



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



**Trabajo Final de Grado**  
**Licenciatura en Agroalimentos**

**Evaluación microbiológica de huevos enteros  
comercializados en la ciudad de Córdoba**



**Autor/a:**

Brarda, Agustina

**Tutor/a:**

Biol. Rondini, Alina. Cátedra de Microbiología

**Asesor/a:**

Bioq. Esp. Jacome, Javier Oscar

**Lugar:** *Laboratorio de Alimentos – Dirección de Calidad Alimentaria de la  
Municipalidad de Córdoba*

**Año:** 2023



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons  
Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quisiera agradecer a mi tutora, Alina Rondini por darme la oportunidad de realizar las prácticas en el Laboratorio de Alimentos de la Municipalidad de Córdoba, por creer en mí desde el primer día que nos vimos en aquella clase de Microbiología de los Alimentos donde me enamoré de su trabajo y su vocación y hoy, gracias a su apoyo, puedo trabajar de lo que tanto me gusta.

Agradezco a mi asesor, Javier Jacome por su paciencia, por darme todas las herramientas y conocimientos, que, junto con Ruth y Dani, “los del fondo”, me acompañaron en este camino e hicieron que todo sea más fácil y divertido.

Y sigo agradeciendo:

A Pablo Mansilla, por acompañarme en este camino del trabajo final, siempre atento a responder cada inquietud que tenía.

A mis amigas que me dio la hermosa FCA, sin ellas esta etapa no hubiese sido lo mismo.

A mis amigas de siempre, por estar siempre para darte ese empujoncito cuando creía no llegar.

Y, por último, una mención especial para mi familia, sin ellos hoy no estaría acá. Gracias por brindarme la posibilidad de estudiar, de formarme como profesional en el mundo de los alimentos que tanto me gusta.

¡Gracias!

## **RESUMEN**

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) más comunes en Argentina son causadas por bacterias como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otros; incluyendo en los últimos tiempos además a *Campylobacter* spp, concordante con reportes actuales que lo categorizan como segundo agente causal de gastroenteritis aguda en pediatría. Los alimentos asociados a patógenos como *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. son principalmente los elaborados a base de carne de ave y subproductos. El huevo es un alimento perecedero y de consumo masivo debido a las distintas preparaciones culinarias existentes; siendo *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli*, bacterias colonizantes del tracto gastrointestinal de aves de corral siendo estos los que pueden contaminar la cáscara y/o el interior del huevo. El Código Alimentario Argentino en el capítulo VI, artículo 492, define al huevo fresco como aquel no fecundado, proveniente de gallinas que no han sido inseminadas de forma natural o artificial y que no ha sido sometido a ningún procedimiento de conservación estableciendo como parámetro microbiológico, la detección de *Salmonella* spp. en 25 g. El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad microbiológica de los huevos comercializados en la ciudad de Córdoba mediante la búsqueda de *Salmonella* spp.; *Campylobacter* spp.; y el recuento de *Escherichia coli*. Para la detección de los patógenos anteriormente mencionados se utilizaron las técnicas oficiales determinadas por el Código Alimentario Argentino: ISO 6579-1:2017, BAM-FDA capítulo 7 y BAM -FDA capítulo 4 por técnica de Número más Probable (NMP) respectivamente. Se analizaron 10 muestras. No se recuperó *Salmonella* spp. ni *Campylobacter* spp. en ninguno de los ensayos realizados. En cuanto al recuento de *Escherichia coli*, en una muestra se obtuvo un valor de NMP= 3,6 bacterias/ g, lo cual podría indicar contaminación fecal. Según los resultados obtenidos, en los huevos analizados no se recuperaron estos patógenos, pero sí presentaron un recuento *Escherichia coli* bajo. Por la tanto, sería de suma importancia aumentar el número de muestras para poder tener certeza de la ausencia total de dichos microorganismos.

**Palabras clave:** huevos; *Salmonella* spp.; *Campylobacter* spp.; *Escherichia coli*, ETAs

## **ABSTRACT**

The most common foodborne illnesses in Argentina are caused by bacteria such as *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, among others; including in recent times, *Campylobacter* spp, in concordance with current reports categorizing it as the second leading cause of acute gastroenteritis in pediatrics. Foods associated with pathogens like *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. are primarily those made from poultry meat and by-products. Eggs are perishable food and are widely consumed due to the various culinary preparations that exists; with *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Escherichia coli*, being the bacterias that colonize the gastrointestinal tract of poultry, which can contaminate the eggshell and/or the inside of the egg. The Argentine Food Code, in Chapter VI, Article 492, defines fresh eggs as unfertilized eggs from hens that have not been inseminated naturally or artificially and have not undergone any preservation procedure, establishing the microbiological parameter as the detection of *Salmonella* spp. in 25 g. The objective of this study was to assess the microbiological quality of eggs sold in the city of Córdoba by searching for *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and counting *Escherichia coli*. To detect the aforementioned pathogens the official techniques defined by the Argentine Food Code were used: ISO 6579-1:2017, BAM-FDA Chapter 7, and BAM-FDA Chapter 4 using the Most Probable Number (MPN) technique, respectively. Ten samples were analyzed. *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. were not recovered in any of the tests conducted. Regarding the *Escherichia coli* count, one sample had an MPN value of 3.6 bacteria/g, which could indicate fecal contamination. Based on the results obtained, these pathogens were not recovered in the analyzed eggs, but they did have a low *Escherichia coli* count. Therefore, it would be of great importance to increase the number of samples to be certain of the total absence of these microorganisms.

**Keywords:** eggs, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, FDI.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	2
RESUMEN .....	3
ABSTRACT.....	4
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
<i>Salmonella</i> spp.....	8
<i>Campylobacter</i> spp. ....	10
<i>Escherichia coli</i> .....	11
Legislación:.....	12
HIPÓTESIS: .....	13
OBJETIVOS: .....	13
<b>Objetivo general:</b> .....	13
<b>Objetivos específicos:</b> .....	13
MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
1.    Establecimiento.....	14
2.    Métodos.....	15
Toma de muestra.....	15
Tamaño de la muestra .....	15
Período del estudio: .....	15
<b>Determinación de <i>Salmonella</i> spp.</b> .....	15
Medios de cultivo utilizados (Anexo 1).....	15
<b>Determinación de <i>Campylobacter</i> spp.</b> .....	17
Medios de cultivo utilizados (Anexo 1).....	17
<b>Recuento de <i>Escherichia coli</i></b> .....	20
Medios de cultivo utilizados (Anexo 1).....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
CONCLUSIONES .....	26
BIBLIOGRAFÍA .....	27
ANEXOS .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Imagen microscópica de <i>Salmonella</i> spp. Fuente: <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmonelle2d.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmonelle2d.jpg</a> .....	8
<b>Figura 2:</b> Imagen de microscopía electrónica de <i>Campylobacter jejuni</i> . Fuente: <a href="https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ARS_Campylobacter_jejuni.jpg">https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ARS_Campylobacter_jejuni.jpg</a> .....	11
<b>Figura 3:</b> Ingreso al Laboratorio de Alimentos de la Municipalidad de Córdoba. Fuente: Google Maps.....	14
<b>Figura 4:</b> Diagrama de flujo para la detección de <i>Salmonella</i> . Fuente: adaptación de la Norma ISO 6579-1:2017.....	17
<b>Figura 5:</b> Diagrama de flujo para la detección de <i>Campylobacter</i> spp. Fuente: adaptación del Manual Analítico Bacteriológico (BAM).....	19
<b>Figura 6:</b> Aislamiento de <i>Campylobacter</i> spp. ....	20
<b>Figura 7:</b> Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> en agar EMB-Levine .....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Especies, subespecies, serotipos y hábitat usual de <i>Salmonella</i> según la clasificación Kauffman - White.....	9
<b>Tabla 2:</b> Condiciones de crecimiento de <i>Salmonella</i> spp. ....	10
<b>Tabla 3:</b> Resultados obtenidos del análisis microbiológico de huevos comercializados en la ciudad de Córdoba - Argentina, en el período abril 2023 - junio 2023. ....	23

## INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Se estima que por año se enferman 600 millones de personas en el mundo por ingerir alimentos contaminados, de los cuales 420.000 mueren. Debido a la cantidad de personas enfermas, se pierden todos los años US\$ 110.000 millones en productividad y gastos médicos en aquellos países de ingresos bajos y medianos. Los niños menores de 5 años son más susceptibles a estas enfermedades, causando 125.000 muertes por año en este grupo etario (Organización Mundial de la Salud, 2020).

