



PENETRACION DE SALMONELLA ENTERITIDIS EN HUEVOS FERTILES Y HUEVOS INFERTILES A DIFERENTES ESTADIOS DE INCUBACION.

Trabajo Final Escrito del IV Seminario de Titulación
en el área de: Aves

Presentado ante la División de Estudios Profesionales
de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Zenaida Juana Rosales Nieves

asesores:

MVZ, Ph. D. Guillermo Téllez I., MVZ Ezequiel Sánchez R., PMVZ
Miriam Trejo R., MVZ José A. Quintana, MVZ Odette Urquiza R.
DMV, Ph. D. Billy M. Hargis.



México, D. F., Mayo de 1993.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
PROCEDIMIENTO	7
RESULTADOS	10
DISCUSION	12
LITERATURA CITADA	16
ESQUEMAS Y GRAFICAS	19

RESUMEN

ROSALES NIEVES ZENAIDA J..Penetración de *Salmonella enteritidis* en huevos fértiles y huevos infértiles a diferentes estadios de incubación :IV Seminario de Titulación en el área de aves.(Bajo la supervisión de los MVZ,Ph.D. Guillermo Téllez I.,MVZ Ezequiel Sánchez R.,PMVZ Miriam Trejo R.,MVZ José A.Quintana ,MVZ Odette Urquiza R.,DMV,Ph.D. Billy M.Hargis)

Tres grupos de huevos infértiles (IF) y huevos fértiles(F) provenientes de gallinas Babcock B-300 con 59 semanas de edad, mantenidos bajo idénticas condiciones de incubación fueron expuestos cada 4 días a partir del octavo día de incubación con una solución de Salmonella enteritidis (SE) fagotipo 13 en la superficie del cascarón.Se realizó la prueba de Williams para evaluar la penetración de SE a través de las diferentes estructuras externas del huevo.Significativamente menos huevos fértiles fueron penetrados por SE,indicando que el desarrollo embrionario los hace considerablemente menos susceptibles a la invasión de SE.al ser comparados con huevos IF. Asi mismo se determinó que la capacidad de penetración de SE decrece en los huevos fértiles a medida que transcurre el desarrollo embrionario.Estos resultados sugieren que los huevos IF que son incubados,pueden ser más susceptibles a la penetración de SE,que aquellos que se encuentran en desarrollo embrionario.

INTRODUCCION

La contaminación de los huevos incubables por bacterias representan pérdidas por concepto de mortalidad embrionaria, mortandad durante las primeras semanas de vida del pollito produciendo un marcado retraso en el crecimiento de las aves (13,7).

Por su importancia en cuanto a salud pública, Salmonella enteritidis (SE) es considerada una causa importante de contaminación alimenticia en Europa Occidental y en el Noreste de los Estados Unidos, contribuyendo a la gran cantidad de casos de la enfermedad asociados con el consumo de huevo (10,8). La Salmonelosis aviar puede ocurrir ya sea en forma subclínica o en forma clínica; la primera y quizás la más frecuente e importante es cuando se presenta un fenómeno de comensalismo entre los diferentes serotipos de Salmonella y el ave, sin que se produzca daño alguno aún en pollitos de una semana de edad (15). El organismo del ave hace muy poco por excluirla o eliminarla y es por esta razón que se dice que las aves son "colonizadas" y no infectadas, provocando así la contaminación del producto final, ya sea carne o huevo. Ambas formas de presentación son un peligro para la salud humana (14,8).

El género Salmonella está compuesto por un grupo de bacilos gram negativos, no esporulados, móviles. Hasta ahora se han clasificado más de 2,000 serotipos de SE antigénicamente distintos (7).

La contaminación de los huevos en los nidos puede ocurrir

rápidamente (20). Se ha demostrado que bastan de 6-20 minutos de exposición a *S. typhimurium* para que la bacteria penetre a través de la cutícula, el cascarón y se localice en la membrana interna, donde los desinfectantes ya no tienen ningún efecto (15,20,21).

Es importante que el personal que recoge el huevo se lave las manos con agua y jabón, cada vez que inicie una recolección ya que se ha comprobado que las manos de los trabajadores contienen entre 30,000 y 40,000 colonias de bacterias por pulgada cuadrada antes de lavarse y baja a 5,000 después de lavárselas, y a menos de 200 una vez que se las rocían con desinfectante (4).

