

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



### **Estudio de la calidad microbiológica y otros patógenos de huevos para consumo de distintos orígenes**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: ISABEL GÓMEZ PUCHADES

TUTORA: ANA ISABEL JIMÉNEZ BELENGUER

DIRECTOR EXPERIMENTAL: ALEJANDRO FENOLLAR PENADÉS

*Curso Académico: 2016/2017 VALENCIA, 5 DE JULIO 2017*

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".



## **RESUMEN**

En el presente trabajo se investiga la calidad microbiológica de huevos de distinta procedencia: ecológicos, domésticos y comerciales. La transmisión de la contaminación se produce desde el exterior de la cáscara al interior debido a una mala praxis en la manipulación al lavado, también puede ser debido a una mala conservación o enfermedad de las gallinas ponedoras. La metodología utilizada para el análisis de las muestras será según la normativa ISO específica para los distintos microorganismos para los que hemos realizado este estudio, basados en los criterios microbiológicos para este tipo de alimento.

Se analizaron de cada tipo de huevo 10 muestras en busca de la posible presencia de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y Enterobacterias, mediante la metodología oficial de análisis de muestras microbiológicas: UNE/EN/ISO para cada uno de los microorganismos estudiados. En caso de obtener colonias sospechosas se procedió a identificar como positivas las cepas obtenidas mediante pruebas bioquímicas para cada bacteria.

La prevalencia que se obtuvo para los microorganismos estudiados fue, en primer lugar *E. coli* en un 63% de las muestras analizadas y *Enterobacterias* presentes en un 32% de las muestras obtenidas de cáscara. No se encontró *Listeria* en ninguna de las muestras analizadas. El aislamiento de una cepa de *Salmonella* en un huevo de origen comercial supone un riesgo en Salud Pública, por el contrario, el consumo de huevos de origen doméstico y ecológico no supone riesgo al consumidor, en cuanto a los microorganismos patógenos, en base a las muestras estudiadas.

**PALABRA CLAVE:** *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y Enterobacterias, sensibilidad antimicrobianos, resistencia antibióticos

**ALUMNA:** Isabel Gómez Puchades

**TUTORA:** Ana Isabel Jiménez Belenguer

## **ABSTRACT**

In the present study the microbiological quality of eggs from different sources, domestic, commercial and ecological was investigated. Transmission contamination occurs from the outside of the shell inside due to malpractice in handling washing, it can also be due to poor conservation or laying hens disease. The methodology used for the analysis of the samples will be according to the ISO standard specific for the different microorganisms for which we have carried out this study, based on the microbiological criteria for this type of food.

They were analyzed for each type of egg 10 samples for the possible presence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* and Enterobacteriaceae, through the official methodology of analysis of microbiological samples: UNE / EN / ISO for each of the microorganisms studied. In case of obtaining suspicious colonies, we proceeded to identify as positive the strains obtained by biochemical tests for each bacterium.

The prevalence of the microorganisms studied was, firstly, *E. coli* in 63% of the samples analyzed and Enterobacteria present in 32% of the samples obtained from the shell. No *Listeria* was found in any of the analyzed samples. The isolation of two *Salmonella* strains in a commercial egg is a risk in Public Health; on the other hand, the consumption of eggs of domestic and ecological origin does not pose a risk to the consumer based on the samples studied.

**KEYWORDS:** *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, Enterobacterias, Antibiograma

**ALUMNA:** Isabel Gómez Puchades

**TUTORA:** Ana Isabel Jiménez Belenguer

## **AGRADECIMIENTOS**

Quería agradecer en primer lugar este trabajo a mis padres, mis hermanos e Israel que durante todo el tiempo de la carrera han estado siempre para apoyarme y ayudarme en cada momento difícil.

A mí misma por el esfuerzo que he hecho de compaginar estudios y trabajo, por todas esas noches que salía de trabajar y me ponía a estudiar hasta altas horas de la noche y madrugar para ir a clase y al fin estar aquí presente redactando el final del largo recorrido.

A mi profesora Ana que desde que coincidimos en una asignatura que imparte siempre me ha dado su apoyo y animado a seguir el camino.

A Alejandro con el que he compartido muchas horas de laboratorio y me ha ayudado siempre en todo lo que podía. Y a Nancy, la técnico del departamento por la ayuda prestada en el laboratorio.

Y también agradecer a la ETSIAMN puesto que conocí muchos compañeros de los cuales ahora son amigos incondicionales.

A la universidad UPV porque han final he encontrado mi camino perdido, y sé que quiero para mi futuro y realizarme profesionalmente, no puedo estar más orgullosa de esta universidad y el profesorado que he tenido durante estos largos años de carrera.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 HUEVOS</b>	
1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	1
1.1.2 ESTRUCTURA	1
1.1.3 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL	3
1.1.4 TRAZABILIDAD Y ENVASE	4
1.1.5 MICROBIOLOGÍA DEL HUEVO	6
1.1.6 CONTAMINACIONES MICROBIÓLOGICAS DEL HUEVO	8
<b>1.2 ENTEROBACTERIAS</b>	
1.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	8
1.2.2 TAXONOMIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	8
1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA	8
<b>1.3 ESCHERICHIA COLI</b>	
1.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	9
1.3.2 TAXONOMIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	9
1.3.3 EPIDEMIOLOGÍA	10
<b>1.3 SALMONELLA</b>	
1.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	10
1.4.2 TAXONOMIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	10
1.4.3 EPIDEMIOLOGÍA	11
<b>1.5 LISTERIA MONOCYTOGENES</b>	
1.5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	12
1.5.2 TAXONOMIA	12
1.5.3 EPIDEMIOLOGÍA	12
<b>1.6 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA</b>	13
<b>2. OBJETIVOS</b>	13
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1 PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	14
3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MUESTRA	15
3.2.1 DETERMINACIÓN <i>ENTEROBACTERIAS</i>	15
3.2.2 DETERMINACIÓN <i>E. COLI</i>	16
3.2.3 DETECCIÓN <i>SALMONELLA</i>	16
3.2.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
<b>3.2.4.1. Prueba de TSI</b>	17
<b>3.2.4.2 Prueba tira reactiva API (índice analítico del perfil)</b>	17
3.2.5 ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS	18
3.2.6 DETECCIÓN DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	19
<b>4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	19
<b>5. RESULTADOS</b>	20
5.1 RESULTADOS <i>ENTEROBACTERIAS</i>	20
5.2 RESULTADOS <i>E. COLI</i>	22
5.3 RESULTADOS <i>SALMONELLA</i>	23
<b>5.3.1 ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS DE LAS CEPAS DE SALMONELLA</b>	24
5.4 RESULTADOS <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	25
<b>6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	26
<b>7. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	27
<b>8. ANEJOS</b>	
8.1 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE <i>ENTEROBACTERIAS</i>	I
8.2 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE <i>E. COLI</i>	II
8.3 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE <i>SALMONELLA</i>	III
8.4 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	IV

## **ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Criterios microbiológicos para el huevo

**Tabla 2.** Huevos domésticos puesta y pesos.

**Tabla 3.** Huevos ecológicos fecha caducidad y peso

**Tabla 4.** Huevos comerciales fecha caducidad y pesos

**Tabla 5.** Antibióticos usados en la investigación clasificados por grupo.

**Tabla 6.** Antibióticos y diámetro del halo

**Tabla 7.** Ufc/g de Enterobacterias obtenidas de la cáscara en las distintas muestras.

**Tabla 8.** Ufc/g de *E. coli* obtenidas de la cáscara en las distintas muestras.

**Tabla 9.** Resultado de los diámetros de los halos de inhibición en la cepa 3C de *Salmonella*

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Estructura y partes de un huevo

**Figura 2.** Diagrama de flujo de proceso industrial del huevo.

**Figura 3.** Marcaje del huevo comercial

**Figura 4.** Especificaciones del envase comercial

**Figura 5.** Esquema proceso de disco-placa

**Figura 6.** Valores de la comparación de medias de las distintas muestras de procedencia. (Enterobacterias)

**Figura 7.** Valores de la comparación de medias de las distintas muestras de procedencia. *E. Coli*

**Figura 8.** Presencia o ausencia de *Salmonella* en interior del huevo.

**Figura 9.** Halos de sensibilidad frente a los distintos antibióticos muestra 3C.

## **ABREVIATURAS**

**APPCC:** análisis de peligros y puntos de control críticos  
**BRC:** British Retail Consortium  
**CCAA:** Comunidad Autónoma  
**CLSI:** Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio  
**CIN:** Centro información nutricional, Argentina  
**CNE:** Centro Nacional de Epidemiología  
**E:** *Escherichia*  
**EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad alimentaria  
**ELIKA:** Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria  
**HDL:** lipoproteínas de baja densidad  
**HR:** Humedad relativa  
**IFS:** International Featured Standards  
**ISCII:** Instituto de Salud Carlos III  
**ISO:** Organización Internacional de Normalización  
**L:** *listeria*  
**LDL:** lipoproteínas de baja densidad  
**MAGRAMA:** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente  
**PRP:** Programa de Prerrequisitos  
**S:** *Salmonella*  
**SIM:** Sistema Información Microbiológica  
**TYP:** *Salmonella* Typhimurium  
**UE:** Unión Europea  
**UFC:** unidad formadora de colonias  
**USDA:** Departamento de agricultura, Inspección y Seguridad Alimentaria de Estados Unidos

## **MEDIOS y REACTIVOS UTILIZADOS**

**ATP:** agua de peptona tamponada (BD Difco, Francia, ref. 218105)  
**VRBG:** Agar violeta cristal – rojo neutro-bilis-glucosa según MOSEL, (Merck, ref. 1.10275.0500 y Scharlau 01-295) (*Enterobacterias*)  
**RVS:** Caldo Rappaport-Vassiliadis con soja, (Difco; ref. 218584) (*Salmonella*)  
**MKTTn:** Caldo Muller-Kauffmann tetracionato/novobiocina (*Salmonella*), (Scharlau, ref. 02-335)  
**XLD:** agar xilosa lisina desoxicolato (*Salmonella*) (Scharlau, ref. 01-211)  
**HT:** Hektoen-Entero-Agar (*Salmonella*), (Merck; ref. 1.11681.0500)  
**TSI:** agar triple azúcar hierro (*Salmonella*) (Merck; ref.: 1.03915.0500)  
**API 20E Biomèrieux®:** pruebas bioquímicas miniaturizadas para identificación de enterobacterias (Biomerux; ref.: 20 100).  
**TBX:** medio triptona-bilis-glucurónico (Merck; ref. 1.16125.0500)  
**PCA:** agar plate count (Scharlau, ref. 01-161-500)  
**FRASER:** caldo base para enriquecimiento (*Listeria monocytogenes*)  
**ALOA:** agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (Aloa, Oxoid, ref. CM1084)  
**PALCAM:** agar base selectivo (*Listeria monocytogenes*) Scharlau 01-470-500  
**Kovacs:** alcohol isoamilo, p-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado  
**Novobiocina:** antibiótico aminocumarina consiste en la unión de tres sustratos  
**MH:** Müller Hilton II Agar 3217374

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1 HUEVOS**

### **1.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES**

El huevo es un producto alimentario perecedero de consumo habitual durante todo el año. La producción de huevos a nivel mundial ha aumentado de forma evolutiva, aunque en el 2014, se redujo por la gripe aviar. Los datos estadísticos muestran el aumento sobre unos 65 millones de toneladas, con la mayor producción en China con el 37%, con un control en Asia del 65% a nivel mundial, seguido de Europa con un 13,5%, donde España ocupa el primer lugar con un 13,1% (Inprovo, 2015).

La producción anual de huevos en España se sitúa en torno a 830.000 toneladas, con una facturación de 1,3 millones de euro. En 2012 había registradas unas 1100 granjas comerciales de ponedoras de las cuales sólo el 7% pertenecen a gallinas ecológicas (Inprovo, 2015).

Actualmente el valor del huevo es un 0,33 céntimos de euro menor al valor del año pasado por estas mismas fechas (euros/docena en 2016 para una talla M es de 0,51 frente los 0,82 del año pasado). En España ha descendido el consumo per cápita anual de 270 a 239 según datos de Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (Magrama, 2015).

La gallina suele poner un huevo cada 24-48 h y su estructura está diseñada para dar resistencia en roturas y evitar contaminación interna. Existen diferentes tamaños que van de talla S a XL según peso, que oscila entre los más pequeños con un peso menor a 53g hasta más de 73g para los huevos de mayor tamaño. Se clasifican según si son para el consumo directo, los llamados huevos frescos denominados A, que son los que presentan su estado natural sin hacer tratamientos de conservación o refrigeración (Decreto 408/1975, de 7 de marzo; B.O.E) y los huevos refrigerados a temperaturas entre 0-2 °C durante un periodo máximo de treinta días (Decreto 408/1975, de 7 de marzo: B.O.E), los conocidos de segunda calidad utilizados en la industria alimentaria y denominados B.

En el mercado se pueden encontrar huevos de gallina (los más consumidos), también podemos encontrar de oca, codorniz y pato pero más como alimentos gourmet. En el consumo es habitual su uso tanto para alimentos dulces como salados puesto que posee propiedades aglutinantes, y gelificantes entre otras muchas (Huevo, 2016).

