). Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research of Salmonella. Institut Pasteur, Paris. p.1-156.

QUEVEDO, A. (2008). O superalimento. *Avicultura Industrial* 2:22-28.

QUIROZ, V.C. (1987). Transmisión de las Salmonellas en las aves. *Veterinaria Tropical* 12: 39-45.

RADKOWSKI, M. (2001). Occurrence of *Salmonella* sp. in eggs consumption in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* 64:189-191.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A.; CLARKE, R.C.; MCEWEN, S.A.; GALIN, J.E.; GINOCCHIO, C.; CURTISS, R. & GYLES, C. L. (1992). Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol. Cell. Probes.* 6:271-279.

REIJRINK, I.A.M., MEIJERHOF, R.; KEMP, B. & VAN DEN BRAND, H. (2008). The chicken embryo and its micro environment during egg storage and early incubation. W. Poult. Scie. Association. 64:581-598.

RIEMANN, H.P. & CLIVER, D.O. (2006). *Salmonella* infections. En: Foodborne infections and intoxications. Ed: Elsevier. California. USA. p.57-115.

RIYAZ-UI-HASSAN, S.; VERMA, V. & NABI QAZI, G. (2004). Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. Mol Cells. Probes 18:333-339.

RODICIO, M.R. & MENDOZA, M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 22:238-45.

ROSSMAN, A.J. & CHANCE, B.L. (1998). Workshop statistics: discovery with data and Minitab. Springer-Verlag, New York, U.S.A.

ROUDAUT, B.; MORETAIN, J.P. & BOISSEAU, J. (1989). Excretion of tetracycline en chlortetracycline in eggs after oral medication of laying hens. Food. Addit. Contam. 6:71-8.

RUIZ B, J. D., SUÁREZ, M. C. & URIBE, C. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Salmonella spp.* en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 19:297-305.

SABRI, H.M.; WILSON, H.R.; HARMS, R.H. & WILCOX, C.J. (1999). Genetic parameters for egg and related characteristics of White Leghorn hens in a subtropical environment. Genet. Mol. Biol. 22:183-186.

SANDOVAL, V.E. & TERZOLO, H.R. (1989). Las infecciones por *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis afectan seriamente a la producción avícola argentina y constituyen un problema de salud pública. Rev. Arg. Prod. Anim. 9 (Sup 1):132-134.

SANDOVAL, V.E., TERZOLO, H.R. & GONZÁLEZ RIVERO, C.V. (1989). Reproducción de paratifosis en pollos parrilleros por inoculación oral de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Enteritidis. Rev. Arg. Prod. Anim. 9:309-314.

SAROJ, S.D.; SHASHIDHAR, R.; KARANI, M. & BANDEKAR, J.R. (2008). Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture-nested PCR combination assay. Mol. Cells. Probes 22:201-206.

SAYAR, R. (2009). Aspectos nutricionales del consumo de huevo. Memorias 1° curso Situación actual de la cadena avícola y salud humana. Foro de la alimentación, la nutrición y la salud. Capital Federal. p. 61-64.

SCHELL, H; CUMINI, M.L.; CISLAGHI, M.A. & BUJIA, D. (2010). Información de la actividad avícola en Entre Ríos. Enero-Agosto 2010. Subsecretaría de Producción Animal. Dirección General de Ganadería y Avicultura. Ministerio de la Producción, Gobierno de Entre Ríos. p. 1-20.

SCOTT, T.A. & SILVERSIDES, F.G. (2000). The effect of storage and strain of hen on egg quality. Poult. Sci. 79:1725-1729.

ŞEKEROĞLU, A. & ALTUNTAŞ, E. (2009). Effects of egg weight on egg quality characteristics. J. Sci. Food Agric. 89:379-383.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P. & LOVELEY, D.R. (2004). Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranea* sp. nov. Appl. Environ. Microbiol. 70:2959-2965.

SHI, S.R.; WANG, K.H.; DOU, T.C. & YANG, H.M.. (2009). Egg weight affects some quality traits of chicken eggs. J. Food Agric. Environ. 7:432-434.

SORIA, M.C.; SORIA, M.A.; BUENO, D.J. & COLAZO, J.L. (2011). A comparative study of culture methods and polymerase chain reaction assay for *Salmonella* detection in poultry feed. Poult. Sci. 90:2606-2618

SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V.; ROSE, N.; DROUIN, P.; SALVAT, G. & COLIN, P. (1999). Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. Lett. Appl. Microbiol. 29:1-6.

STOLKER, A.A.M. & BRINKMAN, U.A.Th. (2005). Analytical strategies for residues analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review. J. Chromatogr. A. 1067-15-53.

SURESH, T.; HATHA, A.A.M.; SREENIVASAN, D.; SANGEETHAN, N. & CASHMANAPERUMALSAMY, P. (2006). Prevalence and antimicrobial resistance of

*Salmonella* Enteritidis and other *Salmonellas* in the eggs and egg-storing trays from retails markets of Combatore, South India. Food Microbiol. 23:294-299.

TASI-HSIN, CH.; TONG-RONG, CH.; WEN-ZHE, H. & HAU-YANG, T. (2005). Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* sp. in food. Int. J. Food Microbiol. 97:259-265.