El huevo está naturalmente dotado de diferentes estructuras que evitan la fácil penetración de las bacterias al interior del huevo (5,19,20). Las tres partes que constituyen esta barrera natural son:

a) La cutícula, que está formada de dos estratos, uno adyacente al cascarón de apariencia espumosa y otro externo de apariencia más compacta; está compuesta de aproximadamente 90% de proteínas con un alto contenido de glicina, ácido glutámico, lisina, cistina y tirosina. En proporción menor hay polisacáridos como hexosamina, galactosa y manosa (3). Mide de 10 a 30 micrometros de espesor (11), se distribuye en forma irregular sobre la superficie del cascarón, y se introduce en los poros formando verdaderos tapones (13). Algunos de los factores que influyen en la penetración de las bacterias son:

-*Maduración tardía de la cutícula.* La cutícula "madura" se seca algunos segundos después de haber sido puesto el huevo la penetración bacteriana puede ocurrir antes de ello (13,15).

-*Ausencia de cutícula.* Se ha demostrado que una cantidad pequeña de huevos carecen de cutícula en forma total o más frecuentemente en uno de sus polos. La superficie del cascarón de estos huevos es rugosa, tiene fisuras profundas y sus poros no tienen tapón, por lo que estos huevos son más susceptibles a la invasión microbiana (2)

-*La cutícula se deteriora con el tiempo y con la temperatura.* Se afecta más rápido cuando son almacenados a 24°C que a 5°C (11,15).

-*La desinfección* empleando gas o soluciones, así como el lavado del huevo reduce la cantidad de cutícula (4)

-*Las sustancias* como el ácido úrico que se encuentra en las heces tienen la capacidad de destruir la cutícula (11).

b) El cascarón ocupa el segundo lugar como barrera para evitar la entrada de bacterias al interior del huevo (6). Si bien el cascarón de un huevo de 56.7 g contiene alrededor de 8,000 poros, la mayoría de estos son demasiado pequeños para permitir el paso de las bacterias. Pero existe un pequeño porcentaje de poros grandes mal formados que poseen un diámetro varias veces superior al de las bacterias por lo que a través de ellos cientos de organismos logran penetrar al interior del huevo, llegando hasta las membranas del cascarón (12).

c) En la superficie interna del cascarón se encuentran dos membranas: la membrana interna y la membrana externa (esquema 1 y 2). La membrana externa cuenta con tres capas de fibrina y mucina, que se encuentran firmemente adheridas a la superficie interior del cascarón. La membrana interna tiene una pequeña capa de material albuminoso que se mezcla con la sustancia del huevo. Estas membranas envuelven toda la superficie interna del huevo cuyo funcionamiento es como un filtro mecánico que evitan la penetración de microorganismos hacia el contenido del huevo (9,19)

Durante el desarrollo embrionario, existen cambios metabólicos como el intercambio gaseoso que altera el pH de la albumina y vitelo, así como producción de enzimas bactericidas que tienen una importante función para el control bacteriano del huevo.

Hipótesis :Conforme transcurren los días de desarrollo embrionario, los huevos fértiles mostrarán menor penetración de SE a través del cascarón que los huevos infértiles mantenidos bajo idénticas condiciones de incubación.

Objetivo:Comparar la penetración de SE a través del cascarón del huevo y sus membranas, en huevos IF y F a diferentes tiempos de incubación.

PROCEDIMIENTO**Material y métodos:**

1.-**Huevos:**se utilizaron 30 huevos Infértiles (IF) y 30 huevos fértiles (F) blancos recién recolectados,limpios y fumigados con 22 g de permanganato de potasio y 40 ml de formaldehído al 40 % por metro cúbico (17).Provenientes de aves libres de Salmonella spp.,de la estirpe Babcock B-300,con 59 semanas de edad.

En el Departamento de Producción Animal:Aves de la UNAM,se ovoscopiaron previamente para eliminar los que presentan fisuras o fracturas.Ambos grupos de huevos se pusieron en similares condiciones de incubación por espacio de 20 días, en una incubadora de mesa (marca IAMEX con capacidad de 120 huevos y de volteo automático)a una temperatura de 37.7°C y con una humedad relativa de 65-70%.

2.-**Bacteria.**La bacteria utilizada en la contaminación del cascarón de los huevos fue una suspensión de PBS y Salmonella enteritidis fagotipo 13, bacteria aislada de aves comerciales del National Veterinary Services Laboratory, Ames IA.50010,USA.