El huevo es un alimento que posee pocas calorías y aporta muchos beneficios de vitaminas como A, B12, minerales como hierro, y efectos positivos en la salud de componentes como ácidos grasos insaturados, antioxidantes o colina, permiten considerarlo además un alimento funcional (Inprovo, 2015), por lo que su consumo ha aumentado en los últimos tiempos y cada vez se introduce más en las dietas (institutodelhuevo, 2015).

### **1.1.2 ESTRUCTURA**

El huevo se compone de la cáscara, la clara y la yema, que a su vez se componen de otras estructuras, que se describen a continuación.

**Cáscara (blanca o marrón):** La cáscara está formada por una estructura microporada entre 7000-17000 poros de distintos diámetros, revestida por dos membranas internas donde se forma una cámara de aire con lo que se determina el índice de frescura del huevo según los mm que tenga. Estructura rígida formada por carbonato cálcico sobre una matriz. El peso de una cáscara según tamaño suele ser un 8- 10% del peso final. Se encarga de que no entre microorganismos al interior.

La resistencia de la cáscara se debe a la alimentación y el metabolismo mineral de la gallina., también de la genética de la ponedora, estado sanitario y la temperatura ambiente (Mead. G.C, 2009).

**Cutícula:** Recubre a la cáscara, está formada por proteínas mayoritariamente y en menor porcentaje por lípidos y carbohidratos. Su principal función es cerrar los poros para que no penetren microorganismos al interior, no se pierda agua y de brillo al huevo. A los cuatro días de la puesta empieza a desaparecer (Mead. G.C, 2009).

**Membrana externa:** Rodea al albumen, se encarga de dar protección contra los microorganismos, se utiliza en la formación de la cáscara, y entre las membranas se forma la cámara de aire.

**Membrana interna:** Rodea al albumen, se encarga de dar protección contra los microorganismos, es de fina estructura con fibras de queratina y contiene lisozima en la matriz que impide la entrada de microorganismos y que otros les cueste más entrar.

**Cámara de aire:** Según la frescura del huevo tendrá unos mm, cuando el huevo es de categoría A no puede ser superior a 6mm, cuando esa frescura empieza a perderse, también pierde agua en forma de vapor y la cámara se expande y empeora la calidad del huevo. También tenemos que tener en cuenta la temperatura, porque cuanto más temperatura antes envejece el huevo.

**Clara o albumen:** Es la parte transparente, gelatinosa formada por varias capas con diferentes viscosidades donde encontramos agua (85%), proteínas, vitaminas y algunos minerales y materia grasa. La proteína presente es la ovoalbúmina, también están presentes: ovomucina, conalbúmina, lisozima, flavoproteína. El peso de la clara del total del huevo es de 50-60%.

Hay dos tipos de albumen: el denso rodea a la yema y donde se concentra la principal fuente de proteínas y riboflavina. El fluido, es muy líquido, está más próximo a la cáscara. Con la pérdida de frescura ambos van perdiendo la consistencia.

**Chalazas:** Están en la clara mantienen la yema en el centro, son un engrosamiento del albumen

**Yema:** Es una emulsión de grasa en agua, de color amarillo-naranja, donde el componente mayoritario es el agua, tienen Luteína y Zeaxantina que son pigmentos que colorean la yema y a la vez antioxidantes (CIN, 2015), también contiene alto porcentaje de lípidos y en menor proporción hidratos de carbono, vitamina A, B, Fe, Ca. El peso varía entre el 30-40%.

**Membrana vitelina:** Da la forma a la yema, hace de separación entre la clara, cuando se produce su rotura es cuando el huevo se desparrama y mezclan yema y la clara.

**Blastodisco:** También llamado disco germinal, es un disco claro y pequeño donde se dividen las células embrionarias en la fecundación.

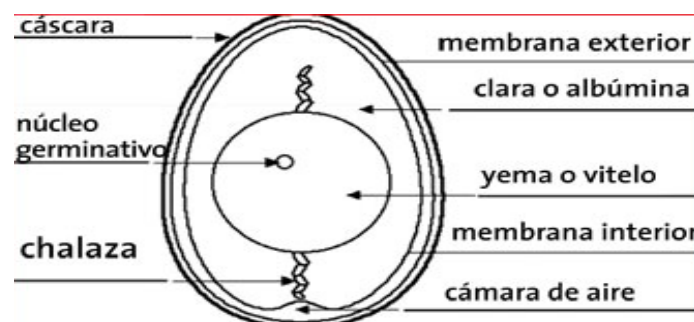


Figura 1. Estructura y partes de un huevo (BM EDITORES, 2015).



### 1.1.3 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL

El huevo recién puesto está a 41°C, por lo que ésta temperatura se tiene que bajar rápidamente para mantener la calidad. La temperatura óptima está alrededor de los 10-15°C, si bajase más la temperatura se puede producir la congelación de la yema. En cuanto a la humedad relativa, la idónea oscila entre 70-80% para que no se produzca pérdida de peso durante su almacenamiento (Mead, G.C. 2009)

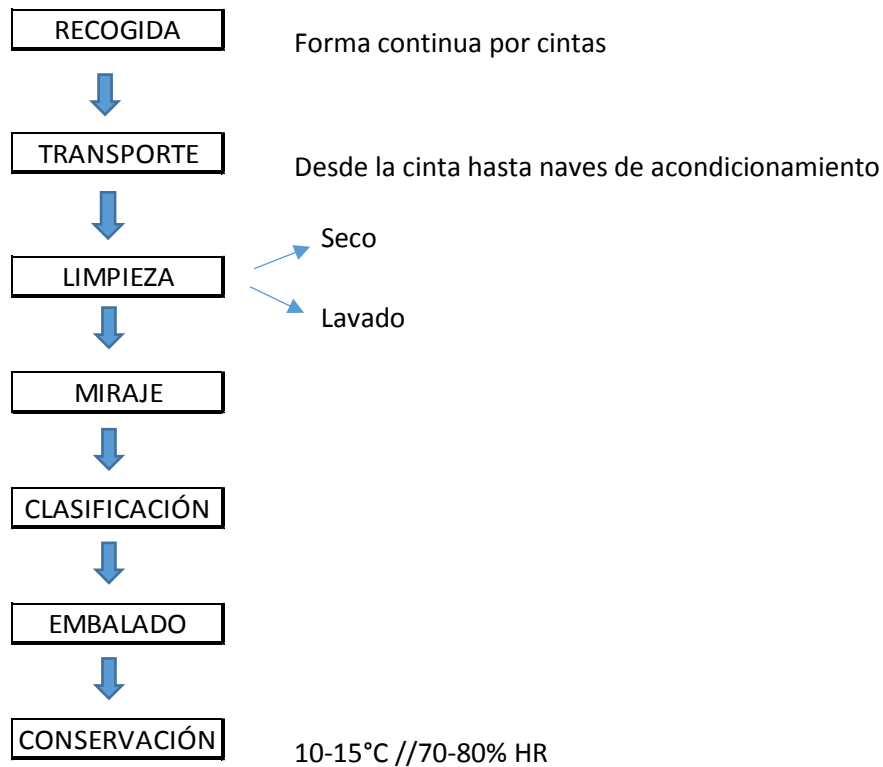


Figura 2. Diagrama de flujo de proceso industrial del huevo.

En el proceso de industrialización pasa por diferentes etapas hasta que llega a los consumidores en las condiciones óptimas para su consumo.

**RECOGIDA:** Se realiza de forma continua inmediata, desde la puesta mediante cintas transportadoras.

**TRANSPORTE:** Se realiza en cintas hasta la nave almacenamiento que están ubicados contiguos a las naves de puesta.

**LIMPIEZA:** Fundamentalmente se realiza de dos formas:

En *seco*: Se frota los huevos con materiales abrasivos para quitar la suciedad que haya en la cáscara. Se realiza con máquinas especiales mediante cepillos que tienen un movimiento de rotación para limpiar toda la superficie del huevo. Con este método de limpieza en seco no existe el peligro de contaminación, a excepción de que los cepillos estén sucios y al eliminar la cutícula protectora se produzca contaminación

Mediante *lavado*: Inmersión de los huevos en agua con un detergente especial (germicida) y desinfectante a una cierta temperatura, después se enjuagan y se secan.

**MIRAJE:** Se miran los huevos a trasluz, donde se observan si hay defectos en el interior como son presencia de roturas, deformidades, tamaño de la cámara de aire, la claridad de la albúmina, centrado de la yema, que no haya presencia de sangre. Es más fácil de detectar cualquier anomalía en los huevos blancos porque son más translúcidos.

**CLASIFICACIÓN:** Después del miraje los que son aptos pasan a la clasificación por su peso.

**EMBALADO:** De forma automatizada en bandejas de plástico o cartón, según peso del producto y en unidades de 6 o 12 en cada envase.

Junto a las normas generales de higiene para el envasado y el embalaje de los productos alimenticios, deben establecerse ciertos requisitos adicionales para reducir al máximo el riesgo de deterioro o contaminación de los huevos durante su almacenamiento y su transporte. Esos requisitos deben basarse en la norma CEPEONU nº 42 (Magrama, 2008).

**CONSERVACIÓN:** Durante el embalado y también cuando salen de la planta de procesado para su venta, con el fin de evitar el exudado, hay que evitar cambios bruscos de temperatura y humedad. Con ello se evitan deterioros de la calidad interna del huevo y se evitan posibles contaminaciones microbiológicas debidas a la penetración de microorganismos, puesto que la cáscara húmeda es más permeable.

#### 1.1.4 TRAZABILIDAD Y ENVASE

Las empresas del sector alimentario están obligadas a asegurar la trazabilidad de sus productos de conformidad con el Reglamento (CE) no 178/2002. Los productores, los colectores y los centros de embalaje deben ser obligados a mantener registros específicos adicionales que permitan a los servicios de inspección comprobar el cumplimiento de las normas de comercialización. (Magrama, 2008).

La trazabilidad es la acción de poder seguir desde el inicio de la formación del huevo hasta el consumidor, durante todas las etapas de producción, distribución y comercialización, que le aporta esa seguridad y calidad para que el consumidor pueda tener una mayor fiabilidad en el control, y cumpliendo la normativa vigente europea (Reglamento CE nº 178/2002 en concreto artículo 18). Con esta información si algún huevo estuviera contaminado u otro problema se detectaría el lote afectado, y podría ser retirado de la comercialización rápidamente, sin correr riesgos mayores.

En la granja con esta trazabilidad se tiene controlado qué ave hace la puesta, el pienso que consume y los controles sanitarios a los que está sometido. (Real Decreto 372/2003, de 28 de marzo).

En la zona de embalaje consta el origen y destino de cada lote que se expida y marcate del envase del registro sanitario, también en la producción cada operario lleva sus registros manuales o informatizados por todas las fases que pasa el huevo hasta la salida de los almacenes.

El huevo va individualmente marcado con unos dígitos que indican la procedencia de la granja, país, comunidad y la forma de cría de las ponedoras. El consumo máximo para un huevo no puede ser superior a los 28 días después de la puesta (Inprovo, 2015).



Figura 3. Marcaje del huevo comercial, en él se indica la forma de cría de la gallinas, el país de origen y la granja de producción y la fecha de consumo preferente (Huevo, 2015).

## ENVASE Y MARCAJE

Actualmente las empresas utilizan las técnicas del Aseguramiento de la Calidad para controlar los peligros existentes microbiológicamente con el APPCC y PRP como sistemas preventivos (Blackburn, 2003), puesto que la producción de huevos la limpieza de las cáscaras es un punto crítico para la alimentación. Controlando los PCC se consigue una mayor seguridad alimentaria, puesto que la legislación y reglamentos y el cumplimiento de normas ISO, BRC o IFS cada vez son más estrictas y exigentes en cuanto a calidad y seguridad alimentaria según vamos evolucionando con el tiempo (Isciii, 2015).



Figura 4. Especificación envase comercial (Instituto huevo, 2009) dónde se indica el tamaño de los huevos, la forma de cría, el código de autorización del centro embalaje y la fecha de consumo preferente.

La normativa básica que regula las condiciones de comercialización de los huevos se encuentra en los Reglamentos 1907/90 y 1274/91 de la Unión Europea, junto con sus posteriores modificaciones, así como en la Decisión del Consejo 94/371/CE. En relación a las condiciones de comercialización de los huevos debe tenerse en cuenta además que a raíz de la publicación de la Directiva Comunitaria 93/43/CEE, el ordenamiento jurídico español incorpora el contenido de la misma en el Real Decreto 2207/1995, de 28 de diciembre, se desarrolla las Guías para implantar el sistema APPCC (Magrama, 2008). Características mínimas para los huevos denominados A: tienen que tener la cáscara limpia, intacta, sin roturas, con cámara de aire no superior a 6 mm y cuando su categoría sean huevos extras no superior a 4mm, la clara transparente, gelatinosa, sin apariencia de manchas ni cuerpo extraños, con yema visible al trasluz, que no se separe del centro al aplicar una fuerza de rotación y sin cuerpos extraños y ausencia de olores extraños.