Las ETAs son provocadas por el consumo de agua y/o alimentos contaminados con microorganismos, o bien por las sustancias tóxicas que ellos producen (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, s.f.- a). Por esto, es muy importante realizar controles de calidad e inocuidad de los alimentos durante todo su proceso de elaboración, ya que la contaminación es muy difícil de detectar debido a que, por lo general, no se alteran los caracteres organolépticos del alimento.

Los síntomas más frecuentes asociados a estas enfermedades son trastornos gastrointestinales (diarrea, vómitos, dolor abdominal, náuseas) aunque también se puede presentar dolor de cabeza, fiebre, visión doble, etc. La intensidad y duración va a depender de la salud del consumidor, la cantidad de alimento consumido y de la cantidad de bacterias o toxinas presentes en el mismo (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2019).

Las ETAs más comunes en Argentina son producidas por *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. Incluyendo en los últimos tiempos, además, a *Campylobacter* spp. (Organización para las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2023).

Los alimentos asociados frecuentemente a patógenos como *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. son principalmente leche y jugos sin pasteurizar, frutas y verduras crudas, agua contaminada y los elaborados a base de carne de ave; como así también los subproductos de estos últimos: “los huevos”; por tener la particularidad de ser un alimento que se consume masivamente y ser empleado en numerosas elaboraciones culinarias (Sociedad Argentina de Pediatría, s.f).

El Código Alimentario Argentino (CAA) (2017) en el capítulo VI, artículo 492, define a huevo fresco como aquel no fecundado y que no ha sido sometido a ningún procedimiento de conservación, con la excepción de la climatización del ambiente a temperatura entre 8-15 °C y humedad relativa comprendida entre 70 – 90 %, libre de olores y sabores extraños.

### ***Salmonella* spp.**

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos (Figura 1), anaerobios facultativos. En la actualidad se reconocen dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*.

*S. entérica* es la única con interés clínico y se subdivide en seis subespecies que se indican en la Tabla 1.



**Figura 1:** Imagen microscópica de *Salmonella* spp. Fuente: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmonelle2d.jpg>.



**Tabla 1:** Especies, subespecies, serotipos y hábitat usual de *Salmonella* según la clasificación Kauffman - White.

<b>Especie y subespecie de <i>Salmonella</i></b>	<b>N° de serotipos dentro de la especie</b>	<b>Hábitat usual</b>
<i>S. entérica subsp. Entérica (I)</i>	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. entérica subsp. Salamae (II)</i>	505	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. Arizonae (IIIa)</i>	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. Diarizonae (IIIb)</i>	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. Hountenae (IV)</i>	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. entérica subsp. Indica (VI)</i>	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori (V)</i>	22	Animales de sangre fría y ambiente
<b>Total</b>	<b>2579</b>	

Fuente: González et al., 2014, p.75

Su reservorio está constituido por animales salvajes y domésticos, de origen porcino, bovino, aviar, mascotas de compañía, entre otros. El hombre puede infectarse y actuar como portador asintomático (ANMAT, s.f -b).

La transmisión se produce por el consumo de alimentos contaminados procedentes de animales infectados o por contaminación con heces. Esta bacteria se puede encontrar en muchos alimentos como carne, huevos, frutas y vegetales, así como también los productos preparados con ellos (Sánchez Canedo, 2012). Puede sobrevivir mucho tiempo en el alimento, pero son sensibles al calor, por lo que es destruida durante la cocción (ANMAT, s.f -b).

La contaminación de los huevos por *Salmonella* spp. se puede dar por diferentes formas: vertical en el caso de que la bacteria infecte el aparato reproductor; horizontal cuando el microorganismo esté presente en las heces que se encuentran en la cáscara del huevo y; lateral cuando los huevos se contaminan por contacto con materiales, animales o personas infectadas (Núñez y Seech, 2023). Sin embargo, la clara de huevo presenta sustancias con propiedades antimicrobianas como la lisozima, la cual actúa degradando la pared bacteriana de bacterias gram positivas; la conalbumina la cual impide el desarrollo bacteriano por su poder quelante; y la avidina y la flavoproteína las cuales

secuestran vitaminas (biotina y riboflavina) que son indispensables para el crecimiento de algunos microorganismos (Solís Neira, 2016). Debido a la presencia de estas sustancias, la cantidad de bacterias que pueden sobrevivir en el huevo es escasa, por lo que es muy poco probable que llegue a la dosis requerida para enfermar; aunque si se mantiene el huevo en el rango de condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo (Tabla 2), puede multiplicarse rápidamente por lo que las sustancias inhibidoras no podrán frenar el crecimiento (ANMAT, s.f - b).

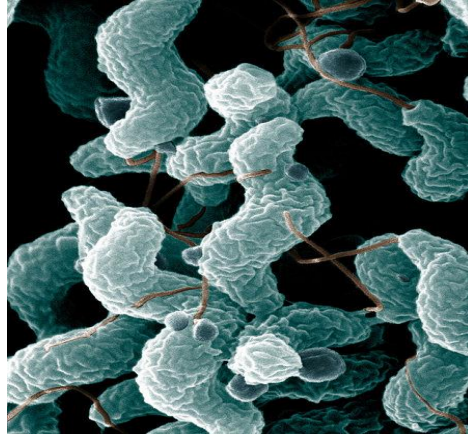
**Tabla 2:** Condiciones de crecimiento de *Salmonella* spp.

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	5,2 (la mayoría de los serotipos no crecen a temperaturas menores que 7°C)	35-43	46,2
pH	3,8	7-7,5	9,5
Actividad acuosa (aw)	0,94	0,99	> 0,99

Fuente: ANMAT, s.f -b

### ***Campylobacter* spp.**

El género *Campylobacter* pertenece a la familia *Campylobacteraceae*, son bacilos gram negativos curvos, en forma de “S” (Figura 2), móviles, microaerófilos estrictos. Actualmente se identificaron 61 especies, de las cuales *C. jejuni* y *C. coli* son las principales causantes de la campylobacteriosis (Parte, et al., 2020).



**Figura 2:** Imagen de microscopía electrónica de *Campylobacter jejuni*. Fuente: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AR\\_S\\_Campylobacter\\_jejuni.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AR_S_Campylobacter_jejuni.jpg)

La transmisión de *Campylobacter* spp. se puede dar de forma directa si la persona está en contacto con heces de animales que contengan el patógeno, o de forma indirecta por el consumo de alimentos contaminados o poco cocidos (Jacome, 2020).

El reservorio está constituido principalmente por animales de sangre caliente destinados al consumo, como aves de corral, vacunos, porcinos y mascotas (Organización Mundial de la Salud, 2020). Las aves de consumo y sus subproductos son los principales reservorios y fuentes de infección humana (Pérez Valenzuela, 2019).

El rango óptimo de temperatura de crecimiento es 37 – 42 °C. No es capaz de crecer a temperaturas menores de 30 °C, aunque sí puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración (Pérez Valenzuela, 2019). Crece en condiciones bajas de oxígeno, pero en altas concentraciones de dióxido de carbono y nitrógeno (Martínez Sierra, 2020).

En Argentina el *Campylobacter* spp. se reportó como uno de los principales agentes zoonóticos causante de ETAs (Rossler, et al., 2017). En la ciudad de Córdoba es la segunda causa de gastroenteritis aguda en los centros nosocomiales de pediatría (Jacome, 2020).

### ***Escherichia coli***

*E. coli* forma parte de las enterobacterias. Se caracterizan por ser bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos (Seminario Agurto, 2011). Esta bacteria se encuentra en el intestino de los humanos y animales, en el medio ambiente y también

puede estar presente en los alimentos y el agua sin tratar (OMS, 2018). La presencia de *E. coli* en agua y alimentos es un indicador de contaminación fecal y se la utiliza como indicador de higiene durante los procesos de elaboración de alimentos. Por su origen fecal su presencia indica riesgo de la existencia de otros patógenos entéricos.