3.-Material para la inoculación:

-Lámpara para ovoscopiado

-Cilindros de papel aluminio (1,5 cm de diámetro por .75 cm de alto).

-Parafina

-Micropipeta

-Pincel

-Inóculo de SE.

4.-Material para el muestreo

-Hisopos

-Recipiente estéril

-Tijeras

-Pinzas estériles

-Perforador

-Manguera de hule látex

-Mechero

-Pipetas de 10 y 1 ml

-Micropipeta

-Alcohol etílico

-PBS estéril

-Medios bacteriológicos (verde brillante y caldo tetracionato).

-Tubos de ensaye.

5.-La exposición con Salmonella se realizó de la siguiente forma:

Grupo	No.de Huevos	Inoculación de SE	Cultivo de SE	Cantidad de SE
1	10 IF 10 F	día 8	96 hrs.	10 ⁸ UFC* en 100+
2	10 IF 10 F	día 12	96 hrs.	10 ⁸ UFC en 100 +
3	10 IF 10 F	día 16	96 hrs	10 ⁸ UFC en 100 +

*UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

100+=100 microlitros

6.-Cultivo bacteriológico. Para la inoculación y recuperación de la bacteria se utilizó la técnica descrita por Williams (19) y López (10).

Las areas muestreadas son las siguientes:

Area 1.- Membrana interna

Area 2.- Entre la superficie interna del cascarón y membrana externa.

Area 3.- Membrana externa

Así mismo se realizó cultivo bacteriológico de yema y clara. Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas solo a las colonias de bacterias lactosa negativa que crecieron en verde brillante, para verificar que correspondía al género inoculado.

7.-Análisis estadístico: La prueba de "Ji" cuadrada fue utilizada para determinar las diferencias estadísticas significativas en el porcentaje de penetración de SE entre los grupos de huevos, evaluados mediante la técnica de Williams (23).

RESULTADOS

La figura 1 muestra los resultados obtenidos a los 8 días de incubación. La penetración de SE no fue significativamente diferente en las tres áreas del grupo 1 de huevos IF y de huevos F ($P > 0.05$). El muestreo de huevos IF positivos a SE en el área 1 fué 3/10 (30%), en el área 2, 5/10 (50%) y en el área 3, 2/10 (20%), mientras que en los huevos F, área 1, 2/10 (20%), área 2, 3/10 (30%) y en el área 3, 1/10 (10%).

La figura 2 muestra los resultados obtenidos de la penetración de SE al interior de las membranas del cascarón a los 12 días de incubación. Los resultados del área 2 y 3 no fueron estadísticamente significativos ($P > 0,05$) ya que en el área 2, en los huevos IF solo en 4/10 (40%) se recuperó la bacteria y en los F 1/10 (10%). En el área 3 de los huevos IF estaban contaminados 4/10 (40%) y en los F 2/10 (20%) en tanto que en el área 1, se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.025$) en el grupo de huevos IF positivos a la penetración de SE 6/10 (60%) y en los huevos F positivos a SE fueron 1/10 (10%).

En la figura 3. Se aprecia que hay una diferencia estadística significativa de las tres áreas del huevo. En el área 1 de los huevos IF se encontraron 9/10 (90%) positivos a SE, mientras que los huevos F 3/8 (24%) resultaron positivos, dando diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.025$).

En el área 2 el los huevos IF 10/10 (100%) fueron positivos

en tanto que de los huevos F 2/8 (16%), diferencia estadísticamente significativa de ($P < 0.001$).

Por último en el área 3 también hay diferencias estadísticas significativas de ($P < 0.001$). En los huevos IF positivo a la penetración de SE, 10/10 (100%), mientras que en los F sólo 2/8 (16%) fueron positivos.

Los resultados de los tres grupos demuestran que conforme avanza el desarrollo embrionario los huevos F son más resistentes a la penetración de la bacteria.

El cultivo bacteriológico de clara y yema resulto negativo en los tres grupos de huevos F e IF (datos no demostrados).

DISCUSION

El hecho de que Salmonella enteritidis pueda penetrar los huevos y permanecer atrapada entre el cascarón y las membranas, puede tener implicaciones importantes para la epidemiología de esta enfermedad. Una vez que el microorganismo está entre el cascarón y las membranas, es posible que pueda multiplicarse durante el manejo y almacenamiento bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura. Se ha demostrado que las membranas pueden ser la base del crecimiento de microorganismos (9).