### 1.1.5 MICROBIOLOGÍA DEL HUEVO

De acuerdo al Reglamento (CE) N° 589/2008 se disponen las normas para la comercialización de los huevos. El huevo según la estructura que presenta se considera prácticamente “estéril” hasta el desarrollo embrionario (Mead, 2009) y podemos hablar de dos mecanismos de defensa: físico y químico. El mecanismo de defensa físico está constituido por las barreras físicas proporcionadas tanto por la cáscara como las membranas y el mecanismo químico lo constituyen tanto la yema como el albumen debido a su efecto antibacteriano.

Las barreras físicas son las que evitan la penetración de microorganismos al interior del huevo y están formadas por: la cutícula que es la encargada de cerrar los poros, la cáscara que contiene millones de microporos que son más anchos donde se encuentra la cámara de aire, donde se producen una mayor penetración, también cuando mayor espesor de la cáscara, la penetración es más difícil para los microorganismos, por lo que a mayor peso de la cáscara, una mayor resistencia. La membrana testácea externa e interna rodea al albumen y ofrece protección contra la contaminación, debido a que contiene menos poros y tiene una estructura más compleja e hidrofóbica (Pascual Anderson, 1989).

Las barreras químicas son las que están en la yema y albumen y forman de manera natural protección antimicrobiana debido al pH alcalino, la lisozima y la conalbúmina. La lisozima produce la lisis de las bacterias Gram +. La conalbúmina secuestra iones metálicos como por ejemplo el hierro evitando el crecimiento de las bacterias y su desarrollo como puede ser el caso de *Salmonella*, que en estas condiciones no se desarrolla favorablemente (Mead, 2009).

Podemos hablar de dos vías de contaminación: **vertical** (también llamada transovárica u oviductal) y **horizontal** (también conocida como transcáscara). La vertical consiste en la contaminación del albumen, membrana vitelina o la yema por microorganismos que se encuentran en el ovario de la gallina o durante el paso del huevo por el oviducto. Durante la formación del huevo, las bacterias que infectan el aparato reproductor pasan al interior del huevo en formación. Esta vía es la más común en el caso de contaminación por *Salmonella* Enteritidis (selecciones avícolas, 2015).

Por otra parte, en la vía horizontal, la contaminación se produce después de la puesta y es debida mayoritariamente a causas ambientales y a la presencia de deposiciones fecales en la cáscara. Una vez que la superficie del huevo está contaminada, esta puede empezar a penetrar en el interior pasando al albumen y posteriormente a la yema. Esta vía de contaminación es la mayoritaria del huevo (selecciones avícolas, 2015).

De acuerdo al REGLAMENTO (CE) No 1441/2007 del 5 de diciembre de 2007, se establecen los criterios microbiológicos que a continuación se desarrollan. En ellos distinguimos entre criterios de higiene y criterios de seguridad, en la tabla 1, así mismo se expresa cada criterio para cada microorganismo con su correspondiente Norma ISO.

Tabla 1. Criterios microbiológicos para el huevo

		Criterios de higiene de procesos		Criterios de seguridad alimentaria	
		<i>Enterobacterias</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Método analítico referencia		EN/ISO 21528/2:2004	EN/ISO 16649-1:2001	EN/ISO 6579/2002	EN/ISO 11290-1:1996/A1
Plan toma muestras	n	5	5	5	5
	c	2	2	0	0
Límites	m	10 ufc/g (o ml)	50 ufc/g (o ml)	ausencia en 25g o ml	ausencia en 25g o ml
	M	100 ufc/g (o ml)	500 ufc/g (o ml)		
Interpretación resultados		<p><b>Satisfactorio:</b> si todos los valores observados son inferiores o iguales a “m” <b>Aceptable:</b> si un máximo de “c/n” valores se encuentran entre “m” y “M” y el resto de los valores son inferiores o iguales a “m”. <b>Insatisfactorio:</b> si uno o varios valores observados son superiores a “M” o más de “c/n” valores se encuentran entre “m” y “M”</p> <p>n: número que compone la muestra. c: número de muestras que dan valores entre m y M. m = Número máximo de unidades formadoras de colonias (ufc). M = Es una cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) que se usa para separar la calidad marginalmente aceptable de la inaceptable.</p>		<p><b>Satisfactorio:</b> si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria. <b>Insatisfactorio:</b> si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras</p>	
Acción en caso de insatisfactorio		Comprobaciones de la eficacia del tratamiento térmico y prevención de la recontaminación		El producto o lote de productos alimenticios será retirado o recuperado conforme a lo dispuesto en el artículo 19 del Reglamento (CE) nº 178/2002 (7-1) Adopción de otras medidas cautelares Propuesta de expediente sancionador. Comunicación al organismo competente	

Para la aceptabilidad o no de las muestras analizadas, se distingue por distintos métodos analíticos de referencia y según el tipo de bacterias:

*Enterobacterias* y *E. coli*: la interpretación de los resultados se basan según los criterios de higiene durante el proceso productivo.

*Salmonella*: la interpretación de los resultados se basa en criterios de seguridad alimentaria durante la vida útil del producto.

Para *Listeria monocytogenes* no hay unos criterios establecidos para huevos pero se realizó el estudio según reglamento para alimentos listos para el consumo basados en criterios de seguridad alimentaria durante la vida útil del producto (Rgto. CE 401/2006, DOUE L70/12 9.3.2006).

### **1.1.6 CONTAMINACIONES MICROBIOLÓGICAS EN EL HUEVO**

Durante el almacenamiento se producen algunos cambios en el huevo que lo hacen más susceptible a las invasiones, se reduce la viscosidad de la membrana y se debilitan las chalazas, y como consecuencia la yema que está contenida por la membrana vitelina va desplazándose hacia las membranas de la cáscara, si toca la membrana interior, alguna bacteria podría tocar la yema y producir el posible crecimiento interno (Mead. G.C, 2009). Los microorganismos que habitualmente se encuentran en la cáscara son Gram positivos como el *Micrococcus* spp, pero los microorganismos encargados de las alteraciones del huevo son las bacterias Gram negativas como (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*) que para producir las alteraciones de un huevo intacto, tienen que ser capaces de penetrar en la cáscara y superar las barreras antimicrobianas, y la magnitud de esta penetración aumenta con la edad del huevo (Mayes y Takeballi, 1983). Entre las bacterias más alterantes encontramos *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, donde los cambios que producen son visibles y apreciables, todo lo contrario a *Salmonella*.

También puede darse el caso de crecimiento de mohos si la recogida es tardía, la humedad alta, y también puede aparecer el hongo *Cladosporium* (Mead. G.C, 2009).

Desde la puesta del huevo hasta que llega al consumidor, hay que tener durante el almacenamiento unas condiciones óptimas, teniendo unas buenas medidas higiénicas para que el PCC (punto de control crítico) que se produce en este tiempo, sea minoritario, controlando la humedad, almacenamiento a bajas temperaturas, que no se produzcan fluctuaciones de temperaturas en el almacenamiento como en el momento de la distribución.

## **1.2 ENTEROBACTERIAS**

### **1.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES**

Las *Enterobacterias* son aquellas bacterias que pertenecen al orden Enterobacteriales, familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias Gram negativas con más de 30 géneros y 100 especies. Su morfología puede ser cocoide o bacilar. Dentro de las Enterobacterias se encuentran los coliformes, e incluye a diferentes especies de Enterobacterias que forman parte de la microbiota normal tanto del intestino como de diferentes órganos tanto en humanos como en otros animales (Prescott H. 2004). Además pueden sobrevivir en diferentes partes como tierra y agua (Pascual M, 2005).

### **1.2.2 TAXONOMIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

Son bacterias anaerobias facultativas, Gram negativas y pueden ser cocos o bacilos, oxidasa negativa, catalasa positiva, no esporuladas, algunas pueden producir toxinas, fermentan azúcares. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 22-37° C, pueden producir o no gas. Los géneros más representativos son: *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Proteus Serratia*, *Yersinia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (Mead, 2009).

### **1.2.3 EPIDEMIOLOGÍA**

Estas bacterias que se pueden aislar en el intestino, pertenecientes a la microbiota o ser transitorias en la boca, piel, perineo, fosas nasales (Dolin y colaboradores., 2006). Se expulsan con las heces por lo que son indicadores de higiene. Se encuentran en gran abundancia en la naturaleza en los medios húmedos (Pascual Anderson, 2005).

Cuando se ingiere un alimento contaminado por este tipo de bacterias se producen diarreas y deshidratación. Algunas especies provocan enfermedades características como: fiebre tifoidea (*S. Typhi*), *E. coli enterotóxica* (gastroenteritis infantil), *Yersinia pestis* (peste).

### 1.3 ESCHERICHIA COLI

#### 1.3.1 CARACTERISTICAS GENERALES

*Escherichia coli* es una bacteria perteneciente a la familia Proteobacteria-Gammaproteobacteria-Enterobacteriales-Enterobacteriaceae, descubierta por Theodore Von Escherich en 1885, bacteriólogo alemán, le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*. Se encuentra en los intestinos de animales sanos, formando parte de su microbiota intestinal normal y es considerado como indicador de contaminación fecal (Prescott, 2004). Tiene poca supervivencia en el ambiente extraentérico, por lo que indica que la contaminación ha sido reciente (Pascual, 2005).

#### 1.3.2 TAXONOMIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo del sistema digestivo, son células pequeñas, alargadas, móviles por flagelos, no forma esporas y es capaz de fermentar glucosa y lactosa. Es una bacteria necesaria para el correcto proceso digestivo y además produce vitamina K y B.

Las condiciones de crecimiento para esta especie van de un mínimo de entre 7-8°C hasta un máximo de 46°C, donde la temperatura óptima para su desarrollo está entre 35-40°C. Este tipo de bacteria crece idóneamente en medios con pH neutro (6-7). Sin embargo, es capaz de crecer en medios básicos con un pH hasta 10 o en medios ligeramente ácidos con un pH de 4-6. Pueden crecer hasta una concentración de 6% de sal. Crecen a temperaturas mesófilas pero pueden resistir a tratamientos térmicos de superiores, pero a partir de 65°C se inactivan. Necesita una actividad de agua de 0,995 para crecer y llevar a cabo sus funciones metabólicas (Adam y Moss 1997).

En la actualidad se pueden distinguir varios serotipos de *Escherichia*:

- **E. coli enteropatógeno (EPEC):** conocida por causar diarreas agudas en neonatales por mala higiene o zonas tropicales, su difusión es por vía directa fecal oral (Madigan y col 2003). Aparece sobre las 6 horas hasta 72 horas, manifestando diarreas, náuseas, vómitos, ligera fiebre, y en casos extremos acidez y deshidratación (Pascual, 2005).
- **E. coli enteroinvasivo (EIEC):** afecta a niños y adultos con un periodo de incubación de 8-24 horas, con manifestaciones clínicas de fiebre, dolor cabeza, escalofríos, calambres y heces sangrientas con duración entre varios días o semanas (Madigan y col 2003). El hombre es el principal reservorio y se propaga por alimentos, agua o contacto fecal-oral.
- **E. coli enterohemorrágico (EHEC):** se caracteriza por tres síndromes característicos: colitis hemorrágica, síndrome hemolítico urémico y púrpura trombótica trombocitopénica. Se considera el *E. coli* patógeno más importante. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C con unos límites de entre 8 a 45°C. Aguanta temperaturas menores a -20 °C. Su periodo de incubación es de 3- 4 días, causa fuertes dolores, distensión abdominal, náuseas, vómitos y diarreas. Pude llegar a causar la muerte en un 36% de los casos (Pascual, 2005).
- **E. coli enterotoxigénico (ETEC):** Es la denominada diarrea del viajero y se encuentra sobre todo en países subdesarrollados (Prescott H. 2004). Es transmitida a través de alimentos o agua contaminada. Elabora dos toxinas, una termolábil inactiva a 60°C a 30 minutos y otra termoestable que resisten temperaturas de hasta 100 °C durante 30 minutos (Adam y Moss 1997).

### **1.3.3 EPIDEMIOLOGÍA**

La principal forma de transmisión es por el consumo de alimentos contaminados, tanto crudos como cocinados si no alcanzan una temperatura superior a 70°C en todo el alimento. En relación a los alimentos en los que se encuentra esta bacteria, está mayoritariamente asociada a la carne y al ganado vacuno. También se puede encontrar en la leche no pasteurizada si no se toman las medidas de higiene alimentaria adecuadas (Madigan y col., 2003).

Las personas que padecen esta infección son muy contagiosas y hay que tener cuidado especial en guarderías y en centros de mayores. Su periodo de incubación comienza 7 días después de la infección y la fase sintomática dura aproximadamente entre 5-10 días (Prescott, 2004).

Los síntomas son: cólicos abdominales fuertes, diarreas sangrientas, fiebre leve, náuseas y vómitos, ocasionando deshidratación, úlceras intestinales, y cistitis. Se diagnostica con un cultivo de heces. Es una infección que se acusa más en mujeres que en hombres (Pascual y Calderón, 2000).