Debido a que esta bacteria es parte de un tracto intestinal sano, la mayoría son inofensivas, pero hay algunos serotipos que pueden causar enfermedades, en algunos casos graves, como diarrea, enfermedades respiratorias e infecciones del torrente sanguíneo (OMS, 2018).

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, ya que son bacterias mesófilas. Es sensible a temperaturas superiores a 70 °C por lo que son fácilmente eliminadas con una adecuada cocción. El pH óptimo para su desarrollo es de 7,2 y su actividad de agua ( $A_w$ ) 0,99 (OMS, 2018).

### **Legislación:**

El C.A.A. es un reglamento técnico que establece disposiciones higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial que deben cumplir tanto las personas físicas o jurídicas, los establecimientos y los productos que se comercialicen en Argentina. Tiene como objetivo principal la protección de los consumidores mediante alimentos seguros e inocuos (Comisión Nacional de Alimentos, s.f).

En este reglamento se describen, entre otras cosas, los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y se señala con qué metodología oficial deben ser evaluados. Con respecto a los patógenos anteriormente mencionados, se establece que *Salmonella* spp. debe estar ausente en muchos alimentos, entre ellos en huevos frescos; estableciendo como metodología oficial la ISO 6579-1:2017 y determina que debe estar ausente en 25g de muestra (C.A.A, 2023).

Para el patógeno *Campylobacter* spp. no está establecida su búsqueda en el C.A.A. para ningún alimento, aunque los laboratorios oficiales de bromatología, ante alguna sospecha, pueden realizar su búsqueda de acuerdo al artículo 6 el cual establece que un alimento contaminado es aquel que contenga: “Agentes vivos (virus, microorganismos o parásitos riesgosos para la salud), sustancias químicas, minerales u orgánicas extrañas a su composición normal sean o no repulsivas o tóxicas” (CAA, 2010). Con respecto a *E. coli*, este patógeno es buscado en muchas matrices, sin embargo, tampoco está

determinada su búsqueda en huevos, pero se puede realizar de acuerdo al artículo anteriormente mencionado.

## **HIPÓTESIS:**

Los huevos comercializados en la ciudad de Córdoba son inocuos para la salud de los consumidores de acuerdo a los parámetros evaluados en el presente trabajo.

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo general:**

Evaluar la calidad microbiológica de los huevos comercializados en la ciudad de Córdoba - Argentina, en el período abril 2023 - junio 2023.

### **Objetivos específicos:**

- Realizar la búsqueda de *Salmonella* spp. en huevos comercializados en la ciudad de Córdoba.
- Realizar la búsqueda de *Campylobacter* spp. en huevos comercializados en la ciudad de Córdoba.
- Realizar recuento de *Escherichia coli* en huevos comercializados en la ciudad de Córdoba.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Establecimiento

La investigación fue realizada en el área de microbiología del Laboratorio de Alimentos de la Municipalidad de Córdoba, ubicado en la calle San Martín 854 de la ciudad de Córdoba (Figura 3).

El Laboratorio de Alimentos funciona como laboratorio oficial, se encarga de:

- Analizar alimentos que se comercializan dentro del ejido y requieran Registro Municipal de Alimentos.
- Vigilancia alimentaria en locales que comercialicen alimentos de alto riesgo.
- Ante un brote: analizar el alimento implicado en búsqueda del probable origen.
- Denuncias anónimas del consumidor: ante la presencia de la misma se concurre al comercio en busca del alimento implicado.

Está dividido en cuatro áreas: administración, calidad, fisicoquímica y microbiología. Cada área se encarga de analizar diferentes aspectos de las muestras de alimentos que ingresan a fin de que se asegure la inocuidad y, además, que cumpla con la legislación alimentaria vigente.



**Figura 3:** Ingreso al Laboratorio de Alimentos de la Municipalidad de Córdoba. Fuente: Google Maps.

## 2. Métodos

### Toma de muestra

Se procedió a la realización de un muestreo aleatorio oficial donde se tomaron muestras indicativas de distintos locales que comercializan huevos (verdulerías, comercios minoristas, supermercados, Mercado de Abasto) dentro del ejido de Córdoba capital.

### Tamaño de la muestra

Se trabajó con 10 muestras de huevos de gallina (de color y blancos), cada una comprendida de un n=5, con un total de 50 huevos analizados. Las muestras fueron tomadas al azar.

### Período del estudio:

El estudio se inició en abril del año 2023 y finalizó en junio del mismo año.

### Procesamiento inicial de la muestra (huevos):

Se preparó un homogenato inicial, rompiendo 4 huevos en un beaker estéril y se homogeneizó el contenido con una varilla de vidrio.

## **Determinación de *Salmonella* spp.**

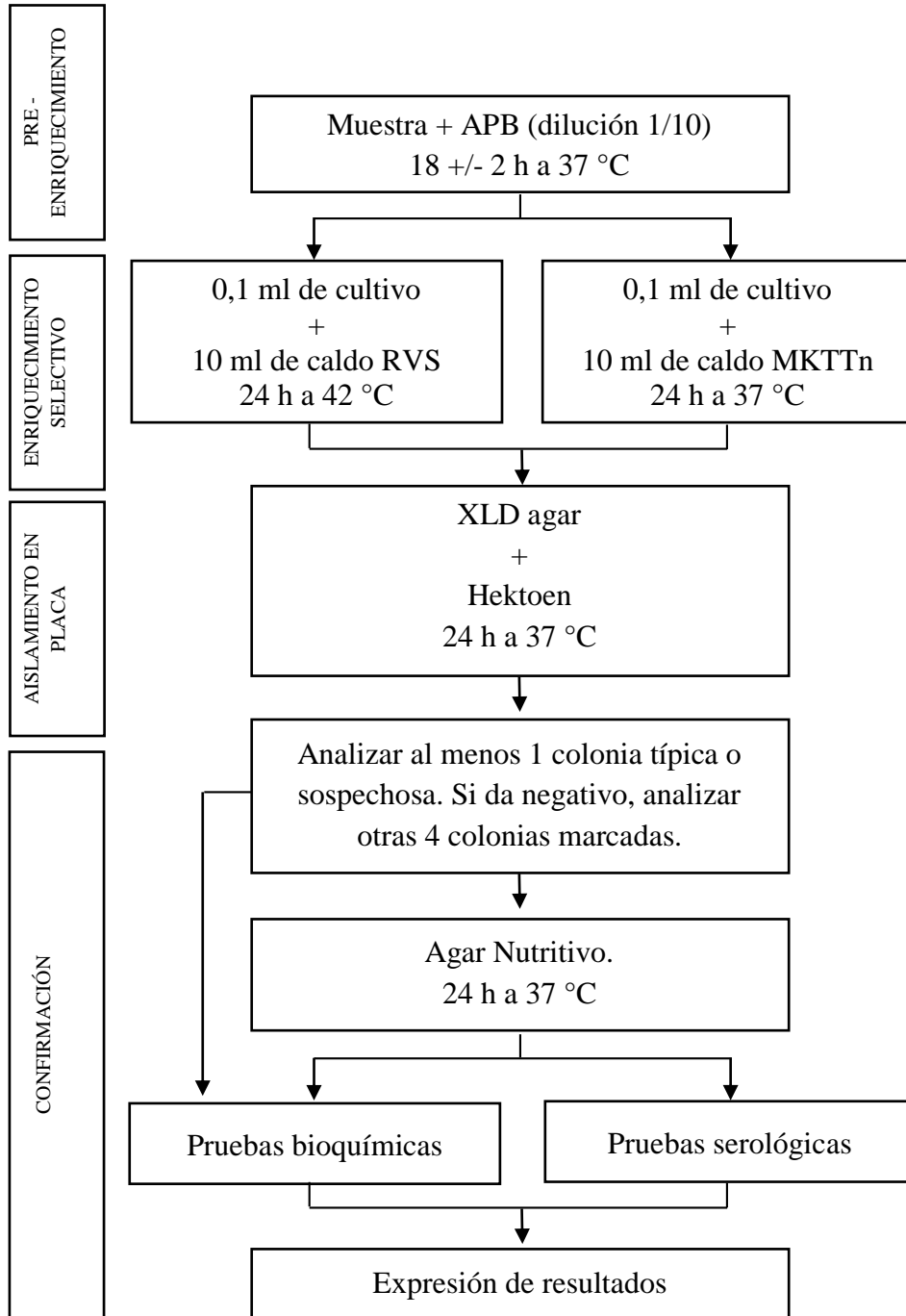
### Medios de cultivo utilizados (Anexo 1)

- Agua Peptona Bufferada (APB) (Biokar)
- Caldo Muller Kauffmann Tetrionato-Novobiocina (MKTTn). (Merck)
- Caldo Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) (Merck)
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (Biokar)
- Agar Hektoen (Oxoid)
- Agar Nutritivo (Merk)

Para la detección de *Salmonella* spp se utilizó la técnica oficial determinada por el C.A.A: Norma ISO 6579-1:2017.