En el presente estudio se observó que la penetración de SE en las membranas del huevo F en los tres grupos evaluados (8, 12 y 16 días de incubación) fue subjetivamente menor que en los huevos IF. Aún cuando no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la penetración de SE entre los huevos IF y F en todas las áreas muestreadas, en general se observó una mayor penetración de SE en los huevos IF al ser comparados con los huevos F.

Estos resultados sugieren que los huevos F incubados en los primeros 8 días son más susceptibles a la penetración de Salmonella enteritidis. Además se observó que los huevos infértiles que son infectados antes de la incubación pueden ofrecer un mayor peligro a Salmonelosis que los huevos fértiles en la incubadora si esos huevos llegan a explotar (22).

El hecho de que la bacteria nunca se pudo recuperar de clara

y yema (datos no mostrados) sugieren que las membranas externa e interna constituyen una importante barrera física para la penetración de bacterias al interior del huevo como ha sido demostrado por otros investigadores (10).

Con el desarrollo embrionario del huevo ,decrece el potencial de penetración de S. enteritidis a través de las estructuras externas del huevo.El desarrollo metabólico y salida de sustancias químicas a las estructuras del cascarón pueden ser bactericidas.Se ha establecido que también pueden existir otras influencias protectoras antibacteriales naturales dentro de las estructuras externas del huevo que son activadas por el desarrollo embrionario (21).

La variabilidad de la penetración de Salmonella en las estructuras del huevo ha sido reportado por otros autores y tal vez se deba a la diferencia en la porosidad, grosor del cascarón a la estructura fisicoquímica de las membranas o a interacción entre el huevo, factores biológicos, producción de enzimas bactericidas como la lizozima, y medio ambiente (1,10,15,16).

Estudios conducidos en el Departamento de Producción Animal:Aves (datos no publicados)se evaluaron los cambios de pH en albumina y vitelo de huevo fértil e infértil, han demostrado que existen cambios áltamente significativos en el pH de estos fluídos que aunado a procesos enzimáticos pueden afectar la penetración y desarrollo de bacterias.Sin embargo son requeridos más estudios para aceptar o rechazar

esta hipótesis. Se sugiere repetir el estudio con una muestra más grande de huevos F e IF para comparar la penetración de SE , así como los muestreos a intervalos más cortos. De igual manera debe tomarse en consideración las variables: fumigación, integridad de la cutícula (2,4,11,13,15), así como métodos de recolección en futuros estudios .

CONCLUSIONES

-Salmonella enteritidis penetra el cascarón, membrana externa e interna de huevos fumigados.

-La membrana externa e interna representan una barrera física a la penetración de SE al interior del huevo.

-Los huevos infértiles incubados son más susceptibles a la penetración de SE que aquellos que se encuentran en desarrollo embrionario.

*Este trabajo fue apoyado en parte por el USDA University Development Linkage Project PCE-5063-A-00-2045-00.

LITERATURA CITADA.

- 1.-BERRANG M.E, Cox N.A, Bailey J.S. and Blankenship L.C.:Methods for inoculation and recovery of salmonella from chicken eggs.Poultry Sci.,70:2267-2270 (1991)
- 2.-BOARD R.G.,Halls N.A.:The cuticle:A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg.Br.Poultry Sci.,14:69-97 (1973).
- 3.-BOARD R.G.:The microestructure of the cuticle-less shell of the egg of the domestic hen.Br.Poultry Sci.,16:89-91 (1975).
- 4.-GARZA F.R.:Todo sobre incubación.Memorias del IV curso anual: Incubación, patología, nutrición y procesamiento.Progenitoras Arbor Acres,S.A. de C.V.Gómez Palacio,Durango,México,1987.pag.1-44 Progenitoras Arbor Acres,Durango,México (1987).
- 5.-GEISSLER H.,Youssef Y.I.:The effect of infection with Arizona Hinshawii on chicken embryos.Avian Patology ,8:157-161 (1979).
- 6.-GENTRY R.,Fand Quarles C.L.:The measurement of bacterial contamination on egg shells.Poultry Sci.,51:930-933 (1972).
- 7.-HENEIDI Z.A.:Reglamentación sanitaria para el control de la salmonelosis aviar en México.Memorias del curso de actualización sobre Salmonella enteritidis y Campylobacter en las aves domésticas:México D.F. pag.20-26 ANECA,México,D.F.(1991).
- 8.-HUMPHREY,T.J.:Infección por Salmonella enteritidis en pollos y gallinas de postura.Memorias del curso de