En 2012 el número de casos en Europa disminuyó un 40% respecto al año anterior (5.671 frente a 9.485 casos en 2011). El número tan elevado de casos observado en 2011 se debió a un gran brote que se produjo en Alemania y Francia asociado al consumo de semillas germinadas, por la cepa O104:H4. No obstante, aún eliminando los datos de 2011, la tendencia para el periodo 2008-2012 es creciente. España notificó 31 casos confirmados en 2012; (tasa de 0,07 frente a 1,15 de la UE). La tendencia en España, al igual que en la UE, es de aumento los últimos años (Centro Nacional de Microbiología del ISCIII, 2015) y los últimos datos del Centro Nacional de fecha de 2014, se detectaron 12 casos en España con una mayor prevalencia en niños menores a 5 años, publicado el 5 de julio de 2016.

## **1.4 GÉNERO SALMONELLA**

### **1.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES**

*Salmonella* fue descubierta por Theobald Smith en 1885 aislada en cerdos, cuya transmisión se produce en alimentos de origen animal. Tiene un periodo de incubación de entre 6-48 horas (Prescott H. 2004). Bacteria entérica que pertenece a Proteobacteria-Gammaproteobacteria-Enterobacteriales-Enterobacteriaceae. La podemos encontrar en carnes de aves crudas, huevos, carne vacuna y excepcionalmente en vegetales y frutas sin lavar. Es una bacteria que no resiste pH ácidos por lo que su evolución en el intestino depende del huésped y su microbiota intestinal. Es una bacteria omnipresente y resistente pudiendo sobrevivir varias semanas en un ambiente seco y varios meses en agua (Anderson, 2005).

Según estudios de la OMS es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más común, y cada año provoca millones de casos en todo el mundo (OMS, 2015).

### **1.4.2 TAXONOMIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

Son bacilos Gram negativos aerobios o anaerobios facultativos, móviles mediante flagelos, producen H<sub>2</sub>S, no fermentan la lactosa. Podemos distinguir 2 especies: *S. Bongori* y *S. Enteritidis*, y según la serotipificación de (Kauffman y White) se clasifican en más de 2000 serotipos en base al antígeno flagelar H y al antígeno somático O. Antígeno flagelar H: su nombre proviene del alemán Hauch, por el halo producido en un medio de cultivo con movimiento, proteína termolábil, y puede ser monofásico (mismo antígeno flagelar) o difásica (presentarse en fase específica o menos específica) (Prescott, 2004).

Antígeno somático O: proviene del alemán Ohne, no tiene movimiento, es una cadena de polisacáridos y lipopolisacárido, constituido por diversos factores antigénicos que pueden dividirse en más grupos O (Anderson, 1989).



Aunque por lo general la mayoría de las cepas causan gastroenteritis que no tiene complicaciones, estas sí se pueden dar en niños, ancianos y personas inmunodeprimidos. Esto ocurre en los dos serotipos más importantes transmitidos de animales a humanos, que son la *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Anderson, 1989).

La tasa de multiplicación es elevada, puesto que en 15-20 minutos a temperaturas superiores a 20° C puede duplicarse, y según aumenta la temperatura la tasa aumenta puesto que su temperatura óptima esta entre 35-43° C. Los límites de crecimiento están entre los 5 y los 46°C (Elika, 2015)

El intervalo de pH en el que se puede desarrollar está comprendido entre 4,5 – 9 pero su condición óptima está entre 6,5-7,5, por debajo de 4,1 se inactiva y muere. Es resistente a la congelación y a la deshidratación. El valor óptimo de Aw en el que se desarrolla es de 0,99 (Anderson, 2005).

### 1.4.3 EPIDEMIOLOGÍA

En el caso de *Salmonella* existen tres posibles rutas para que los microorganismos puedan acceder al interior del huevo. Una puede ser por infección en el tejido reproductor de la gallina (algunas cepas de esta bacteria tienen la capacidad inusual de invadir el tracto reproductivo). Otra por invasión del oviducto desde la cloaca (puesto que primero se forma la clara, luego membranas y por último la cáscara) y también puede producirse la contaminación a través de la cáscara a partir de microorganismos del tracto intestinal o del sitio de puesta (Mead, 2009). Normalmente, en caso de haber contaminación, está se suele localizar en la clara y en el exterior de la membrana vitelina.

Las personas que contraen *Salmonella* generalmente es debido al consumo de alimentos contaminados, en este caso por la ingesta de huevos crudos o alimentos elaborados de huevos crudos: salsas a base de huevo, helados, etc. (Madigan y col., 2003). Un estudio realizado por Conselleria de Sanitat de la Comunidad Valenciana, por un brote de toxiinfección de *Salmonella* en un banquete de bodas, llegaron a la conclusión de que el origen estuvo en carne y un pastel, en el cual un 60% de los manipuladores no tenían los conocimientos adecuados de manipulación de alimentos, no había un control de las cámaras con las temperaturas y hubo una contaminación cruzada entre los utensilios utilizados para la elaboración de la carne y el pastel. Por lo que es muy importante la formación del personal y llevar un control estricto del cumplimiento del APPCC.

Los síntomas que suelen presentarse son: fiebre, diarrea, cólicos abdominales, dolor de cabeza, incluso náuseas, vómitos y pérdida de apetito. Estos síntomas empiezan a manifestarse a las 12-36 horas después de la ingesta del alimento contaminado y suelen durar entre 4-7 días (Prescott H. 2004). Para el diagnóstico se realiza un análisis de heces. Puesto que es autolimitante no se suele aplicar terapias con antibióticos, excepto en casos graves, y el tratamiento suele limitarse a mantener una correcta hidratación y asegurar la reposición de sales minerales, (USDA 2015)

Un hecho de especial relevancia es la presencia de portadores sanos: Un portador sano de *Salmonella* puede albergar y eliminar bacterias viables durante meses en la heces sin presentar síntomas.

La dosis que desencadena gastroenteritis por *Salmonella* suele ser de  $1 \times 10^5$  microorg.por gramo de alimento, dependiendo de hospedador (Mead. G.C 2009).

Según informó el Sistema de Información Microbiológica, en España en el año 2014 se detectaron 5008 nuevos aislamientos de *Salmonella* no tifoidea en distintas comunidades autónomas. La mayor prevalencia se presentó en niños con edades de 1 a 4 y en personas >65. El 95% de las muestras son de procedencia fecal (SIM, 2015). En el primer trimestre del 2016 en Aragón se han encontrado un total de 109 de *Salmonella*, según el Sistema de Información Microbiológica de Aragón.

## **1.5 LISTERIA MONOCYTOGENES**

### **1.5.1 CARACTERISTICAS GENERALES**

La *Listeria monocytogenes* es una bacteria que pertenece a la familia Firmicutes-Bacilli-Bacillales-Listeriaceae, recibe el nombre de *Listeria* por Joseph Lister cirujano inglés y por la capacidad de generar monocitos. Es una bacteria de desarrollo intracelular que causa listeriosis, generando infecciones graves y que presenta una tasa de mortalidad que puede llegar al 30% (ISCIII, 2016).

Puede aislarse en diferentes ambientes como aguas residuales, agua fresca, suelo y vegetación. A temperaturas bajas forma un biofilm. Puede encontrarse también en alimentos refrigerados, pudiendo ocasionar contaminación cruzada si hay un mal almacenamiento. Hay evidencias de que se transmite a través del agua y algunos alimentos (Pascual, 2005). Según el BOE es una enfermedad de declaración obligatoria por medio de los organismos públicos y competentes.

### **1.5.2 TAXONOMIA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

Es un bacilo Gram positivo anaerobio facultativo con 11 serotipos, de tamaño pequeño, no ramificado, crece a pH entre 6-9, con capacidad de desarrollo entre 1- 45°C y tolera una concentración alta de sal, máxima 16% (Madigan y col., 2003). Es catalasa positiva, tiene flagelos que le dan movilidad a temperaturas iguales o inferiores a 30°C. Tiene un metabolismo fermentativo, y partir de azúcar produce ácido y acetona (Pascual, 2005)

La temperatura óptima de crecimiento está entre 30 - 37° C, con valores límites de crecimiento entre 4-46°C. El rango de pH en el que puede sobrevivir está comprendido entre 4 – 9,6 pero su condición óptima esta entre 6 -8. Resistente a la refrigeración, desecación y el calentamiento. El valor óptimo de Aw es de 0,97 (Elika, 2013).

### **1.5.3 EPIDEMIOLOGÍA**

La transmisión se da por vía fetal, vía oral por alimentos contaminados que es la más común, por animales contaminados y nosocomial, donde la tasa mortalidad es de un 20% (El, 2013).

Cuando existe la contaminación el periodo de incubación suele ser de 3 semanas, y los síntomas que se tienen al ser parecidos a una gripe pasan desapercibidos. Los síntomas son dolor de cabeza, gastroenteritis grave, vómitos, diarreas, y pústulas en algunos casos. En personas inmunodeprimidas o neonatos los síntomas se pueden agravar con una septicemia, meningitis o incluso la muerte. (CNE, 2015), debido a que sus cepas tienen la mayor virulencia, debido a que sus sistemas inmunes son más débiles (Pascual Anderson, 2005).

La mejor opción para combatir esta enfermedad es el uso de gentamicina y penicilina de amplio espectro (ampicilina) a excepción de personas alérgicas a la penicilina, en las que se utiliza trimetoprim y sulfametoxazol. La duración del tratamiento varía entre semanas a meses según el paciente y caso en concreto (Centro Nacional de Epidemiología, 2016).

En 2012 se notificaron 1.642 casos humanos confirmados en toda Europa (Red Nacional de vigilancia Epidemiológica).

Los productos alimenticios en los que se ha aislado con más frecuencia *Listeria monocytogenes* por encima de los límites permitidos han sido los procedentes de la pesca. En España se notificaron al SIM 107 casos humanos confirmados (tasa de 0,93 casos por 100.000 habitantes, muy superior a la media de la UE que fue de 0,41). Dentro de la UE, nuestra tasa sólo es superada por Finlandia con 1,13 casos por 100.000 habitantes (Red Nacional de vigilancia Epidemiológica). El Centro de Epidemiología notificó en el año 2014 un total de 150 casos de listeriosis en 10 Comunidades Autónomas recogido en el Sistema de Información Microbiológica, por lo que se observa un aumento respecto a años anteriores y según el SIM, las personas con mayor riesgo son las personas mayores, mujeres embarazadas y niños.

### **1.6 Resistencia antimicrobiana**

Las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia frente a distintos antibióticos, mediante la producción de enzimas que inhiben esos antibióticos. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas.

Desde el punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella eso quiere decir que es capaz de curar la infección causada; por el contrario, es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección (Sistema Nacional de Salud, 1998).

Para que los antibióticos sean efectivos y destruyan o inhiban a los microorganismos, tienen que atravesar la barrera superficial y fijarse en un órgano diana (Hospital de Santander, 2006).

Actualmente el abuso de los antibióticos sin una preinscripción, la automedicación, administrando una mayor o menor dosis, conlleva a la pérdida de eficacia de los antibióticos para combatir infecciones.

## **2. OBJETIVOS**

En la actualidad pese a que la presencia de microorganismos patógenos en alimentos está muy controlada en todos los procesos industrializados mediante distintos controles en la industria, es necesario mantener un control microbiológico sobre los productos obtenidos que puedan suponer un riesgo para el consumidor. Los huevos son un alimento que se comercializa y almacena en el domicilio en estado fresco y con muy poca manipulación, por lo que el riesgo para el consumidor puede ser elevado si hay algún problema en la cadena de producción.

La finalidad de este estudio consiste en el análisis microbiológico según la normativa vigente de huevos de diferentes procedencias, domésticos sin ningún control sanitario, comerciales y de cría ecológica para observar las posibles diferencias en cuanto a su contaminación y el cumplimiento de la normativa microbiológica.

Los microorganismos investigados coinciden con los que se buscan en los análisis oficiales: *Salmonella*, Enterobacterias y *Escherichia coli* y la detección de *Listeria monocytogenes* se realiza debido a que no se investiga de forma rutinaria y en caso de consumo en fresco o contaminación cruzada puede suponer un riesgo para el consumidor.

1. Muestreo de huevos de distintas procedencias: comerciales, ecológicos y domésticos.
2. Detección de *Salmonella*, Enterobacterias, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.
3. Estudio de la resistencia microbiana de los microorganismos patógenos presentes, a distintos antibióticos utilizados habitualmente en clínica.
4. Comparación de la prevalencia según la procedencia de los huevos con mayor contaminación.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS**

Se analizaron huevos de origen comercial, ecológico y doméstico. Los huevos procedieron de distintos comercios, granjas ecológicas y de distintas procedencias domésticas. Se analizaron 10 huevos de cada tipo, de distintos orígenes en el caso de los domésticos y de varias marcas comerciales en el caso de los comerciales y ecológicos. En total se analizaron 30 huevos.

En las tablas 2, 3 y 4 se pueden observar las muestras según sus diferentes procedencias, fechas de los análisis y peso total y por separado (solo el de la cáscara y el de la yema y la clara). Según los pesos que hemos obtenido se puede saber que los huevos son de clase M y L.

En las tablas 2, 3 y 4 se indica en los huevos domésticos el día de puesta, y en los huevos ecológicos y comerciales la fecha de consumo preferente, así como el tamaño de los huevos seleccionados al azar.

