



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Estudio de la prevalencia de *Salmonella* spp y *E. coli* en huevos comerciales para consumo humano en el cantón Ibarra, para la creación de un banco de recursos microbianos de la PUCE-SI”.

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERA EN ZOOTECNIA

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

LÍNEA 4: Gestión Sostenible y Aprovechamiento de los Recursos Naturales

SUBLINEA:

Seguridad y Soberanía Alimentaria

AUTOR: MISHIEL IVETH VILLARRUEL MONTESDEOCA

ASESOR: MSc. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA, JUNIO 2021

Ibarra, 1 de junio de 2021

MSc. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE
ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f.)

MSc. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

C.C.: 1002658399

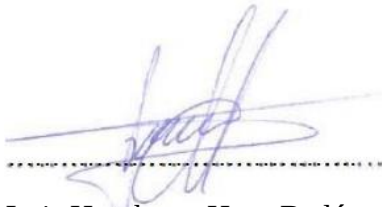
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f): 

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C: 1002658399

(f): 

Mgs. Luis Humberto Haro Bedón

C.C: 100273938-9

(f): 

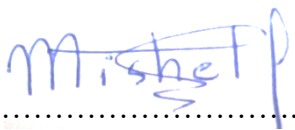
MVZ. Mónica Patricia Velástegui Moreno

C.C.: 050332302-4

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 1 de junio de 2021

f): 

Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca

C.C.: 1003581103

AUTORÍA

Yo, Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca portador de la cédula de ciudadanía N° 1003581103, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del (los) autor (es), y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f): 

Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca

C.C.: 1003581103

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo: Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca, con CC: 1003581103, autor del trabajo de grado intitulado: “ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE *SALMONELLA* SPP Y *E. COLI* EN HUEVOS COMERCIALES PARA CONSUMO HUMANO EN EL CANTÓN IBARRA, PARA LA CREACIÓN DE UN BANCO DE RECURSOS MICROBIANOS DE LA PUCE-SI.”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera en Zootecnia, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 1 de junio de 2021

(f.).....

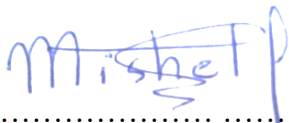
Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca

C.C. 1003581103

DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE *SALMONELLA* SPP Y *E. COLI* EN HUEVOS COMERCIALES PARA CONSUMO HUMANO EN EL CANTÓN IBARRA, PARA LA CREACIÓN DE UN BANCO DE RECURSOS MICROBIANOS DE LA PUCE-SI.”, lo propuesto en el código de Ética de la Investigación y Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 15 de enero de 2018.

Para constancia firma:



(f).....

Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca

Estudiante que ejecuta el trabajo de Titulación

C.I: 1003581103

Carrera: Ingeniería en Zootecnia

Ibarra, 1 de junio de 2021

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico con mucho amor a mi ángel en el cielo, mi Padre Oswaldo, quién me cuida, me protege, me guía y me ilumina en todo momento, a pesar de no contar con su presencia en este mundo terrenal, siempre está presente en mi corazón y en mis pensamientos. A la persona que más admiro, mi Madre Anita quién con sacrificio, perseverancia y fuerza me ha apoyado constantemente para alcanzar mis objetivos, es por ti que ahora estoy aquí.

Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Anita, por nunca decaer ante las adversidades, y siempre haberme apoyado y guiado en cada paso de mi vida y travesía estudiantil, con su amor, sus consejos y su ejemplo hoy culmino una etapa más en mi vida.

Mi especial agradecimiento al Dr. Manly Espinosa Benavides, quién fue el principal precursor para la realización de este trabajo de investigación, además de mi gratitud por ser tan excelente docente y haber inculcado en mí valores y ética en mi formación como profesional, quiero expresarle mi admiración por ser un ejemplo de lucha, perseverancia y constancia; es para mí un ejemplo de vida.

A mi asesor MSc. Santiago Mafla, le agradezco por su apoyo, su tiempo, su paciencia y su importante aporte académico para el desarrollo de esta investigación, es un docente de calidad que desde que inicié la carrera ha sembrado en mí su conocimiento y me ha enseñado a mejorar tanto personal como académicamente.

A toda mi familia, amigos y compañeros de aula, un extensivo agradecimiento por su ayuda, apoyo, compañía y su cariño hacia mí.

Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xx
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
CAPITULO I.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO II	7
OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo General	7
2.2. Objetivos Específicos.....	7
2.3. Hipótesis	7
CAPITULO III	8
ESTADO DEL ARTE.....	8
3.1. Antecedentes de la Investigación.....	8
3.2. Avicultura mundial	8
3.3. Avicultura en Ecuador	10
3.3.1. Principales empresas en el mercado	12
3.3.2. Mercado actual.....	12
3.3.3. Análisis económico de producción de huevos de gallina	12

3.3.4. Bioseguridad en la producción de huevos	14
3.4. El Huevo	15
3.4.1. La Cáscara	15
3.4.2. La Clara	16
3.4.3. La Yema	16
3.5. Factores que determinan la calidad del huevo	16
3.5.1. Calidad del huevo de expendio.....	16
3.5.2. Calidad microbiológica del huevo	16
3.6. Mecanismos de transmisión de microorganismos en el huevo.....	18
3.6.1. Transmisión vertical	18
3.6.2. Transmisión horizontal	18
3.6.3. Transmisión lateral	18
3.7. Bacterias	20
3.7.1. Clasificación de las bacterias	21
3.7.2. Enterobacterias.....	21
3.7.3. Características de las Enterobacterias	22
3.7.4. Bacterias que impactan en la industria avícola de postura.....	23
3.7.5. Características generales de <i>Salmonella</i> spp.	24
3.7.6. Clasificación taxonómica de <i>Salmonella</i> spp.	25
3.7.7. Toxiinfección por <i>Salmonella</i> spp.	26
3.7.8. Detección de <i>Salmonella</i>	27
3.7.9. Características generales de <i>Escherichia coli</i>	29
3.7.10. Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	29
3.7.11. Toxiinfección por <i>Escherichia coli</i>	30
3.7.12. Detección de <i>Escherichia coli</i>	31
3.8. Cuenta en placa de bacterias.....	32
3.9. Ácido desoxirribonucleico (ADN).....	33
3.10. Reacción en cadena polimerasa (PCR).....	33

3.11. ADN ribosomal 16S.....	35
3.12. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	36
CAPITULO IV	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1. Materiales, reactivos y equipos de laboratorio.....	37
4.1.1. Materiales de laboratorio	37
4.1.2. Equipos de laboratorio	38
4.1.3. Reactivos de laboratorio	39
4.1.4. Materiales de oficina	40
4.2. Metodología	40
4.2.1. Lugar de investigación.....	40
4.2.2. Ubicación del área de estudio.....	41
4.2.3. Variables.....	41
4.3. Métodos	42
4.3.1. Determinación de la muestra.....	42
4.3.2. Toma de muestra	44
4.3.3. Trabajo de laboratorio.....	45
CAPITULO V	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1. Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp.	53
5.1.2. Análisis de la cantidad de UFC/ml de <i>Salmonella</i> spp., por fuentes de expendio.....	53
5.1.3. Análisis de la cantidad de UFC/ml de <i>Salmonella</i> spp., por sectores A y B (principales cadenas comerciales y distribuidores mayoristas)	54
5.2. Prevalencia de <i>Escherichia coli</i>	57
5.2.1. Análisis de la cantidad de UFC/ml de <i>Escherichia coli</i> por fuentes de expendio.....	57

5.2.2. Análisis de la cantidad de UFC/ml de <i>Escherichia coli</i> por sectores A y B (principales cadenas comerciales y distribuidores mayoristas)	58
5.3. Caracterización con enzimas de restricción	61
5.4. Identificación por secuenciación.....	74
5.5 Evaluación de la socialización.....	77
CAPÍTULO VI.....	80
CONCLUSIONES.....	80
CAPÍTULO VII.....	82
RECOMENDACIONES.....	82
CAPÍTULO VIII	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores que integran un sistema de bioseguridad	14
Tabla 2. Parámetros microbiológicos de huevos de gallina	17
Tabla 3. Vías de contagio de <i>Escherichia coli</i> en ponedoras	19
Tabla 4. Localización de infecciones más frecuentes de Enterobacterias por orden de prevalencia	22
Tabla 5. Bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de las aves	24
Tabla 6. Condiciones y rangos óptimos para el desarrollo de Salmonella	26
Tabla 7. Serotipos de <i>Salmonella</i> spp., en aves y la enfermedad que causan.....	26
Tabla 8. Factores que predisponen al ave a adquirir <i>Escherichia coli</i>	31
Tabla 9. Materiales de laboratorio	37
Tabla 10. Equipos de laboratorio	38
Tabla 11. Reactivos de laboratorio.....	39
Tabla 12. Materiales de oficina.....	40
Tabla 13. Primers usados para la amplificación del gen ARNr 16S	49
Tabla 14. Enzimas de restricción Promega.....	51
Tabla 15. Enzimas de restricción Termofisher.....	51
Tabla 16. Protocolo para el uso de enzimas de restricción	51
Tabla 17. Prueba t Student del promedio de UFC/ml de <i>Salmonella</i> spp., en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.....	55
Tabla 18. Prueba t Student del promedio de UFC/ml de <i>Escherichia coli</i> en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.....	59
Tabla 19. Secuencias de las bacterias presentes en huevos comerciales en el cantón Ibarra.....	74

Tabla 20. Tabulación de los resultados de la encuesta	79
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países productores de huevos	9
Figura 2. Tipos de aves criadas en campo y planteles avícolas en Tungurahua unidades (2014-2019)	10
Figura 3. Destino de la producción de huevos de gallinas ponedoras.....	11
Figura 4. Porcentaje de costos en la producción avícola de acuerdo a su dimensión.....	13
Figura 5. Partes del huevo	15
Figura 6. Vías de contagio de <i>Salmonella</i> spp., en aves	20
Figura 7. Clasificación de las bacterias	21
Figura 8. Estructura de una Enterobacteria de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	23
Figura 9. <i>Salmonella</i> Entérica y subespecies.....	25
Figura 10. Amplificación del gen 16S.....	28
Figura 11. Clasificación de <i>Escherichia coli</i> de acuerdo a sus patotipos.....	29
Figura 12. Amplificación del gen 16S para <i>Escherichia coli</i>	32_To
c65613646	
Figura 13. Etapas del proceso PCR.....	34
Figura 14. Estructura del ADNr 16S.....	35
Figura 15. Procedimiento para RFLP.....	36
Figura 16. Sitios de muestreo	41
Figura 17. Definición y recolección de las muestras	44
Figura 18. Clasificación de las muestras para cultivo SS y EMB	46
Figura 19. Promedio de UFC/ml de <i>Salmonella</i> spp., en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.	53

Figura 20. Promedio de UFC/ml de <i>Salmonella</i> spp., en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.	54
Figura 21. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de <i>Salmonella</i> spp., y el sector A (Principales cadenas comerciales)	56
Figura 22. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de <i>Salmonella</i> spp., y el sector B (Distribuidores mayoristas)	56
Figura 23. Promedio de UFC/ml de <i>Escherichia coli</i> en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.	57
Figura 24. Promedio de UFC/ml de <i>Escherichia coli</i> en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.	58
Figura 25. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de <i>Escherichia coli</i> y el sector A (Principales cadenas comerciales)	60
Figura 26. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de <i>Escherichia coli</i> y el sector B (Distribuidores mayoristas)	60
Figura 27. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 EcoR I.....	61
Figura 28. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 EcoR I.....	61
Figura 29. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 EcoR I	62
Figura 30. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 EcoR I	63
Figura 31. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 MspI.....	63
Figura 32. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 MspI.....	64

Figura 33. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 Mspl	65
Figura 34. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 Mspl	65
Figura 35. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción apal	66
Figura 36. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción apal	66
Figura 37. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción apal	67
Figura 38. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción apal	67
Figura 39. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción Hind III	68
Figura 40 Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción Hind III	68
Figura 41. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción Hind III	69
Figura 42. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción Hind III	69
Figura 43. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción Sac II	70
Figura 44. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción Sac II	70
Figura 45. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción Sac II	71

Figura 46. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción Sac II.....	71
Figura 47. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III.....	72
Figura 48. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de <i>Salmonella</i> spp., caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III.....	72
Figura 49. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III.....	73
Figura 50. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de <i>Escherichia coli</i> caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III.....	73
Figura 51. Evaluación de la sala en dónde se organización el evento.....	78
Figura 52. Evaluación del material audiovisual del evento.....	78
Figura 53. Evaluación de dominio del tema por parte del expositor.....	79

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Base de datos acerca de las fuentes de expendio	88
Anexo 2. Registro fotográfico de la investigación	90
Anexo 3. Resultados conteo UFC/ml <i>Salmonella</i> spp	94
Anexo 4. Resultados conteo UFC/ml <i>Escherichia coli</i>	94
Anexo 5. Invitación a la socialización.....	95
Anexo 6. Tabulación de datos de la socialización.....	96
Anexo 7. Secuencias identificadas	99

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema importante en la salud pública y la prevalencia de las mismas permiten conocer la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, se aplicó la metodología de muestreo no probabilístico en el cuál se muestrearon aleatoriamente ocho sitios de expendio, de los cuales cuatro corresponden al denominado sector A (cadenas comerciales) y los otros cuatro del sector B (distribuidores mayoristas) de huevo comercial en la ciudad de Ibarra, es así que se escogieron al azar 10 huevos por sitio de expendio, dando así un total de 80 huevos analizados. De cada huevo se tomaron muestras de clara, yema y cascarón para cultivos de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*. Como resultado del análisis microbiológico se obtuvo un total de 18 muestras positivas, uno en clara, dos en cascarón y siete en yema para *Salmonella* spp., y tres en cascarón, cuatro en yema y uno en clara para *Escherichia coli*.

Posterior a esta identificación se realizó la extracción de ADN y por medio de la técnica de RFLP (fragmentos de restricción de longitud polimórfica) se reveló la existencia de cuatro grupos de cepas para *Salmonella* spp., y cuatro grupos de cepas para *Escherichia coli*, mismos que arrojaron una prevalencia del 4,16% y 3,33% respectivamente, siendo el sector B (distribuidores mayoristas) el de mayor prevalencia. En conclusión los sitios de expendio del Cantón Ibarra demostraron que en un 62% no cumplen con las medidas higiénico sanitarias establecidas en la NTE INEN 1973:2013. Además mediante la secuenciación se detectaron otras especies bacterianas correspondientes a: *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Enterobacter* sp. Se identificó dos serotipos para *Salmonella* spp: *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. El serotipo identificado de la bacteria *Escherichia coli* fue O157:H7.

PALABRAS CLAVE

Salmonella spp., *Escherichia coli*, RFLP, ETA.

ABSTRACT

Foodborne diseases (FBD) are an important public health problem and their prevalence provides information on the hygienic-sanitary quality of food. A descriptive cross-sectional study was carried out using a non-probabilistic sampling methodology in which eight commercial egg stores were randomly sampled, of which four correspond to sector A (commercial chains) and the other four to sector B (wholesale distributors) in the city of Ibarra. 10 eggs per store were randomly selected, giving a total of 80 eggs analyzed. Samples of egg white, yolk and shell were taken from each egg for *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* cultures. As a result of the microbiological analysis, a total of 18 positive samples were obtained, one in egg white, two in eggshell and seven in yolk for *Salmonella* spp. and three in eggshell, four in yolk and one in egg white for *Escherichia coli*.

After this identification, DNA extraction was carried out and by means of the RFLP technique (polymorphic length restriction fragments) revealed the existence of four groups of strains for *Salmonella* spp. and four groups of strains for *Escherichia coli*, with a prevalence of 4.16% and 3.33%, respectively, with sector B (wholesale distributors) having the highest prevalence. In conclusion, 62% of the retail outlets in Canton Ibarra did not comply with the hygienic and sanitary measures established in NTE INEN 1973:2013. In addition through sequencing other bacterial species were detected corresponding to: *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Enterobacter* sp. Two serotypes were identified for *Salmonella* spp: *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. The serotype identified for *Escherichia coli* was O157:H7.

KEY WORDS

Salmonella spp., *Escherichia coli*, RFLP, ETA.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016), y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2009), exponen su inquietud por el nivel de inocuidad de los alimentos obtenidos de fuentes primarias, en los últimos decenios se ha registrado un incremento de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), considerándose entre las enfermedades centrales de notificación obligatoria, en donde la Salmonelosis es de las más prevalentes Ministerio de Salud Pública (MSP, 2012).

La tendencia creciente de contaminación en humanos y la constante aparición de enfermedades de origen alimentario (ETA) son un indicativo para establecer un mayor control concertado entre gobierno e industria en donde se vigilen todos los procesos productivos sobre los alimentos de origen animal (Loaiza *et al.*, 2011).

En América Latina aproximadamente se reportan 150.000 casos de Salmonelosis por año, considerándose una causa trascendental en el grupo de toxiinfecciones. En el Ecuador no se cuenta con datos exactos acerca de la cuantía de infectados anuales por Salmonelosis debido a la falta de reportes, sin embargo, existe un estimado de muertes anuales de 1.000 personas por Salmonelosis aguda a causa del efecto combinado entre la malnutrición y la infección (Acosta, 2016).

En décadas pasadas, el comité del Codex Alimentarius – Higiene de los Alimentos, estipuló que la presencia de *Salmonella* spp., en huevos y en aves de corral eran 2 de 21 combinaciones de patógenos más prioritarias, siendo alimentos de consumo masivo en diferentes preparaciones por lo que originaron gran preocupación en la salud pública y la comercialización de alimentos (FAO, 2009) (OMS, 2016).

El Ministerio de Agricultura y Ganadería Ecuador (2019), afirma que: “en nuestro país existen 13,5 millones de ponedoras mismas que producen cerca de 10 millones de huevos por día, teniendo un consumo per cápita anual de 226 huevos”. De este total, la participación de las

principales provincias es: Tungurahua el 45%, Cotopaxi el 21%, Manabí el 15%, Pichincha alcanza el 14% y Guayas apenas el 2% de aporte en la producción nacional.

Los huevos de venta en el cantón Ibarra provienen de todas las provincias antes mencionadas, por lo tanto, se dificulta establecer la fuente primaria de contaminación, en base a ello este estudio se enfocó en determinar la contaminación de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* en función a la calidad del producto final que obtiene el consumidor. Los huevos sin marca del mercado informal no cumplen con las especificaciones sanitarias establecidas por la NTE INEN 1973:2013¹, por otra parte los huevos con marca no garantizan su total inocuidad para la prevención de aparición de enfermedades.

Considerando que el huevo es uno de los alimentos de origen animal de mayor consumo porque constituye una importante fuente de proteínas, vitaminas, grasas y minerales es de reducido valor económico y gran importancia en la nutrición infantil tiene un impacto directo sobre la Inocuidad Alimentaria y Salud Pública que forma parte del proyecto del Buen Vivir en Ecuador (Montero, 2016).

La *Salmonella* spp., es una de las bacterias presentes en el intestino de algunos organismos vivos incluido el hombre que son capaces de provocar enfermedades infecciosas cómo es la Salmonelosis, es así que, con frecuencia los alimentos de origen animal son un vector para la transmisión de la enfermedad al ser humano, su frecuencia de aparición es en épocas de calor debido a que las altas temperaturas benefician su proliferación en los alimentos (Sáenz, 2010).

En explotaciones avícolas, la Salmonelosis es una de las principales enfermedades zoonóticas que afecta a las aves, esta enfermedad tiene dos vías de transmisión; horizontal cuando la contaminación se origina por contacto en el sitio de producción y vertical cuando el huevo ha sido contaminado en el interior de la gallina. Se incluyen síntomas en el ser humano tales como diarrea, fiebre, náuseas, entre otros (Moro, 2012). Por otra parte la FAO (2009), enuncia:

¹ Huevos comerciales y ovoproductos. Requisitos

“Cada año, cientos de miles de personas se hallan afectados a causa de la *Escherichia coli* produciendo muertes constantes, además en los últimos tiempos los brotes han ido incrementando originando de esta forma un impacto sobre la seguridad alimentaria”.

La contaminación por *Escherichia coli* implica la interacción entre humanos, animales y plantas, por ello es importante controlar la inocuidad de los productos de origen animal que están destinados al consumo humano, para que se incluyan buenas prácticas agrícolas, de fabricación y de higiene; análisis de peligros y puntos críticos de control desde la producción en granja o finca hasta el consumo directo (FAO, 2009).

Por desgracia algunos productores y consumidores desconocen o no le dan la debida importancia a la presencia de contaminantes en los alimentos, en este caso los huevos, sin tomar en cuenta que constituyen una amenaza seria para la salud, obstaculizando el desarrollo económico y social, perjudicando de esta forma la economía nacional, turismo y comercio. Loaiza *et al.*, (2011), recalca: “Se deben tomar las consideraciones pertinentes sobre prevención en el manejo de gallinas ponedoras o granjas destinadas a la producción de huevos”.

En la actualidad en Ecuador existen pocos aportes científicos sobre la prevalencia de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y otras enterobacterias en huevos, debido a que los estudios de aislamiento bacteriano resultan costosos, lentos y complicados.

En el ámbito de vigilancia epidemiológica es fundamental establecer la detección e identificación de los patógenos precursores de las enfermedades transmisibles, una detección temprana, prevendría la aparición de brotes, permitiendo así, la implementación de controles previos a la aparición de las enfermedades que se producen en el ámbito nacional, regional y /o mundial (Loaiza *et al.*, 2011).

Partiendo de esta premisa se justifica la importancia de la presente investigación, debido a que determinada la prevalencia de contaminantes bacterianos se establece la calidad del huevo para beneficio del consumidor, ya que como consecuencias de ingerir un producto contaminado genera enfermedades trascendentales que generan un impacto social en la salud pública además de ocasionar un elevado gasto económico llegando a provocar incluso la muerte, es así que

mediante análisis microbiológico, estudios de PCR y RFLP se determinó la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* en huevos de gallina destinados al consumo humano en expendios del cantón Ibarra.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar la prevalencia y serotipo de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* en huevos destinados al consumo humano del cantón Ibarra, mediante análisis microbiológico, RFLP² y PCR³, para la creación de un banco de recursos microbianos de la PUCE-SI.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* mediante análisis microbiológico de huevos comerciales (clara, yema y cascarón) de consumo en el cantón Ibarra.
- Aislar e identificar los principales serotipos de las bacterias entéricas patógenas presentes en los huevos comerciales de consumo en el cantón Ibarra, para la creación de un banco de recursos microbianos de la PUCE-SI.
- Socializar los resultados a los actores involucrados.

2.3. Hipótesis

Ho: Las bacterias *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*., no están presentes en los huevos de consumo humano del cantón Ibarra

Ha: Las bacterias *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*., se encuentran presentes en los huevos de consumo humano del cantón Ibarra.

² Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

³ Reacción en cadena de la polimerasa

CAPITULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1. Antecedentes de la Investigación

En el estudio realizado por Estrada *et al.*, (2012): determinan la presencia de *Salmonella* spp., en huevos de gallina obtenidos en los mercados de mayor concurrencia en la Ciudad de Quito, en su trabajo concluye que no halló presencia de *Salmonella* spp., obtenidos de 47 lugares de venta mismos que fueron recogidos de 15 mercados, se detectaron otras bacterias tales como: *Pseudomona* spp., *Enterobactercloacae cloacae*, *Pantoea* spp., *Provindencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Aeromona hydrofila*, y *Burkholdelia cepacia*”. Como recomendación final toma en cuenta la realización de análisis de los huevos de traspatio y realizar un contraste sobre el contenido de contaminantes microbianos.

En proyectos de investigación sobre *Salmonella* spp., Suárez *et al.*, (2000): acotan que los huevos de gallina son un vector principal para la transmisión de Salmonelosis en humanos, por ende, es importante estudiar todos los factores que intervienen en la transmisión de la bacteria al huevo para encontrar los ejes fundamentales de su patogenicidad con relación a las afecciones humanas. Esto es de gran impacto social ya que a partir de ahí se imparten planes de prevención para reducir las enfermedades por Salmonelosis.

En un estudio sobre la determinación de *Salmonella* y *Enterobacterias* totales en huevos, realizado por Leyva *et al.*, (2016), encontraron la contaminación de huevos con *Salmonella zioria*, *Enterobacter sp* y *Escherichia coli*; con un 0,60% y 17,57% respectivamente en muestras analizadas de yema, clara y cascarón. El estudio revela además, que la alcalinidad de la clara es capaz de inhibir cualquier crecimiento microbiano que hubiera en la yema.

3.2. Avicultura mundial

El sector avícola ha ido creciendo continuamente y cada vez con industrialización mejorada, factores como el crecimiento demográfico, las cadenas de suministro mejoradas, el desarrollo

económico y el aumento del poder adquisitivo favorecen este progreso, con un incremento del 24% en la última década en lo que se refiere a la producción de huevos.

En el año 2008 hubo una producción total de huevos de 61,7 millones de toneladas, que aumentó considerablemente al año 2018; con 76,7 millones de toneladas, de las cuales China produce 466 mil millones de huevos, representando de esta forma el 34% de producción de huevos a nivel mundial, posicionándose de esta manera como el mayor productor durante los últimos 30 años. Seguidamente se encuentra EE.UU. y la India completando el 60% de la producción de huevos, y el 16% lo representan México, Brasil, Rusia, Japón, Indonesia y Turquía (Aguirre *et al.*, 2018).