Se pesó 25 g del homogenato inicial y se añadieron 225 ml de APB, se incubó a 37 °C por 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó 1 ml del caldo de enriquecimiento de APB, se sembró en 10 ml de caldo MKTTn y se incubó 24 h a 37 °C; por otra parte, se tomó 0,1 ml del caldo de enriquecimiento de APB, se sembró en 10 ml caldo RVS y se incubó 24 h a 42 °C (Figura 4). Luego se tomó una ansada del caldo MKTTn y se sembró por estriado con agotamiento del inóculo en una placa de XLD y Hektoen. Se realizó el mismo procedimiento a partir del caldo RVS. Las placas fueron incubadas 24 h a 37 °C. Se realizó la lectura de las placas, en caso de observar colonias sospechosas se procederá a realizar pruebas bioquímicas.





**Figura 4:** Diagrama de flujo para la detección de *Salmonella*. Fuente: adaptación de la Norma ISO 6579-1:2017.

## Determinación de *Campylobacter* spp.

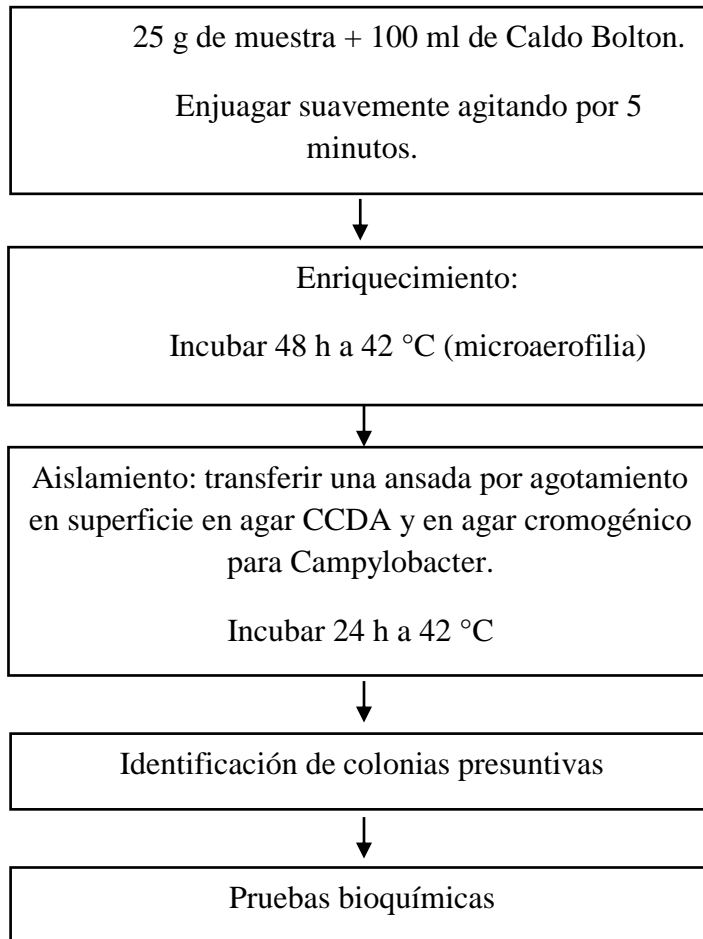
### Medios de cultivo utilizados (Anexo 1)

- Caldo Bolton (Merck)
- Agar libre de sangre *Campylobacter* modificado (mCCDA). (Merck)
- Agar cromogénico para *Campylobacter* (Chromagar)
- Bicarbonato de sodio (Cicarelli)

- Ácido cítrico (Cicarelli)

Para la determinación de *Campylobacter* spp. se utilizó la técnica descrita en el capítulo 7 del Manual Analítico Bacteriológico (BAM) (Figura 5).

Se pesó 25 g del homogenato inicial y se añadieron 100 ml de caldo Bolton. Se incubó a 42 °C por 48 h en condiciones de microaerofilia. Para generar la microaerofilia se utilizó una mezcla de 10 g de bicarbonato de sodio con 50 ml de ácido cítrico 24 %, la cual se coloca junto con las muestras en la jarra de incubación. Transcurrido el período de incubación se tomó una ansada del cultivo y se inoculó en dos medios de cultivo selectivos para este microorganismo: Agar mCCDA y agar cromogénico para *Campylobacter* (Figura 6). Se incubaron las placas 24 h a 42°C en condiciones de microaerofilia. Una vez transcurrido el período de incubación se realizó la lectura de las placas, en caso de observar colonias sospechosas se procederá a realizar pruebas bioquímicas.



**Figura 5:** Diagrama de flujo para la detección de *Campylobacter* spp.  
Fuente: adaptación del Manual Analítico Bacteriológico (BAM).



**Figura 6:** Aislamiento de *Campylobacter* spp.

## **Recuento de *Escherichia coli***

### Medios de cultivo utilizados (Anexo 1)

- Agua de Lavado de Butterfield (Cicarelli)
- Caldo Lauryl Sulfato (Biokar)
- Caldo EC (Oxoid)
- Agar Levine - EMB (Merck)
- Agar recuento en placa (PCA) (Merck)
- Caldo triptona (Britania)
- Reactivo de Kovacs (Neogen)
- Solución indicadora rojo de metilo
- caldo MR-VP (Britania)

Para la determinación de *Escherichia coli* se utilizó la técnica descrita en el capítulo 4 del Manual Analítico Bacteriológico (BAM).

Del homogenato inicial se pesó 10 g y se añadieron 90 ml de Agua de Lavado de Butterfield. Se realizó la técnica de Número Más Probable (NMP), para lo cual se

utilizaron 9 tubos de caldo Lauryl sulfato, realizando diluciones decimales  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se incubó 48 h a 37 °C. Transcurrido el período de incubación se observó la producción de gas y turbidez.

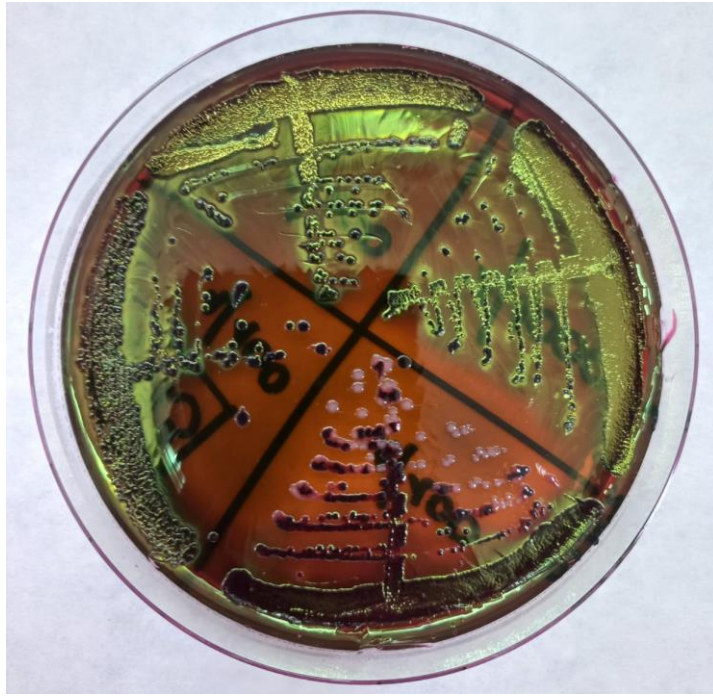
De los tubos con producción de gas en la inspección visual, se transfirió una ansada a un tubo de caldo EC y se incubó 48 h a 44 °C, luego se examinó la producción de gas. Se tomó una ansada de aquellos tubos con producción de gas, se sembró en una placa de Agar EMB- Levine y se incubó 24 h a 37 °C (Figura 7).

Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron colonias sospechosas (centro oscuro y planas, con o sin brillo metálico), y se transfirieron 5 a una placa de PCA, las cuales se incubaron 24 h a 37 °C. De este re-aislamiento se realizaron las pruebas IMViC las cuales incluyen: producción de Indol, compuestos reactivos con rojo de metilo, compuestos de Voges – Proskauer (VP), y citrato. En este estudio sólo se realizaron las dos primeras pruebas ya que son suficientes para determinar si se trata de *E. coli*, mientras que las otras dos pruebas no aportan resultados concluyentes.

Para realizar la prueba de Indol se inoculó un tubo de caldo triptona y se incubó 24 h a 37 °C, luego se añadió 0,2 ml de reactivo de Kovacs y se observó un color rojo en la capa superior lo que indicó una prueba positiva.

En segundo lugar, se realizó la prueba de rojo de metilo; se inoculó un tubo que contiene 2 ml de caldo MR-VP y se incubó 48 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó 5 gotas de la solución indicadora de rojo de metilo y se agitó ligeramente para homogenizar y luego se observó un color rojo indicando que la prueba fue positiva.

Con los resultados obtenidos de las reacciones IMViC, mediante una tabla (Anexo 2) se calculó el NMP para *E. coli*.



**Figura 7:** Aislamiento de *Escherichia coli* en agar EMB-Levine.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de las muestras analizadas no se detectó la presencia de *Salmonella* spp. ni de *Campylobacter* spp. Sólo una muestra obtuvo recuentos de *E. coli* con un valor de NMP= 3,6 bacterias/ g (Tabla 3).

**Tabla 3:** Resultados obtenidos del análisis microbiológico de huevos comercializados en la ciudad de Córdoba - Argentina, en el período abril 2023 - junio 2023.

MUESTRA N°	PARÁMETRO		
	Recuento de <i>Escherichia coli</i> (bacterias/g)	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.
		Plan 2 clases	Plan 2 clases
<b>319250423</b>	NMP= 3,6	Ausencia	Ausencia
<b>320250423</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>375090523</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>376090523</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>398160523</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>399160523</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>454010623</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>456010623</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>536140623</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia
<b>537140623</b>	NMP < 3	Ausencia	Ausencia

Los resultados obtenidos para el patógeno *Campylobacter* spp. coinciden con lo reportado por Delgado Yubero (2019), quien mediante una investigación y comparación con otros autores determinó que no es posible la transmisión vertical de este patógeno, a pesar de que el huevo esté contaminado con heces de una gallina portadora. Esta teoría se puede reafirmar con lo expresado por García et al. (2013), quienes coinciden en que la transmisión vertical en las aves es prácticamente nula, ya que, a pesar de que *Campylobacter* se ha aislado del oviducto y de otras partes del tracto genital de la gallina, la posibilidad de que este patógeno se encuentre en el interior del huevo es muy baja o nula.

Sin embargo, se debe considerar que el número de muestras analizadas en este trabajo es pequeño, por lo que puede que no haya sido suficiente para su detección. Además, es importante destacar que *Campylobacter* es muy sensible a la desecación y al oxígeno, por lo que en el supuesto caso que se encontrara el patógeno en la superficie del huevo es muy poco probable que pudiese sobrevivir (Delgado Yubero, 2019).

La investigación demostró la ausencia de *Salmonella* spp. en los huevos analizados, esto puede estar relacionado con la dificultad que existe a la hora de detectar *Salmonella* en este alimento debido a su baja prevalencia en esta matriz y a la presencia de sustancias inhibidoras en la albúmina del huevo (Ochoa y Madjorie, 2019). En trabajos similares realizados en Perú, Colombia y Cuba no se encontraron serotipos del género *Salmonella* importantes para la salud pública, pero sí otras cepas no tipificables propias de la especie (Estrada y Valencia, 2019).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (2022) informó que la probabilidad de que un huevo tenga *Salmonella* depende de la prevalencia del patógeno en cada manada productiva y de la frecuencia con la que las gallinas infectadas pongan huevos contaminados. Este escenario, según la mayor parte de los estudios realizados, es inferior al 3 % (Porrero et al., 2006).

En el año 2021 la EFSA identificó a *Salmonella* como el agente causal en la mayoría de los brotes asociados a alimentos en la Unión Europea, 773 brotes, lo cual representa un 19,3% del total de los brotes ocurridos. Además, determinó que *S. Enteritidis* fue el serovar predominante (N=350; 79,7% de todos los brotes de *Salmonella*). En estos países, los huevos están más frecuentemente asociados a los brotes que la carne de aves de corral, debido a que la colonización de los órganos internos de la gallina aumenta el riesgo de que se contamine el interior de los huevos. También influyen las temperaturas de almacenamiento inadecuadas y el uso común de huevos crudos como ingrediente para diversas preparaciones (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2022).

Debido a los datos publicados, en distintas partes del mundo, de *Salmonella* spp. en huevos y a los resultados que se obtuvieron en el presente estudio, consideramos que se debería ampliar el número de muestras para verificar la ausencia de este patógeno en huevos de la ciudad de Córdoba.

Por último, con respecto a el recuento de *E. coli*, los resultados son similares a los obtenidos en una investigación realizada en Perú, donde se analizaron 110 huevos de los cuales solamente 2 resultaron positivos para este patógeno, lo cual indica un porcentaje del 1,8 % (Seminario Agurto, 2011). Macías et al. (2021), en su investigación no recuperó *E. coli* en el interior de ninguno de los huevos analizados, sin embargo, obtuvo 4 muestras con presencia de este microorganismo en el exterior de la muestra. Con estas dos



investigaciones podemos decir que la prevalencia de *E. coli* en esta matriz es baja, lo cual puede estar relacionada con las Buenas Prácticas Avícolas (BPA) que realice el lugar, ya que, la contaminación de los huevos depende de distintos factores como la humedad, pH, temperatura y el manejo que se le haya dado (Macías et al., 2021).

## **CONCLUSIONES**

Según los resultados obtenidos, los huevos comercializados en la ciudad de Córdoba no presentan los patógenos evaluados, pero sí un recuento de *E. coli* bajo; quedando la hipótesis planteada sujeta a una posterior evaluación con un aumento en el número de muestras para asegurar la ausencia total de los microorganismos analizados.

Destacando que los huevos, a nivel mundial, son considerados una fuente importante de transmisión de enfermedades, estos deben ser monitoreados. Para asegurar la inocuidad de los mismos es importante el control en los puntos de producción y distribución, además, informar a la población sobre la conservación y preparación adecuada del huevo de forma tal que en caso de que exista alguno de estos microorganismos se pueda eliminar y de esta forma prevenir una ETA.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, (s.f. - a). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/comunidad/enfermedades-transmitidas-por-alimentos#:~:text=Las%20enfermedades%20transmitidas%20por%20los,sustancias%20t%C3%B3xicas%20que%20aqueellos%20producen.>
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, (10 de julio de 2019) *Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden comprometer la salud*. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/las-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-pueden-comprometer-la-salud>
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, (s.f. - b). *Salmonelosis*. Ficha técnica n°9. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat\\_ficha\\_tecnica\\_salmonelosis.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_ficha_tecnica_salmonelosis.pdf)
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2022). *Story map on Salmonella*, Recuperado el 26 de junio de: <https://storymaps.arcgis.com/stories/13979918ca8948399180651d3b7ce3e1>
- Código Alimentario Argentino. (2010). *Capítulo I “Disposiciones generales” Artículo 6*. Recuperado el 26 de junio de 2023 de: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo\\_i\\_caa.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_i_caa.pdf)
- Código Alimentario Argentino. (2023). *Capítulo VI “Alimentos cárneos y afines” Artículo 499 bis*. Recuperado el 26 de junio de 2023 de: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat\\_caa\\_capitulo\\_vi\\_carneos\\_act\\_2023\\_5.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/anmat_caa_capitulo_vi_carneos_act_2023_5.pdf)
- Comisión Nacional de Alimentos. (s.f). *Código Alimentario Argentino*. Recuperado el 28 de junio de 2023 de: <http://www.conal.gob.ar/CAA.php>
- Delgado Yubero, S. (2019). *Estudio de los caracteres epidemiológicos y control experimental de Campylobacter jejuni en el entorno de la producción de pollos para carne* [Tesis de Doctorado, Universidad de León]. Repositorio Institucional Universidad de León.
- Estrada Aguila, J.P y Valencia Bustamante, B. A. (2012). *Determinación de Salmonella spp. En huevos frescos de gallina en los principales mercados de la Ciudad de Quito* [Tesis de Grado, Universidad Central del Ecuador] Repositorio Institucional Universidad Central del Ecuador.
- Feng, P., Weangant, D.S., Grant, M.A. (2020). *Enumeración de Escherichia coli y bacterias coliformes*. Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 4: BAM-FDA.
- Freschi, M. A., Cabrera Durango, M. J., Ruarte S., Garbini A, y Jakubowsk, N. (2018) Verificación intralaboratorio de la norma iso 6579: método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. en fórmula en polvo para lactantes. *Revista Ciencia Reguladora de la ANMAT*, N° 2, p. 16-19. <https://www.argentina.gob.ar/anmat/revista-cient%C3%ADfica/ediciones-ciencia-reguladora/numero-2>