La selección de muestras se hizo a temperatura ambiente, de la forma más aséptica posible. Para ello, los huevos se manipulaban con guantes de nitrilo y se colocaban en envases de cartón previamente irradiados con luz ultravioleta para evitar las contaminaciones cruzadas.

Se han estudiado diferentes tipos de huevos según el origen de la muestra, siendo estas definidas como:

- Huevo doméstico: aquel que proviene de producción particular, sin ningún control sanitario, de higiene, alimentación, etc. Estos tipos de huevos a no llevar controles no se garantiza que estén libres de contaminaciones microbianas.
- Huevo ecológico: se rigen por la normativa CEE nº 2092/91, mediante la cual se prohíbe el empleo de cualquier sustancia química en su cría. Los animales se deben encontrar libres en campos sobre los que no se hayan utilizado abonos químicos ni plaguicidas, y tienen sus controles sanitarios. Están en granjas al aire libre, alimentados con piensos naturales. Deben tener certificación ecológica, respetar el bienestar animal, impacto medioambiental y calidad de los productos.
- Huevo comercial: son los que están criados en jaulas, con luz artificial. La puesta la hacen en superficie limpia, por lo que tiene un menor riesgo de contaminación microbiana, tienen controles sanitarios de instalaciones, inspección de producto, de los lotes, condiciones higiénicas, verificación de buenas prácticas de higiene y distintas auditorías a lo largo del año.

Tabla 2. Huevos domésticos fecha de la puesta y pesos en gramos de la cáscara y del interior.

<b>Domésticos</b>					
Procedencia	Puesta	Análisis	Peso total (g)	Peso cáscara (g)	Peso interior (g)
Doméstico A	22/02/2015	23/02/2015	62,4	9,1	53,3
Doméstico A	22/02/2015	23/02/2015	59,8	8,8	51
Doméstico A	27/02/2015	03/03/2015	61,5	9,4	52,1
Doméstico B	19/03/2015	23/03/2015	76,3	12	64,3
Doméstico B	19/03/2025	23/03/2015	74	9,6	64,4
Doméstico B	04/04/2015	06/04/2015	63	9,3	53,7
Doméstico C	17/04/2015	27/04/2015	62,6	7,8	54,8
Doméstico C	17/04/2015	27/04/2015	64,6	7,8	56,8
Doméstico A	07/05/2015	11/05/2015	73,2	9,4	63,8
Doméstico B	08/05/2015	11/05/2015	68,2	9,7	58,5

Tabla 3. Huevos ecológicos fecha de caducidad y peso en gramos de la cáscara y del interior.

<b>Ecológicos</b>						
Procedencia	Fecha caducidad	Análisis	Talla	Peso total (g)	Peso cáscara (g)	Peso interior (g)
Ecológico A	21/03/2015	02/03/2015	L	70,4	8,6	61,8
Ecológico A	21/03/2015	02/03/2015	L	78,9	8,2	70,7
Ecológico A	21/03/2015	02/03/2015	L	69,8	8,4	61,4
Ecológico B	14/04/2015	23/03/2015	M	64,2	9,8	54,4
Ecológico B	14/04/2015	23/03/2015	M	66,1	7,2	58,9
Ecológico C	14/05/2015	04/05/2015	M	57,8	8	49,8
Ecológico C	20/05/2015	04/05/2015	M	61,6	8,4	53,2
Ecológico C	20/05/2015	04/05/2015	M	61,8	8,9	52,9
Ecológico D	23/05/2015	11/05/2015	M	61,6	8,4	53,2
Ecológico D	20/05/2015	11/05/2015	M	61,8	8,9	52,9

Tabla 4. Huevos comerciales fecha de caducidad y pesos en gramos de la cáscara y del interior.

<b>Comerciales</b>						
Procedencia	Fecha caducidad	Análisis	Talla	Peso total (g)	Peso cáscara (g)	Peso interior (g)
Comercial A	06/05/2015	27/04/2015	L	64	8,8	55,2
Comercial A	06/05/2015	27/04/2015	L	64,4	8,7	55,7
Comercial B	12/06/2015	25/05/2015	L	65,2	10,1	55,1
Comercial B	12/06/2015	25/05/2015	L	66,8	7,9	58,9
Comercial B	12/06/2015	25/05/2015	L	67,4	7,5	59,9
Comercial B	12/06/2015	25/05/2015	L	68,8	8,8	60
Comercial C	18/06/2015	01/06/2015	L	70	8,2	61,8
Comercial C	18/06/2015	01/06/2015	L	62,6	8,4	54,2
Comercial C	18/06/2015	01/06/2015	L	64,7	8,4	56,3
Comercial C	18/06/2015	01/06/2015	L	70,3	8,8	61,5

### 3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA MUESTRA

Las muestras se fueron analizando a lo largo de varios meses, desde febrero hasta junio, hasta completar el número total de muestras del estudio.

#### 3.2.1 DETERMINACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

Según la Normativa ISO 21528/2:2004 se llevó a cabo diluciones decimales seriadas con agua de peptona tamponada (APT) (BD Difco, Francia, ref. 218105) tanto de la cáscara como del interior del huevo, ajustando el volumen según el peso para hacer una dilución 1:10. Posteriormente se homogenizó cada tubo, y a continuación se sembró en profundidad, por duplicado, en Agar VRBD (Scharlau, España, 1.10275.0500). Una vez solidificados se incubaron a  $37 \pm 1$  °C durante  $24h \pm 2h$ . Una vez transcurrido el tiempo se contaron las colonias características de *Enterobacterias* para el medio y se expresaron los resultados en ufc/g.

### 3.2.2 DETERMINACIÓN DE *E. COLI*

Según la Normativa ISO 16649-1:2001 para la determinación de *E. coli* se utilizó un método horizontal, por un lado se hizo la cáscara y por otro lado el interior del huevo, y según peso, una relación 1:10 con agua de peptona tamponada. La cáscara se introdujo en botes estériles y el interior del huevo en una bolsa de stomacher estéril para su homogeneización. A continuación se cogió la muestra y se hicieron una serie de diluciones seriadas y se sembró en superficie en el medio triptona-bilis-glucurónico (TBX, Merck; ref. 1.16125.0500) e incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24h, pasado el tiempo recuento colonias, confirmación y resiembra de una colonia aislada en medio agar plate count (PCA, Scharlau, ref. 01-161-500 ) de las colonias que crecieron se confirmó con prueba bioquímica de Indol, se suspendió una colonia aislada de PCA en caldo triptófano (Difco; ref. 0123-17) e incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Se adicionaron de dos gotas de reactivo de Kovacs y observo el halo de color rojo en la superficie, que indica que la presencia de enzima triptofanasa. En medios PCA se observan colonias azuladas - verdosas.

Fórmula (Estimación de números bajos)

$$N_E = \frac{\sum c}{V * n * d}$$

$N_E$ : unidad formadora de colonias

$\sum c$ : suma de ufc típicas en dos placas

$n$ : número placa retenida (en este caso  $n=2$ )

$V$ : volumen inculo, aplicado a cada placa

$d$ : factor dilución de la suspensión inicial o factor primera dilución retenida

### 3.2.3 DETECCIÓN DE *SALMONELLA*

Para la detección de *Salmonella* se siguieron las indicaciones de la norma ISO 6579:2002 'Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Se partió de un preenriquecimiento en el agua de peptona tamponada (ATP) manteniendo una relación 1:10 entre muestra y medio, tanto de la cáscara como del interior del huevo (muestras separadas). Las muestras fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24h. A continuación, se hizo un enriquecimiento en dos medios líquidos selectivos, RVS (Caldo Rappaport-Vassiliadis con soja (Difco; ref. 218584) y MKTTn (Caldo Muller-Kauffmann tetracionato/novobiocina, Scharlau, ref. 02-335): en el caso del RVS, se inocularon 0,1 ml del preenriquecimiento y se incubó a  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ , por otro lado, para el caldo MKTTn se inoculó 1 ml del preenriquecimiento y se incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . Una vez incubados, de cada uno de los enriquecimientos se hizo una siembra en 2 medios sólidos selectivos, agar xilosa-lisina-deoxiglicolato (XLD) (Scharlau, ref. 01-211) y agar Hektoen Entero (HK) (Merck; ref. 1.11681.0500). Ambos medios se incubaron  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . Pasado el tiempo de incubación, si en las placas no se observaron colonias sospechosas de *Salmonella* incubaban otras  $24 \pm 3\text{h}$ . Todas las siembras se realizaron por duplicado.

Las colonias sospechosas de ser *Salmonella* fueron sembradas en agar nutritivo triple azúcar hierro (TSI) (Merck, ref. 1.03915.0500) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . En caso de observarse colonias sospechosas de *Salmonella* se procedió a resembrar en agar platecount PCA (Scharlau, ref. 01-161-500) para realizar las pruebas bioquímicas confirmativas.

### 3.2.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para la caracterización e identificación se realizaron distintas pruebas bioquímicas.

#### 3.2.4.1 Prueba de TSI

Se usó el agar hierro triple azúcar para la comprobación de las colonias sospechosas de *Salmonella* aisladas de los medios XLD y HK. La prueba se basa en la capacidad de las bacterias entéricas de metabolizar distintos azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa), si los pueden fermentar (formando gas) y su capacidad de producir ácido sulfhídrico.

Según la capacidad de la bacteria de metabolizar cada uno de los compuestos del medio, el viraje de color en el medio puede ser:

- Si fermenta lactosa o sacarosa, el medio se acidifica volviéndose amarillo, sino seguirá rojo.
- Si se fermenta glucosa, el indicador del fondo vira a amarillo, y sino fermenta se queda rojo.
- Si se produce ácido sulfhídrico, se produce un ennegrecimiento. Si hay producción de gas se puede producir desplazamiento del medio o rotura de este.

Para la inoculación de la bacteria, primero se siembra en picadura y posteriormente en triple estría en la parte inclinada del agar.

Se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ .

#### 3.2.4.2 Prueba tira reactiva API

La prueba API20, (Merck, ref. 1.03915.0500) es un sistema de rápida identificación para Enterobacterias. Consta de 20 pocillos con diferentes medios de cultivos y sustratos. Es rápido, eficaz y muy fácil de utilizar. Se coge una colonia presuntamente positiva, y se hace una dilución en 5ml de agua estéril, se homogeniza en el vortex y se inocula una gota en cada pocillo, siguiendo las indicaciones del fabricante y sellando aquellas que necesitan anaerobiosis. Una vez inoculada toda la tira, para mantener la humedad necesaria se inundan los pocillos de la base y se incuba a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ . Posteriormente pone en los pocillos indicados por el fabricante distintos reactivos, y una vez reaccionen se procede a la lectura de los resultados. Las pruebas pueden ser positivas o negativas y en función de la prueba y del resultado se asigna una numeración que al final al compararla en la base de datos del fabricante, indica con un porcentaje la probabilidad de la especie de la bacteria.

### 3.2.5 ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS

Es una prueba de sensibilidad bacteriana donde se mide la sensibilidad de una cepa a distintos antibióticos a concentraciones definidas. Se llevó a cabo mediante la técnica de disco placa, en la cual discos con concentración fija donde se evaluó la sensibilidad de una bacteria al antibiótico, cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de microorganismos y aporta información según sea R-resistente, I-intermedio y S- sensible, basándonos en la norma CLSI, el cual es el método de mayor referencia para el estudio de la sensibilidad microbiana.

Se realiza una suspensión de las cepas de estudio en suero salino a una concentración 0,5 en la escala Mcfarland, se homogeneiza y se siembra con hisopo en medio agar Müeller Hilton extendiendo bien la suspensión del inóculo, se seca unos 5-6 minutos. Posteriormente se añadieron los distintos antibióticos en distintas placas con el dispensador automático (Oxoid) y se lleva a incubar  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{h} \pm 3\text{h}$ , después de la incubación se realiza la lectura del diámetro de los halos de cada antibiótico con una regla milimetrada. Posteriormente se procede a establecer el rango de sensible (S), resistente (R) e intermedio (I) según la guía del CLS (CLSI, 2014).

Este estudio sólo se realizó en las de las cepas de *Salmonella* aisladas debido a la importancia que tiene las resistencias para los tratamientos clínicos en caso de producirse un brote de toxiinfección.