- actualización sobre Salmonella enteritidis y Campylobacter en las aves domésticas: México D.F. pag. 27-41. ANECA, México, D.F. (1991).
- 9.-LIFSHITZ, A.: The exterior structures of the egg as nutrients for bacteria. J. Food Sci., 30: 516-519 (1965).
- 10.-LOPEZ, J., Karpowicz, E. and Becker, S.: Penetración de Salmonella enteritidis en huevos clasificados intactos, sin llegar al contenido del huevo. Memorias del curso de actualización sobre Salmonella enteritidis y Campylobacter en las aves domésticas: México, D.F. pag 97-120. ANECA, México, D.F. (1991).
- 11.-MAYEREN, S.R.: Efectos de tres desinfectantes sobre la integridad de la cutícula de huevos incubables de gallinas de raza leghorn. Tesis de Licenciatura Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1991.
- 12.-NORTH, D.H.: Manual de Producción Avícola. Segunda edición Editorial El Manual Moderno, México, 1986.
- 13.-PADRON, N.M.: Factores que influyen la penetración de las bacterias a través del cascarón. I curso de manejo para la prevención de problemas aviarios. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Dpto. Prod. Animal: Aves. México, D.F., 1989. pag. 79-83. Fac. de Med. Vet y Zoot. Dpa: Aves (1989).
- 14.-PADRON, N.M.: Infecciones paratifoideas en el pollo de engorde: Avicultura Profesional Vol. 6 No. 4 (1989).
- 15.-PADRON, N.M.: Salmonella typhimurium penetration through

the eggshell of hatching egg. Avian Dis., 34:463-465 (1990).

16.-QUARLES, C.L., R.F. Gentry et al: Bacterial contamination in poultry huoses and its relationship to egg hatchability. Poultry Sci., 48:60-66 (1969).

17.-QUINTANA, L.J.A.: Avitecnia. Segunda Edición. Editorial Trillas, México, D.F., 1991.

18.-STADELMAN, W.J., Catterill, O.J.: Eggscience and tecnology. 2da. ed. Avi. Publishing Company, Inc. Connecticut, USA. 1977.

19.-WILLIAMS, J.E., A.D. Whittemore.: A Method for studyin microbial penetration through the outer structure of the avian egg. Avian Dis., 11:467-490 (1967).

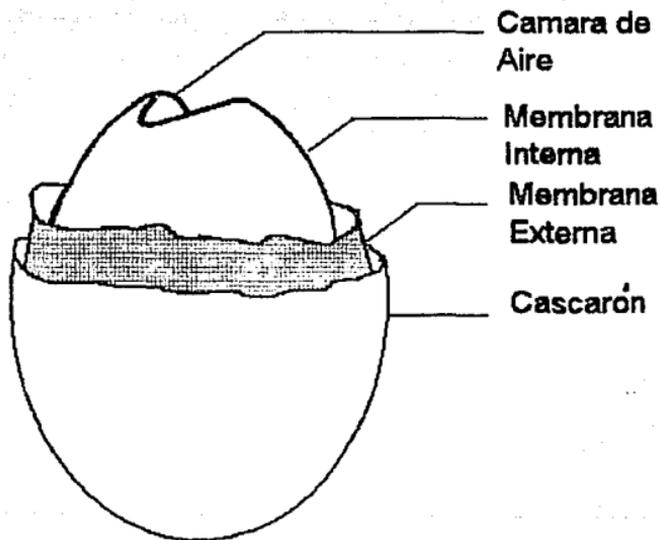
20.-WILLIAMS, J.E., Dillard, L.H., Hall, G.O.: The penetration patterns of salmonella typhimurium through the outer structure of chicken eggs. Avian Dis., 12:445-466 (1968).

21.-WILLIAMS, J.E., Dillard, H.: Penetration of chicken egg shells by members of the arizona grup. Avian Dis., 12:645-649 (1968).