- García, F.J., Abad, J.C., Serrano, T., Frías, N., Castro, M. y Lorente, S. (2 y 4 de octubre de 2013) *Epidemiología de Campylobacter en avicultura*. Simposio Científico de Avicultura. Asociación Española de Ciencia Avícola (AECA).
- González J., Pereira N., Soto Z., Hernández E. y Villarreal J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Revista científica Salud Uninorte*, Vol. 30 (nº1), 73-94. <http://dx.doi.org/10.14482/sun.30.1.4316>
- Gutiérrez C.A.C., Paasch M.L.H. y Calderón A.N.L. (2008) Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria México*, Vol 39(Nº 1),81-90. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=17054>
- Hunt, J. M., Abeyta, C., Tran, T. (2000). *Campylobacter*. Bacteriological Analytical Manual. Capítulo 7: BAM-FDA.
- Jacome, J. O. (2020). *Búsqueda de Campylobacter spp. Termotolerantes en pollos parrilleros en la ciudad de Córdoba*. [Tesis de posgrado, Universidad Nacional de Córdoba]. Repositorio Institucional Universidad Nacional de Córdoba.
- Macías Andrade, E.F., Demera Lucas, F.M., Rivadeneira García, R.T., Montesdeoca Párraga, R.R., Piloso Chávez, K.J., Cevallos García, K.F. y Quiñones Alvarado, M.P. (2021). Carga microbiana inicial en huevos de gallinas. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, vol. 5 (nº 1), 36-42. <http://www.revistaecuatorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/255>
- Martínez Sierra, M.P (2020). *Verificación del método VIDAS CAM para la detección de Campylobacter spp. en alimentos seleccionados y muestras de ambientes de producción*. [Tesis de grado, Universidad de Pamplona] Universidad de Pamplona. Repositorio Institucional Hulago Universidad de Pamplona.
- Núñez, G. y Seech C. (2023). Evaluación de la calidad de los huevos. *Actualización en Nutrición* Vol. 24 (Nº 2), 13-23. <https://doi.org/10.48061/SAN.2022.24.1.13>
- Ochoa Ruano, M. E. (2019). *Detección de Salmonella Sp. y Escherichia Coli en huevos de gallina criolla, procedentes de ventas del Mercado Municipal de Antigua Guatemala en el año 2018*. [Tesis de grado, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Repositorio Institucional Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Organización Mundial de la Salud. (30 de abril de 2020). *Inocuidad de los alimentos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Campylobacter*. Recuperado el 26 de junio de 2023 de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter#:~:text=Campylobacter%20son%20bacilos%2C%20por%20lo,coli>.
- Organización Mundial de la salud (2018) *E. Coli*. Recuperado el 26 de septiembre de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- Organización para las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], (2023). *Advierten que el 40% de las enfermedades transmitidas por alimentos*

*ocurren en los hogares*. Recuperado el 25 de septiembre de 2023 de: <https://www.fao.org/argentina/noticias/detail-events/es/c/1641570/>

- Parte, A.C., Sardá Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C. y Göker, M. (2020). La lista de nombres procarióticos con posición en la nomenclatura (LPSN) se traslada a la DSMZ. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, vol. 70 (N° 11), 5607-5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>
- Pérez Valenzuela, R. (2019). *Evaluación de Campylobacter spp. en carne y vísceras de cerdo y pollo por diferentes métodos microbiológicos y moleculares*. [Tesis de máster, Universidad Politécnica de Valencia]. Repositorio Institucional Universidad Politécnica de Valencia.
- Porrero, C., García, M., Cubillo, I., Rivero, E., Herrera, L., Marino, E., Sánchez, E., Iñigo, S., García, M., Vilas, F., Domínguez, L. y Moreno, M.A. (2006). Salmonelosis y huevos. *Profesión Veterinaria*, vol. 16 (N° 64), 28-32. [https://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id\\_articulo=656](https://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=656)
- Ramírez R.R., Rincón A.D. P. y Vargas M.J.C. (2015). Salmonella Enteritidis en huevos de gallina comercializados en Tunja (Colombia). *Salud & Sociedad Uptc*, vol. 1 (N°2), 22-27. Recuperado a partir de [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/salud\\_sociedad/article/view/3496](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/salud_sociedad/article/view/3496)
- Rössler, E., Fuhr, E.M., Lorenzón, G., Romero Scharpen, A., Berisvil, A.P., Blajman, J. E., Astesana, D.M., Zimmermann, J.A., Fusari, M.L., Signorini, M.L., Soto, L.P., Frizzo, L.S. y Zbrun, M.V. (2017) Presencia de serotipos de Campylobacter jejuni O:19 en la cadena avícola Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, vol.49 (N°2), 178-182. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.002>
- Sánchez Canedo, S. (2012). *Validación de un método de detección de Salmonella en huevos y pollo*. [Tesis de maestría, Universidad de La Coruña]. Repositorio Institucional Universidad de La Coruña.
- Seminario Agurto, R. (2011). *Prevalencia de Escherichia coli en huevos de gallinas de postura del Centro Productivo Granja Zootecnia de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional de Piura*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Piura]. Repositorio Institucional – Universidad Nacional de Piura.
- Sociedad Argentina de Pediatría (s.f) Subcomisión de Epidemiología *Informe. Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. Recuperado el 25 de septiembre de 2023 de: [https://www.sap.org.ar/uploads/archivos/general/files\\_etas-09-19\\_1567801555.pdf](https://www.sap.org.ar/uploads/archivos/general/files_etas-09-19_1567801555.pdf)
- Solís Neira, C. (2016). Microbiota en huevos y derivados: identificación y desarrollo. [Tesis de máster, Universidad de Oviedo]. Repositorio Institucional de la Universidad de Oviedo.

## ANEXOS

### ANEXO 1: Medios de cultivo utilizados para los análisis microbiológicos

#### 1- Agua Peptonada Bufferada -APB (Biokar)

**Uso:** es un diluyente de uso general destinado a numerosas operaciones y normas, incluyendo la preparación de muestras, la preparación de suspensiones madre y diluciones seriadas de muestras (norma ISO 6887).

Este medio también se utiliza para el preenriquecimiento de *Salmonella* y para *Cronobacter sakazakii*, al permitir la resucitación de microorganismos que han sufrido tratamientos subletales como en el caso del secado por pulverización, la pasteurización acción de conservantes, presión osmótica elevada y alta acidez.

**Modo de acción:** El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. El medio se tampona con fosfatos de sodio y potasio.

**Composición g/L:** peptona 10, cloruro de sodio 5, fosfato disódico 3,57, fosfato monopotásico 1,5.

**Preparación:** disolver 20 g del medio en 1 litro de agua destilada. Ajustar el pH, si es necesario, para que después de la esterilización sea de 7,0 +/- 0,2 a 25°C. Esterilizar durante 15 minutos en autoclave a 121°C.