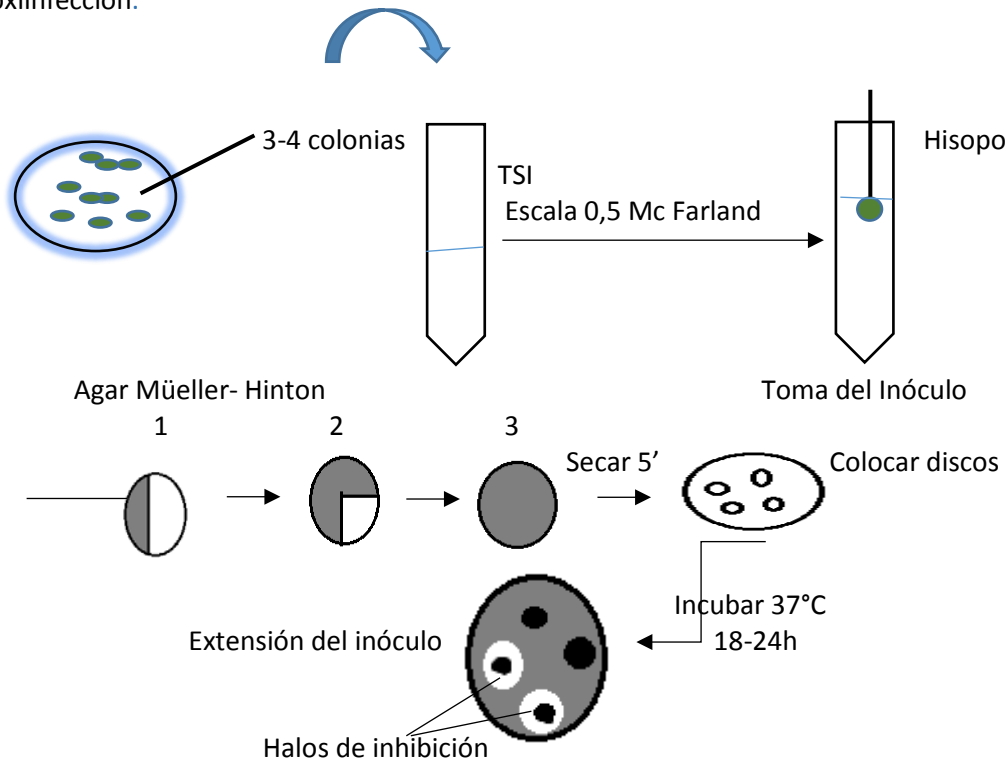


Figura 5. Esquema proceso de disco-placa.

Para el estudio de sensibilidad de *Salmonella* de la cepa con presunción de positivo, usamos la cepa 3C y el método recomendado por el CLSI. Se seleccionaron 12 antibióticos de distintos grupos, mencionados en la tabla 5.

Tabla 5. Antibióticos usados en la investigación clasificados por grupo.

Grupo	Antibiótico
Aminoglucósidos	Amikacina(AK)
	Gentamicina(CN)
	Kanamicina (K)
Anfenicoles	Cloranfenicol(C)
	Tetraciclina(TE)
Betalactámicos	Amoxicilina(AMC)
	Ampicilina(AMP)
	Cefalotina(KF)
	Ceftriaxona(CRO)
Macrólidos	Estreptomicina (S)
Quinolonas	Ác.Nalidíxico(NA)
	Ciprofloxacino(CIP)

En la tabla 6 se muestran los antibióticos que se usaron para determinar la sensibilidad antimicrobiana, donde se indica la carga de los discos utilizados y según resistencia que puede ser sensible, intermedia o resistente, según el CLSI usado como método de referencia.



Tabla 6. Antibióticos empleados y valores del diámetro del halo de inhibición para su clasificación en Sensibles, Intermedios y Resistentes (según datos CLSI).

	Carga del disco $\mu\text{g}$	Diámetro del Halo de Inhibición (mm)		
		Sensible	Intermedia	Resistente
Cloranfenicol ( C )	30	$\geq 18$	13-17	$\leq 12$
Tetraciclina (TE)	30	$\geq 19$	15-18	$\leq 14$
Amikacina (AK)	30	$\geq 17$	15-16	$\leq 14$
Cefalotina (KF)	30	$\geq 18$	15-17	$\leq 14$
Ac. Nalidixico (NAL)	30	$\geq 19$	14-18	$\leq 13$
Ampicilina (AMP)	10	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$
Estreptomina (S)	15	$\geq 23$	14-22	$\leq 13$
Gentamicina (CN)	10	$\geq 15$	13-14	$\leq 12$
Kanamicina (K)	30	$\geq 18$	14-17	$\leq 13$
Ciprofloxacino (CIP)	5	$\geq 21$	16-20	$\leq 15$
Ceftriaxona (CRO)	30	$\geq 21$	14-20	$\leq 13$
Amoxicilina-clavulánico (AMC)	20	$\geq 18$	14-17	$\leq 13$

### 3. 2. 6 DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Según la Normativa ISO 11290-1: 1996/A1 para la determinación de *Listeria monocytogenes*, mediante un método horizontal, se realizó un preenriquecimiento en medio líquido no selectivo: al igual que en la detección de *Salmonella* se analizó la cáscara y el interior del huevo por separado, y según peso se realizó una relación 1-10 con el agua de peptona tamponada.

La cáscara se introdujo en botes previamente esterilizados en autoclave y el interior del huevo en bolsa de Stomacher para su homogeneización y se lleva a incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Luego un enriquecimiento selectivo caldo Fraser 10ml con 0,1 ml de la muestra e incubó a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48h. Siembra en medios selectivos: agar cromogénico listeria (Aloa, Oxoid, ref. CM1084) y agar base selectivo Palcam (Scharlau, ref. 01-470-500) a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24h, por último, presencia y confirmación de las colonias resultantes. En el medio Aloa se observan colonias verdes - azuladas con un halo opaco y en el medio Palcam se observan colonias verdes grisáceas con un halo negro.

## **4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el programa informático Statgraphics Centurion XVI, para los distintos datos. Donde se observan los intervalos de confianza de las medias obtenidas, de las tres poblaciones estudiadas, si son estadísticamente significativas entre ellas.

## **5. RESULTADOS**

La prevalencia de los microorganismos estudiados con los datos obtenidos, fue en primer lugar para *E. coli* el cuál se aisló en un 63% de las muestras analizadas y Enterobacterias presentes en un 32% de las muestras obtenidas de cáscara.

A continuación, se expresan los resultados obtenidos y significación estadística según los distintos orígenes de los huevos analizados a partir de las distintas muestras. Se expresan los resultados de la cáscara por un lado y los del interior del huevo.

### **5.1 Enumeración de Enterobacterias totales**

**Cáscara:** se obtuvieron aislamientos de Enterobacterias en la cáscara de huevos domésticos y ecológicos. Esto puede ser debido a que en ambos casos no se utiliza ningún medio aséptico para la puesta. En los huevos domésticos fue donde se observó una mayor crecimiento de Enterobacterias, probablemente porque las gallinas ponedoras tienen la zona de puesta en el suelo y los huevos pueden mezclarse con heces, tierra, y tienen menos conocimientos sobre medidas higiénicas los propietarios de este tipo de gallina.

En huevos comerciales no se observó ningún crecimiento. Esto puede deberse a que las zonas de puesta están en alto, a excepción de los otros dos tipos de muestras, y cumplen con las normativas sanitarias y requisitos de normativas ISO.

**Interior del huevo:** No se observó crecimiento en ningún huevo independientemente del origen de procedencia de las muestras.

Tabla 7. Ufc/g de Enterobacterias obtenidas de la cáscara en las distintas muestras.

Nº de muestra	Doméstico ufc/g	Ecológico ufc/g	Comercial ufc/g
1	$3,7 \times 10^4$	0	0
2	$4,3 \times 10^4$	0	0
3	0	0	0
4	0	$3,9 \times 10^4$	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	$5,1 \times 10^4$	0	0
10	$6,5 \times 10^4$	$4 \times 10^4$	0

Según criterios de aceptabilidad, los huevos tanto domésticos como ecológicos, presentaron unos resultados aceptables puesto que cumplen con los criterios según la norma ISO 21528/2:2004, no sobrepasando los límites establecidos de ufc. Los huevos comerciales serían los más seguros porque no se desarrolló ningún crecimiento en ninguna de las muestras.

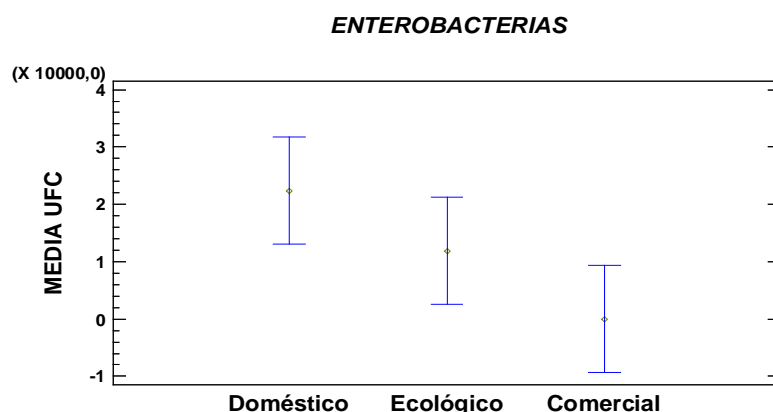


Figura 6. Valores para Enterobacterias de la comparación de medias de las distintas muestras de procedencia.

Teniendo en cuenta el gráfico de la comparación de medias del recuento para *Enterobacterias*, se puede apreciar que los huevos comerciales son los que presentan una mayor higiene puesto que no hubo presencia de colonias.

Por otro lado, los huevos domésticos y ecológicos presentan un crecimiento parecido por lo que ambas medias están próximas y hay poca diferencia significativa entre ambas muestras, pero si hay una diferencia significativa entre la media de los huevos comerciales con las otras dos procedencia de muestras.

Esta diferencia estadísticamente significativa entre las distintas muestras, se debe a que los huevos comerciales cumplen con los requisitos APPCC, que las otras dos no contemplan en su forma de cría, alimentación y puesta.

En estudios de Hernández Castellano y col. (2015) de la facultad de veterinaria de Gran Canaria determinaron que las granjas con la implantación de un APPCC, la contaminación microbiana es baja, de los cuales el 1% de huevos representa a contaminaciones por *Enterobacterias*. Por lo que en comparación a este estudio, los datos de *Enterobacterias* son mayores al proceder las muestras de granjas que no tienen una implantación de APPCC, a excepción de los huevos de procedencia comercial, que sí que tienen el sistema de APPCC en las granjas.

En un estudio llevado a cabo por Englmaierová y col. (2014), indican que la puesta de huevo en jaulas o zona en alto presenta una menor contaminación por enterobacterias, y comparando con nuestros datos obtenidos, obtenemos resultados similares.

## 5.2 Enumeración de *E. coli*

En ninguna de las muestras analizadas del interior de los huevos se presentó un crecimiento microbiológico, por lo que se puede determinar que los resultados son satisfactorios en los diferentes tipos de procedencia de los huevos según criterios microbiológicos.

**Cáscara:** En todos los orígenes se aislaron cepas de *E. coli*. En el caso de los huevos domésticos se obtuvieron aislados en 5 huevos, de los huevos ecológicos en 6 y de los huevos comerciales tan solo en 1.

**Interior del huevo:** No se observó crecimiento en ningún huevo independientemente del origen de procedencia de las muestras.

Tabla 8. Recuento en ufc/g de *E. coli* obtenidas de la cáscara en las distintas muestras.

Nº de muestra	Doméstico ufc/g	Ecológico ufc/g	Comercial ufc/g
1	$3,32 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	0
2	$4,5 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	0
3	0	0	0
4	$1,5 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
5	$5 \times 10^3$	$4,5 \times 10^3$	0
6	0	0	0
7	0	$5 \times 10^3$	0
8	0	0	0
9	$5 \times 10^3$	0	0
10	0	$4 \times 10^3$	0

La tabla 8 presenta los resultados de los recuentos expresados en ufc/g del total de 10 muestras por cada tipo de huevo ( $n=10$ ), donde en muestras de huevos domésticos la contaminación supone un 50% y en muestras de huevos ecológicos supone un 60% de contaminación en cáscara. Según los criterios microbiológicos las muestras de domésticos y ecológicos serían aceptables puesto que el crecimiento está dentro de criterios establecidos. En referente a los huevos comerciales son satisfactorios porque de las 10 muestras solo en un huevo hubo crecimiento y por debajo de los valores establecidos para la aceptación de los lotes.

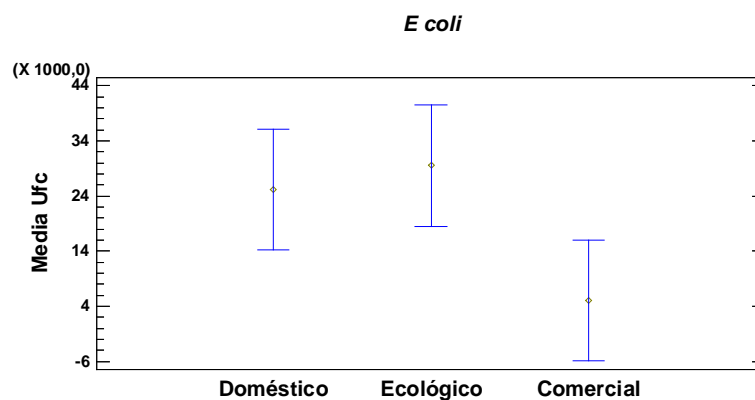


Figura 7. Valores de la comparación de medias de las distintas muestras de procedencia. *E. coli*

Como se puede observar en la figura 7 se observa que no hay diferencia significativa entre las muestra de origen doméstico y comercial, puesto que tienen un modo parecido de cuidados, puesta y alimentación. La muestra donde se obtiene una menor contaminación es la comercial con diferencias muy significativas con las otras dos muestras. Por lo que según condiciones de puesta y alimentación sí que influyen en la contaminación microbiológica de los huevos.