El consumo per cápita en los diferentes países varía, en la India 76 huevos, Sudáfrica 130 huevos, China 255, Japón 337, México 368, etc.

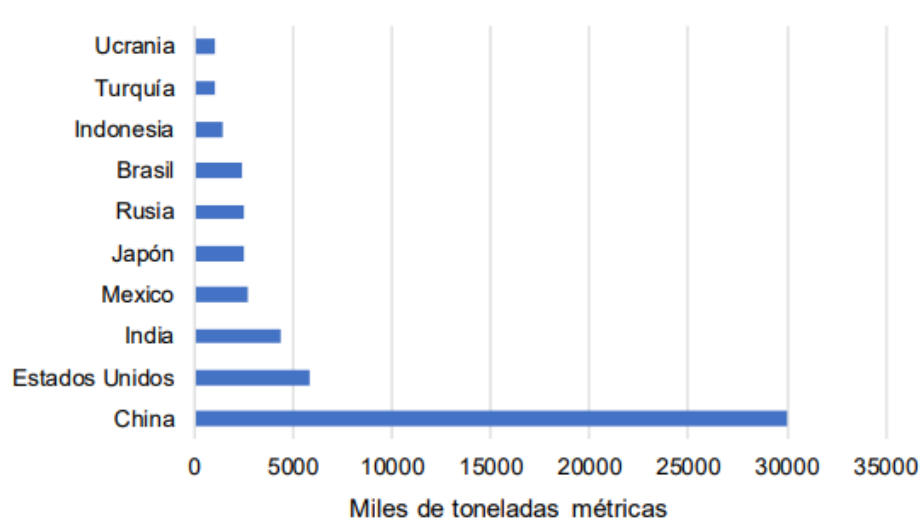


Figura 1. Principales países productores de huevos, por Aguirre *et al.*, (2018)

Los progresos dentro del sistema de producción ha incrementado 2,5 veces esto se debe al mejoramiento de la industria mediante el desarrollo de nuevas infraestructuras, sistemas de crianza tecnificados, condiciones de sanidad eficientes, ambientes controlados, personal técnico capacitado, bioseguridad y gestión ambiental.

3.3. Avicultura en Ecuador

La avicultura en el Ecuador es un sistema de producción de crecimiento continuo, entre el 2018 y 2019 se registró un 27% de crecimiento en el número de aves criadas en campo con un total de 9'341.321 y en planteles avícolas cuentan con 46'572.210 aves, lo que representa el 15,3% y 84,7% de aves respectivamente (INEC, 2019).

Los pollitos, pollitas, pollos y pollas son las aves que más se crían, seguidos por las gallinas ponedoras con un 16%, la producción de gallinas ponedoras se concentra en un 50% en la provincia del Tungurahua, el otro 50% está distribuido entre las provincias: Guayas, Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, El Oro, Cotopaxi, Imbabura y Pastaza (INEC, 2019).

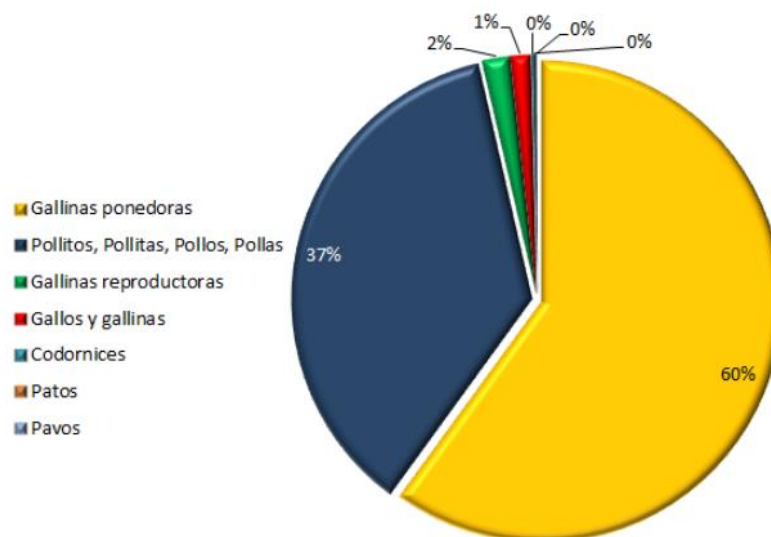


Figura 2. Tipos de aves criadas en campo y planteles avícolas en Tungurahua unidades (2014-2019), por INEC (2019)

Hoy en día el consumo de huevos per cápita por persona desde el año 2018 al 2019 a incrementado en 13 unidades, es decir que cada ecuatoriano consume 226 unidades en el año 2019, lo cuál representa un incremento constante en la demanda de huevos ya que junto con la carne de pollo son una fuente de proteína económica y accesible para todos los estratos sociales.

De acuerdo al consumo de un ecuatoriano promedio, la producción diaria de huevos fue de 9,38 millones de unidades en el año 2017, incrementando a 10,01 millones en el año 2018 y llegando hasta 10,81 millones en el 2019.

En el año 2019 se registró en el Ecuador una producción semanal de huevos de 361'078.496 unidades, lo cual al año representa una producción promedio de 4.000 millones de unidades.

La producción semanal de huevos de gallina provienen en un 8,6% de aves de campo y el 91,4% de planteles avícolas, en donde Región Sierra contribuye con el 75,4% la Región Costa aporta el 17,6% y la Región Amazónica con el 7%.

En el año 2019 el destino de la producción nacional de huevos fue para venta en un 97,4% y para el autoconsumo un 0,03% especialmente de las gallinas ponedoras de traspatio, el restante 2,6% se destinó a otras utilidades tal como se presenta en la figura 3.

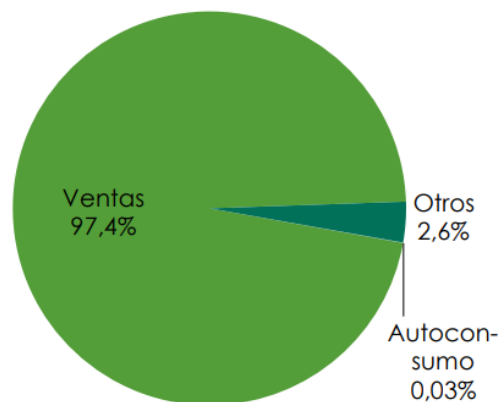


Figura 3. Destino de la producción de huevos de gallinas ponedoras, por ESPAC (2019)

Tungurahua constantemente lidera la producción de huevos y junto con Cotopaxi, Pichincha y Manabí conforman el 80% de la producción de huevos a nivel nacional.

3.3.1. Principales empresas en el mercado

Actualmente el mercado de expendio de huevos está clasificado en dos segmentos: los distribuidores mayoristas, quienes tienen su funcionamiento en locales y realizan la venta directa de huevos sin marca. Según el autor Albán, 2018 “hay productores autónomos situados en Puellaro, Ambato y Pichincha, ellos establecen los precios en función del tiempo de comercialización, es decir los precios incrementan cuando es temporada escasa y rebajan cuando la demanda es menor”. La principal desventaja es carecer de garantía de marca. Por otro lado, los huevos con marca tienen canales de distribución similares a nivel local, sin embargo, están desfavorecidos por la imagen y marca que proporcionan a la sociedad ya que no son reconocidos en la zona (Albán, 2018).

3.3.2. Mercado actual

La comercialización de huevos cada año incrementa conforme crece la demanda, el mercado está siendo atendido por huevos sin marca ocupando el 49,25%, y los huevos de marca comercializados que cubren la demanda en un 50,75% son: indaves, huevos oro, selecto, gigos EC, entre otros. El posicionamiento de estas marcas en el mercado actual fluctúa en base a la marca, calidad y precios (Tobar, 2012).

El 82% de los propietarios distribuidores (abastos, víveres, tiendas, almacenes, supermercados, comisariatos) eligen adquirir huevos con marca y fecha de caducidad para expendio, un 18% eligen huevos sin marca, ya que representa ahorro de costos (Tobar, 2012).

3.3.3. Análisis económico de producción de huevos de gallina

Los planteles de gallinas ponedoras se enfrentan a varios retos para lograr una producción eficiente al menor costo posible, es así que se ven en la necesidad de adaptarse a los modelos de producción y comercialización en donde obtengan el máximo provecho de los recursos optimizando así su potencial dentro de la cadena productiva, se debe dar un control riguroso a todos los factores de producción: alimentación, alojamiento, manejo, desafío patógenos, bioseguridad y estado sanitario; este último es uno de los más importantes ya que cuando la

parvada presenta problemas sanitarios se ve afectado el rendimiento general: ganancia de peso corporal, tamaño del huevo, huevos producidos por ave, porcentaje de postura, porcentaje de mortalidad y conversión alimenticia. “Animales sanos producen alimentos seguros” (Moro, 2012).

Probablemente la salud y la enfermedad de una parvada son los factores menos predecibles, sin embargo pueden representar grandes pérdidas económicas en la industria avícola, el autor Trevor (2013), indica que los costos económicos que incluyen vacunas y decomisos forman el 20% del valor total de la producción, lo que representa tres veces las pérdidas económicas por concepto de mortalidad, por otro lado las pérdidas por enfermedad incluyen el 8,2%, es así que las pérdidas por mortalidad y por enfermedad tienen una relación 1:2 es decir, por cada

USD 1.000 dólares de pérdidas a causa de mortalidad, se pierden USD 2.000 dólares de pérdida por enfermedades.

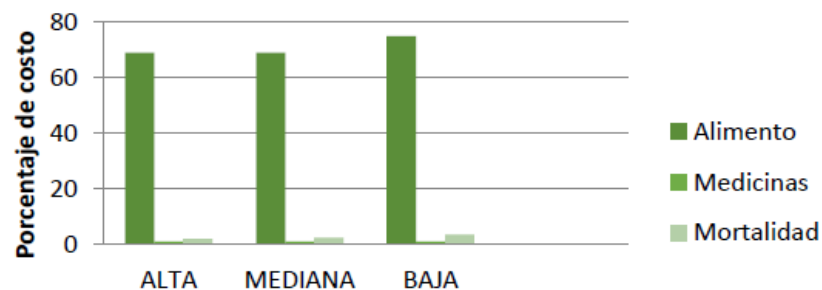


Figura 4. Porcentaje de costos en la producción avícola de acuerdo a su dimensión, por Rojas (2017)

Como se puede apreciar en la figura 4 la alimentación es el factor dentro de la producción avícola que ocupa un 70% del costo total es así que los parámetros que se encuentran directamente relacionados como la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia incorrecta, afecta el rendimiento final de la parvada.

Por otro lado, el manejo adecuado que incluye sanidad y control de enfermedades simplificado a los costos de medicina representa un 1% de los costos de producción, por ende la mortalidad sería mínima.

3.3.4. Bioseguridad en la producción de huevos

La bioseguridad se plantea como el conjunto de normas y procedimientos orientados a la prevención de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, o también se puede decir que es el conjunto de prácticas de manejo sanitarias e higiénicas que previenen la entrada de agentes patógenos en la producción avícola (Trevor, 2013).

La producción y comercialización de huevos es un proceso que debe ser controlado desde sus primeras etapas de vida, proporcionando a los animales una excelente alimentación, sanidad y manejo, para disminuir los riesgos de mortalidad, morbilidad y caídas de la producción, además de garantizar la obtención de huevos inocuos que además de ser un alimento nutritivo y altamente proteico, cumpla con los estándares de higiene y sanidad hasta llegar a su consumidor final. Los aspectos que integran el sistema de bioseguridad para la producción de huevos inocuos, se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1.

Factores que integran un sistema de bioseguridad

Factores que integran un sistema de bioseguridad	
Ubicación de la granja	Infraestructura de la granja
Registro de entradas y salidas	Señalética
Limpieza constante del personal	Aves silvestres/roedores/ mascotas
Overoles y botas	Lavado de vehículos, utensilios y equipos
Aves de traspaso	Calidad y saneamiento del agua
Productos de limpieza y desinfección	Saneamiento de sistemas de bebederos y comederos
Calidad y saneamiento del alimento	Todo dentro/Todo fuera
Manejo y eliminación de excretas y cadáveres	Manejo de la cama
Clasificación de parvadas	Reparaciones y mantenimiento de las instalaciones
Ventilación	Agentes patógenos
Estatus sanitario de la parvada	Nivel de inmunidad de las aves
Vectores de transmisión de enfermedades	Vacunación
Mediación	Monitoreo

Nota: Esta tabla muestra los componentes internos y externos en una explotación avícola necesarios para mantener la bioseguridad pecuaria.

Fuente: (Loaiza *et al.*, 2011)

Prácticamente se debe realizar un control preventivo de peligros ya sean físicos, químicos o biológicos que pongan en riesgo la inocuidad del alimento o comprometa la salud de la parvada. Estos riesgos deben ser evitados y si se encuentran presentes, eliminarlos.

3.4. El Huevo

El huevo es un alimento completo que llena los requerimientos nutricionales del ser humano ya que se halla compuesto del 74% de agua, 11% de lípidos y 12% de proteínas; en conjunto aportan muchos beneficios en su consumo como principal fuente proteica. Su estructura se compone de una cáscara fortalecida en calcio con apariencia porosa, la clara es la parte líquida de aspecto acuoso con coloración amarillenta. La yema se compone de capas amarillentas (Sastre *et al.*, 2003).

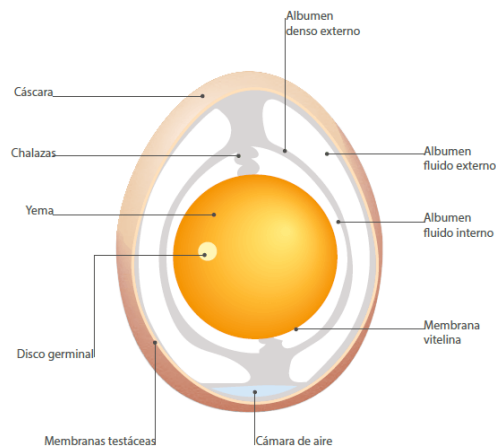


Figura 5. Partes del huevo, por Aguirre *et al.*, (2018)

3.4.1. La Cáscara

Las ovoporfirinas son las responsables de suministrar color al cascarón del huevo, este se halla constituido de carbonato y fosfato cálcico, magnésico y proteínas. Los poros proporcionan el intercambio gaseoso, se hallan en cantidad de 16.000 además poseen una cutícula que permite el paso de gases. Hasta cierto punto la contaminación microbiológica al huevo se produce por el traspaso de los microorganismos a las membranas (Belitz y Grosh, 2002).

3.4.2. La Clara

Dependiendo de la estirpe, edad del ave y edad del huevo la clara se llega a componer de 4 capas: interior y gruesa fluida, intermedia y fino exterior denso. La clara forma un 60% del 100% total de huevo (Belitz y Grosh, 2002).

3.4.3. La Yema

Está conformada por capas de coloración blanca y amarilla, membranas, disco germinal, entre otros. Para su formación pasa por tres etapas productivas: Embriogénesis, periodo juvenil y maduración sexual, periodo fértil. Comprende el 30% del 100% de la estructura del huevo (Belitz y Grosh, 2002).

3.5. Factores que determinan la calidad del huevo

Cuando se habla de calidad hace referencia a la capacidad de satisfacer con un producto o servicio las necesidades del cliente o consumidor (Sauveur, 2001).

En el caso del huevo de gallina, su aspecto físico, características organolépticas, su composición nutricional, entre otros, están en función de factores internos y externos afectados por el manejo, instalaciones, animales y personal técnico.

3.5.1. Calidad del huevo de expendio

El huevo producido en granja o finca debe mantener su calidad hasta ser receptado en bodega con la finalidad de que llegue en buen estado al consumidor, se deben considerar aspectos físicos, apilamiento de 15 cubetas, temperatura de 15°C, inexistencia de humedad y distribución de máximo tres semanas para mantener la frescura del producto (Tobar, 2012).

3.5.2. Calidad microbiológica del huevo

El huevo se considera un medio estéril bajo óptimas condiciones para el desarrollo del embrión, sin embargo, la estructura porosa de la cáscara favorece el intercambio gaseoso entre el embrión

y el medio ambiente, permitiendo de esta forma el ingreso de microorganismos, la pérdida de agua y dióxido de carbono (Moro, 2012).

Existen barreras propias de la estructura del huevo que cumplen con la función de protección al embrión ante el medio exterior , es así que se clasifican en tres:

- Barreras físicas: conformado por la cáscara y las membranas testáceas.
- Barrera mecánica: viscosidad del albumen (obstaculiza el ingreso de agentes patógenos).
- Barrera química: lisozimas de la clara (efecto antibacteriano).

No obstante, el huevo se encuentra expuesto a la contaminación externa en el momento de la postura por el contacto con la materia fecal, aquí prevalecen los cocos Gram-positivos y bacilos Gram-negativos, estos últimos tiene mayor facilidad de ingreso a través del cascarón, algunas de las principales bacterias encontradas en huevos son: *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Proteus vulgaris*, *Aeromonas* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., (Acosta, 2016).

Tabla 2.

Parámetros microbiológicos de huevos de gallina

Parámetro	Muestras	Aceptación	Rechazo
Recuento de aerobios mesófilos	5	10 ⁴	5x10 ⁴
<i>Escherichia coli</i> ufc externa	5	<50	50
<i>E. coli</i> ufc interno	5	Ausencia	Presencia
<i>Salmonella</i> spp en 25 g.	5	Ausencia	Presencia

Nota: Esta tabla muestra la cantidad de enterobacterias permisibles en huevos en relación a x10⁴ UFC/ml

Fuente: (INEN, 2013)

3.6. Mecanismos de transmisión de microorganismos en el huevo

El huevo puede tener contaminación biológica al momento de su paso por el trayecto de la cloaca en la gallina, sin embargo, el contenido interno es estéril. A pesar de ello en su exterior existen microorganismos ambientales que pueden difundirse a su interior y propagarse, claro que necesitan tener las condiciones apropiadas para su crecimiento. Se han estudiado tres posibles vías de contaminación en huevos: transmisión vertical, horizontal y lateral (Rincón *et al.*, 2001).

3.6.1. Transmisión vertical

En este tipo de transmisión el huevo durante su formación se contamina cuando el cascarón transita por la vagina y la yema en los ovarios u oviductos infectados.

La prevalencia de contaminación del huevo por *Salmonella* spp., no está exenta de presentarse ya que con facilidad esta bacteria puede estar en el sistema reproductor de las gallinas, presentando el riesgo de infectar el huevo antes de la formación de su cascarón, además que las gallinas pueden ser asintomáticas y realizar la postura con normalidad (Acosta, 2016).

3.6.2. Transmisión horizontal

En esta transmisión interviene el paso del huevo por la cloaca contaminándose de esta forma con materia fecal en su cascarón exponiéndose a la presencia de gérmenes ya que el huevo al momento de la puesta se encuentra susceptible al ingreso de microorganismos por medio de los poros presentes en su cascarón, hasta que se enfría, de esta forma las bacterias invaden y contaminan el contenido interno del huevo (Acosta, 2016).

3.6.3. Transmisión lateral

El tipo de transmisión lateral se da por contaminación a través del consumo de agua y alimento; presencia de animales o plagas; mal manejo en las instalaciones o en su almacenamiento, distribución, comercialización. Las bacterias contaminan el huevo según el tiempo de exposición de las mismas, además de requerir altas temperaturas y humedad relativa, por otra

parte, la circulación de aire es un vector que disemina o no los patógenos para favorecer la contaminación (Acosta, 2016).

Cabe recalcar que la presencia de microorganismos en el exterior del huevo es de corta sobrevivencia a menos que los altos niveles de humedad relativa y temperatura favorezcan su proliferación, de esta forma la contaminación tanto externa como interna duraría en huevos almacenados durante un largo período de tiempo (Acosta, 2016).

Tabla 3.

Vías de contagio de Escherichia coli en ponedoras

Cloaca	<i>Escherichia coli</i> presente en excretas accede a la vagina y trompas de falopio a causa del esfínter debilitado
Pared del intestino	<i>Escherichia coli</i> accede a la cavidad abdominal por medio del canal y la pared intestinal
Vías respiratorias	<i>Escherichia coli</i> atraviesa los sacos aéreos, penetrando en las trompas de falopio y cavidad abdominal

Fuente: (Schippers Agrícola, 2020)

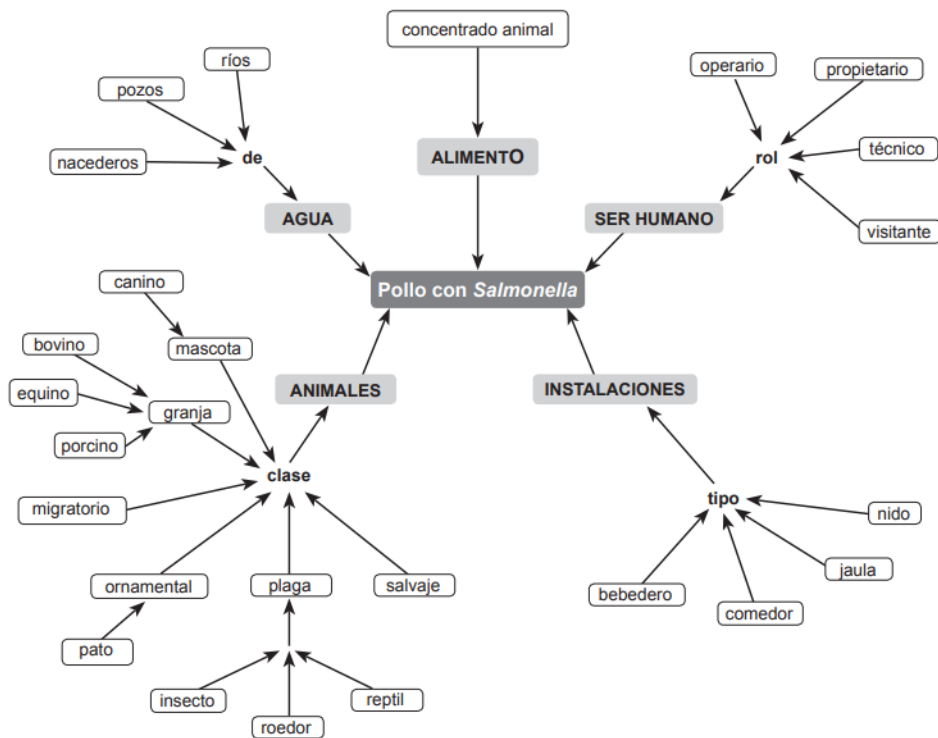


Figura 6. Vías de contagio de *Salmonella* spp., en aves, por Rincón *et al.*, (2011)

Es fundamental vigilar cada fase de la cadena productiva del huevo, mediante la identificación de peligros minimizar los riesgos sobre la proliferación de microorganismos patógenos en los alimentos destinados al consumo humano, además la calidad comercial debe mitigar la presencia virus, bacterias, hongos ya que pueden alterar la composición final del producto ocasionando que sea un alimento no apto para el consumo (Albán, 2018).

3.7. Bacterias

Las bacterias son seres vivos unicelulares pertenecientes a la clasificación procariota y se encuentran en todas partes, suelo, tierra, aire, agua; ya que son partes del ecosistema. Algunas bacterias soportan condiciones extremas de temperatura y presión para su supervivencia, además cabe recalcar que el organismo humano y animal se encuentra lleno de bacterias que conforman la flora saprófita, están en la piel, vías respiratorias, boca, sistemas digestivo,

urinario y reproductor, que en realidad son bacterias benéficas para nuestro organismo, por el contrario las bacterias conocidas como patógenos causan enfermedades (Rojas, 2017).

3.7.1. Clasificación de las bacterias

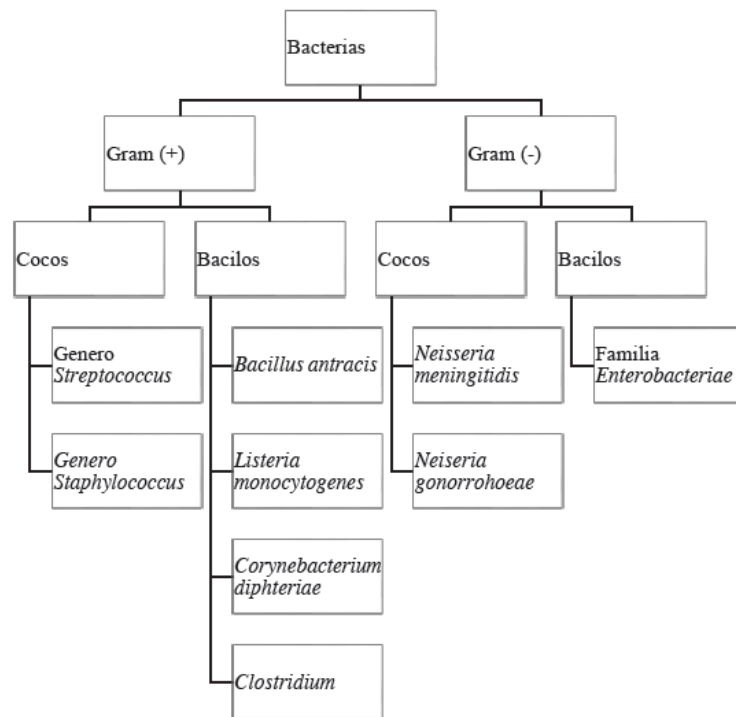


Figura 7. Clasificación de las bacterias, por Rojas (2017)

3.7.2. Enterobacterias

Las enterobacterias con origen en la familia *Enterobacteriaceae* se clasifican como bacilos gramnegativos, por lo tanto, se caracterizan por ser anaerobios facultativos con forma de varilla, son de fácil cultivo y pueden o no tener flagelos. Su hábitat es el intestino de los humanos y animales, entre los géneros predominantes se encuentran: *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp,

La mayoría de especies de enterobacterias se encuentran presentes en la naturaleza en especial en medio húmedos, además al ser hospedadoras del tracto digestivo se encuentran presentes en

la materia fecal, que al ser eliminado sirve como indicador de parámetros epidemiológicos en salud pública. *Escherichia coli* representa el 80% de la microbiota aeróbica intestinal por naturaleza, sin embargo, puede predisponer a ciertas infecciones en especial en organismos inmunosuprimidos.