**Almacenamiento:** Medio de cultivo deshidratado a 2-30 °C. - Medio de cultivo preparado a 2-8 °C, durante un máximo de seis meses.

#### 2- Caldo Muller Kauffmann Tetrionato-Novobiocina (MKTTn). (Merck)

**Uso:** para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* a partir de alimentos, piensos y otros materiales.

**Modo de acción:** el medio de cultivo contiene peptona que provee los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, y carbonato de calcio que neutraliza y adsorbe metabolitos tóxicos. La selectividad está dada por la presencia de sales biliares y tetrionato (compuesto generado en el medio de cultivo al reaccionar el tiosulfato de sodio con la solución iodo-iodurada) que inhiben el desarrollo de microorganismos Gram positivos y algunas enterobacterias. *Salmonella* spp. contiene la enzima tetrionato reductasa y puede crecer satisfactoriamente en el medio de cultivo debido a que no la

afecta la toxicidad del tetracionato. Para evitar la proliferación de especies de *Proteus* spp., se recomienda agregar 40 mg/l de Novobiocina previo al agregado de la solución yodurada.

**Composición g/L:** peptona de caseína 2,5, peptona de carne 2,5, carbonato cálcico 10, mezcla de sales biliares 1, tiosulfato sódico 30.

**Preparación:** Disolver 46 g en 1 L de agua purificada, calentar brevemente hasta ebullición. No esterilizar en autoclave.

Antes del uso, añadir 20 ml de solución de yodo/yoduro de potasio, 10 ml de verde brillante y 0,04 g/L de novobiocina.

Dispensar el medio asépticamente en recipientes de capacidad adecuada para obtener las porciones de la prueba, por ejemplo, cantidades de 10 ml en tubos. Evitar el calentamiento posterior.

El medio preparado es turbio y verde con un sedimento blanco (carbonato cálcico). El pH a 25 °C se sitúa entre 7,8 y 8,2.

Si el medio completo no se utiliza inmediatamente, almacenar en la oscuridad entre +2 °C y +8 °C. El pH puede disminuir durante el almacenamiento debido a reacciones químicas. No utilizar el medio completo si el pH desciende por debajo de 7,0.

### 3- Caldo Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) (Merck)

**Uso:** Para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* a partir de alimentos y piensos, agua y otros materiales.

**Modo de acción:** Es un medio de cultivo nutritivo que contiene un sistema buffer de fosfatos, alta concentración de sales de magnesio y sodio y la presencia del colorante verde de malaquita (oxalato).

El enriquecimiento selectivo de las especies de salmonella se debe a la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir y multiplicarse a presiones osmóticas relativamente altas (debido a la elevada concentración de cloruro de magnesio en el medio), a pH relativamente bajos, y porque se suprime el efecto tóxico del verde de malaquita hacia las salmonellas debido a la presencia de cloruro de magnesio. La incubación a 41-42 °C favorece la selectividad hacia las salmonellas.

**Composición g/L:** digerido enzimático de soja 4,5, cloruro de sodio 7,2, cloruro magnésico anhidro 13,6, hidrogenofosfato dipotásico 0,18, dihidrogenofosfato potásico 1,26, verde de malaquita oxalato 0,036. pH final:  $5,2 \pm 0,2$

**Preparación:** Disolver 41,8 g en 1 l de agua purificada. Dispensar en tubos o matraces y autoclavar 15 min a 115 °C.

El medio preparado es transparente y de color azul oscuro.

**Almacenamiento:** Almacenar entre +15 °C y +25 °C, seco y bien cerrado. No utilice medio aglomerado o descolorido. Proteger de la luz UV (incluida la luz solar).

El medio ya preparado puede almacenarse en recipientes cerrados a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C en la oscuridad y protegido de la evaporación durante un máximo de tres meses.

#### 4- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) (Biokar)

**Uso:** Para el aislamiento y la diferenciación de Salmonella en alimentos y piensos, agua y otros materiales.

**Modo de acción:** el desoxicolato de sodio inhibe la flora Gram-positiva contaminante. La xilosa es fermentada por prácticamente todas las bacterias enteropatógenas, excepto las Shigella, que se diferencian así de las demás especies. Tras agotar la xilosa, la Salmonella descarboxila la lisina (a través de la lisina descarboxilasa) a cadaverina, provocando un aumento del pH. Las colonias de salmonelas se parecen a las de shigelas en el medio que se ha vuelto básico.

Las colonias formadas son rojas en presencia del indicador rojo de fenol.

La adición de lactosa y sacarosa al medio permite que las bacterias coliformes descarboxilen la lisina y produzcan así un exceso de acidez, haciendo que el indicador se vuelva amarillo, favoreciendo su diferenciación.

En medio básico, los productores patógenos de H<sub>2</sub>S reducen el citrato férrico de amonio y provocan un ennegrecimiento debido a la producción de sulfuro de hierro en el centro de las colonias. Las bacterias no patógenas que no descarboxilan la lisina acidifican el medio, resultado de la fermentación del azúcar. La disminución del pH impide el ennegrecimiento de las colonias.

**Composición g/L:** extracto de levadura 3, lisina 5, lactosa 7,5, sacarosa 7,5, xilosa 3,75, desoxicolato de sodio 1, cloruro de sodio 5, tiosulfato de sodio 6,8, citrato férrico de amonio 0,8, rojo de fenol 0,08, agar 12,5.

pH final 25 °C: 7,4 ± 0,2.

**Preparación:** disolver 52,9 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Llevar lentamente a ebullición, removiendo con agitación completa hasta completa disolución. Enfriar a 44-47°C y verter rápidamente en placas de Petri estériles y dejar solidificar.



**Almacenamiento:** medio deshidratado conservar entre 2 -30°C, la fecha de caducidad se indica en la etiqueta. Los medios ya preparados en placas se deben conservar entre 2-8°C por 8 días.

#### 5- Agar Hektoen (Oxoid)

**Uso:** es un medio diferencial para el aislamiento de especies de Shigella y Salmonella a partir de muestras fecales. También puede utilizarse para analizar muestras de alimentos.

**Modo de acción:** este medio contiene mayores cantidades de peptona para compensar los efectos inhibidores de las sales biliares sobre las especies de Shigella. Los hidratos de carbono (sacarosa y salicina) permiten una mejor diferenciación que la lactosa sola y la menor toxicidad del doble indicador, fucsina ácida y azul de bromotimol, mejora la recuperación. El aumento de lactosa ayuda a reconocer precozmente los organismos de fermentación lenta de la lactosa. El tiosulfato y el citrato férrico están presentes para detectar organismos productores de sulfuro de hidrógeno. La presencia de sales biliares inhibe las bacterias Gram-positivas.

**Composición g/L:** peptona proteica 12, extracto de levadura 3, lactosa 12, sacarosa 12, salicina 2, sales biliares 9, cloruro sódico 5, tiosulfato sódico 5, citrato férrico de amonio 1,5, fucsina ácida 0,1, azul de bromotimol 0,065, agar 14.

**Preparación:** suspender 76 g del medio en 1 L de agua estéril. Calentar suavemente y dejar hervir unos segundos para disolver el agar. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y verter en placas de Petri estériles.

**Almacenamiento:** conservar el producto en su envase original a 2-12°C hasta su utilización. Conservar protegido de la luz.

#### 6. Caldo Bolton (Merck)

**Uso:** se utiliza para el enriquecimiento selectivo de Campylobacter spp. a partir de alimentos y piensos, así como de muestras medioambientales y otros materiales.

**Modo de acción:** Cefoperazona, vancomicina, cicloheximida y trimetoprima son los agentes selectivos utilizados para inhibir las bacterias grampositivas y gramnegativas acompañantes, así como levaduras y mohos.

**Composición g/L:** digerido enzimático de tejidos animales 10; lactoalbúmina hidrolizada 5; extracto de levadura 5; cloruro sódico 5; ácido a-cetoglutarico 1; piruvato sódico 0,5; disulfito sódico 0,5; carbonato sódico 0,6; hemina 0,01

**Preparación:** disolver 27,6 g en 1 L de agua destilada y autoclavar 15 minutos a 121 °C. Enfriar 45 -50°C. Añadir asépticamente 50 ml de sangre lisada de caballo y el contenido de 2 viales de suplemento selectivo de Caldo Bolton.