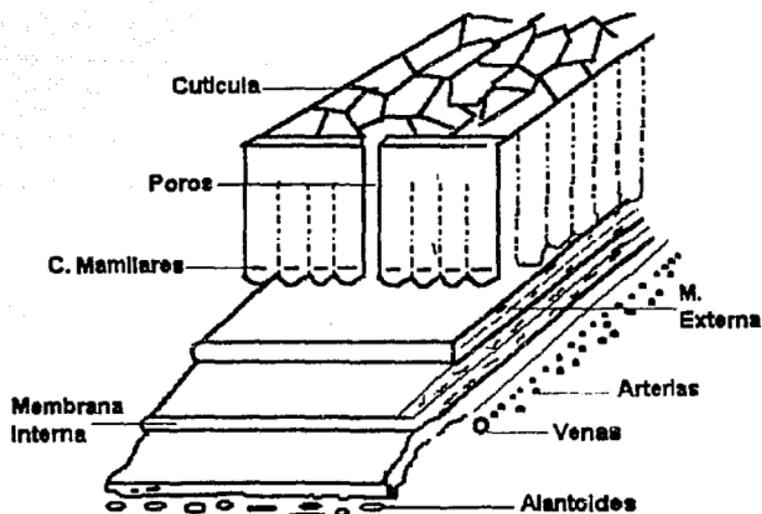
22.-WILLIAMS, J.E., Dillard, H.: Salmonella penetration of fertile and infertile chicken egg at progressive stage of incubation. Avian Dis., 12:629-635 (1968).

23.-ZAR, J.: Bioestadística analysis, 1984. 2da. ed. Preitice-Hall Inc. Englewood Cliff. NJ.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