De las enterobacterias hay dos bacterias potencialmente patógenas se trata de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Tabla 4.

Localización de infecciones más frecuentes de Enterobacterias por orden de prevalencia

Localización	Enterobacterias frecuentes
Sistema nervioso central	<i>Escherichia</i>
Tracto respiratorio inferior	<i>Klebsiella, Enterobacter, Escherichia</i>
Torrente sanguíneo	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter</i>
Tracto digestivo	<i>Salmonella, Shigella, Escherichia, Yersinia</i>
Tracto urinario	<i>Escherichia, Proteus, Klebsiella, Morganella</i>

Fuente: (Rojas, 2017)

3.7.3. Características de las Enterobacterias

Se caracterizan por ser bacterias gramnegativas generalmente bacilos, aunque en ocasiones en forma de cocabacilos, con un tamaño de 2 a 4 μm , no son exigentes por ende son de fácil proliferación, se consideran oxidasa negativa, con propiedades reductoras del nitrato a nitrito, son fermentadores y oxidadores bajo condiciones aeróbicas y algunos géneros poseen flagelo, pero otros no.

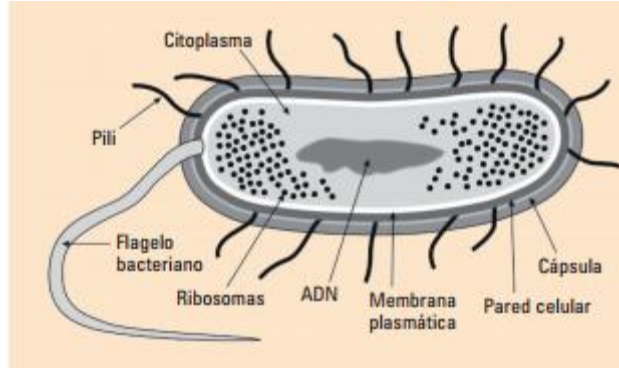


Figura 8. Estructura de una Enterobacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, por Schippers Agrícola (2020)

3.7.4. Bacterias que impactan en la industria avícola de postura

La microflora presente en el tracto digestivo de las gallinas varía en cantidad y composición de acuerdo a la edad del ave y a la estructura intestinal, los microorganismos presentes en esta estructura cumplen un rol metabólico importante en el desempeño del ave (NutriNews, 2020).

Durante el desarrollo del embrión el óvulo facilita las condiciones necesarias para el mismo, y sus estructuras anatómicas como la cáscara y cutícula lo protegen del medio externo, a pesar de esto, la cutícula se degrada con el tiempo y es ahí donde se facilita la colonización de bacterias desde el medio externo al interno. Al penetrar por los poros alcanza la capa mamilar⁴, su humedad favorece la multiplicación de las bacterias.

Bacterias como *Campylobacter* y *Salmonella* desarrollan una transmisión vertical desde la matriz al huevo, por ello debe tomarse en consideración las bacterias que colonizan el tracto reproductivo de la gallina, aunque las bacterias propias del tracto digestivo, colonizan al pollito antes del nacimiento y conforme va creciendo la microbiota aumenta, las especies presentes son: *Clostridium perfringens*, *Ruminococcus* spp., *Lactobacillus bulgaricus* y *Proteobacterias* spp., incluyendo *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*, las dos últimas mencionadas son la principal

⁴ Una de las cuatro capas del huevo

causa de trastornos digestivos y septicémicos en aves ocasionando pérdidas por mortalidad, además que las sobrevivientes portan la bacteria (NutriNews, 2020).

Tabla 5.

Bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de las aves

Sección intestinal	Bacterias
Buche	<i>Lactobacillus</i> +, <i>Streptococcus</i> + <i>E. coli</i> -, <i>Staphylococcus</i> +, <i>Streptococcus</i> +
Pro ventrículo	<i>Coliformes</i> <i>Lactobacillus</i> +, <i>Clostridium</i> +
Molleja	<i>coliformes</i> -, <i>Eubacterium</i> + , <i>Bacteroides</i> -
Yeyuno íleon	<i>Staphylococcus</i> +, <i>Streptococcus</i> +, <i>Lactobacillus</i> +, <i>Clostridium</i> +, <i>Bacteroides</i> -, <i>Eubacterium</i> +
Ciego	<i>Fusobacterium</i> -, <i>Bofidobacteria</i>

Fuente: (Rojas, 2017)

3.7.5. Características generales de *Salmonella* spp.

La bacteria *Salmonella* pertenece a las gramnegativas con flagelos móviles peritricos, anaerobios facultativos, no esporulados y con medidas de 1.5 µm de ancho hasta 5 µm de largo, abarca alrededor de 2.700 serovares excepto la serovariedad móvil con presencia de flagelos, Gallinarum-Pollorum. Es así que la *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, la primera se subdivide a su vez en seis subespecies:

- *Salmonella entérica*
- *Salmonella salamee*
- *Salmonella arizoanae*
- *Salmonella diarizonae*

- *Salmonella houtenae*
- *Salmonella indica*

En un 99% de las salmonelosis están estrechamente relacionadas con la subespecie *Salmonella entérica* que se encuentra presente en especies de sangre cálida, por el contrario, el resto de subespecies se encuentran en reptiles y el medio ambiente con menor potencialidad de virulencia.

3.7.6. Clasificación taxonómica de *Salmonella* spp.

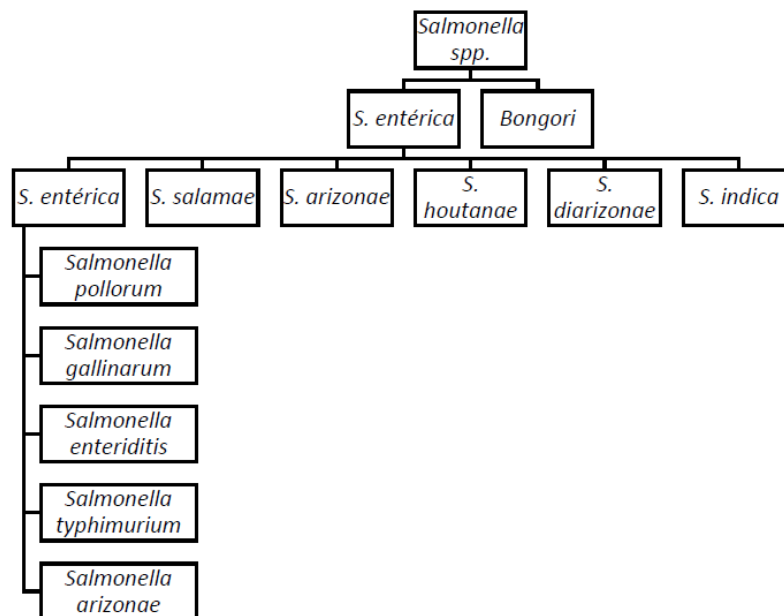


Figura 9. *Salmonella* Entérica y subespecies, por Rojas (2017)

Algunos serovares de *Salmonella* poseen estricta adaptación a un determinado huésped como es el caso de *S. Gallinarum* para las aves o *S.Typhi* en el caso del ser humano, sin embargo *S. Typhimurium* y *Enteritidis* se aíslan en aves, cerdos, bovinos, gatos, perros, pájaros y reptiles.

3.7.7. Toxiinfección por *Salmonella* spp.

La *Salmonella* da origen a la Salmonelosis, es una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) o mejor dicho una zoonosis ya que se transmite al ser humano cuando este consume productos de origen animal (huevos, carne, aves y leche) contaminados.

Tabla 6.

Condiciones y rangos óptimos para el desarrollo de Salmonella

Condiciones	Mínimo	Óptimo	Máximo
pH	3,8	7	9,5
Temperatura °C	7	35	46,2

Fuente: (RENAPRA, 2018)

La Salmonelosis origina síntomas como: fiebre alta, dolor abdominal, diarrea y vómitos, lo que se resumen en un cuadro de gastroenteritis, los síntomas aparecen en las primeras 6 a 72 horas y puede durar entre 4 y 7 días.

Los animales domésticos hospedadores de la *Salmonella* adquieren la bacteria por transmisión lateral, es decir que insectos, roedores, aves silvestres y el hombre son quienes en un inicio transfieren esta bacteria por medio de sus excretas, contaminando de esta forma el agua, alimentos y el medio ambiente, de esa forma los animales domésticos y sus productos derivados se contaminan. A continuación, se muestran los serotipos que se pueden presentar en aves.

Tabla 7.

Serotipos de Salmonella spp., en aves y la enfermedad que causan

Etiología	Enfermedad
<i>Salmonella pollorum</i>	Pullorosis aviar
<i>Salmonella gallinarum</i>	Tifoidea aviar
<i>Salmonella enteritidis</i>	Paratifoidea
<i>Salmonella typhimurium</i>	Paratifoidea
<i>Salmonella arizonae</i>	Arizonosis aviar

Fuente: (Rojas, 2017)

Es importante mencionar que la fiebre tifoidea y paratifoidea en humanos son ocasionadas por *Salmonella entérica* cepas *Typhi* y *Paratyphi* respectivamente, el hombre es el único reservorio de *Salmonella Typhi*, además en animales estos serotipos no son patógenos, por el contrario, los serotipos de *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* son bacterias dañinas en humanos y animales, produciendo toxiinfección asintomática. De acuerdo a la investigación realizada por el autor Montero (2016), los serotipos aislados de humanos son los siguientes.

- *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serotipo *Typhimurium* (19,2%)
- *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serotipo *Enteritis* (14,1%)
- *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serotipo *Newport* (9,3%)
- *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serotipo *Javiana* (5%)
- *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serotipo *Heidelberg* (4,9%)
- *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serotipo *Montevideo* (2,4%)

En el año 1990 en nuestro país se presentaron aproximadamente 9.908 casos de toxiinfección alimentaria por salmonelosis, aumentando para el año 2001 a 18.772 casos de esta enfermedad hasta que en el 2008 se presentaron descensos obteniendo un total de 3.286 casos, no obstante autor Montero (2016), en su estudio explica que entre enero y febrero del año 2012, 175 casos fueron reportados por *Salmonella* y del total 153 fueron válidos así cómo hubo 103 reportes confirmados por fiebre tifoidea y paratifoidea (MSP, 2012).

3.7.8. Detección de *Salmonella*

La detección temprana de *Salmonella* es fundamental en la industria avícola productora de huevos ya que se pueden mitigar los riesgos, enfermedades y pérdidas por contaminación con esta bacteria, además del daño que provoca a la salud pública.

Acosta (2016), expresa que en la industria de alimentos se realizan estudios microbiológicos de control y calidad mediante cultivos bacterianos enriquecidos que permiten confirmar la presencia de contaminantes en los alimentos. La eficacia de los medios de cultivo depende de la condición de las muestras, su mantenimiento y colonización.

El control bacteriológico de los huevos es un procedimiento que consta de varias etapas para el estudio de los componentes del huevo, ya que para el aislamiento de las bacterias presentes en el cascarón se requiere H₂O peptonada diluida en una bolsa estéril donde va a ser introducido el huevo, las muestras de la clara y la yema pueden ser tomadas de forma directa, pero deben estar diluidas para poder realizar el conteo de UFC. Posterior al aislamiento de las bacterias se requiere una identificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y una caracterización a través de la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).

Estrada *et al.*, (2012), menciona que para realizar el cultivo bacteriano del cascarón del huevo usó bolsas estériles con H₂O peptonada e introdujo el huevo dejándolo reposar 10 minutos y 1ml de esa solución la transfirió a 8ml de caldo de Tetratónato y esperó un día de incubación a 42°C, luego en cajas petri sembró en Agar Rambach, incubó durante un día a 37°C. Para la obtención de muestras de clara y yema obtuvo 1ml de muestra que transfirió a caldo de Tetratónato y continuó con el procedimiento mencionado anteriormente. El autor se basó en el método ISO además de las normas USDA.

Li *et al.*, (2006), en su experimento de detección de *Salmonella enteritidis* en muestras de leche y carne de pollo, para realizar la PCR, se basa en la amplificación del gen 16S rRNA región V3, en donde obtuvo 134 pb para *Salmonella enteritidis* tal como lo muestra la siguiente figura:

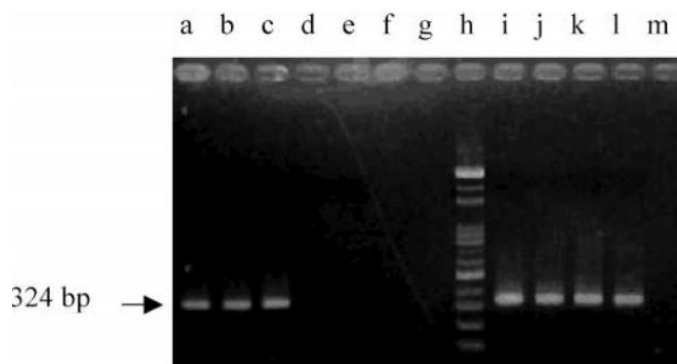


Figura 10. Amplificación del gen 16S, por Li *et al.*, (2006)

3.7.9. Características generales de *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, género *Escherichia*, especie *coli*, considerado un bacilo gram negativo, de fácil cultivo, anaerobio facultativo, por lo general es móvil por flagelos peritricos y prefiere una temperatura de 37°C para su crecimiento. Mide de 1 µm por 2-6 µm (OMS, 2016).

Una de las características que distinguen a la bacteria *Escherichia coli* es su capacidad de adherirse en las microvellosidades del epitelio intestinal, específicamente en sus los gangliósidos receptores, esta propiedad se atribuye a los componentes proteicos presentes en la bacteria, denominados adhesinas, mismas que se clasifican en: F1, F2, F3, F4, F41 Y F165; es así que las de tipo F1 son las principales participes de virulencia de las cepas aviares (Rojas, 2017).

3.7.10. Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

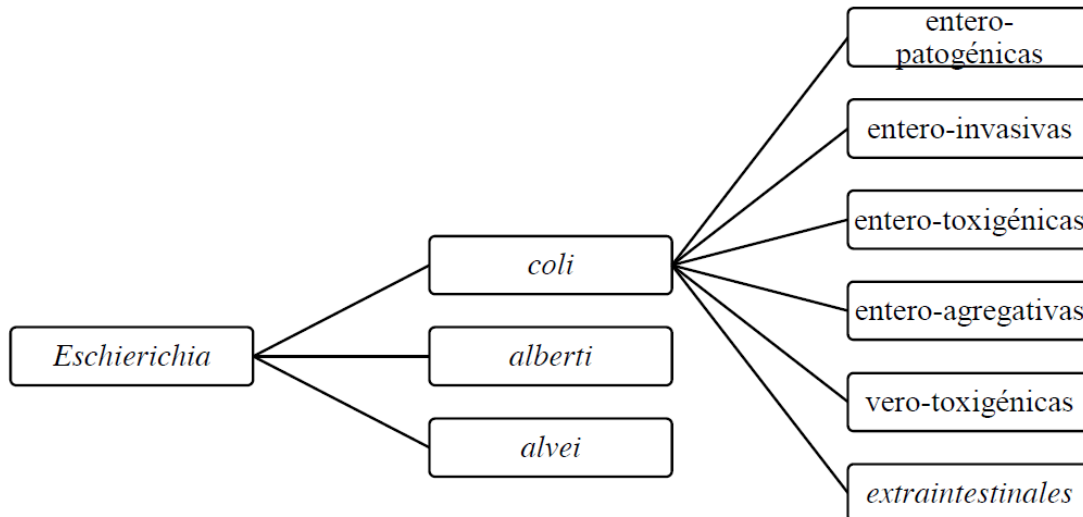


Figura 11. Clasificación de *Escherichia coli* de acuerdo a sus patotipos, por Gibert (2010)

Dentro de la clasificación de *Escherichia coli* verotoxigénico se encuentran los serotipos de *Escherichia coli* enterohemorrágicos como son:

- O157:H7 ó H-
- O26:H11
- O111:H-
- O145:H-
- O45:H2
- O128:H-
- O4:H-
- O103:H2

Siendo los serotipos responsables de los brotes de colitis hemorrágica en humanos, el serotipo O157 es el más común. Las aves son hospedadores y reservorio del serotipo O157:H7.

3.7.11. Toxiinfección por *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria presente en el intestino del ser humano y algunos animales de sangre caliente, las cepas pertenecientes a *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), causan enfermedades por transmisión alimentaria. Su importancia radica en la producción de toxinas altamente peligrosas como son las toxinas de Shiga. EHEC necesita un medio ideal para su crecimiento y proliferación con una temperatura óptima de 37 °C (Alimentaryá, 2015).

La enfermedad causada por EHEC se caracteriza por producir síntomas principales cómo: calambres abdominales y diarrea, la incubación de la enfermedad dura alrededor de 3 a 8 días, aunque los pacientes pueden recuperarse de la enfermedad, en niños y ancianos puede ser mortal. Se consideran reservorios potenciales los rumiantes, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos y aves (Alimentaryá, 2015).

Se requieren métodos de prevención y control dentro de la cadena alimentaria, desde la producción en granja, elaboración, fabricación, distribución y preparación de los alimentos (Alimentaryá, 2015).

La Colibacilosis aviar es una enfermedad que ataca directamente al sector avícola, comprometiendo la salud animal, alterando sus índices productivos: incrementos de la

conversión alimenticia, mortalidad, aves descartadas, decomisos y retraso del crecimiento; lo que generar pérdidas económicas en el sistema productivo.

La colibacilosis se presenta en las aves como una enfermedad secundaria, es decir que se adquiere cuando el organismo está inmunodeprimido por otras enfermedades aviares como Newcastle, Micoplasmosis, Bronquitis Infecciosa o Gumboro; dichas enfermedades como antecedentes favorecen el ingreso y colonización de *Escherichia coli*.

Tabla 8.

Factores que predisponen al ave a adquirir Escherichia coli

FACTORES PREDISPONENTES	
VIRUS	Adenovirus Aviar, Pneumovirus Aviar, Anemia Infecciosa, Enteritis Hemorrágica, Bronquitis Infecciosa, Enfermedad de Gumboro, Laringotraqueitis Infecciosa, Influenza Aviar, Enfermedad de Marek, Enfermedad de Newcastle
BACTERIAS	<i>Bordetella avium</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Mycoplasma gallisepticum</i> , <i>Mycoplasma meleagridis</i> , <i>Mycoplasma synoviae</i> .
PARASITOS	<i>Ascaridia dissimilis</i> , <i>Ascaridia galli</i> , <i>Eimeria brunetti</i> , <i>Eimeria tenella</i> , <i>Cryptosporidium baileyi</i> , <i>Histomonas meleagridis</i> , <i>D. gallinae</i> .
AMBIENTALES	Agua contaminada, exceso de partículas de polvo, restricciones de agua y/o comida, ventilación inadecuada, acúmulo de gases, temperaturas extremas, exceso de ruido, superpoblación, etc.
FISIOLOGICOS	Edad, periodo de pico de puesta, estrés, picaje, nerviosismo.

Fuente: (Gibert, 2010)

3.7.12. Detección de *Escherichia coli*

Gibert (2010), en su estudio “Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras” para el aislamiento microbiológico uso medios de cultivo agar McConkey y agar sangre, continuó con la identificación bioquímica IMVIC⁵,

⁵ Prueba para la identificación de bacterias: Indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato

seguido de la determinación del antígeno somático a través de la técnica de aglutinación con el medio líquido *Brain heart infusión*, para la PCR se centró en factores de virulencia específicos, concluye que la contaminación por *Escherichia coli* se da en algunos órganos del ave, especialmente en el peritoneo, hígado, pulmón y en menor cantidad en el riñón, además obtuvo 6 patotipos que abarcan el 78,7% de los aislados clínicos, obtuvo 12 serogrupos diferentes entre ellos: O78, O88, O1, O20 y O2.

En la experimentación de perfiles genéticos de *Escherichia coli* el autor Suwanto (2017), realizó una comparación de cepas amplificando el gen 16S rRNA para el desarrollo de la PCR, obtuvo 1.300pb para la bacteria *Escherichia coli*.

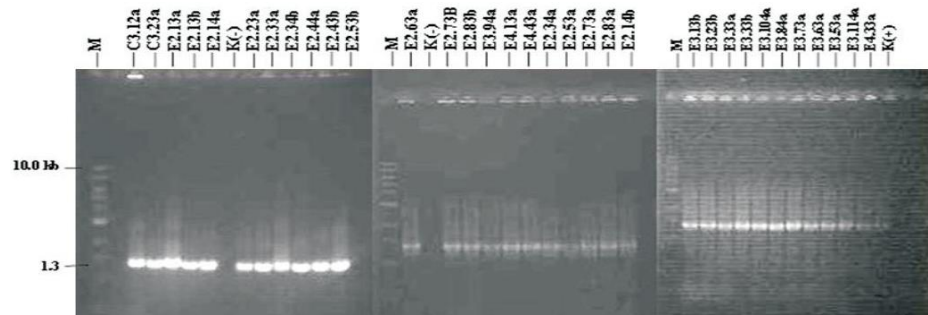


Figura 12. Amplificación del gen 16S para *Escherichia coli*, por Suwanto (2017)

Nota: El perfil genético del gen ADNr 16S de *Escherichia coli* presenta 1.300 pares de bases

3.8. Cuenta en placa de bacterias

Es un método aplicado en microbiología para determinar el contenido de microorganismos en muestras de alimentos y otros productos, la técnica aplicada es el conteo en placa, según el medio de cultivo y sus características se dará el crecimiento de bacterias específicas, esta premisa es un indicativo del nivel de contaminación de la muestra o producto en estudio.

Los microorganismos generados al formar colonias permiten aplicar la técnica de UFC/gr o ml, quiere decir que se realiza el conteo de unidades formadoras de colonias. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se realizan diluciones 1:10 antes de aplicarla en el medio de cultivo (Estrada *et al.*, 2012).

$$UFC/ml \text{ ó } UFC/g = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias por placa} * \text{factor de dilución}}{ml \text{ de la muestra sembrada}}$$

3.9. Ácido desoxirribonucleico (ADN)

El ADN está formado por nucleótidos (base nitrogenada + azúcar + grupo fosfato), su agrupación conforma un polímero, que resulta en un polinucleótido. La unión de nucleótidos se da por enlace covalente conformando una cadena que va en dirección 3'-5' y viceversa (Pérez de Saltos, 2010).

El ADN está conformado por dos cadenas en forma de doble hélice, a su vez estas cadenas están formadas por azúcar, fosfato y una base nitrogenada que se divide en purinas: adenina (A), guanina (G) y pirimidinas: citosina (C) y timina (T), su posicionamiento es lo que va a codificar la información genética (Pérez de Saltos, 2010).

3.10. Reacción en cadena polimerasa (PCR)

La PCR tiene un amplio campo de aplicación, para el control de la inocuidad de alimentos, en la industria alimentaria aplican esta técnica como método rápido y eficaz ante la detección de microorganismos, lo que permite detectar las posibles amenazas alimentarias (Alimentaryá, 2015).

La técnica PCR se basa en la amplificación de un pequeño segmento de ADN, es decir, la multiplicación de segmentos para la detección específica de su secuencia. PCR se usa para amplificar un fragmento de ADN, es útil para la identificación de virus y bacterias específicos (Bustin *et al.*, 2005).

El método se basa en amplificar una región específica de ácido nucleico en millones de copias, esto se logra a través de los amplicones que son productos de PCR y el segmento resultando de la amplificación de ADN conocido como diana, el progreso de amplificación tiene como modelo 2^n en dónde los ciclos son representados por n.

El proceso de PCR debe contener ADN o ARN, una polimerasa de ADN con estabilidad térmica, cuatro deoxinucleósido trifosfato, magnesio, oligonucleótidos cebadores y un tampón de esta manera se procede a ejecutar los pasos de: desnaturalización, hibridación y extensión.

- Desnaturalización: se separan las dos cadenas de ADN, con un calentamiento de 92°C a 98°C, dependiendo de la conformación de la cadena.
 - Hibridación: el cebador se une a la secuencia complementaria del molde desnaturalizado, para ello se emplea una temperatura de 65°C y 72°C. Los cebadores participan como los límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.
 - Extensión: el ADN molde es tomado por la polimerasa para sintetizar la cadena, empezando por el cebador para realizar la nueva síntesis, es así que agrega dNTP en dirección 5'→ 3'. Comúnmente se usa una temperatura de 72°C.
- (Rojas, 2017).