Resultados similares obtenidos en estudios realizados por Loaiza y col. (2011) donde se detectó un 11% de *E. coli* aislados de las cáscaras de huevos no comerciales, y según datos obtenidos en este trabajo la mayor prevalencia de microorganismos se obtiene en esos tipos de bacterias, con un porcentaje del 50%-60% de las muestras.

### 5.2 Detección de Salmonella

Al igual que en los apartados anteriores se muestra los resultados de la determinación de *Salmonella* agrupados por cáscara o el análisis del interior del huevo.

**Cáscara:** Una vez realizados las pruebas bioquímicas mencionadas en el apartado 3.2.3 de material y métodos se pudo confirmar la presencia de *Salmonella* en una de las muestras de huevo comercial, en concreto la muestra 3C, por lo que según la criterios microbiológicos el resultado aunque solo sea de 1%, el resultado es insatisfactorio y se desecharía todo el lote donde se encontró tal presencia.

De acuerdo a los criterios microbiológicos para el estudio de *Salmonella*, se puede decir que en los huevos ecológicos y domésticos tienen un carácter satisfactorio para su consumo y no suponen un riesgo de salud pública, pese a estar más en contacto con el suelo y los otros animales.

**Interior del Huevo:** una vez analizadas las colonias sospechosas de la muestra 3C en el interior del huevo perteneciente a tipo comercial, se pudo confirmar mediante las pruebas bioquímicas la presencia de *Salmonella* y la no aceptación de todo el lote afectado.

En el resto de muestras analizadas de los distintos orígenes, no se detectó *Salmonella* lo cual supone criterios satisfactorios para el consumo de los huevos.

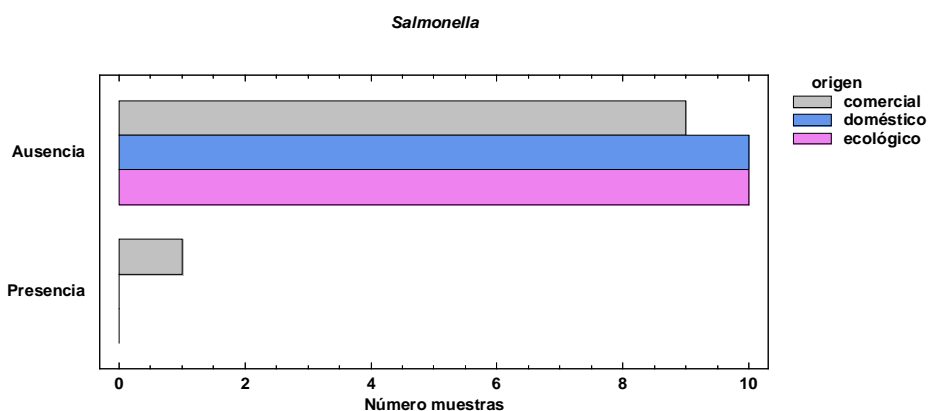


Figura 8. Presencia o ausencia de *Salmonella* en interior del huevo

De las 10 muestras de huevos comerciales analizados solo una a dado positivo por lo que el riesgo supone un 1% de resultado insatisfactorio, y representa una 3,33% del total de las muestras analizadas en el presente estudio.

Gross y col. (2014) realizaron un estudio de *Salmonella* para determinar el momento idóneo para un enfriamiento del huevo, para disminuir las posibles contaminaciones que se produzcan al interior del huevo. Se determinó que en huevos que ya estaban en el momento de compra para los consumidores y no estaban sometidos a temperaturas bajas, tuvieron crecimiento de *Salmonella* mayor a los huevos que habían estado en refrigeración, con una disminución de un 45%, lo que determinan que hay una relación entre tiempo y temperatura.

En nuestro estudio solo apareció *Salmonella* en huevos comerciales adquiridos en una cadena de supermercados sin estar en la parte de refrigeración, lo que ha podido ser también un precedente del desarrollo de contaminación.

De Reu y col. (2006) en un estudio similar al presente, estudiaron la comparativa entre la contaminación externa con la contaminación interna, tiene una contaminación mayoritariamente más significativa en la cáscara de diferentes tipos de microorganismos pasando de un 12% al principio de puesta hasta un 25% en el transcurso de los días llegando al 95% de contaminación con más de dos semanas desde la puesta. En este estudio la presencia de *Salmonella* externa fue de 33% con respecto al 3% en el interior del huevo que obtuvimos en el presente estudio, no encontrándose en nuestro caso ningún aislamiento de *Salmonella* en exterior.

El estudio de Hajieh y col. (2011), basado sobre distintos tipos de contaminantes microbianos en huevos de venta en mercados, sí que encontraron carga microbiana parecida a los resultados de este estudio, pero en cuanto a la presencia de *Salmonella* no tuvieron ningún positivo siendo el consumo seguro.

### 5.2.1 Estudio de las resistencias antimicrobianas

Debido a la importancia de la presencia de *Salmonella* se procedió a estudiar el perfil de resistencia antibiótica, debido al riesgo de salud pública y el peligro que supone para el consumidor. Para ello se utilizaron distintos antibióticos, de interés en clínica, como se muestra en el apartado 3.2.5 de material y métodos, para estudiar la resistencia a dichos antibióticos de la cepa de *Salmonella* aislada.

Tabla 9. Resultado de los diámetros de los halos de inhibición en la cepa 3C de *Salmonella*

Muestra	Huevo comercial interior	
Antimicrobiano	Diámetro del halo (mm)	Lectura del halo (mm)
Gentamicina (CN)	26	sensible
Cloranfenicol (C)	29	sensible
Tetraciclina (TE)	20	sensible
Amikacina (AK)	25	sensible
Cefalotina (KF)	26	sensible
Ác. Nalidíxico (NA)	26	sensible
Ampicilina (AMP)	25	sensible
Estreptomomicina (S)	19,7	Intermedia
Ciprofloxacino (CIP)	18	Intermedia
Kanamomicina (K)	14	Intermedia
Amoxicilina (AMC)	11	Resistente
Ceftriaxona (CRO)	18	Intermedia

Como se observa en la tabla 9, de los 12 antibióticos utilizados se observó que la cepa 3C fue sensible a 7 antibióticos, a 4 mostró resistencia intermedia Ciprofloxacino, Ceftriaxona, Kanamicina, Estreptomicina y solo a un antibiótico, Amoxicilina-clavulánico, fue resistente (figura 9), por lo que una cepa de estas características supondría un peligro de salud pública para el consumidor. Los resultados del informe anual europeo de la EFSA y del Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) 2016, subrayan que la resistencia a los antimicrobianos plantea un grave riesgo para la salud humana y animal.

La Ceftriaxona, que en nuestro trabajo muestra resistencia intermedia, está restringida en uso animal, para proteger la eficacia en los seres humanos. Actualmente el Reglamento (UE) 2016/429 del parlamento europeo y del consejo del 9 de marzo de 2016 prohíbe el uso de estos antimicrobianos para garantizar la eficacia en tratamientos de los seres humanos.

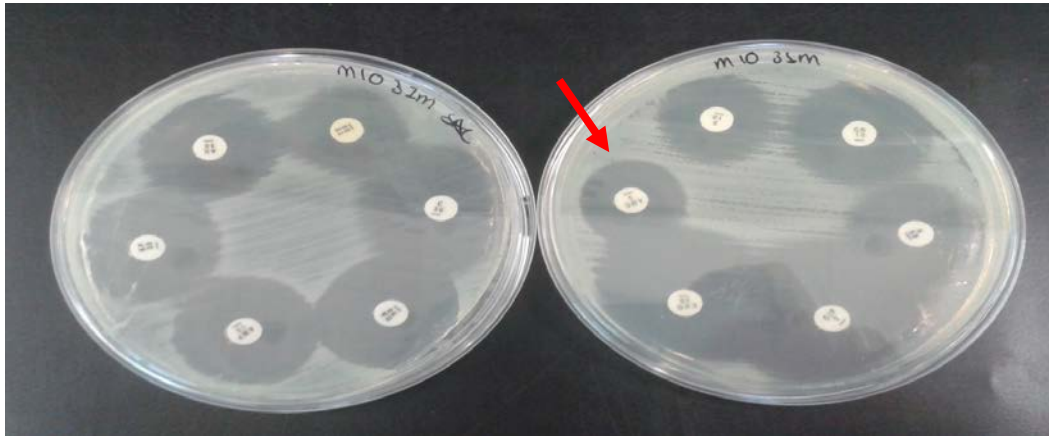


Figura 9. Halos de sensibilidad frente a los distintos antibióticos muestra 3C, la flecha señala el halo correspondiente a AMC.

## **5.2 Detección de *Listeria monocytogenes***

El estudio de la presencia de *Listeria monocytogenes* en huevo no está contemplado en la norma microbiológica, pero se consideró adecuado realizarlo en el presente trabajo debido a la ubicuidad de *Listeria* y a la posibilidad de utilizar el huevo en crudo y que se diera contaminación cruzada. Los resultados obtenidos tanto en cáscara como en el Interior del huevo han sido negativo en las distintas muestras estudiadas, por lo que confirman la seguridad para el consumidor en este tipo de productos y resultados satisfactorios.

Resultados similares de estudios de Safaei y col., (2011) en 100 huevos en busca de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*, obtuvieron unos resultados de ausencia total de *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en huevos de venta al por menor, pero sí que hubo contaminación de *E. coli* en 19% huevos de 100 muestras analizadas, que comparadas con el estudio los datos son parecidos para los distintos tipos de bacterias analizadas.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Las muestras según los resultados obtenidos fueron aceptables, puesto que la presencia de microorganismos obtenidas fueron en el exterior del huevo, porque lo que determinamos que su consumo no conlleva ningún riesgo para la salud, a excepción de una muestra de huevos comerciales que no fue aceptable.
2. Según los resultados obtenidos de huevos de las granjas tanto ecológicos como los comerciales cumplen la normativa de calidad y seguridad alimentaria que exige la Agencia de Seguridad Alimentaria Española.
3. Se concluye la verificación y buen funcionamiento del sistema APPCC para la disminución de contaminación microbiana.
4. No se detectó en ningún caso *L. monocytogenes* en ninguno de los orígenes, confirmando que aunque no esté en los criterios microbiológicos no supone riesgo para el consumidor.
5. No se detectó *Salmonella* en muestras domésticas y ecológicas, por lo que dichas muestras fueron satisfactorias.
6. La mayor contaminación de Enterobacterias se produjo en los huevos domésticos con una mayor prevalencia en la cáscara que en el interior, puesto que la puesta de los huevos es en tierra, donde las condiciones de asepsia no existen.
7. Se encontraron presencia de Enterobacterias en huevos ecológicos puesto que la cría de este tipo de gallinas está en tierra donde se depositan los huevos, con crecimiento en la cáscara y ningún crecimiento en el interior del huevo, en este tipo de granjas no se usan ni pesticidas, ni ningún otro producto que no cumpla la normativa para productos ecológicos.
8. En la contaminación por *E. coli* se obtuvo presencia en los 3 distintos tipos de muestra pero únicamente en la cáscara, con mayor prevalencia en huevos ecológicos.
9. En aquellos huevos donde la puesta es en suelo tienen una mayor contaminación de *Enterobacterias* y *E. coli* que los huevos de puesta en alto.
10. Según la Normativa para *Salmonella*, la presencia de una muestra positiva en los huevos comerciales, se califica como un resultado insatisfactorio para el consumo de ese lote.
11. La Resistencias antimicrobianas encontradas en la cepa de *Salmonella* aislada supone un riesgo para el consumidor, debido a que esta cepa es resistente a antibióticos utilizados en clínica, y presenta resistencia intermedia en dos antibióticos de elección para tratamiento clínico en salmonelosis.



## **7. BIBLIOGRAFÍA O REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**ADAMS, M.R.; MOSS, M.O.** (1997). Microbiología de los alimentos. Editorial ACRIBIA S.A.-Zaragoza.

**AECOSAN AGENCIA DE CONSUMO, SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN.** Visitada 2015-2016 [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan\\_inicio.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm)

**AENOR, ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN.** Visitada durante varias veces en el proyecto, 2015-2016.

**BOE, Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado** (2004). Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Referencia: DOUE-L-2004-81036. Visitada el 16 de Octubre del 2015. <https://www.boe.es/doue/2004/139/L00055-00205.pdf>

**BOE, Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado** (2007). Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Referencia: DOUE-L-2007-82244. Visitada el 16 de Octubre del 2015. <http://www.boe.es/doue/2007/322/L00012-00029.pdf>

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement. CLSI document M100-S17 (ISBN 1-56238-625-5) USA, 2007.

**DOLIN R, BENNETT J, ELSEVIER CHURCHILL LIVINGSTONE (2006),** Enfermedades infecciosas, microbiología clínica, Mandell GL; S.A.

**DIARIO OFICIAL DE LA UNIÓN EUROPEA:** <https://www.boe.es/doue/2016/084/L00001-00208.pdf> visitada 18 de junio 2017

**EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria**  
<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160211> (visitada 15 de septiembre 2016).  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1110/pdf> (visitada 4 de noviembre 2016).