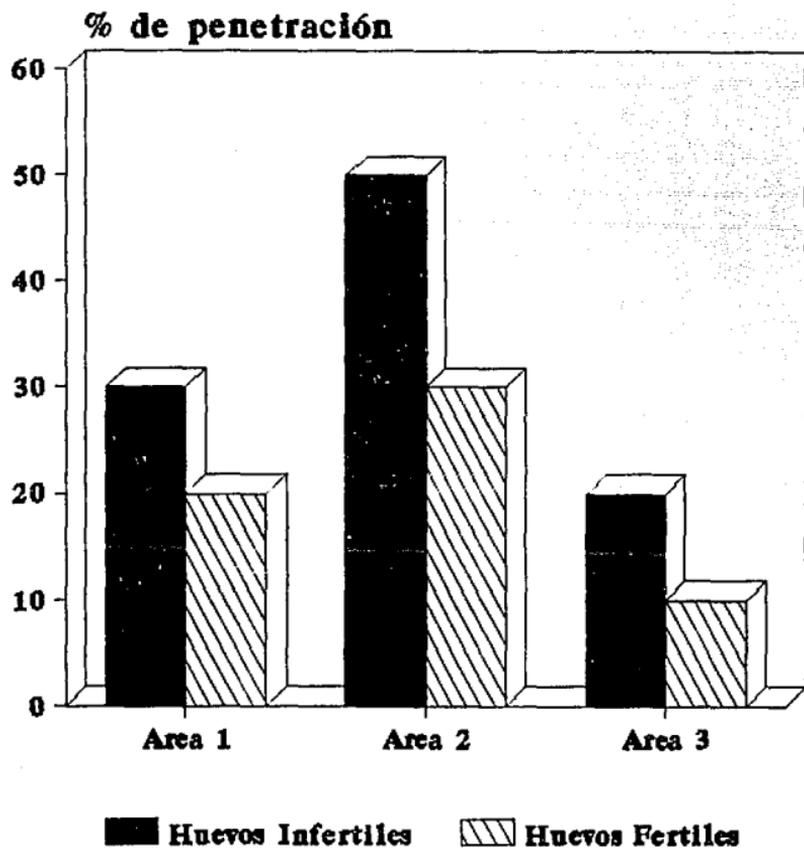


Esquema 1. Relación de las estructuras del huevo



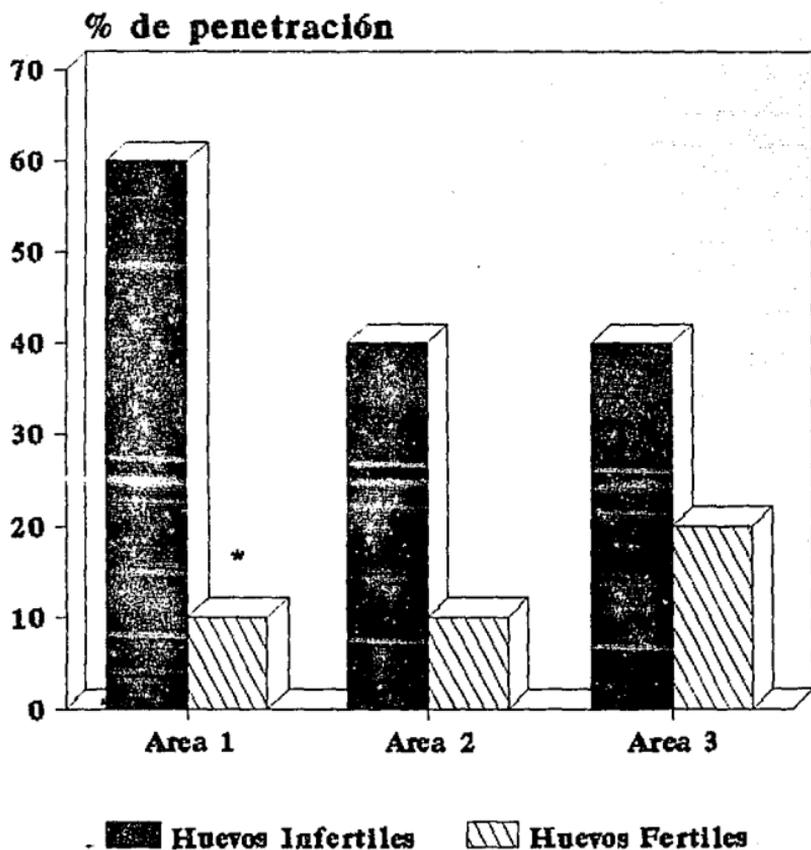
**Esquema 2.-Corte esquemático del cascaron,
 entre una profundidad de .4 milímetros**

Figura 1. Penetración de *S. enteritidis* en las membranas del cascarón (8 días)



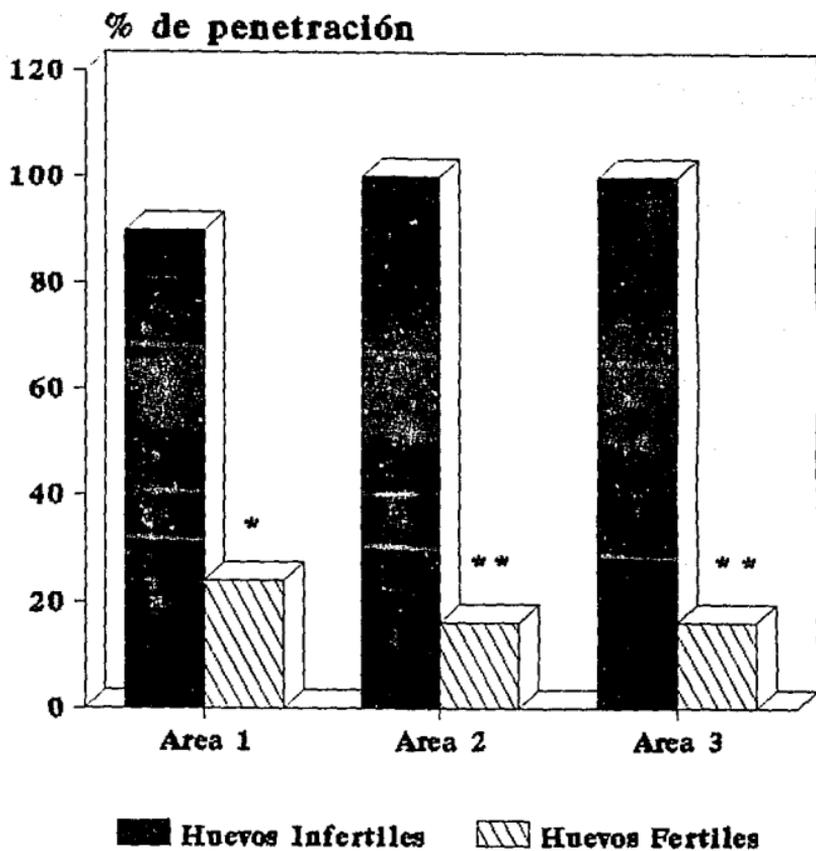
$P > 0.05$, $n=10$ huevos

Figura 2. Penetración de *S. enteritidis* en las membranas del cascarón (12 días)



* $P < 0.025$, $n=10$ huevos

Figura 3. Penetración de *S. enteritidis* en las membranas del cascarón (16 días)



*** $P < 0.025$, ** $P < 0.001$, $n=10$ huevos**