Este proceso se da con 20 a 35 ciclos (cambios de temperatura), dependiendo de parámetros como: enzima para la síntesis de ADN, concentración de dTNP, temperatura de unión entre cebadores, longitud del ADN.

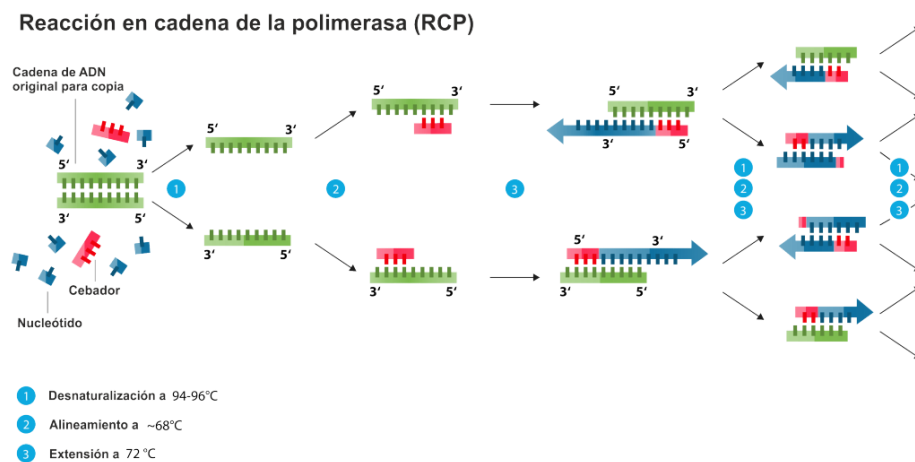


Figura 13. Etapas del proceso PCR, por Pérez de Saltos (2010)

Nota: Numerales 1, 2 y 3 indican el procedimiento de reacción en cadena polimerasa con sus respectivas temperaturas.

3.11. ADN ribosomal 16S

ARNr 16S también se denomina ADNr 16S y es un polirribonucleótido formado por 1.500 pares de bases, estructuralmente pertenece a los ribosomas procariotas de la subunidad 30S, es usado en el establecimiento de filogenias bacterianas ya que se considera un marcador universal porque está presente en la mayoría de los organismos (bacterias y arqueas), debido a sus regiones hipervariables puede proporcionar secuencias específicas lo que permite clasificar e identificar varias especies de bacterias o a su vez descubrir nuevas especies (Rodicio *et al.*, 2015).

El gen ADNr 16S como se mencionó anteriormente contiene regiones hipervariables que van de la V1 a la V9 de las cuales la V2 y V3 son las más aplicadas para diferenciar las especies bacterianas.

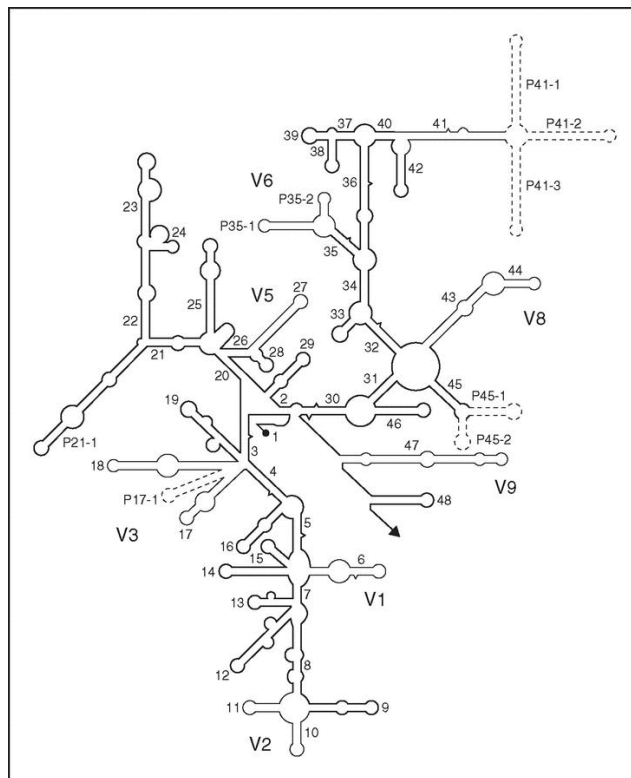


Figura 14. Estructura del ADNr 16S, por Rodicio *et al.*, (2015)

Nota: Se distinguen las nueve regiones hipervariables que conforman el gen ADNr 16s siendo V2 y V3 las regiones usadas para la diferenciación de especies bacterianas.

3.12. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

La técnica RFLP, en donde a partir de una muestra se obtienen secuencias de nucleótidos en el ADN por medio de enzimas de restricción, lo que genera varios cortes de diferente longitud en donde se reconoce la secuencia específica de acuerdo a la disposición del ADN (Nuez *et al.*, 2000)

Avise (2004), indica: “Los RFLP son marcadores genéticos del ADN y se pueden encontrar en regiones que codifican proteínas o exones, en los intrones o en el ADN que separa un gen de otro”.

La técnica RFLP se usa como marcador molecular para la identificación de muestras particulares, muestra la interacción genética entre individuos (Nuez *et al.*, 2000). Esta técnica se aplica a la par con PCR como mecanismo de detección de alelos en una región específica, con la PCR se amplifica el fragmento de un gen para posteriormente mediante RFLP con la aplicación de enzimas de restricción, cortar los fragmentos. Los pasos para este procedimiento son los siguientes:

- Extracción y purificación del ADN (PCR).
- Aplicación de enzimas de restricción para obtener los fragmentos de ADN.
- Electroforesis en gel, los fragmentos se separan a través del campo eléctrico generado.

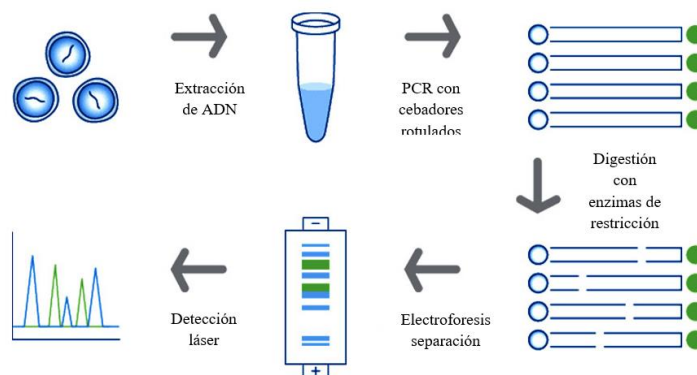


Figura 15. Procedimiento para RFLP, por Avise (2004)

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales, reactivos y equipos de laboratorio

4.1.1. Materiales de laboratorio

Tabla 9.

Materiales de laboratorio

Material	Cantidad	Actividad empleada
Tubos de ensayo	960	Análisis microbiológico y conteo de UFC, Aislamiento de bacterias
Guantes de látex	100	Análisis microbiológico y conteo de UFC, Aislamiento de bacterias, Extracción de ADN, PCR, RFLP
Micropipetas	5	Análisis microbiológico, Aislamiento de bacterias, Extracción de ADN, PCR, RFLP
Fundas Wirlpack	80	Análisis microbiológico
Cajas petri	480	Análisis microbiológico
Frascos boeco	5	Análisis microbiológico, PCR, RFLP
Lámparas de alcohol	2	Análisis microbiológico y conteo de UFC, Aislamiento de bacterias, Extracción de ADN
Pipetas Pasteur	480	Análisis microbiológico
Gradillas	3	Análisis microbiológico, Extracción de ADN, PCR, RFLP
Puntas expell esterilizadas	1000	Análisis microbiológico, Extracción de ADN, PCR, RFLP
Papel kraft	30	Análisis microbiológico

4.1.2. Equipos de laboratorio

Tabla 10.

Equipos de laboratorio

Material	Cantidad	Actividad empleada
Digital Dry Bath ACCU BLOCK™	1	Extracción de ADN
Cámara de flujo laminar	1	Análisis microbiológico, PCR
Balanza Analítica	1	Análisis microbiológico, Extracción de ADN, PCR, RFLP
Refrigeradora	1	Aislamiento de bacterias, Extracción de ADN, PCR, RFLP
Contador de colonias Stuart™	1	Conteo de UFC
Autoclave ICANCLAVE D®	1	Análisis microbiológico
Estufa	1	Análisis microbiológico y conteo de UFC
Cámara de electroforesis	1	PCR, RFLP
Vórtex	1	Extracción de ADN, PCR, RFLP
Termociclador	1	Extracción de ADN, PCR, RFLP
Transiluminador UV	1	PCR, RFLP
Fuente de poder	1	PCR, RFLP
Bandeja para preparar gel de agarosa	1	PCR, RFLP
Microcentrífuga	1	Extracción de ADN, PCR, RFLP
Microondas	1	Análisis microbiológico

4.1.3. Reactivos de laboratorio

Tabla 11.

Reactivos de laboratorio

Material	Cantidad	Actividad empleada
Agar EMB	1	Análisis microbiológico
Agar SS	1	Análisis microbiológico
Caldo nutritivo	1	Aislamiento de bacterias
Agua peptonada	1	Análisis microbiológico
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	1	Extracción de ADN
Etanol al 70%	1	Extracción de ADN
Agarosa	1	PCR, RFLP
TAE 1X	1	PCR, RFLP
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder	1	PCR, RFLP
Intercalante fluorescente Orange Diamond Thermo Fisher Scientific	1	PCR, RFLP
Primers Invitrogen	2	PCR
Agua libre de nucleasas	1	PCR, RFLP
Enzima de restricción Anza™ 11 EcoRI	1	RFLP
Enzima de restricción Anza™ 65 MspI	1	RFLP
Enzima de restricción HindIII	1	RFLP
Enzima de restricción Apal	1	RFLP
Enzima de restricción SacII	1	RFLP

4.1.4. Materiales de oficina

Tabla 12.

Materiales de oficina

Material	Cantidad	Actividad empleada
Software PRIMER-e	1	Caracterización mediante enzimas de restricción
Laptop hp	1	Redacción
Cámara fotográfica	1	Evidencia del trabajo
Software ArcGis 10,5	1	Diseño de mapa cartográfico
Software R Project 3,6,0	1	Realizar prueba estadística de los resultados obtenidos

4.2. Metodología

4.2.1. Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, cantón Ibarra provincia de Imbabura.

Ubicación: Av. Padre Aurelio Espinosa Polit.

Coordenadas: Latitud Norte 0° 20' 50" Longitud Oeste 78° 6' 29", Altitud 2210 msnm.

Clima: Cálido y templado. La temperatura media anual se encuentra a 16,3 °C. La precipitación es de 623 mm al año.

4.2.2. Ubicación del área de estudio



Figura 16. Sitios de muestreo, por ArcGIS (2020)

4.2.3. Variables

4.2.3.1. Variables dependientes

- Prevalencia de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*
- Serotipos de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*

4.2.3.2. Variables independientes

- Clara, yema y cascarón
- Sitios de expendio

4.3. Métodos

4.3.1. Determinación de la muestra

Según Hernández (2014), la aplicación de estadística no paramétrica en este tipo de estudios experimentales de carácter descriptivo y la aplicación de pruebas que permitan establecer diferencias significativas entre dos variables, se aplica con frecuencia en investigaciones que requieren conocer la naturaleza de una variable aleatoria, ya que de esa manera se predice su comportamiento para posteriormente realizar cálculos y métricas que establecen sus características.

Es así que según Acosta (2016), en su investigación titulada “Caracterización de *Salmonella* (*Salmonella* spp) en huevos frescos de gallinas mediante la utilización del sistema microgen gn a en la parroquia Cotaló” realizó un muestreo aleatorio de 229 huevos en dónde se estudió exclusivamente solo las yemas, además explica que la investigación es una evaluación estadística no paramétrica por lo cual no existen tratamientos ni diseño experimental ya que aplica la metodología explicada por Hernández (2014), además se basa en la estadística descriptiva y la aplicación de una prueba para la comprobación de la hipótesis.

Por otra parte según Estrada y Valencia (2012), en su trabajo de grado “Determinación de *Salmonella* spp., en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito”, selecciona aleatoriamente los huevos en todos los expendios y para establecer el tamaño de la muestra se basa en la cantidad de mercados ubicados en la ciudad de Quito, el número de expendios seleccionados y la toma de las muestras; es así que escogió al azar 15 mercados y de cada uno obtuvo seis huevos para su estudio. No aplica diseño experimental ni tratamientos, usa la metodología de Hernández (2014).

Según Rojas (2017), en su proyecto titulado “Estudio de la prevalencia de *Salmonella* y *E.coli*, en pollos de engorde de planteles avícolas del cantón Ibarra, mediante análisis microbiológico, PCR y RFLP, para la propuesta de un plan de manejo sanitario” determinó la muestra mediante métodos de muestreo no probabilísticos ya que de lo contrario el estudio implica gastos elevados, consideró para ello las políticas de manejo sanitario y nutricional integrados en un

mismo ambiente y para la misma fase fisiológica de las aves, de esta manera no aplica diseño experimental sino más bien una prueba t Student para la comprobación de su hipótesis. Además cita al autor Hernández (2014), quien menciona:

“Las muestras no probabilísticas pueden también llamarse muestras dirigidas, pues la elección de casos depende del criterio del investigador”

Considerando lo anteriormente expuesto, para determinar la muestra en la presente investigación se realizó por métodos de muestreo no probabilísticos, ya que para la aplicación del muestreo probabilístico en estudios exploratorios como es el caso resulta elevadamente costoso, es por ello que se recurre a métodos no probabilísticos (Hernandez, 2014), es así que de acuerdo al enfoque de este estudio, por la grande cantidad de expendios en la ciudad de Ibarra se consideraron solo los principales de acuerdo a la base de datos obtenida y por la gran producción de huevos a nivel nacional se considera tomar al azar 10 muestras de cada fuente de expendio obteniendo un total de 480 muestras procesadas (figura 18), además de que no se muestrea desde la fuente primaria de producción, para realizar el estudio con una muestra representativa se recolectó de la siguiente manera, replicando la técnica de recolección de los autores (Acosta, 2016) (Estrada y Valencia, 2012) (Rojas, 2017):

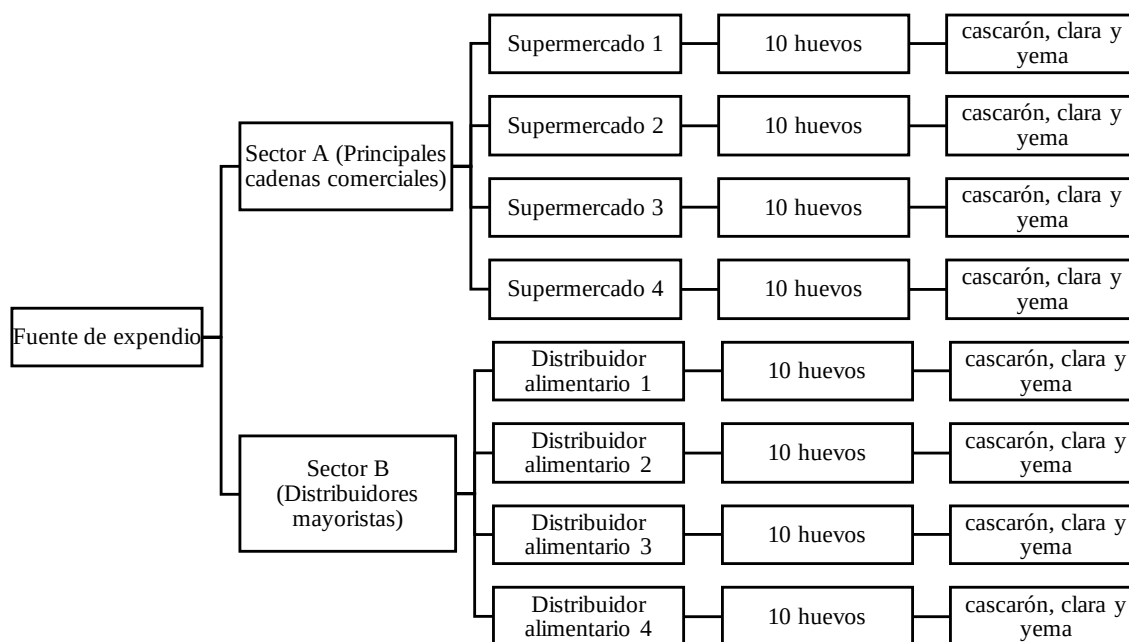


Figura 17. Definición y recolección de las muestras

Para definir los lugares de toma de muestra se buscó un catastro que indique los principales establecimientos de abasto de huevos de gallina en la ciudad de Ibarra, sin embargo en el Ilustre Municipio de San Miguel de Ibarra no existe un registro de acuerdo a los establecimientos y sus actividades, solo se registran los establecimientos para su permiso de funcionamiento, así lo indicó un funcionario de la institución (C. Vaca, comunicación personal, 17 de febrero, 2020).

Por otro lado en la Agencia de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), tampoco existe un catastro acerca de los establecimientos de abasto de huevos de gallina en la ciudad de Ibarra, sólo del registro de la actividad comercial, sin embargo por conocimiento propio del técnico S. Soto (comunicación personal, 17 de febrero, 2020) dio a conocer los establecimientos más grandes que distribuyen huevos de gallina, por ende esos fueron tomados en cuenta para realizar la toma de muestras (Anexo 1).

4.3.2. Toma de muestra

Para la toma de muestra se acudió a los principales establecimientos de expendio de huevos de gallina y de cada lugar se adquirió una cubeta de huevos que sería trasladada al Laboratorio de

Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra para su posterior análisis.

Además, en cada sitio de expendio se recopiló información acerca de la procedencia del producto, el tiempo de permanencia en el establecimiento, la cantidad de abasto y el nivel de bioseguridad para su posterior análisis en los resultados finales.

4.3.3. Trabajo de laboratorio

4.3.3.1. Análisis microbiológico y conteo de UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

Inicialmente se preparó Agar EMB, Agar SS, Agua peptonada y caldo nutritivo siguiendo las instrucciones del fabricante, tubos de ensayo con agua destilada estéril, placas Petri y puntas expell esterilizadas, luego con la aplicación de una cámara de flujo laminar, se procedió a realizar la siembra de las muestras en las cajas Petri, tal como lo hizo el investigador Estrada *et al.*, (2012), en su experimentación siguiendo el siguiente orden:

1. Se depositó 100 ml de Agua peptonada en una funda Wirlpack y se introdujo el huevo dejándolo reposar 3 min.
2. Se tomó 1 ml del líquido y se realizó cuatro diluciones (1:10000) en los tubos de ensayo previamente esterilizados con agua destilada.
3. Del tubo de la cuarta dilución se tomó 1 ml y se depositó en la caja Petri con Agar EMB y lo mismo para el Agar SS.
4. Con una pipeta Pasteur se distribuyó uniformemente el líquido en la placa.
5. Se incubó las placas en la estufa a 35°C por 48 horas
6. Para aislar las bacterias presentes en clara y yema se siguió el orden de los pasos desde el literal (2).

Es así que por cada huevo se necesitó:

- 12 tubos de ensayo con agua destilada estéril
- 1 funda Wirlpack
- 3 cajas Petri con Agar EMB (clara, yema, cascarón)

- 3 cajas Petri con Agar SS (clara, yema, cascarón)
- 100 ml de Agua peptonada
- 15 puntas expell esterilizadas

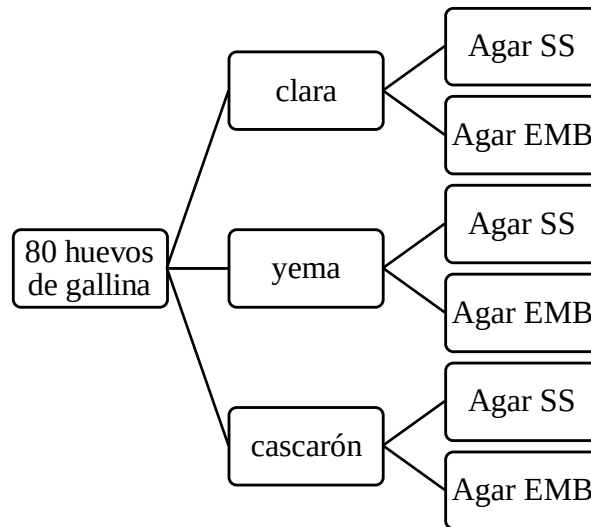


Figura 18. Clasificación de las muestras para cultivo SS y EMB

Nota: 80 huevos de gallina x 3 componentes del huevo (clara, yema, cascarón) x 2 (medios de cultivo) = 480 cultivos bacterianos de huevo

Posterior a las 48 horas de incubación se verificó el crecimiento bacteriano y se realizó el conteo de UFC para *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*.

4.3.3.2. Aislamiento de colonias de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*

Del total de 480 placas Petri sembradas, solo 26 presentaron crecimiento bacteriano, por lo tanto para el aislamiento de las colonias se necesitó 26 tubos de ensayo con 5ml de caldo nutritivo (NutrientBroth), previamente esterilizados en autoclave a 121°C y 1.5 atm durante 45 minutos (Estrada *et al.*, 2012) (Gibert, 2010).

En un ambiente estéril y mediante la llama de un mechero, con un asa estéril se tomó las colonias de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* se depositó en los tubos con caldo respectivamente. Por último se dejó las muestras en el refrigerador mínimo durante 48 horas hasta proceder a la extracción de ADN (Loaiza *et al.*, 2011).

4.3.3.3. Extracción de ADN

Con las colonias de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* previamente aisladas y cultivadas en caldo nutritivo (NutrientBroth) se procedió a la extracción de ADN de bacterianas gramnegativas con el uso del Mini kit de ADN genómico PureLink™ del proveedor Invitrogen, utilizando el protocolo del fabricante, mismo que se encuentra en su página web (Invitrogen, 2018).

Lisado de células bacterianas gramnegativas

1. Se colocó 1 ml del cultivo bacteriano a un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó a 10000 rpm (revoluciones por minuto) por 30 segundos, se desechó el sobrenadante y se volvió a centrifugar 3 veces más hasta lograr una adecuada sedimentación.
2. Se re suspendió el sedimento celular en 180 µl de tampón de digestión genómica PureLink™. Se añadió 20 µl de proteinasa K para lisar las células. Se mezcló bien por breve agitación.
3. Se incubó los tubos a 55°C por 30 minutos.
4. Se agregó 20 µl de ARNasa A para la lisis, se mezcló bien por breve agitación, y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.
5. Se agregó 200 µl tampón de unión / lisis genómica PureLink™ y se mezcló por vórtex para obtener una solución homogénea.
6. Se agregó 200 µl de alcohol al 96-100% para el lisado. Se mezcló bien con vórtex por 5 segundos para producir una solución homogénea.
(Invitrogen, 2018).

Unión del ADN

1. Se retiró la columna de centrifugado PureLink™ en un tubo de recolección.
2. Se añadió el lisado del numeral (6).
3. Se centrifugó la columna a 10.000 rpm (revoluciones por minuto) por 1 minuto a temperatura ambiente.

4. Se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna de centrifugado en un tubo de recolección PureLink™ limpio.

(Invitrogen, 2018)

Lavado de ADN

1. Se añadió 500 µl de tampón de lavado genómico PureLink™ 1 con alcohol a la columna.
2. Se centrifugó la columna a 10.000 rpm (revoluciones por minuto) por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna de centrifugado en un tubo de recolección PureLink™ limpio.
4. Se añadió 500 µl de tampón de lavado genómico PureLink™ 2 con alcohol a la columna.
5. Se centrifugó la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente.
Se desechó el tubo de recolección.

(Invitrogen, 2018)

Elución de ADN

1. Se añadió 100 µl de tampón de elución genómico PureLink™ a la columna.
2. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó la columna a velocidad máxima por 1 minuto a temperatura ambiente.
3. El tubo contiene ADN genómico purificado.

(Invitrogen, 2018)

Almacenado de ADN

1. Se almacenó el ADN en el congelador a -20°C para su posterior análisis de PCR
(Invitrogen, 2018).

4.3.3.4. Amplificación de ADN mediante la técnica de la PCR

A través de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se procedió a la amplificación del gen ADN_r 16s, en dónde se usó Primers (iniciadores) universales para el dominio de bacterias, 907r (926r) y P3 (341f). La mezcla de 24 µl de volumen final contiene:

- 4,5 µl de agua libre de nucleasas
- 12,5 µl de Master Mix
- 1 µl de primer 907r (926r a una concentración de 0,10µM)
- 1 µl de primer P3 (341f a una concentración de 0,10µM)
- 5 µl de ADN

(TermoFisher, 2020).

Posteriormente se colocó las muestras en el termociclador, configurado de la siguiente manera: se eleva la temperatura a 94°C durante 5 minutos, proceso denominado desnaturalización, luego el alineamiento a 55,6°C por 45 segundos y la fase de elongación a una temperatura de 72°C por 90 segundos.

Por consiguiente, otro proceso de desnaturalización a 94°C por 30 segundos de la misma forma el alineamiento a 55,6°C por 45 segundos y por último una extensión final a 72°C por 90 segundos (Pérez de Saltos, 2010).

Tabla 13.