**ELIKA: Fundación vasca para la seguridad alimentaria**  
[http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf) (visitada el 15 septiembre 2015).  
[http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf) (visitada el 27 octubre 2015)  
[http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento85/Copia%20de%204.Listeria](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento85/Copia%20de%204.Listeria) (visitada el 27 octubre 2015).

**ENGLMAIEROVÁ, M., Tůmová, E., Charvátová, V., Skřivan, M. 2014,** Efectos de la zona de puesta, las características de calidad del huevo y la contaminación microbiana de huevo. Czech J. Anim. Sci., 59, 2014 (8): 345–352.

**FAO: Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y agricultura.** Visitada varias veces durante 2015-2016. <http://www.fao.org/home/es/>  
[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BRCP%2B15-1976%252FCXP\\_015s.pdf](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BRCP%2B15-1976%252FCXP_015s.pdf)  
<http://www.fao.org/docrep/012/i1111s/i1111s01.pdf>

**GROSS, S., JOHNE, A., ADOLPHS, J., SCHLICHTING, D., STINGL, K., MÜLLER-GRAF, C., BRÉAUNIG, J., GREINER, M., APPEL, B., KASBOHRER, A. 2014:** Federal Institute for Risk Assessment (BfR)Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlín, Germany Food Control 47 (2015) 254e263: *Salmonella* de la granja a la mesa, ¿cuándo se requiere enfriamiento?

**SAFAEI, H. G., JALALI, M., HOSSEINI, A., NARIMANI, T., SHARIFZADEH, A., E. RAHEIMI. 2011;** Jundishapur Journal of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, 4(4): 249-253., La prevalencia de la contaminación bacteriana de los huevos de consumo por *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* en Shahrekord, Irán.

**HERNÁNDEZ CASTELLANO, L.; SANJUÁN VELÁZQUEZ, E.; MILLÁN DE LARRIVA, R.; CARRASCOSA IRUZUBIETA, C.; MAURICIO QUINTANA, C.; PÉREZ GARCÍA, 2008.** E. Facultad de Veterinaria de la ULPGC. Servicio de la OHAPA. Trasmontaña, s/n. Arucas. 35413. Las Palmas REVISTA CANARIA DE LAS CIENCIAS VETERINARIAS - Número 4 y 5.: Propuesta sistemática para el control de la calidad huevos de Gran Canaria en el entorno APPCC.

**HUEVO.** Org.es. [http://www.huevo.org.es/el\\_huevo\\_etiquetado\\_marcado.asp](http://www.huevo.org.es/el_huevo_etiquetado_marcado.asp) (visitada 15 de agosto 2016).

**INFOCIN:** Centro de Información Nutricional: <http://www.infocin.com.ar/profesionales/estudios-cientificos/> (visitada 9, septiembre, 2016).

**INPROVO:** Organización Interprofesional del huevo y sus derivados. [http://www.inprovo.com/sector\\_economico\\_consumo.asp](http://www.inprovo.com/sector_economico_consumo.asp) (visitada 30 de diciembre 2016) [http://www.inprovo.com/images/archivos/af\\_folleto\\_corporativ\\_inprovo\\_14160313.pdf](http://www.inprovo.com/images/archivos/af_folleto_corporativ_inprovo_14160313.pdf) (visitada 10, agosto 2015).

**INSTITUTO DE ESTUDIOS DEL HUEVO (2009)** Editorial Everest, S. A. 1ª Edición.

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III:**

<http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fdsistemainformacionmicrobiologica/informesespecificosmicroorganismos.shtml>  
[http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fdsistemainformacionmicrobiologica/Informe\\_anual\\_2014\\_20160209.pdf139/es/](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fdsistemainformacionmicrobiologica/Informe_anual_2014_20160209.pdf139/es/)

[http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-procedimientos/BOE\\_Orden\\_SSI\\_445\\_2015\\_mod\\_RD\\_vigilancia.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-procedimientos/BOE_Orden_SSI_445_2015_mod_RD_vigilancia.pdf)  
<http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/335/357> (visitada 3 de octubre 2016).

<http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/866/1017> (visitada 2 de octubre 2016).

**LOAIZA, J., SÁNCHEZ, M., HENAO, S., CARDONA CASTRO, N. 2011.** Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área Metropolitana en Sudamérica publicados en la revista Científica de América Latina (vol. 6, nº 2, pp 20 – 28).

**MAYES, J. F., - TAKEBALLIE M. A. 1983.** Microbial contamination of the hen's egg: a review. Journal of Food Protection 46(12), 1092-1098.

**MADIGAN T. MICHAEL, MARKITNKG, JOHN M. 2003.** Biología de los microorganismos Editorial Brock. Edición 10.

**MEAD, G. C. 2009.** Análisis microbiológico de carne roja, aves y huevos. | Zaragoza: Acribia, D.L.

**MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO:** Informe Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Referencia AESAN 2007-2008. Visitado 25 de julio de 2015.

**MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD:**

<http://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf> (visitada 3, septiembre 2016).

**NORMAS MICROBIOLÓGICAS PARA LOS ALIMENTOS:**  
[http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/\\*/\\*/\\*normicro.htm](http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/*/*/*normicro.htm) (visitada 3 diciembre 2015).

**OMS: Organización Mundial de la Salud**

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/> (visitada 31 enero 2016).

**PASCUAL ANDERSON M. R.** 1989. Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Editado por el Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo.

**PASCUAL ANDERSON, M. R - CALDERÓN Y PASCUAL, V.** 2000. Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ed. Díaz de Santos S.A. Madrid, 2ª Edición.

**PASCUAL ANDERSON, Mª DEL ROSARIO.** 2005. Editorial Díaz de Santos.

**PRESCOTT HARLEY KLEIN.** (2004). Microbiología. Editorial Mc Graw, Edición quinta.

**REVISTA AVÍCOLA:** <http://seleccionesavicolas.com/avicultura/2015/12/riesgos-de-deterioro-y-contaminacion-del-huevo-por-salmonella> (visitada 27, diciembre 2015)

**DE REU, K., GRIJSPEERDT, K., MESSENS, W., HEYNDRIKX, M., UYTENDAELE, M., DEBEVERE, J., HERMAN, L.** 2006. International Journal of Food Microbiology 112, 253–260, Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation, Department of Food Technology and Nutrition, University of Ghent, Coupure Links 653, 9000 Ghent, Belgium [http://ac.els-cdn.com/S0168160506002303/1-s2.0-S0168160506002303-main.pdf?\\_tid=8fd52834-a7e1-11e5-8c46-0000aacb360&acdnat=1450702472\\_b60b4d17a7b161d3e87eb856bf8789fa](http://ac.els-cdn.com/S0168160506002303/1-s2.0-S0168160506002303-main.pdf?_tid=8fd52834-a7e1-11e5-8c46-0000aacb360&acdnat=1450702472_b60b4d17a7b161d3e87eb856bf8789fa)

**SEVILLA RUIZ, I., FRANCO SANCHEZ, A.** 2015. Departamento de Genética y Microbiología. Facultad de Ciencias Sociosanitarias. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. 27/abril/2015.: Evolución de brotes epidémicos causados por *Salmonella* spp en la Región de Murcia (2003-2013), Nutr. Clin, Diet, hosp. 2015; 35(2):80-90 DOI: 10.12873/352sevilla. Visitado 27 de junio de 2016.

**SIM: Sistema de Información Microbiológica de Aragón:**

[http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13\\_SaludPublica/18\\_Vigilancia\\_Epidemiologica/201601\\_Boletin\\_Microbiologico.pdf](http://www.aragon.es/estaticos/GobiernoAragon/Departamentos/SanidadBienestarSocialFamilia/Sanidad/Profesionales/13_SaludPublica/18_Vigilancia_Epidemiologica/201601_Boletin_Microbiologico.pdf) visitada 3 de octubre 2016.

**USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos**

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/enfermedades-por-alimentos/salmonella-preguntas-y-respuestas/salmonella-preguntas-y-respuestas> (visitada febrero 2016).

## ANEJOS

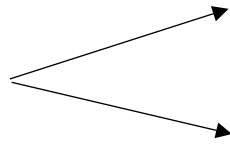
### 8.1 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE *ENTEROBACTERIAS*

Porción para el ensayo (1/10 g o ml)

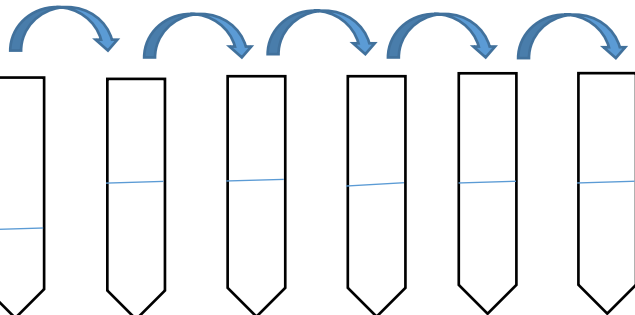


Hacer diluciones seriadas hasta la menos 6 (coger 1ml muestra y diluir)

Muestra diluciones (1/10)



1ml



-1

-2

-3

-4

-5

-6



Agar VRBD  
Siembra en profundidad

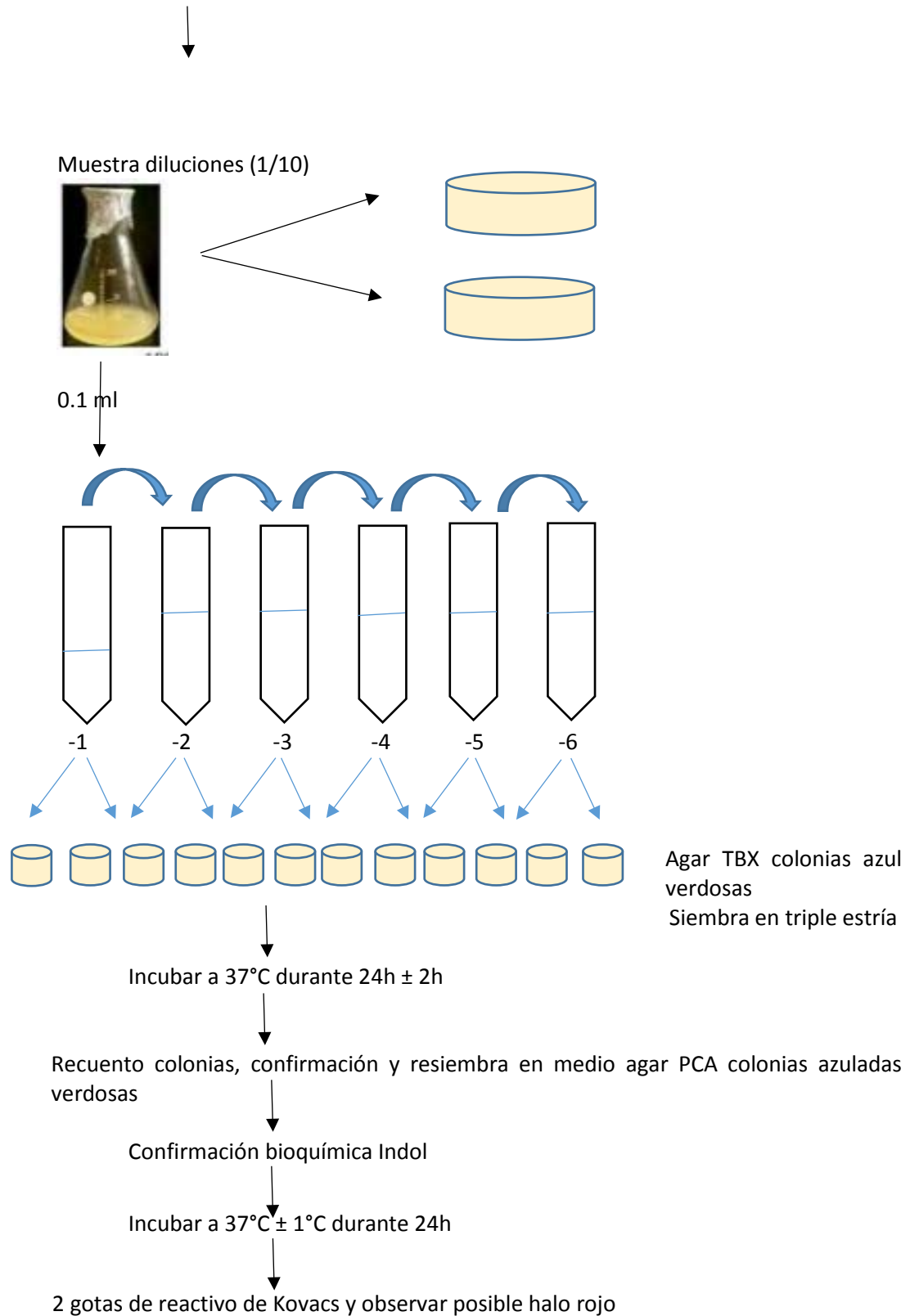
Incubar a 37°C durante 24h ± 2h

Recuento colonias

Colonias rosas – rojas o púrpura con o sin halo de precipitación

## 8.2. DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE *E. COLI*

Porción para el ensayo (1/10 g o ml)





#### 8.4. DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