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: almacenar entre 15-25°C, no utilice medio apelmazado o descolorido. Proteger de la luz.

Medio preparado: almacenar entre 1 - 5°C en la oscuridad durante un máximo de 7 días.

7. Agar libre de sangre *Campylobacter* modificado (mCCDA). (Merck)

**Uso:** para el aislamiento, la detección y el recuento de *Campylobacter* spp. en alimentos y piensos, así como en muestras medioambientales y otros materiales.

**Modo de acción:** este medio contiene extracto de carne y digeridos enzimáticos de tejido animal y caseína que se utilizan como fuentes de nitrógeno. La combinación de carbón activado, sulfato de hierro (II) y piruvato sódico se utiliza para absorber radicales y peróxidos que podrían ser inhibitorios para el *Campylobacter* microaerófilo. El agar es el agente solidificante. Este medio contiene los agentes selectivos desoxicolato, cefoperazona y anfotericina B para inhibir la flora bacteriana acompañante, así como las levaduras y los mohos.

**Composición g/L:** peptona 20; caseína hidrolizada 3; carbón activo 4; cloruro sódico 5; desoxicolato de sodio 1; piruvato de sodio 0,25; sulfato de hierro 0,25; agar-agar 12.

**Preparación:** disolver 45,5 g en 1 L de agua destilada y calentar hasta disolución completa. Tratar en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfriar el medio de cultivo a 45-50°C. Agregar asépticamente el contenido disuelto de 2 frascos de CCDA suplemento selectivo. Mezclar bien.

pH 7,4 +/- 0,2 a 25°C

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: almacenar en lugar seco y en recipiente bien cerrado a 15-25°C. Proteger de la luz.

Medio preparado: almacenar entre 1-5°C en la oscuridad durante un máximo de 7 días.

8. Agar cromogénico para *Campylobacter* (Chromagar)

**Uso:** es un medio de cultivo cromogénico selectivo destinado a la detección directa cualitativa, diferenciación e identificación presuntiva de *Campylobacter* termotolerantes.

**Modo de acción:** la mezcla cromogénica permite diferenciar entre especies de *Campylobacter* y la mezcla del suplemento selectivo inhibe hongos, levaduras, y otras especies bacterianas.

**Composición g/L:** agar 15; peptona y extracto de levadura 25; sales minerales 9; mezcla cromogénica y selectiva 2,2

pH final 7,4 +/- 0,2.

**Preparación:** disolver 51,2g en 1 L de agua estéril. Calentar y llevar a ebullición mientras se remueve regularmente hasta la disolución completa. No calentar a más de 100°C. Enfriar a 45-50°C. Verter en placas de Petri estériles.

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: almacenar en lugar seco y en recipiente bien cerrado a 15-25°C. Proteger de la luz.

Medio preparado: conservar 1 mes en refrigeración (2-8 °C), proteger de la luz y de la deshidratación.

#### 9. Agua de Lavado de Butterfield (Cicarelli)

**Uso:** es un diluyente de uso general destinado a numerosas operaciones que incluyen la preparación de muestras, la preparación de suspensiones madre y diluciones seriadas de muestras.

**Composición g/L:** di-Potasio Hidrógeno Fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), agua destilada.

**Preparación:** Disolver 68 g en 1L de agua destilada. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C.

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: conservar los envases perfectamente cerrados en un lugar fresco, seco y bien ventilado.

Medio preparado: conservar a temperatura de refrigeración (2-8°C).

#### 10. Lauryl Sulfato (Biokar)

**Uso:** Es un medio de enriquecimiento selectivo utilizado para la detección y recuento de *Escherichia Coli* y coliformes en agua y productos alimenticios.

**Modo de acción:** El lauryl sulfato de sodio inhibe considerablemente el desarrollo de la flora microbiana acompañante sin inhibir las especies de coliformes. Debido a su excelente capacidad nutritiva, así como a la presencia de tampón fosfato, permite que las

bacterias coliformes se desarrollen rápidamente y liberen grandes cantidades de gas a partir de la fermentación de la lactosa, incluso con pequeños inóculos

**Composición g/L:** triptona 20; lactosa 5; fosfato dipotásico 2,75; dihidrógeno potásico 2,75; cloruro sódico 5; lauryl sulfato sódico 0,1.

pH 6,8 +/- 0,2 a 25°C.

**Preparación:** disolver 35,6 g en 1 L de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo colocando 10 ml por tubo y colocarle campana de Durham. Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 min.

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: 1-30°C

Medio preparado: conservar 180 días en refrigeración.

#### 11. Caldo EC (Oxoid)

**Uso:** es un medio selectivo para la diferenciación de coliformes fecales y la prueba de confirmación de Escherichia Coli a partir de muestras alimentarias y ambientales.

**Modo de acción:** La presencia de sales biliares inhibe el crecimiento de formadores de esporas y enterococos, pero permite el crecimiento de E. Coli y coliformes. La producción de gas de la fermentación de la lactosa se indica utilizando tubos de Durham invertidos.

**Composición g/L:** triptona 20; lactosa 5; sales biliares 1,5; fosfato dipotásico 4; fosfato monopotásico 1,5; cloruro sódico 5.

pH 6,9 +/- 0,2 a 25°C.

**Preparación:** disolver 37 g en 1L de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo colocando 8 ml por tubo y colocarle campana de Durham. Esterilizar en autoclave a 121°C, durante 15 min.

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: conservar a 10-30°C y utilizarlo antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Medio preparado: almacenar a 2-8 °C durante un máximo de 4 semanas.

#### 12. Agar Levine - EMB (Merck)

**Uso:** medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento, confirmación e identificación de Escherichia Coli y otras Enterobacteriaceae de la cadena alimentaria, cosméticos y otros materiales.

**Modo de acción:** En el medio de cultivo, la peptona es la fuente nutritiva y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. La combinación utilizada de eosina y azul de metileno, inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos y de bacterias Gram negativas fastidiosas, y también, permite diferenciar bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. El agar es el agente solidificante.

**Composición g/L:** peptona de gelatina 10; lactosa 10; hidrogenofosfato dipotásico 2; eosina amarillenta 0,4; azul de metileno 0,065; agar- agar 13,5.

**Preparación:** disolver 36 g en 1 L de agua destilada, calentar en un baño de agua hirviendo, tratar en autoclave 15 minutos a 121°C. Verter en placas.

pH 7,1 +/- 0,2 a 25°C.

**Almacenamiento:**

Medio de cultivo deshidratado: conservar a 10-35 °C, proteger de la luz

Medio de cultivo preparado: conservar a 2-8 ° C durante 6-8 semanas.

### 13. Agar recuento en placa (PCA) (Merck)

**Uso:** medio general para la determinación del contenido microbiano total de alimentos y piensos, agua y otros materiales.

**Modo de acción:** La productividad de este medio, está basada en el alto contenido nutricional de sus componentes, que permite el desarrollo de las bacterias presentes en la muestra.

**Composición g/L:** peptona de caseína 5, extracto de levadura 2,5, D (+) glucosa 1, agar –agar 14.

**Preparación:** disolver 22,5 g en 1 litro de agua destilada, calentar en un baño de agua hirviendo, fraccionar en tubos de ensayo. Tratar en autoclave 15 min a 121°C. Antes de su utilización se debe fundir el medio.

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: almacenar entre +15°C y +25°C.

Medio preparado: las placas ya preparadas deben conservarse a una temperatura de +2 a +8 °C en la oscuridad y protegidas contra la evaporación durante un máximo de cuatro semanas.

### ANEXO 2: Tabla utilizada para calcular NMP

Para tubos cada uno con inóculos de 0.1, 0.01, 0.001 g, los NMP por gramo e intervalos de confianza del 95%

Pos. tubos			NMP/g	Conf. lím.		Pos. tubos			NMP/g	Conf. lím.	
0,10	0,01	0.001		Bajo	Alto	0,10	0,01	0.001		Bajo	Alto
0	0	0	<>	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0,15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0,15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0,17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	dieciséis	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1.000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1.000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2.000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-

Fuente: Manual Analítico Bacteriológico (BAM)