Primers usados para la amplificación del gen ARNr 16S

Primers	Secuencia	Tamaño esperado	Referencia
907r	5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3'	926pb	Muyzer, 1995
P3	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3		

Fuente: (Andrade, 2016)

4.3.3.5. Electroforesis para PCR

De acuerdo con el autor Bustin *et al.*, (2005), detalla en su investigación el procedimiento para realizar PCR, es así que inicialmente se requirió un volumen de 100 ml para obtener el gel de agarosa al 1%, para lo cual se empleó TAE Buffer con concentración 1X y se efectuó la siguiente ecuación:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{100\text{ml} * \text{TAE Buffer } 1X}{\text{TAE Buffer } 10X}$$

$$V1 = 10 \text{ ml TAE Buffer } 10X$$

Es así que en un frasco boeco de 100ml se colocó 10 ml TAE Buffer 10X + 90 ml de H₂O destilada + 2 gramos de agarosa. Luego se introdujo en el microondas durante 1 minuto hasta que la mezcla quede homogénea y cristalina, luego se colocó 5µl de GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, mismo que proporciona una tinción fluorescente extremadamente sensible para la detección de ácidos nucleicos, a través del transiluminador. Posteriormente se calibró el casete y se dispersó el gel sobre este, se colocó el peine y se esperó aproximadamente 5 minutos hasta que esté solidificado.

Para comprobar la extracción exitosa de ADN, en el gel solidificado se procedió a colocar en el primer y último pocillo 3µl de TrackIt™ Cyan/Orange Loading Buffer + 3µl de Plus DNA Ladder, en los demás pocillos se depositó una mezcla de 5µl de ADN + 3µl de 6X DNA Loading Dye. Se ajustó los polos positivos y negativos y se calibró el voltaje y el tiempo a 90V por 40 minutos respectivamente.

A continuación, para poder observar la amplificación del gen ADNr 16s con los cebadores 907r-P3f, el gel solidificado se situó en la cámara de electroforesis y en el primer y último pocillo se colocó una mezcla de 3µl de TrackIt™ Cyan/Orange Loading Buffer + 3µl de Plus DNA Ladder, en los demás pocillos se depositó 5µl de PCR, se ajustó los polos positivos y negativos y se calibró el voltaje y el tiempo a 90V por 40 minutos respectivamente.

Una vez listo el gel se llevó hasta el transiluminador y se visualizó el tamaño de los productos amplificados.

4.3.3.6. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Para realizar el procedimiento de RFLP se usó 5 enzimas de restricción para distinguir mayor variabilidad y detección de polimorfismos ya que se descubre de mejor forma las mutaciones

entre las especies de una misma cepa (Rojas, 2017). Las enzimas de restricción que se usó son las siguientes:

Tabla 14.

Enzimas de restricción Promega

Enzima de Restricción	Apal	SacII	HindIII
Proveedor	Promega		
Sitio de restricción	G GGCC▼C C▲CCGG G	CC GC▼GG GG▲CG CC	A▼AGCT T T TCGA▲A

Fuente: (Promega, 2017)

Tabla 15.

Enzimas de restricción Termofisher

Enzima de Restricción	Anza 11 EcoRI	Anza 65 MspI
Proveedor	TermoFisher	
Sitio de restricción	5'...G^A A T T C...3' 3'...C T T A A^G...5'	5'...C^C G G...3' 3'...G G C^C...5'

Fuente: (TermoFisher, 2020)

Tabla 16.

Protocolo para el uso de enzimas de restricción

Componente	Volumen
Agua libre de nucleasas	16µl
Tampón de enzima de restricción 10X	2µl
Producto de PCR	1µl
Enzima de restricción	1µl
Volumen final	20µl

Fuente: (TermoFisher, 2020) (Promega, 2017)

Se procedió a centrifugar los tubos por algunos segundos a velocidad máxima y se incubó en el termociclador a 37°C durante 15 minutos.

4.3.3.7. Electroforesis para RFLP

De acuerdo a las instrucciones de los fabricantes Invitrogen (2018), y ThermoFisher (2020), Se preparó la misma mezcla requerida en la Electroforesis para PCR, por lo cual se desarrolla el mismo procedimiento, la diferencia radica en la deposición de los productos en los pocillos del gel, ya que se depositó 4 µl de los productos de:

- RFLP con 0,4µL de Anza 11 EcoRI
- RFLP con 0,4µL de Anza 65 MspI
- RFLP con 0,4µL de ApaI
- RFLP con 0.4µL de SacII
- RFLP con 0.4µL de HindIII

Se ajustó los polos positivos y negativos y se calibró el voltaje y el tiempo a 90V por 40 minutos respectivamente.

Una vez listo el gel se llevó hasta el transiluminador y se visualizó el tamaño de los productos amplificados.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Prevalencia de *Salmonella* spp.

En la investigación se constató que de los 240 cultivos microbiológicos de *Salmonella* spp., al menos 10 muestras resultaron contaminadas con esta bacteria, es decir que del 100% aproximadamente el 4,16% de cultivos presentan contaminación con *Salmonella* spp.

5.1.2. Análisis de la cantidad de UFC de *Salmonella* spp., por fuentes de expendio

Las fuentes de expendio del cantón Ibarra presentan contaminación de la bacteria *Salmonella* spp., sin embargo, el sector B (Distribuidores mayoristas) desarrolla una mayor prevalencia en comparación al sector A (Principales cadenas comerciales), es así que se obtiene como promedio un total de $7,19 \times 10^4$ UFC/ml y un rango de 2×10^4 UFC/ml hasta $19,6 \times 10^4$ UFC/ml.

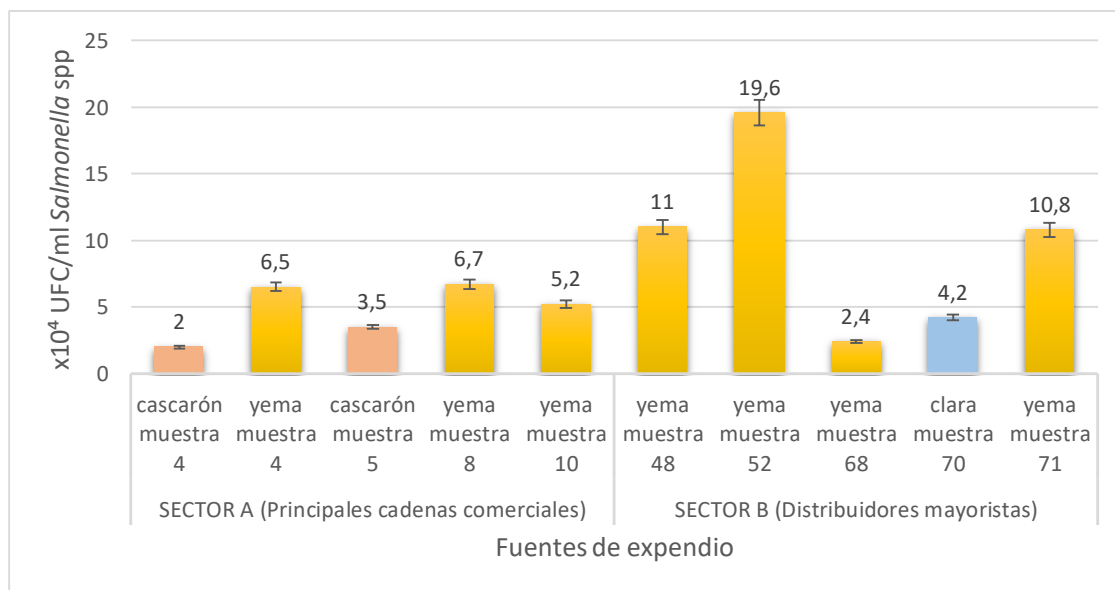


Figura 19. Promedio de UFC/ml de *Salmonella* spp., en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.

Como se puede apreciar en la figura 19 se encontró mayor prevalencia de *Salmonella* spp., en el Sector B correspondiente a los distribuidores mayoristas, esto se puede deber a que el producto de estas fuentes, no cumplen con las medidas sanitarias ni de bioseguridad adecuada ya sea en el sitio de producción, transporte, almacenamiento, etc. Son muchos los factores que definen la contaminación del huevo a nivel de cascarón, clara y especialmente yema en dónde se encontró mayor contaminación.

Moro (2012), indica que las yemas incorporan y secuestran los residuos durante semanas anteriores a la ovulación, esto se debe a la capacidad de los ovarios para captar contaminantes, estos ingresan a la yema por medio del alimento que las gallinas consumen, y por ende a los productos obtenidos de las mismas.

Loaiza *et al.*, (2011), recalca que por lo general las bacterias como *Salmonella* spp., se localizan en la clara pero a medida que el huevo envejece, las membranas de la yema se deterioran y permiten el ingreso de microorganismos, la temperatura ambiente favorece la proliferación de los mismos, lo ideal es mantener el producto en refrigeración.

5.1.3. Análisis de la cantidad de UFC/ml de *Salmonella* spp., por sectores A y B (principales cadenas comerciales y distribuidores mayoristas)

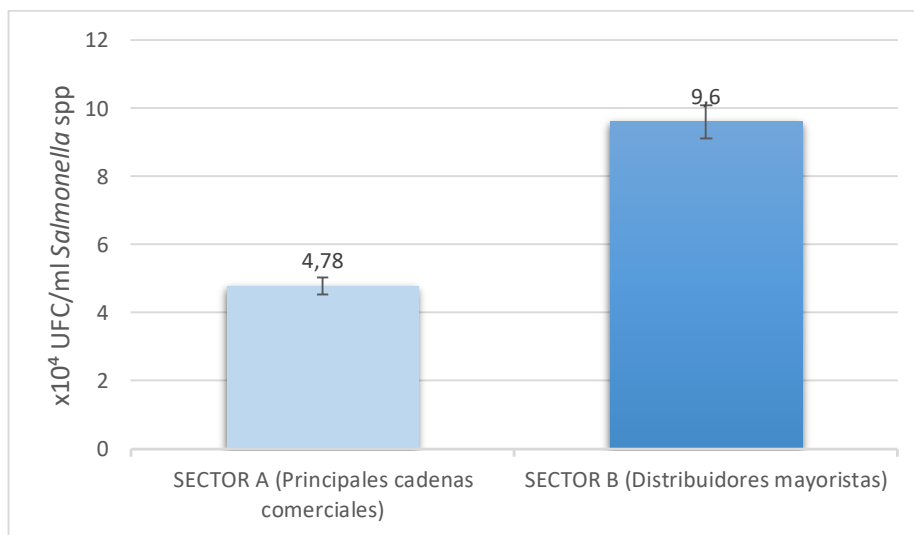


Figura 20. Promedio de UFC/ml de *Salmonella* spp., en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.

Para un mejor análisis se realizó un promedio de los valores obtenidos en el conteo de UFC/ml de la bacteria *Salmonella* spp., dando como resultados que el sector A presenta una cantidad de $4,78 \times 10^4$ UFC/ml en 5 muestras contaminadas, y el sector B una cantidad de $9,6 \times 10^4$ UFC/ml en 5 muestras igualmente. Esta diferencia de promedios se atribuye a la aplicación o ausencia de protocolos de salubridad en la cadena productiva y comercial del huevo comercial de gallina.

Como método de comprobación estadística se realizó la prueba t Student en el programa RStudio, aplicando un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ (Tabla 16).

Hipótesis nula: $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alternativa: $\mu_1 \neq \mu_2$

Dónde μ_1 representa al sector A y μ_2 representa al sector B

Tabla 17.

Prueba t Student del promedio de UFC/ml de Salmonella spp., en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.

Variables	
Media	$7,19 \times 10^4$ UFC/ml
Varianza	$19,95 \times 10^4$ UFC/ml
Observaciones	10
Coeficiente de correlación de Pearson	0,98
Diferencia hipotética de las medias	0,00
Grados de libertad	9
Estadístico t	$0,13 \times 10^4$ UFC/ml

Como se puede observar en la tabla 16 se verifica que existe diferencia estadística entre los contajes de UFC encontrados en el sector A (Principales cadenas comerciales) y el sector B (Distribuidores mayoristas) en el caso de *Salmonella* spp., aceptándose así la hipótesis alternativa, la cual establece que el sector A es diferente del sector B, siendo este último el que mayor prevalencia de *Salmonella* spp., presentó.

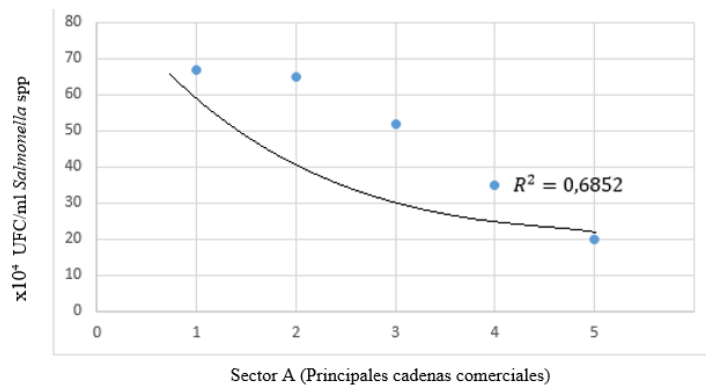


Figura 21. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de *Salmonella* spp., y el sector A (Principales cadenas comerciales)

Como se observa en la figura 21, se encontró que los puntos se acercan a la línea de tendencia, el valor R^2 es mayor a 0,5 indicando que existe una correlación lineal significativa, de tal forma que a mayor cantidad de muestras tomadas en el sector A mayor será la presencia de *Salmonella* spp., en los análisis.

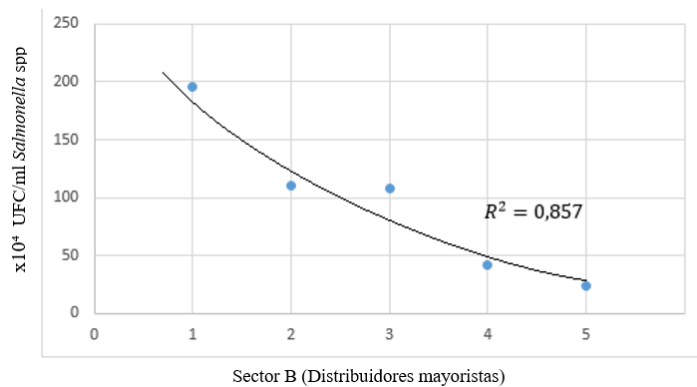


Figura 22. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de *Salmonella* spp., y el sector B (Distribuidores mayoristas)

Como se observa en la figura 22 se encontró que los puntos se acercan a la línea de tendencia, el valor R^2 es mayor a 0,5 indicando que existe una correlación lineal significativa, de tal forma que a mayor cantidad de muestras tomadas en el Sector B mayor será la presencia de *Salmonella* spp., en los análisis.

5.2. Prevalencia de *Escherichia coli*.

En la investigación se constató que de los 240 cultivos microbiológicos de *Escherichia coli*, al menos 8 muestras resultaron contaminadas con esta bacteria, es decir que del 100% aproximadamente el 3,33% de cultivos presentan contaminación de *Escherichia coli*.

5.2.1. Análisis de la cantidad de UFC/ml de *Escherichia coli* por fuentes de expendio

Las fuentes de expendio de huevo de gallina en el cantón Ibarra arrojaron resultados de contaminación de *Escherichia coli* en los componentes del huevo, clara, yema y cascarón, se obtuvo un promedio de $17,9 \times 10^4$ UFC/ml y un rango de $1,9 \times 10^4$ UFC/ml hasta 72×10^4 UFC/ml.

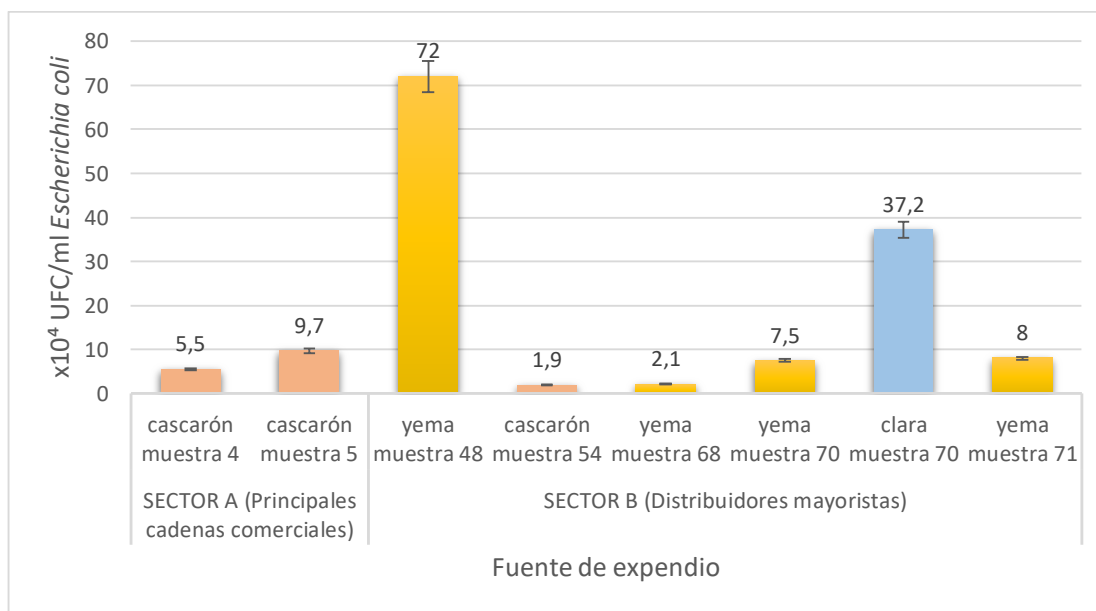


Figura 23. Promedio de UFC/ml de *Escherichia coli*., en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.

Como se puede apreciar en la figura 23, se obtuvo mayor prevalencia en el sector B, específicamente por la muestra de yema 48 con 72×10^4 UFC/ml y la muestra de clara 70 con $37,2 \times 10^4$ UFC/ml, la explicación a estos resultados se hallan en la información proporcionada por el Médico Veterinario Vásquez (2011), quién en su publicación detalla que cuando la cutícula no ejerce su función de impermeabilidad y efecto tapón de los poros del cascarón del huevo, la *Escherichia coli* invade su contenido interno, aunque hay otros factores que

predisponen a esta contaminación de forma lateral, por medio de la inadecuada manipulación del huevo recién puesto, mal desarrollo de la recolección, incorrecta desinfección e irregulares condiciones de almacenamiento.

Además de los factores mencionados anteriormente hay bacterias como la *Pseudomona* que predisponen con facilidad a la contaminación del huevo con otros microorganismos.

Gibert (2010), en su investigación destaca que han desarrollado estudios sobre la similitud que pueden presentar cepas patógenas de *Escherichia coli* aviares (APEC) y de origen humano, que causa brotes toxiinfecciosos, y advierte que si tienen la capacidad de transmitir una zoonosis, ya que incluso comparten serotipos y factores de virulencia.

5.2.2. Análisis de la cantidad de UFC/ml de *Escherichia coli* por sectores A y B (principales cadenas comerciales y distribuidores mayoristas)

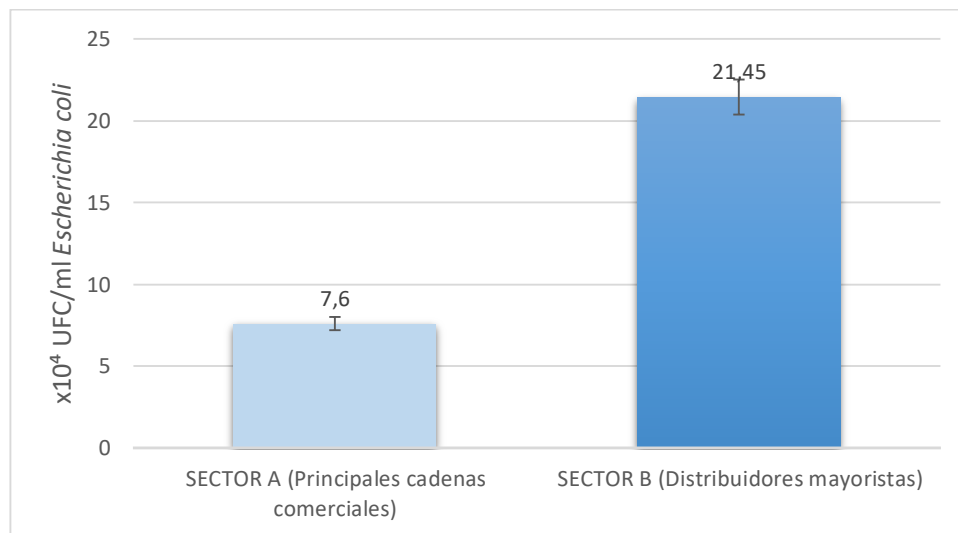


Figura 24. Promedio de UFC/ml de *Escherichia coli* en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.

Como se visualiza en la figura 24, el promedio de UFC/ml de *Escherichia coli* es mayor en el sector B, con un total de 6 muestras contaminadas y el sector A tiene un total de 2 muestras contaminadas. La presencia de este contaminante podría resultar patógeno para los mamíferos en especial para el hombre.

Como método de comprobación estadística se realizó la prueba t Student en el programa RStudio, aplicando un nivel de significancia $\alpha = 0,05$ (Tabla 18).

Hipótesis nula: $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alternativa: $\mu_1 \neq \mu_2$

Dónde μ_1 representa al sector A y μ_2 representa al sector B

Tabla 18.

Prueba t Student del promedio de UFC/ml de Escherichia coli en las fuentes de expendio de huevo comercial de gallina.

Variables	
Media	$18,2 \times 10^4$ UFC/ml
Varianza	$19,2 \times 10^4$ UFC/ml
Observaciones	10
Coeficiente de correlación de Pearson	0,96
Diferencia hipotética de las medias	0,00
Grados de libertad	9
Estadístico t	$0,13 \times 10^4$ UFC/ml

Como se puede observar en la tabla 17, se verifica que existe diferencia estadística entre los contajes de UFC/ml encontrados en el sector A (Principales cadenas comerciales) y el sector B (Distribuidores mayoristas) en el caso de *Escherichia coli*, aceptándose así la hipótesis alternativa que establece que la no igualdad de UFC/ml entre ambos sectores.

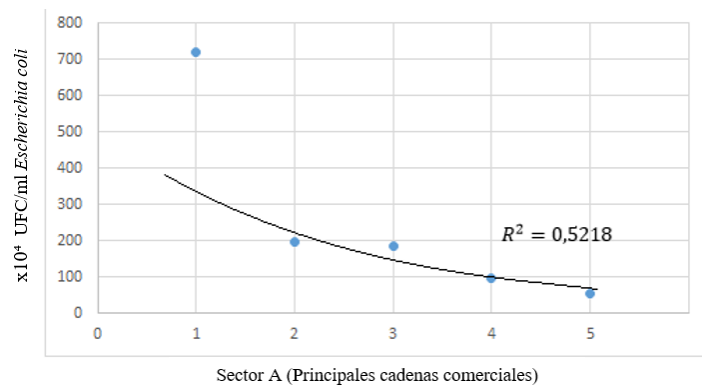


Figura 25. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de *Escherichia coli* y el sector A (Principales cadenas comerciales)

Como se observa en la figura 25, se encontró que los puntos se acercan a la línea de tendencia, el valor R^2 es mayor a 0,5 indicando que existe una correlación lineal significativa, de tal forma que a mayor cantidad de muestras tomadas en el sector A mayor será la presencia de *Escherichia coli* en los análisis.

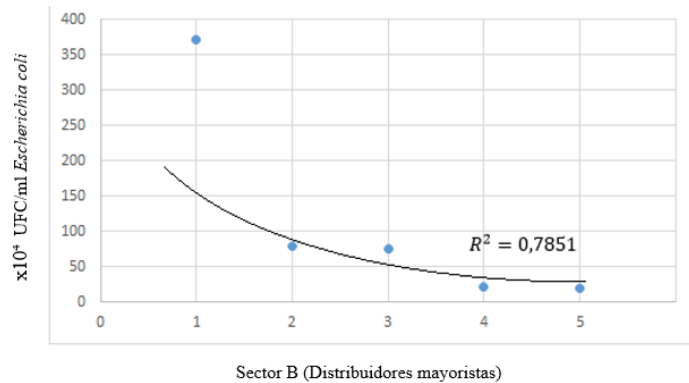


Figura 26. Gráfica de correlación entre el promedio de UFC/ml de *Escherichia coli* y el sector B (Distribuidores mayoristas)

Como se observa en la figura 26, se encontró que los puntos se acercan a la línea de tendencia, el valor R^2 es mayor a 0,5 indicando que existe una correlación lineal significativa, de tal forma que a mayor cantidad de muestras tomadas en el sector B mayor será la presencia de *Escherichia coli* en los análisis.

5.3. Caracterización con enzimas de restricción

Para determinar la abundancia y similitud de cada especie correspondiente a *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* se utilizó el programa Primer 7, el cuál mediante algoritmos predeterminados del software calcula los índices de similitud, para el desarrollo de esta etapa se usó dos figuras específicas para un entendimiento mejorado: Bray-Curtis y escalamiento multidimensional no métrico.