TERRAGNO, R.; CAFFER, M.I. & BINSZTEIN, N. (2008). Aislamiento y caracterización de *Salmonella* sp. En: Manual de Procediendo. Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* sp. Servicio de Enterobacterias. Departamento de Bacteriología. INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv. Buenos Aires, Argentina. p. 9-56.

THRUSFIELD, M. (1990). Encuentas. En: Epidemiología veterinaria. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp: 191-205.

TOBÍAS, M.B. & PANTOZI, F.L. (2007). Enterobacterias. En: Microbiología Veterinaria. STANCHI, N.O.; MARTINO; P.E.; GENTILINI, E.; REINOSO, E.H.; ECHEVERRIA; M.G.; LEARDINI, N.A. & COPES, J.A. Ed: Inter Médica. Buenos Aires, Argentina. p. 195-196.

TORRENT MOLLEVI, M. (1982). Producción de huevos. Zootecnia básica aplicada. Ed. Aedos, Barcelona, España. p. 63-75.

TRKOV, M. & AVGUŠTIN, G. (2003). An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. Int. J. Food. Microbiol. 80:67-75.

TSAI, W.T.; YANG, J.M.; LAI, C.W.; CHENG, Y.H.; LIN, C.C. & YEH; C.W. (2005). Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. Bioresour. Technol. 97:488-493.

TUNES, M. & VIGO, G.B. (2007). *Salmonella*. En: Microbiología Veterinaria. STANCHI, N.O.; MARTINO; P.E.; GENTILINI, E.; REINOSO, E.H.; ECHEVERRIA; M.G.; LEARDINI, N.A. & COPEL, J.A. Ed: Inter Médica. Buenos Aires, Argentina. p. 210-214.

UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2000). Egg grading manual. USDA AA grade. US department of Agriculture, Washington, DC.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2008). Progress report on *Salmonella* testing of raw meat and poultry products, 1998-2008. [http://www.fsis.usda.gov/PDF/Progress\\_Report\\_Salmonella\\_Testing.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/Progress_Report_Salmonella_Testing.pdf).

VIORA, S.; ANSELMO, R.; BARRIOS, H. & DE FRANCESCHI, M. (1993). *Salmonella* Enteritidis en maples. Rev. Med. Vet. 74:96-99.

VUILLEUMIER, J.P. (1969). The 'Roche yolk colour fan'—an instrument for measuring yolk colour. Poult Sci. 48:767-779.

WALL, H., JÖNSSON, L. & JOHANSSON, L. (2010). Effects on egg quality traits of genotype and diets with mussel meal or wheat-distillers dried grains with soluble. Poult. Sci. 89:745-751.

WALLACE H.A. & HAMMACK, T. (2011). *Salmonella*. Chapter 5. En: Food and Drug Administration.

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm>. Acceso Agosto 2011

WEI, R. & BITGOOD, J.J. (1990). A new objective measurement of eggshell colour. 1. A test for potential usefulness of two colour measuring devices. *Poult. Sci.* 69:1775–1780.

WILLIAMS, H. (2008). *Salmonella* - Seminario Web. CAPIA informa N° 228:33-44.

WOO, P.C.Y.; LAU, S.K.P.; TENG, J.L.L.; TSE, H. & YUEN, K-Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:908-934.

YANG, H.M.; WANG, Z.Y. & LU, J. (2008). Study on the relationship between eggshell colors and egg quality as well as shell ultrastructure in Yangzhou chicken. *African J. Biotechnol.* 17:2898-2902.

YANG, S.J., PARK, K.Y., KIM, S.H., NO, K.M., BESSER, T.E., YOO, H.S., KIM, S.H., LEE, B.K., & PARK, Y.H. (2002). Antimicrobial resistance in *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet. Microbiol.* 86:295-301.

YOUSEF, A.E. & CARLSTROM, C. (2006). *Salmonella*. En: Microbiología de los alimentos. Manual de laboratorio. Ed. Acribia. Zaragoza. España. p:181-222.

YU-CHENG, CH.; CHI-YEA, Y.; CHIN, L.; YI-CHENG, H.; CHIEN-KU, L. & HAU-YANG, T. (2006) Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization. Int. J. Food Microbiol. 107:131-137.

ZAHRAEI SALEHI, T.; MAHZOUNIEH, M. & SAEEDZADEH, A. (2005). Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. Int. J. Poult. Sci. 4:557-559.

ZIEMER, C.J. & STEADHAM, S.R. (2003). Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Lett. Appl. Microbiol. 37:463-469.

ZITA, L., TŮMOVÁ, E. & ŠTOLC, L. (2009). Effects of genotype, age and their interaction on egg quality in brown-egg laying hens. Acta Vet. Brun. 78:85-91.

### **FE DE ERRATAS**

Se hace constar que se ha detectado la siguiente fe de errata:

1. Pág. 106: **Tabla 24:** Valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para los métodos bacteriológicos y de PCR para cada cepa de *Salmonella* en pool de clara y yema contaminadas experimentalmente. Valores entre paréntesis indican el 95% de confianza en los intervalos para los respectivos parámetros.

En el cuadrante donde se expresan los datos de VPP para PCR-CTSH y PCR-APT para las serovariedades *S. Typhimurium* ATCC 13076; *S. Infantis* CUB 05/08; *S. Pullorum* INTA 90/142 y *S. Gallinarum* CUB 05/10, donde dice 0 (cero), debe decir IND (indeterminado).