Caracterización de *Salmonella* con enzima de restricción anza 11 EcoR I

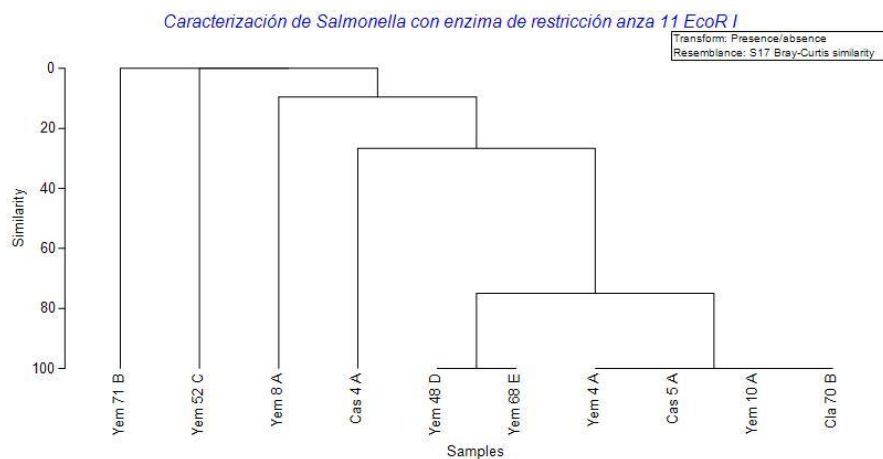


Figura 27. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 EcoR I, por Software Primer 7

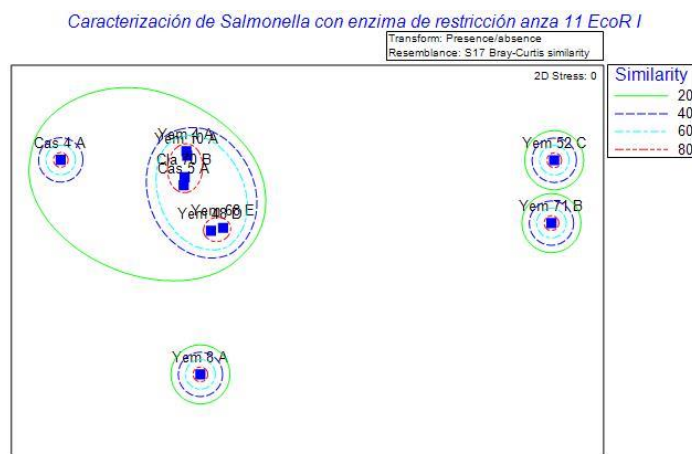


Figura 28. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 EcoR I, por Software Primer 7

La muestra de huevo número 4 presentó contaminación con *Salmonella* spp., en yema y cascarón, pero comparten el 30% de similitud, lo que indica que se contaminaron con la misma bacteria pero diferente cepa, se descarta una posible contaminación cruzada ya que de ser así la muestra número 4 del cascarón presentaría un 100% de similitud con otra de las muestras, por lo que se deduce que la contaminación se debe a un mal manejo en los procesos de la cadena alimentaria del huevo (Hernández *et al.*, 2018).

Las muestras: yema 8, yema 52 y yema 71 correspondientes a huevos de cadenas comerciales son muestras independientes que no comparten similitud. Las muestras yema 4, cascarón 5, yema 10, clara 70 comparten un 80% de similitud al igual que yema 48 y yema 68 con un 80%, por lo tanto se deduce que dichas muestras comparten la misma cepa de *Salmonella* spp.

Caracterización de *Escherichia coli* con enzima de restricción anza 11 EcoR I

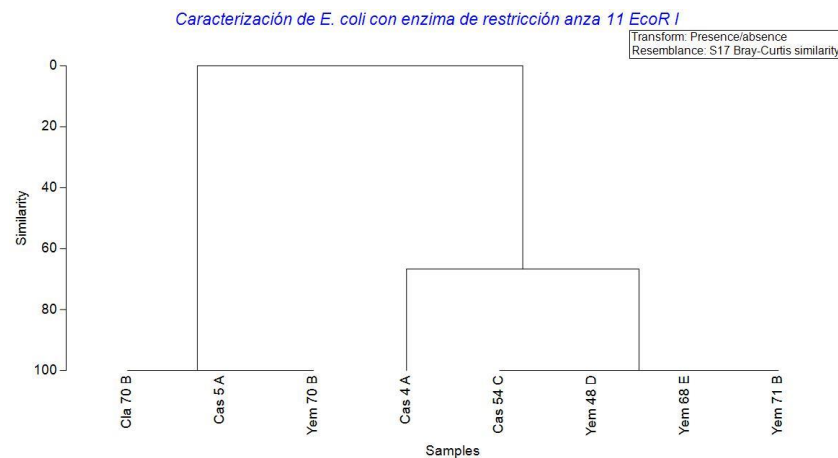


Figura 29. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 EcoR I, por Software Primer 7

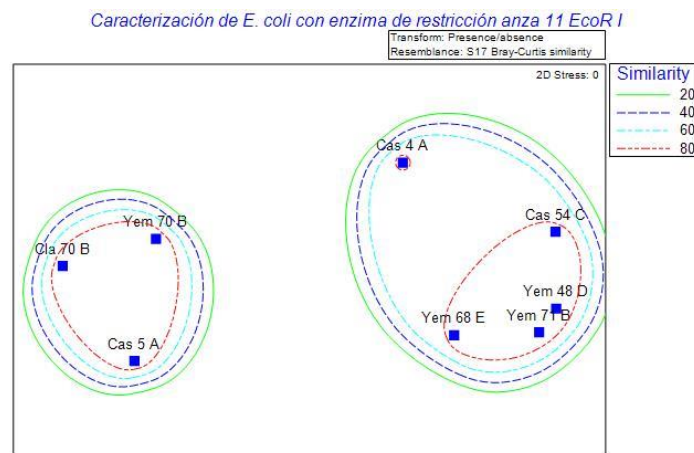


Figura 30. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción anza 11 *EcoR I*, por Software Primer 7

En este caso la clara 70 y yema 70 que corresponden al mismo huevo y comparten un 100% de similitud conjuntamente con la muestra de cascarón 5, a pesar de corresponder a diferentes granjas de producción.

Se puede apreciar la similitud dividida en dos grupos con un alto porcentaje de similitud cada uno, del 60% y 80%, eso indica que se trata del mismo grupo de *Escherichia coli*.

Caracterización de *Salmonella* con enzima de restricción anza 65 *MspI*

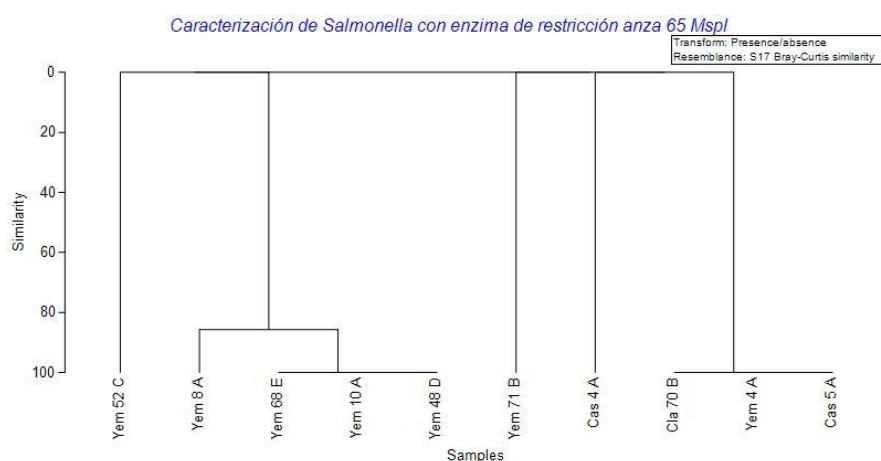


Figura 31. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 *MspI*, por Software Primer 7

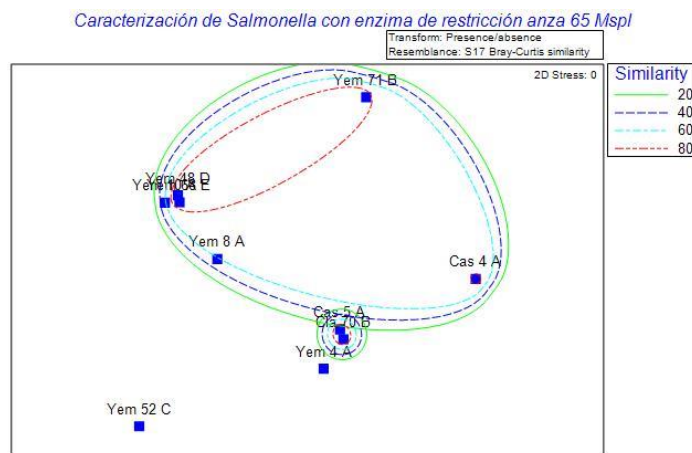


Figura 32. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 MspI, por Software Primer 7

En este caso los agrupamientos son divididos con baja similitud, a excepción del grupo conformado por las muestras de yema 8, yema 68, yema 10 y yema 48 que si comparten un 80% de similitud.

Existen muestras independientes como yema 52, yema 4 que no comparten similitud, por lo demás tal como se observa en la figura, comparten desde el 20% hasta el 80% de similitud lo que indica la variedad de cepas de la misma bacteria *Salmonella*.

Caracterización de *Escherichia coli* con enzima de restricción anza 65 MspI

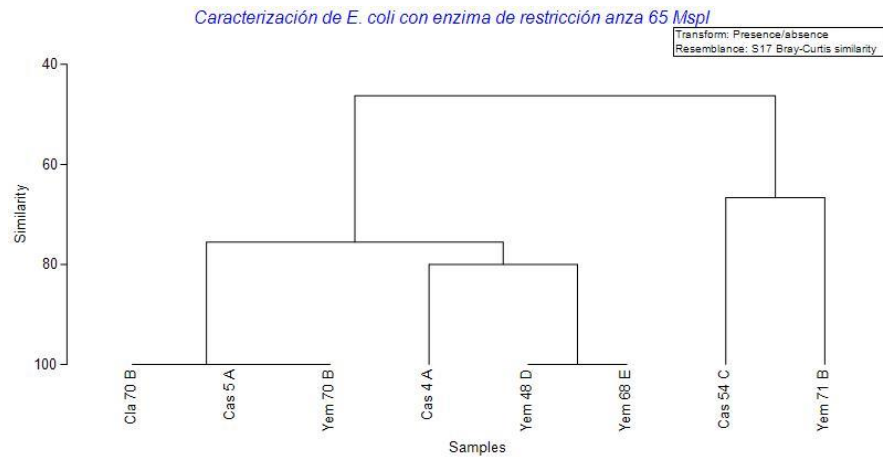


Figura 33. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 MspI, por Software Primer 7

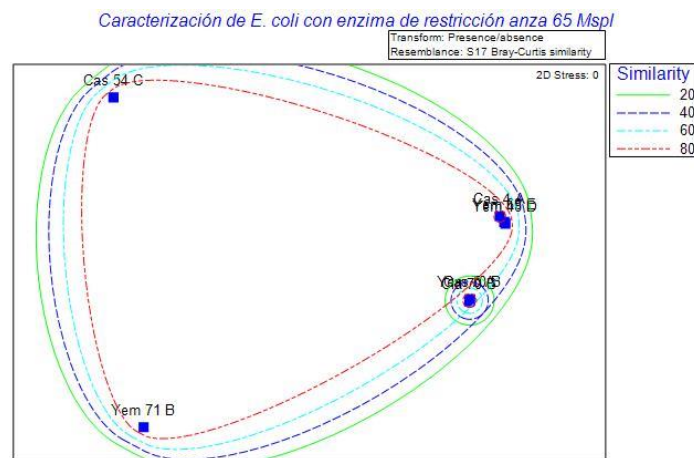


Figura 34. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción anza 65 MspI, por Software Primer 7

La similitud de asociación entre las muestras positivas para *Escherichia coli* comparte un 80% de semejanza de sus cepas, segregado en dos grupos. Las muestras de clara y yema 70 comparten la misma cepa.

Caracterización de *Salmonella* con enzima de restricción Apal

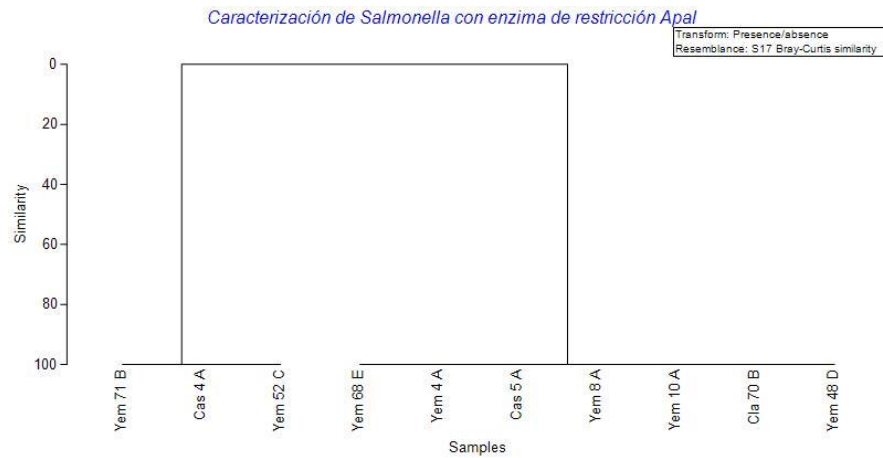


Figura 35. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción apal, por Software Primer 7

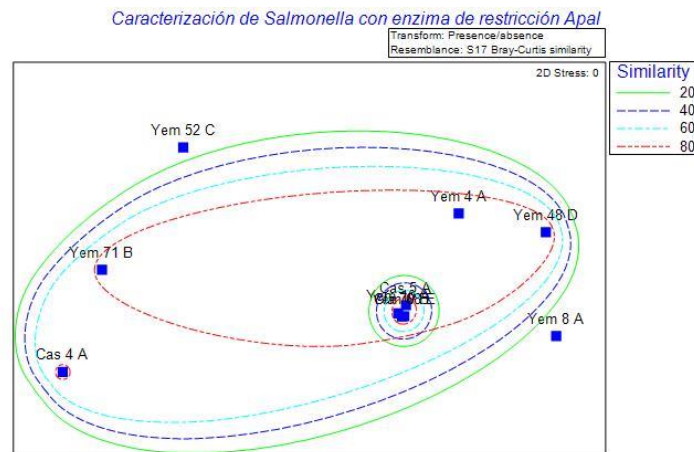


Figura 36. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción apal, por Software Primer 7

En este caso se segrega un grupo importante que comparte el 80% de similitud, aquí están las muestras: yema 4, yema48, yema 71, yema 68, cascarón 5 y clara 70. El conjunto en total comparte un 20% de similitud. Las muestras de cascarón y yema 4 como se había mencionado anteriormente, no comparten el mismo grupo.

Caracterización de *Escherichia coli* con enzima de restricción Apal



Figura 37. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción apal, por Software Primer 7

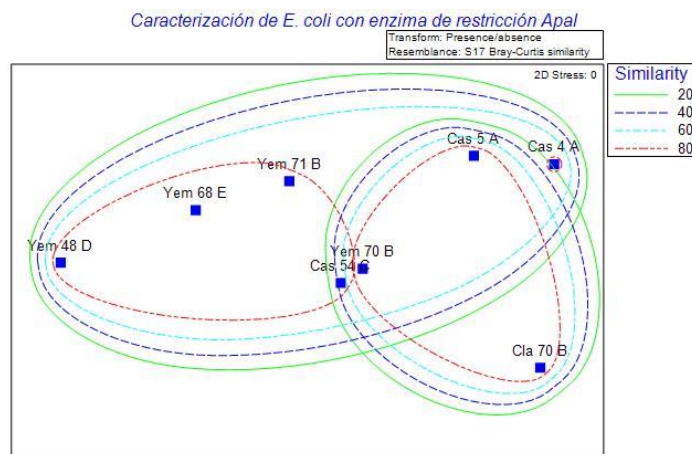


Figura 38. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción apal, por Software Primer 7

En la caracterización de *Escherichia coli* con la enzima de restricción apal se segregaron dos grupos, en el primer grupo las muestras de yema 48, yema 68, yema 71 y cascarón 54 comparten un 80% de similitud, en el segundo grupo de las muestras de clara 70, cascarón 5 y yema 70 de igual manera presentan el 80% de similitud, el caso de la muestra de cascarón 4 comparte similitud con ambos grupos, pero en un 60% mayormente con el primer grupo.

Caracterización de *Salmonella* con enzima de restricción Hind III

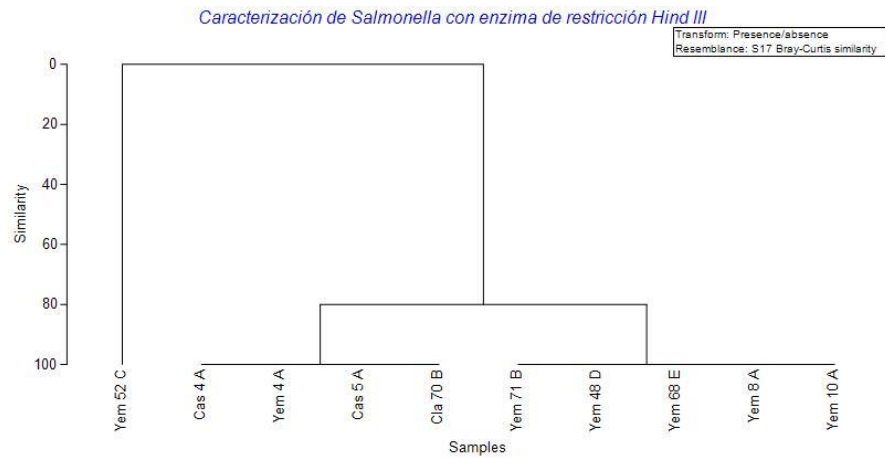


Figura 39. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción Hind III, por Software Primer 7

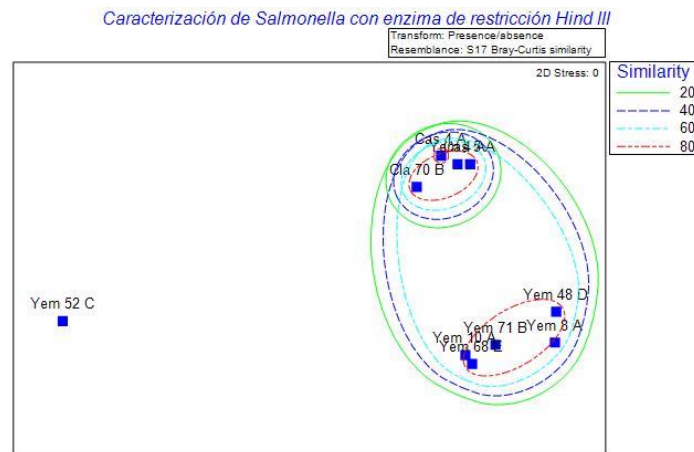


Figura 40 Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción Hind III, por Software Primer 7

Se segregaron dos grupos con similitud compartida del 80% a excepción de la muestra de yema 52 que es una muestra independiente. En este caso las muestras de cascarón y yema 4 comparten similitud ya que conforman el mismo grupo o división.

Caracterización de *Escherichia coli* con enzima de restricción Hind III

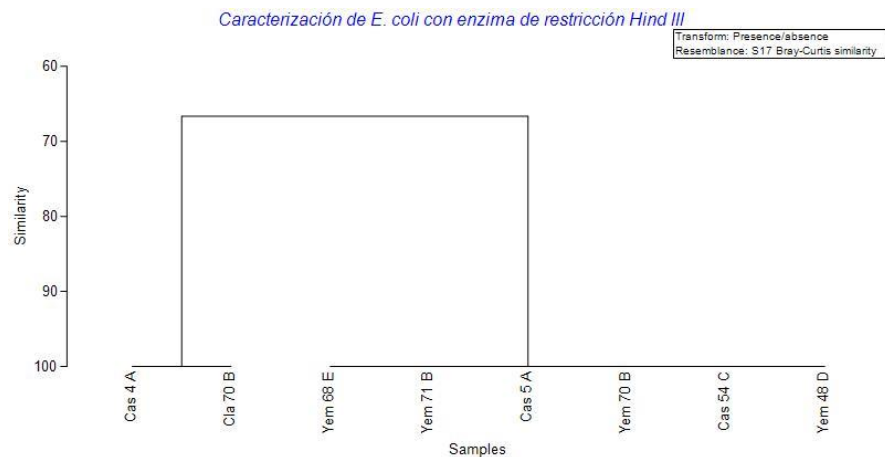


Figura 41. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción Hind III, por Software Primer 7

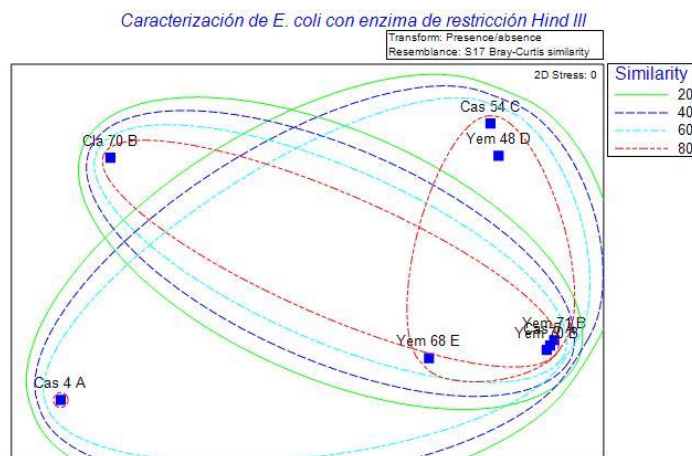


Figura 42. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción Hind III, por Software Primer 7

Se segregaron dos grupos con el 65% de similitud, en dónde las muestras de clara y yema 70 no pertenecen al mismo grupo. Las muestras de cascarón 5, cascarón 54, yema 48, yema 68, yema 71 y yema 70 comparten un 80% de similitud.

Caracterización de *Salmonella* con enzima de restricción Sac II

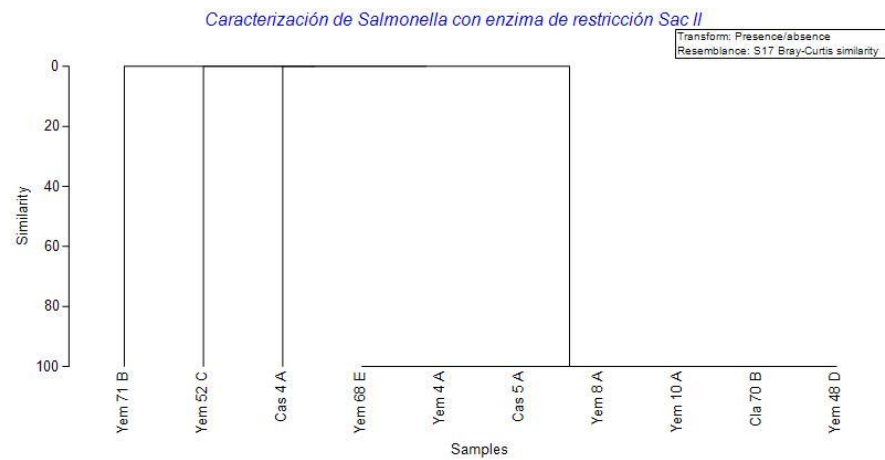


Figura 43. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción Sac II, por Software Primer 7

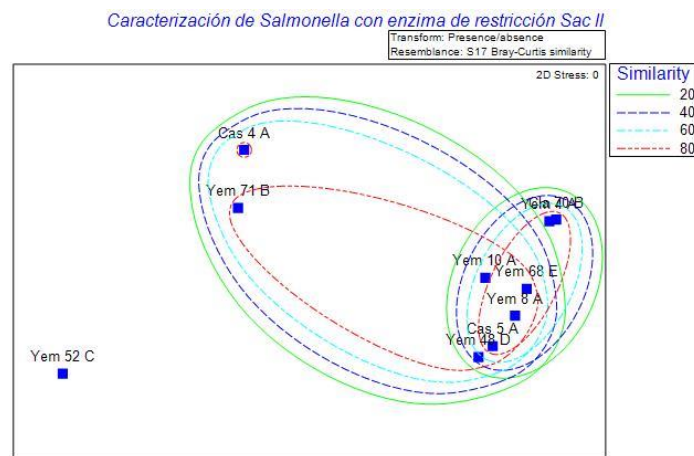


Figura 44. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción Sac II, por Software Primer 7

En este caso particular, la muestra de yema 52 es la única muestra independiente que no comparte similitud alguna con otra muestra, por otro lado se segregaron dos grupos que comparten el 60% y el 80% de similitud entre ellos. Las muestra de yema y cascarón 4 no conforman el mismo grupo.

Caracterización de *Escherichia coli* con enzima de restricción Sac II



Figura 45. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción Sac II, por Software Primer 7



Figura 46. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción Sac II, por Software Primer 7

Se segregaron dos grupos que comparten el 65% de similitud, pero las muestras de clara 70, yema 70 y cascarón 5 comparten el 80% de similitud, como se presenció en este caso el huevo 70 estuvo contaminado por la misma cepa de *Escherichia coli* de acuerdo a la caracterización con la enzima de restricción Sac II.

Caracterización de *Salmonella* con las enzimas de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III

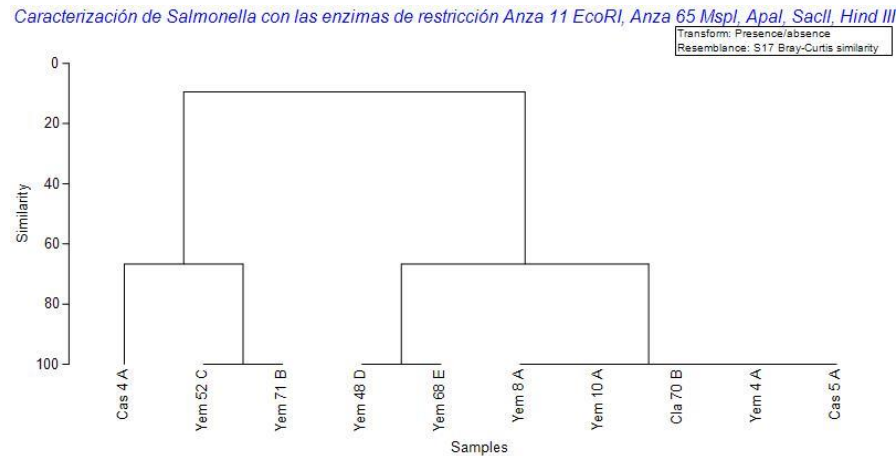


Figura 47. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III; por Software Primer 7

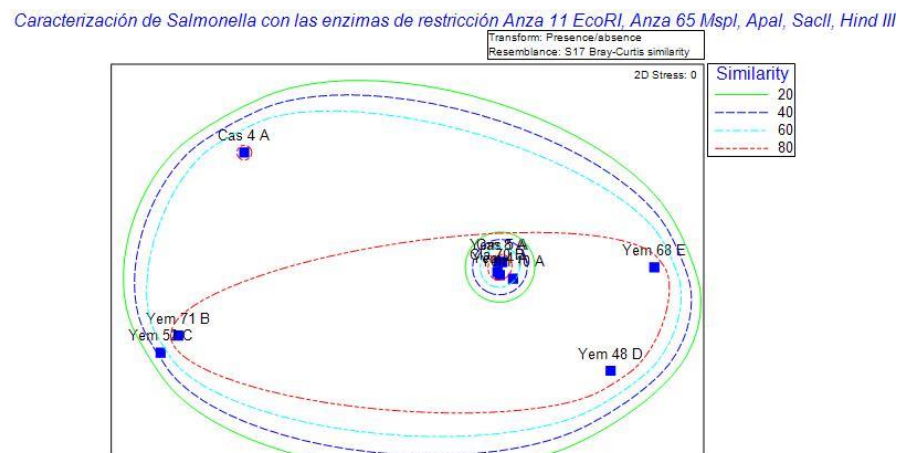


Figura 48. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 10 muestras de *Salmonella* spp., caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III; por Software Primer 7

Como se puede apreciar en las figuras 55 y 56 se realizó un agrupamiento de las muestras de *Salmonella* con todas las enzimas de restricción para determinar el comportamiento de agrupación y similitud, y se obtuvo la existencia de conjuntos discrepantes en la misma bacteria, sin embargo los agrupamientos presentan similitudes del 40% al 80%, siendo más similares las muestras de yema 4, yema 8, yema 10, cascarón 5 y clara 70.

Evidentemente las muestras de yema y cascarón 4 están muy lejos de presentar similitud, este caso puede ser explicado también como la presencia de cepas raras, poco comunes o mutadas que se encuentran heterogéneamente distribuidas. Además se sugiera la existencia de una sola asociación de *Salmonella*, de acuerdo a los datos congruentes obtenidos.

Caracterización de *Escherichia coli* con las enzimas de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III

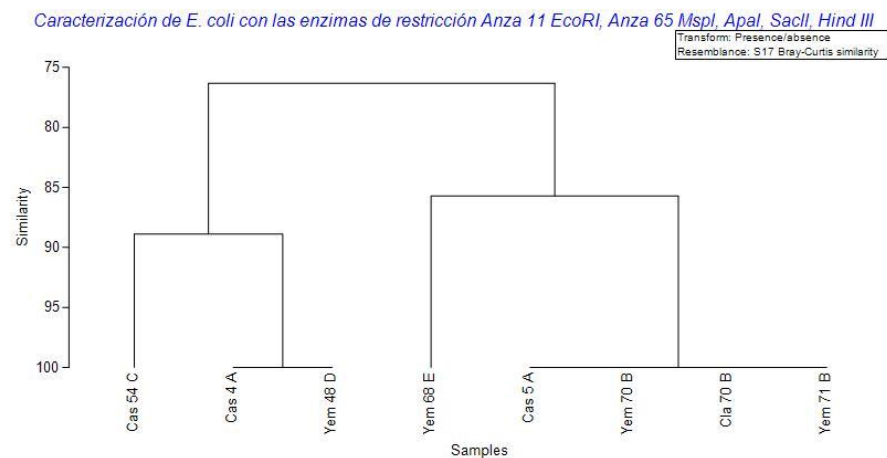


Figura 49. Agrupamiento de similitud de Bray-Curtis de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III; por Software Primer 7

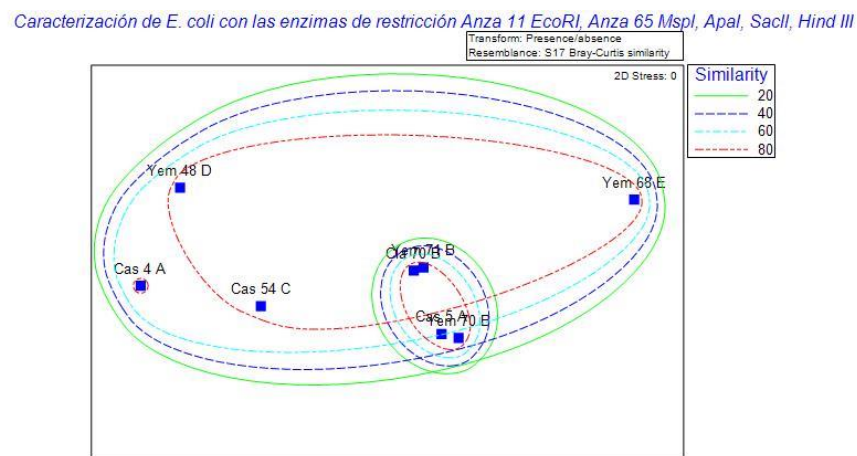


Figura 50. Agrupamiento de similitud MDS no métrico de 8 muestras de *Escherichia coli* caracterizadas con la enzima de restricción Anza 11 EcoRI, Anza 65 Mspl, Apal, SacII, Hind III; por Software Primer 7

Como se puede observar en las figuras 49 y 50 se realizó un agrupamiento de las muestras de *Escherichia coli* con todas las enzimas de restricción para determinar el comportamiento de agrupación y similitud, y se consiguió la segregación de diversos grupos con similitudes del 75% y 85%, lo que indica la homogeneidad de cepas existentes en el género *Escherichia coli* presente en huevos de gallina.

Las muestras con mayor porcentaje de similitud son las muestras de cascarón 5, yema 70, clara 70 y yema 71. Cabe recalcar que la aplicación de este método para determinar similitudes entre agrupamientos en este caso de cepas de un género de bacteria, es una caracterización tentativa que no representa el 100% de eficacia ya que las bacterias mutan constantemente sus serotipos o cepas (Bonfil, 2007).

5.4. Identificación por secuenciación

Tabla 19.

Serotipos de Salmonella spp., Escherichia coli y otras bacterias de acuerdo al porcentaje de similitud de análisis de secuencias parciales 16S

Secuencia	Nombre	% de identidad	N° de acceso	Serotipos
cascarón muestra 4	<i>Salmonella enterica</i> strain DQ-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95	KY022739.1	<i>S. Enteritidis</i>
yema muestra 4				
cascarón muestra 5				
yema muestra 8				
yema muestra 10				<i>S. Typhimurium</i>
clara muestra 70				
yema muestra 52				
yema muestra 71				
yema muestra 48				
yema muestra 68				
cascarón muestra 4	<i>Escherichia coli</i> strain Huaian_154_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95,50	MN314208.1	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
cascarón muestra 5				
yema muestra 48				
cascarón muestra 54				
yema muestra 68				

yema muestra 70			
clara muestra 70			
yema muestra 71			
cascarón muestra 5	<i>Pseudomonas</i> sp. J15(2008) 16S		
yema muestra 8	ribosomal RNA gene, partial sequence	95,96	EU573783.1
cascarón muestra 54	<i>Acinetobacter</i> sp. 263XG7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97,29	KF818639.1
cascarón muestra 5			
yema muestra 10			
clara muestra 70	<i>Enterobacter</i> sp. strain A2731		
yema muestra 48	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97,72	KX825896.1
yema muestra 48			
yema muestra 68			

Fuente: NCBI

Como se puede observar en la tabla 18, se realizó secuenciación de los productos de PCR obtenidos de las 10 muestras de *Salmonella* spp., y 8 muestras de *Escherichia coli*, obteniendo como resultados, la contaminación con: *Salmonella* entérica, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Pseudomonas* sp, *Acinetobacter* sp, *Enterobacter* sp.

De acuerdo a los resultados obtenidos es importante recalcar que el reservorio de *Salmonella* en este caso de los serotipos *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium es exclusivamente en animales domésticos y salvajes: aves de corral, cerdos, bovinos, perros, gatos, roedores, iguanas, tortugas y el ser humano (RENAPRA, 2018).

Los serotipos de *Salmonella* encontrados en esta investigación coinciden con los encontrados en la investigación realizada por Sáenz (2010), el cuál observó dos serotipos de *Salmonella* que fácilmente invaden el tracto reproductor de la gallina, para contaminar los huevos, estos serotipos son *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, el mecanismo de contaminación con microorganismos del primer serotipo se da por transmisión vertical y

horizontal, en cambio el segundo serotipo puede contaminar el huevo a través del material fecal que contamina directamente al cascarón.

Otros estudios de examinación de huevos como el de Franeschi *et al.*, (2016), aisló *Salmonella* en yema de huevo, pero su objetivo principal era aislar los microorganismos presentes en cascarón, sin embargo descubrió que la serovariedad de *Salmonella* en la yema perteneció a *Salmonella gallinarum*, además explica que la contaminación de clara, yema y cascarón es muy probable a partir de las fuentes de contaminación presentes en el lugar de producción: maples sucios, presencia de roedores e insectos, alimento contaminado; en estos focos contaminantes logró determinar la presencia de *Salmonella enteritidis*.

Los serotipos *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* comprenden una epidemiología compleja que se estrecha profundamente con la contaminación ambiental y la cantidad de focos de contaminación, es por ello que se considera fundamental el control a partir de las medidas de bioseguridad, vacunación e higiene (Gibert, 2010).

Por otra parte, la presencia de la bacteria *Escherichia coli* en huevos comerciales, con su serotipo O157:H7, es responsable de las toxiinfecciones alimentarias en el ser humano, por ello se clasifica dentro del grupo de *Escherichia coli* enterohemorrágicos (ECEH) (Gibert, 2010).

Además, el autor Dho-Moulin *et al.*, (2007), indica que los pollos tienen la susceptibilidad de adquirir el serotipo O157:H7, misma que actúa como agente potencialmente zoonótico.

Loaiza *et al.*, (2011), manifiesta que en su investigación de contaminantes microbianos en huevos reporta aislamientos bacterianos similares a los obtenidos en esta investigación, en dónde se percató de la presencia de estos microorganismos en los contenedores usados para el transporte de huevos: *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Aeromonas* spp., *Listonella* spp., *Chryseomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp.

Cabe destacar que el instituto de estudios del huevo menciona: una gallina infectada puede producir varios huevos sanos y solo unos pocos infectados, la predisposición de las bacterias a colonizar al animal y sus productos, radica en factores como la edad (Parra, 2002).

5.5 Evaluación de la socialización

Por motivo de la emergencia sanitaria mundial a causa del COVID-19 se llevó a cabo la socialización de la presente investigación por video llamada a través de la aplicación meet (meet.google.com/mfi-zacr-dgn), el día 18 de enero de 2021, se elaboró la invitación (Anexo 4), misma que fue enviada por correo electrónico a docentes y alumnos de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, se obtuvo un total de 15 asistentes.

Al terminar la socialización de la investigación se solicitó a los presentes que llenen el cuestionario en dónde se evalúa el proceso de socialización de la investigación, el formulario se elaboró en la aplicación de Google formularios (https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSe478UXdqHkR0ZTwkql4nzfMKg6NqWE9LHhAzdfIJU2LdLYhg/viewform?usp=sf_link), es así que por este medio se conoció la valoración en cuanto a la organización del evento, la ejecución por parte del expositor y el impacto de la socialización.

A continuación en la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos de la encuesta aplicada, misma que sirve para mejorar los procesos de socialización de futuras investigaciones, los asistentes dieron a conocer que la presente investigación es de interés con un amplio campo para futuros estudios complementarios ya que es importante determinar prevalencia de bacterias responsables de las enfermedades por transmisión de alimentos (ETA) para realizar una mejora continua en lo que se refiere a seguridad alimentaria.



Figura 51. Evaluación de la sala en dónde se organización el evento

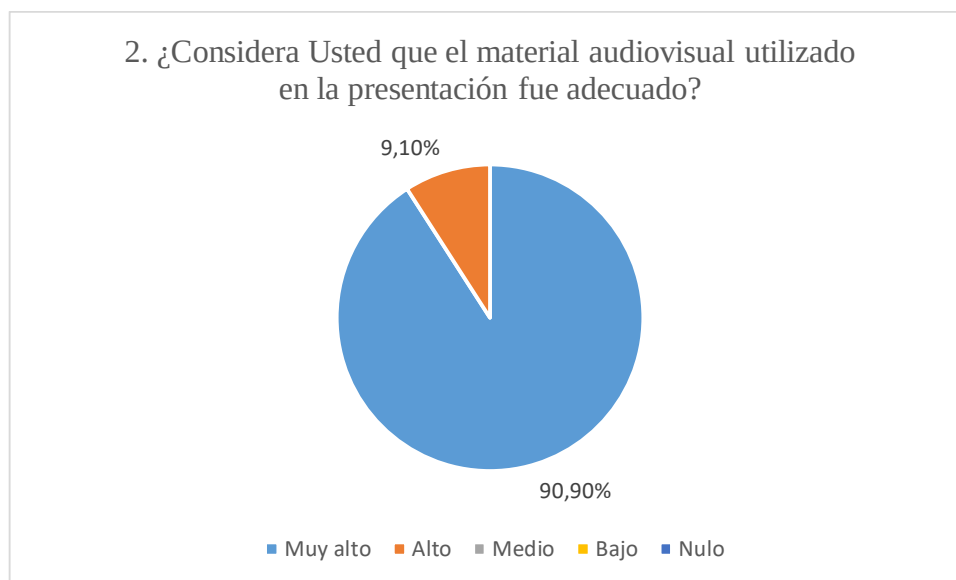


Figura 52. Evaluación del material audiovisual del evento

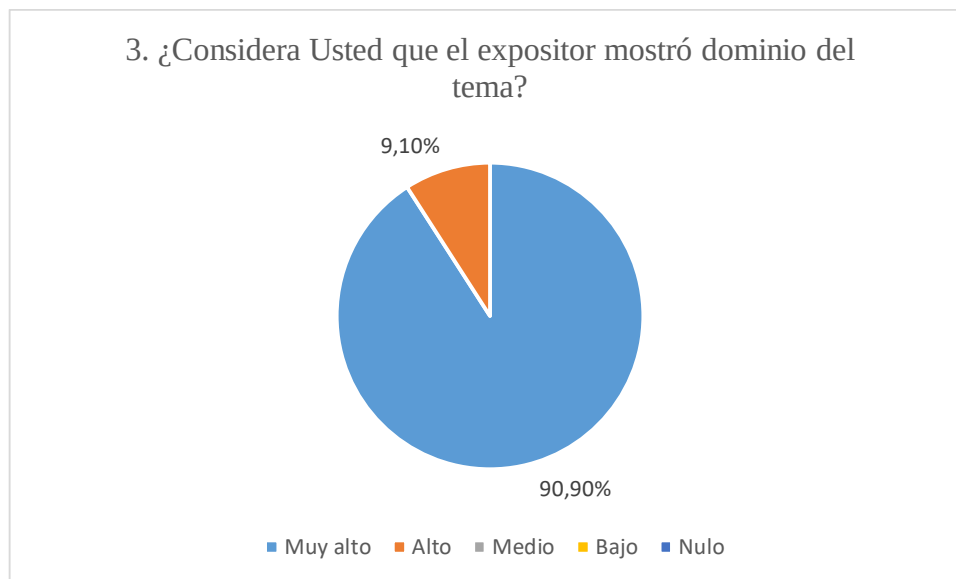


Figura 53. Evaluación de dominio del tema por parte del expositor

Tabla 20.

Tabulación de los resultados de la encuesta

Preguntas	Nulo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
4. ¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?				9,10%	90,90%
5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?				9,10%	90,90%
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					100%
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					100%
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					100%
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					100%

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Los sitios de expendio en un 62% (5/8) no cumplen con la normativa vigente para huevos comerciales y ovoproductos, Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1973:2013 en cuanto a calidad microbiológica, ya que se halló la presencia en clara, yema y cascarón de bacterias tales como: *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp.
- Se determinó la prevalencia de *Salmonella* spp., mediante análisis microbiológico de huevos comerciales (clara, yema y cascarón) de consumo en el cantón Ibarra; obteniendo como resultado el 11,25% (9/80) huevos contaminados, sin embargo el huevo número 4 presentó contaminación en yema y cascarón, por esta razón suman diez muestras en total, en dónde la clara representa el 1,25% (1/9) de contaminación, la contaminación en yema representa el 8,75% (7/9), y la contaminación en cascarón representa el 2,5% (2/9); siendo el sector B (Distribuidores mayoristas) el que mayor contaminación presentó en cinco muestras, siendo la muestra de yema número 52, proveniente del distribuidor alimentario 2, la de mayor carga contaminante con una presencia de $19,6 \times 10^4$ UFC/ml de *Salmonella* spp.
- Se determinó la prevalencia de *Escherichia coli*, mediante análisis microbiológico de huevos comerciales (clara, yema y cascarón) de consumo en el cantón Ibarra; obteniendo como resultado el 8,75% (7/80) huevos contaminados, sin embargo el huevo número 70 presentó contaminación en clara y yema, por esta razón suman ocho muestras en total, en dónde la clara representa el 1,25% (1/7) de contaminación, la contaminación en yema representa el 5% (4/7), y la contaminación en cascarón representa el 3,75% (3/7); siendo el sector B (Distribuidores mayoristas) el que mayor contaminación presentó en cinco muestras, siendo la muestra de yema número 48, proveniente del distribuidor alimentario 1, la de mayor carga contaminante con una presencia de 72×10^4 UFC/ml de *Escherichia coli*.

- Se identificó dos serotipos para *Salmonella*.
Salmonella Enteritidis: presente en un 50% (5/10) en las muestras del supermercado 1.
Salmonella Typhimurium, presente en un 10% (1/10) en el distribuidor alimentario 1, un 10% (1/10) en el distribuidor alimentario 2, un 20% (2/10) en el distribuidor alimentario 3 y 10% (1/5) en el distribuidor alimentario 4.
- Se identificó el serotipo O157:H7 de la bacteria *Escherichia coli*: 25% (2/8) en el supermercado 1, un 12,5% (1/8) en el distribuidor alimentario 1, un 12,5% (1/8) en el distribuidor alimentario 2, un 25% (2/8) en el distribuidor alimentario 3.
- Se creó el banco de recursos microbianos de la PUCE-SI con las cepas obtenidas en esta investigación, recursos genéticos que permitirán a futuras investigaciones solucionar problemas relacionados con la salud humana y animal.
- La socialización del presente estudio tuvo gran acogida, lo que permitió establecer el grado de impacto de la investigación, mismo que fue calificado como muy relevante al 100% en su totalidad, ya que el público consideró el tema como altamente relevante para la sociedad, con amplias perspectivas para estudios complementarios, de muy alto beneficio actual y a futuro para la comunidad y consideraron el cumplimiento total de los objetivos planteados.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Para determinar el origen de contaminación de los huevos comerciales, se recomienda continuar un estudio en campo, el cuál debe seguir el rastro en toda la cadena productiva, empezando por realizar el control de salud, manejo, alojamiento, alimentación, bioseguridad y sanidad de los animales en granja; producción y recepción del huevo; almacén de envases y embalajes; cinta transportadora, cámara de miraje, pesaje y clasificación; embazado y embalado; almacenamiento, transporte y distribución.
- Para realizar futuros estudios complementarios o comparativos de la prevalencia de *Salmonella* spp., y *Escherichia coli*, presentes en huevos comerciales se preservó las cepas obtenidas en el banco de recursos microbianos de la PUCE-SI.
- Para ampliar el estudio de las enfermedades de transmisión alimentaria por consumo de productos de origen animal en la ciudad de Ibarra, se debería analizar la prevalencia de los otros microorganismos encontrados en la presente investigación.
- Para ampliar la información epidemiológica de las enterobacterias estudiadas, se debe aumentar el número de muestras, número de expendios y otros mercados en la ciudad de Ibarra.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, F. (2016). *Caracterización de Salmonella (Salmonella spp) en huevos frescos de gallinas mediante la utilización del sistema microgen gn a en la parroquia de Cotaló* (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24288/1/Tesis%2068%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20436.pdf>
- Aguirre, R., y Pizarro, M. (16 de Abril de 2018). Panorama y mercado del huevo. Recuperado de <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/04/Huevos.pdf>
- Albán, E. (2018). *Determinación de la calidad física y organoléptica de los huevos*. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14288/1/T-UCE-0014-054-2018.pdf>
- Alimentaryá. (17 de Noviembre de 2015). ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA. Recuperado de <http://www.alimentosecuador.com/2015/11/17/enfermedades-de-transmision-alimentaria/>
- Andrade, J. (2016). *Efecto de los metales pesados sobre a microbiota acuática bacteriana en el río Guayllabamba en el sector de la comunidad corazón del Chontal-Intag* (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra). Recuperado de <http://axioma.pucesi.edu.ec/index.php/axioma/article/view/539>
- Avise, J. (2004). Molecular markers, natural history, and evolution. *Massachusetts: Sinauer Associates cop*, 65, pp. 30-33. Recuperado de <https://www.springer.com/gp/book/9780412037719>
- Bonfil, C. (16 de Octubre de 2007). Cambios en la estructura de la asociación de diatomeas epifitas de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512008000100005
- CONAVE. (20 de Junio de 2013). Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador . Recuperado de <http://www.conave.org/upload/informacion/Estadisticas%20avicolas.pdf>

- Enriquez, L. (29 de Octubre de 2007). Gallinas más que un negocio, un crecimiento asistido. *La Hora*, pág. 30.
- Estrada, J., y Valencia, B. (2012). *Determinación de Salmonella spp. En huevos frescos de gallina en los principales mercados de la Ciudad de Quito*. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador). Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/handle/25000/599>
- FAO. (2009). Recuperado de Prevención de la *Escherichia coli* en los alimentos: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf
- Freansechi, M., y Barrios, H. (11 de Junio de 2016). *Salmonella*: separando el mito de la realidad. Industria avícola. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/693/69370201.pdf>
- Gibert, M. (2010). *Detección y caracterización de aislados de Escherichia coli de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras* (Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid). Recuperado de <https://eprints.ucm.es/10514/1/T31540.pdf>
- Hernández, L., Sanjuán, E., Millán de Larriva, R., Carrascosa, C., Quintana, M., y Pérez, E. (2018). Propuesta de sistemática para el control de la calidad bromatológica de huevos de Gran Canaria en el entorno APPCC. *Facultad de Veterinaria de la ULPGC*, 18, pp.1-5. Recuperado de https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/9910/1/0280574_00004_0003.pdf
- Hernández, R. (2014). *Metodología de la investigación*. México D.F: Mc Graw Hill.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2013). Huevos comerciales y ovoproductos, requisitos. Recuperado de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1973-2.pdf>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2019). Manual del encuestador y supervisor "Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC". Recuperado de <https://blogs.cedia.org.ec/obest/wp-content/uploads/sites/7/2020/09/Sector-avicola-Ecuador.pdf>
- Invitrogen. (2018). PureLink® Genomic DNA Kits. Recuperado de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>
- Leyva, V., Valdés, E., Cisneros, E., y Pérez, O. (2016). Determinación de *salmonella* y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 10(2), pp.1-4. Recuperado de https://www.adiveter.com/ftp_public/articulo559.pdf

- Li, Y., Liu, D., Cao, B., y Han, W. (2006). NCBI. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1698391/figure/f2/>
- Loaiza, J., Sánchez, M., Henao, S., y Cardona, N. (2011). *Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área Metropolitana*. (Tesis de pregrado, Universidad CES). Recuperado de <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/2037/1945>
- Ministerio de Salud Pública (MSP). (2012). Enfermedades y eventos de notificación obligatoria sujetas a Vigilancia Epidemiológica. Recuperado de http://instituciones.msp.gob.ec/dps/cotopaxi/index.php?option=com_content&view=article&id=13:epimedologiaycatid=3:epimedol&Itemid=44
- Montero, A. (2016). *Caracterización de salmonella (Salmonella spp) en huevos frescos de gallinas mediante la utilización del sistema microgen gn a en la parroquia Cotaló*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato). Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24288/1/Tesis%2068%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20436.pdf>
- Moro, F. (20 de Julio de 2012). Contaminación y microbiología del huevo. Recuperado de <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/contaminacion-microbiologia-huevo-t32289.htm>
- Nuez, F., y Carrillo, J. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, *Servicio de Publicaciones*, 20, 84-7721-945-1 . Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=1832>
- NutriNews. (21 de Julio de 2020). Un repaso por la microbiota del tracto gastrointestinal de las aves. Recuperado de <https://nutricionanimal.info/un-repaso-por-la-microbiota-del-tracto-gastrointestinal-de-las-aves/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (15 de Agosto de 2016). Enfermedades de transmisión alimentaria. Recuperado de <http://www.alimentosecuador.com/2015/11/17/enfermedades-de-transmision-alimentaria/>
- Parra, M. (12 de Agosto de 2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/693/69370201.pdf>
- Pérez de Saltos, A. M. (2010). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

- Promega. (2017). Genomics Essentials. *PROMEGA BIOTECH* , 68.
- RENAPRA. (2018). Salmonelosis. Recuperado de <http://www.anmat.gov.ar/alimentos/salmonelosis.pdf>
- Rincón, A., Ramírez, Y., y Vargas, C. (2011). Transmisión de *Salmonella* entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*, 43(2), pp. 167-177. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000200008&lng=pt&nrm=isoy&lng=es
- Rodicio, M., y Mendoza, M. (2015). Elsevier. Recuperado de <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del->
- Rojas, C. (2017). *Estudio de la prevalencia de Salmonella y Escherichia coli, en pollos de engorde de planteles avícolas del cantón Ibarra, mediante análisis microbiológico, PCR y RFLP, para la propuesta de un plan de manejo sanitario* (Tesis de pregrado, PUCESI).
- Sáenz, I. (2010). *Determinación de Salmonella spp, en huevos de gallina para consumo humano, recolectados en los mercados municipales de la ciudad de Guayaquil*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica Particular de Loja). Recuperado de <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/974>
- Schippers Agrícola . (2020). Escherichia coli. Recuperado de [https://www.schippersweb.com/themes/aves-de-corrall/e-coli-t3001/#:~:text=Escherichia%20coli%20\(E.,normales%2C%20la%20bacteria%20del%20E.](https://www.schippersweb.com/themes/aves-de-corrall/e-coli-t3001/#:~:text=Escherichia%20coli%20(E.,normales%2C%20la%20bacteria%20del%20E.)
- Suárez, M., y Jorge, M. (2000). *Presencia de Salmonella serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública*. (Tesis de pregrado, Universidad de Antioquia). Recuperado de <http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/viewFile/349/271>
- Suwanto, A. (2017). Jurnal. Recuperado de <http://jurnal.permi.or.id/index.php/mionline/article/view/319>
- ThermoFisher. (2020). Anza Restriction Enzyme Finder Tool. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/restriction-enzyme-digestion-and-ligation/restriction-enzyme-cloning/anza-enzyme-selection-tool.html>
- Tobar, E. (2012). *Estudio de factibilidad para la creación de una micro empresa dirigida a la comercialización de huevos INDAVES-PRONACA para la distribuidora San Luis en la*

ciudad de Ibarra. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte). Recuperado de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/6529>

Trevor, B. (2013). Salud de las aves de corral y control de enfermedades en los países en desarrollo. FAO: *Revisión del desarrollo avícola*, 57, pp. 101-108. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3531s.pdf>

Vásquez, C. (7 de Julio de 2011). Escherichia coli patógeno aviar. Recuperado de <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/escherichia-coli-patogeno-aviar-t28854.htm>

ANEXOS

Anexo 1. Base de datos acerca de las fuentes de expendio

Principales fuentes de expendio sitio A (cadenas comerciales)

Nombre comercial	Ruc o rise	Número de permiso	Razón social	Nombres titular	Email titular	Actividad establecimiento	Teléfono principal	Cantón	Dirección
Supermercados Santa María	1792060346001	Arcsa-2018-14.5.1-0000985	Mega Santamaria S.A.	Mariana de Jesus Pastrano	anita280178@gmail.com	Supermercado/comisariato	2942900	Ibarra	Calle: Av. Mariano Acosta s/n Av. Fray Vacas Galindo
Akí Ibarra centro	1790016919001	Arcsa-2018-14.5.1-0001076	Corporación favorita C.A.	Mora Aguilar Hugo Bladimir	greinoso@favorita.com		062601341	Ibarra	Calle: Bolívar 1048 y Colón
Supermaxi Ibarra	1790016919001	Arcsa-2018-14.5.1-0000745	Corporación favorita C.A.	Mora Aguilar Hugo Bladimir	greinoso@favorita.com		062631470	Ibarra	Barrio: san francisco calle: Av. Mariano Acosta 2147 Victor Gómez Jurado
Tía Ibarra	0990017514001	Arcsa-2018-14.5.1-0000592	Tiendas industriales asociadas tía S.A.	Pedro Pascual Gonzalez Villon	yolanda.cisneros@tia.com.ec		3987000	Ibarra	Ciudadela: San Francisco calle: Av. Pérez Guerrero 775 Sánchez Cifuentes y Bolívar

Principales fuentes de expendio sitio B (distribuidores mayoristas)

Razon social	Ruc o rise	Número permiso	Nombres titular	Email titular	Actividad establecimiento	Teléfono principal	Cantón	Dirección	Nombre comercial	Sector
Su megabodega JH	10917 62869 001	Arcsa- 2018- 14.3- 0000925	Navarrete Pepinos Sandra Margarita	Sandys260 9@gmail.com	Distribuidoras de alimentos, bebidas, aditivos alimentarios combinados	062611241	Ibarra	Calle: Eugenio Espejo 444 Teodoro Gómez	Su megabodega jh	A una cuadra del terminal terrestre
Chuquín Garzón Diego Javier	10017 09730 001	Arcsa- 2018- 14.3- 0000591	Chuquín Garzón Diego Javier	Diegojavier _70@yahoo.com.ar		062951737	Ibarra	Ciudadela: Yacucalle calle: Obispo Mosquera 8-13 Bartolome García	Comercial Jazmin	Mercado amazonas
Flores Trujillo Julio Cesar	10026 19672 001	Arcsa- 2018- 14.2- 0001539	Flores Trujillo Julio Cesar	Granjalaval netina@gmail.com		2601988	Ibarra	Calle: Rafael Larrea 11- 53 Julio Andrade	Granja y abastos la Valentina	A una cuadra del mercado amazonas
Ipiales Diaz Mariana Del Carmen	10023 03962 001	Arcsa- 2017- 14.2- 0002892	Ipiales Diaz Mariana Del Carmen	Mariana.ipiales@hotmail.com		2650271	Ibarra	Calle: Zenon Villacis 2- 25 Juana Atabalipa	Distribuidora Jerusalen	A una cuadra del mercado amazonas

Anexo 2. Registro fotográfico de la investigación

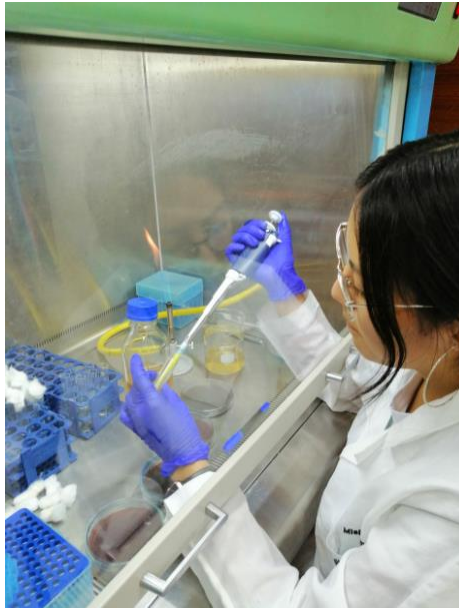
Recolección de muestras en la fuente de expendio sitio A (cadenas comerciales)



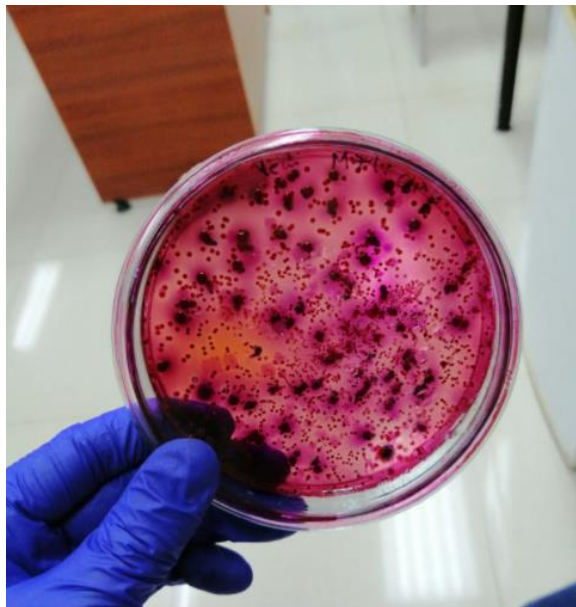
Recolección de muestras en la fuente de expendio sitio B (distribuidores mayoristas)



Siembra de las muestras en la cámara de flujo laminar



Yema de huevo contaminada con *Escherichia coli*



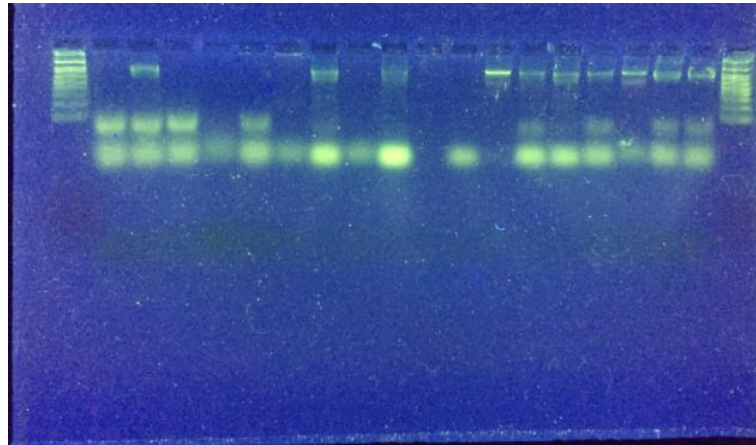
Conteo de UFC/ml de las placas con crecimiento bacteriano



Procedimiento PCR



Gel de agarosa para confirmación de PCR



Materiales y reactivos de laboratorio para realizar RFLP



Anexo 3. Resultados conteo UFC/ml *Salmonella* spp

	Sitios de expendio	x10 ⁴ UFC/ml <i>Salmonella</i> spp
A	casarón muestra 4	2
	yema muestra 4	6,5
	casarón muestra 5	3,5
	yema muestra 8	6,7
	yema muestra 10	5,2
B	clara muestra 70	11
	yema muestra 71	19,6
C	yema muestra 52	2,4
D	yema muestra 48	4,2
E	yema muestra 68	10,8

	Sitios de expendio	x10 ⁴ UFC/ml <i>Salmonella</i> spp
SECTOR A (Principales cadenas comerciales)	casarón muestra 4	2
	yema muestra 4	6,5
	casarón muestra 5	3,5
	yema muestra 8	6,7
	yema muestra 10	5,2
SECTOR B (Distribuidores mayoristas)	yema muestra 48	11
	yema muestra 52	19,6
	yema muestra 68	2,4
	clara muestra 70	4,2
	yema muestra 71	10,8

Anexo 4. Resultados conteo UFC/ml *Escherichia coli*

	Fuente de expendio	x10 ⁴ UFC/ml <i>Escherichia coli</i>
A	casarón muestra 4	5,5
A	casarón muestra 5	9,7
D	yema muestra 48	72
C	casarón muestra 54	1,9
E	yema muestra 68	2,1
B	yema muestra 70	7,5
B	clara muestra 70	37,2
B	yema muestra 71	8

Sitios de expendio		x10 ⁴ UFC/ml <i>Escherichia coli</i>
SECTOR A (Principales cadenas comerciales)	cascarón muestra 4	5,5
	cascarón muestra 5	9,7
SECTOR B (Distribuidores mayoristas)	yema muestra 48	72
	cascarón muestra 54	1,9
	yema muestra 68	2,1
	yema muestra 70	7,5
	clara muestra 70	37,2
	yema muestra 71	8

Anexo 5. Invitación a la socialización



UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial Invitación a la socialización del trabajo de investigación:

"Estudio de la prevalencia de Salmonella spp y E. coli en huevos comerciales para consumo humano en el cantón Ibarra, para la creación de un banco de recursos microbianos de la PUCE-SI".

cuyo autor es la señorita Mishel Iveth Villarruel Montesdeoca, de la carrera de Zootecnia

Fecha: 18 de Enero del 2021

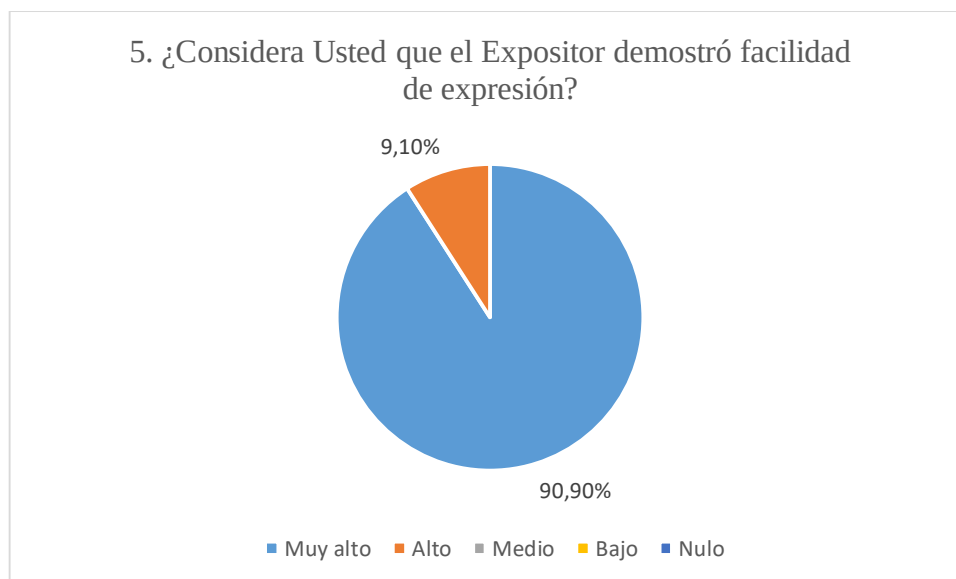
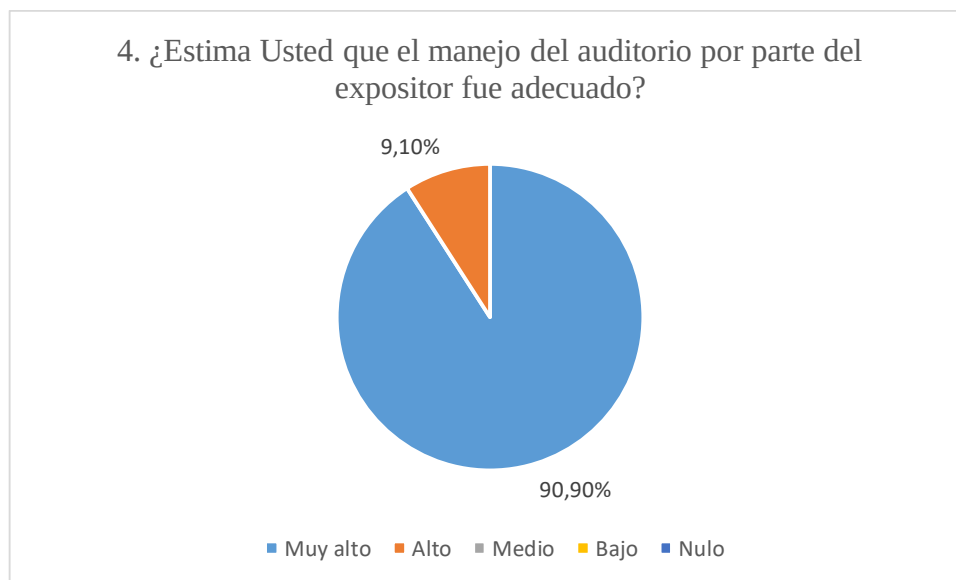
Lugar: Vía ~~Meet~~ (meet.google.com/mfi-zaci-dgn)

Hora: 15h00

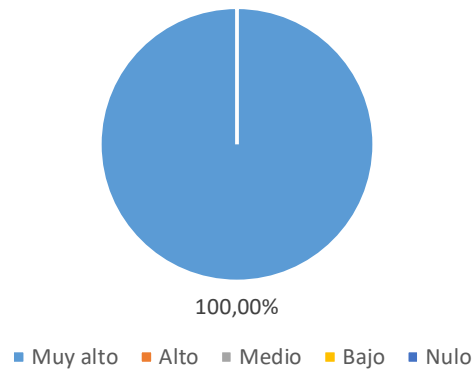
RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) son un problema importante en la salud pública y la prevalencia de las mismas permiten conocer la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, bajo esta premisa el objetivo de la presente investigación fue determinar la prevalencia y serotipo de Salmonella spp y E. coli en huevos destinados al consumo humano del cantón Ibarra, mediante análisis microbiológico, RFLP y PCR, para la creación de un banco de recursos microbianos de la PUCE-SI. De esta forma se logró conocer el nivel de inocuidad y calidad de un producto tan completo y nutritivo como es el huevo, hasta que llega a la mesa del consumidor, convirtiéndose así en un tema de trascendencia en la seguridad alimentaria.

Anexo 6. Tabulación de datos de la socialización



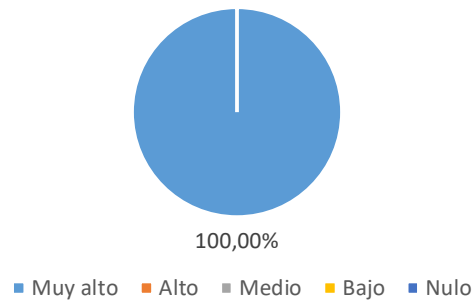
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?



7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?



8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?



9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?



Anexo 7. Secuencias identificadas

Secuencia: *Salmonella enterica* strain DQ-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TGCGAGGGCTAGTCTGCTGTGCGAGTCAGACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCT
TCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCTGATGGAGGG
GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAG
GGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGG
TGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAG
CCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGCCGTTAATAACCGTG
TCGATTGACGTTACCCGCAGAAAAAGCACCTGCTAACTCCGTGGCCGCATCCCCG
GTAATACGGAGGGTGCAATCGTTTATCGGAATTTCTGGGCGTAAACCCCAAGCGG
GCCGTCCTTCGAGTCCGAAGTGAAATCCCCCTGCTCAATGTGGGGAGCTGCCTCCC
AAAAATGGGCCCGGGGACACCTCCCCAAGGGGGGGCTTTAATCCCCGGGTCAAA
GCGGAAACATCGCTGGGATTTTTTAGAAGGAAAAAAGGGCCCAAAATGGCCCCC
CCTTGGGGTCCAAGACAAGTTTTTGGGGGTAAAACCCCCGGGTTCACCAAAGTT
TTTACTCCCCTTCCCCGGGGGAAACCCCCCCCCAAAATTATATCCCCCCCCCGCG
CCCTTCTGCCCCAAAAAAGAAAAGTTTTTCCCTTACTGATAACCCCGTTAACATTC
TAGCGGGGTGGGGGGGTCACCCCCCGCCTTTTGTTAAAACCCCCACATGGTATA
ACATAAAAAAAAAGTTGGTGCGTTGCGGTGGATATAGTTGTTTGTGTTGTGTTG
TTTGGTGGGGAGTGTGGGGTTCTACGGTATTTATTATAAGATGATCCCGTAAGCGT
TGGGCTGACTGTCGTGTGAGAATGGAGAACTAGGGGTGAGGGATAGTGGTTTATG
GTTGTTGTATAGTAGGCCTTCGGGTGCGCTAATGTGCTTGGTGGGTGGGGGGTGTA
GGGGGGTGAGAGAGGGTCGGGGGGTGGGGTGAAAGGTACTGATGCTGCATTCGT
TTCTCCGTCTGTGGGAGGGTGAGGCATGAATTGTAAAGATTATTGGGTATGCCGA
TTGCGCCTCGCACTCTCTCTGAGCGTGTGCTGGGCGTGTGGGTATGTGGAGGTCGG
CACGAATGTAAGGGAGGGTCGTTTGGCAGCGTTGCATCATTTTATTAGGTCGTTTC
TGCCCCGGAATCTGTATTGGAATGCTGTTACCGGATGAAGTCGCGGTATTGGAG
TCGATAGGCGCG

Secuencia: *Escherichia coli* strain Huaian_154_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GTAAGTAATTAAATTATTGTCGCGAGTCGACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCT
TTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGG
GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACAAAAGAG
GGGGACCTTCCGGACTCTTGCCATCGGATGTGCCCCGATGGGAGTAGGTAAAAGG
AGGGGCAGCTTATCTGCTGCACCGACTCCTTTTTTCGGGAGGGTCCCTTCCCCGACG
TCCCCAAGGTATGACATCTGCACGTCAGCGTACGGCTGCCTGGTGTGGGCCTTGTC
AGCCTGGCCCGCACCTAGATCAGGGATGGTAGCCGGTTAGGGACCTATTGCCTCA
ATTAATCTATACCTCCGCCTACGACGCAACATATTACTTAAACAAGGGCATGAAC
CTGGTGGGCCTGCCGGTCCGGTCGGAGCGGCTGCCTCCACGCTCAACCCTCCTTTC
AATCCAAAGCAACTGTTGCCCTGAACGGGTTTATCCACACGGTGACCGCCGCCG
GCCACACAGTGCTGCTCCATCTGCAAAATTATGTGCGCTATTACGGCACGTTGATC
TGGTGCAGCGCCGCTGCCCAACCTTCGCAGTTTCTGGATTTCTCGGGGGCACCCGG
TCACCGCCTTTGAGGGCGATGTCCTCGTCATCATCTAGGATGATGAATCAGAGCA
ATTCGATGACTACATATCAGTGGCTGTGCGGCGCTGCACCGCGCTGCTCGCGATCT
GTCGTACATGTGTTGCAACGTGTGTTGTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Secuencia: *Enterobacter* sp. strain A2731 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ACATTAGCATGTAGATCGTACTGTGCGAGTCAGAACGGTAGCACAGAGAGCTTG
TCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGA
GGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAA
GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGT
AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAC
CAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACC
TCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCA

TTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTACACGGGGGTACAATTCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTATAGATCTGGAGGAATACCAGTGGCGAAAGCGGCCCCCTGTACA
AAGACTGACGCTCATGTGCGAAAACGTGCGGAGCATAACAGGATTATACACCCTCG
CTAGTCCCCCTCCCCCAACAAATATCGCCCTCGCCGGCTGGTGCCCCCTGAAGCGA
AGACTTTCTGGACCTAACGCCCCCAAGTCCACCGCCGGGGGGAGAACGGTCGCCC
CCGGTCCAAACCCCAATTGAATTTGGAAGGGAAAAAAAATTCGTGTGGCAACGG
TGCTTTTGGATTTCGATTCTGTATTGATTAAGGAGTGGGTTGGCGGTTTTTGATAGAA
GCAGAAGACCTGCGCCCTATATCTAAGTTGTTGCGCGCGGCAAGTTGTTTGATGTT
GTTTTTATTAATTCCTCACGCGTTTTTTTGGCGTGGAAGGTTTTTGTGGGTGTGTGA
GTAGGGTGGTGGCTTAAGTGTGGGTTTGTGTTTATCCCCGAGGGTATAGTGT
TTGGGAAGAGTACAGACAATGTGGATCACTTCTCTTGTGTTTCTGGGGTTTCGG
GCCTTGAAAATAAGGCAGCAGCGATATGTGATGTGGCTTACGTCATCGTGTCAA
TTCTGTTCTCCCTGCAGCGGATTATATAGAGTAC

Secuencia: *Pseudomonas* sp. J15(2008) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ACGGGGGCGAGAGTGCAGAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACAGC
GGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTC
GAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG
GCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCT
CACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG
GCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAA
GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTAC
CGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGT
GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTGAAGCGCGCGTACGTGGTTTTGTAAAGT
TGGATGTGAAAACCCCGGGCTCAACCCGGGAGCTGCATCATGAAGTGGCAAACCT
GACTAGTGTACACGGTGGTGTAACTTTTTCTGTAGCCAAGAAAAGCGCAGATATT
GGGCAGAAGATAACTGGCGAGGGCAGAAAAGCCCCCAGTTTTTCTCCTGATAACG
ATGCGGCACTAGTGGGGGCATTCACAAAGATGTTCTCCCCCAGCTCGCCCAGTTTT
CGAGGGTTTTTCAACAGCCGTCGGCATACTACGAAGGAGAGGGCCCCCATCCAA

CCGCTTTGTTTGTACGTTGTAGGGCCGCCCCCCCCGCGTTTTTAATTAAAAAATATAT
ATTAAAAAACAAGTTCGTTTGGCTTTCTTTCCCGTGTTAAGGAGGGGT
GTGGGAACGCGGAATGGGGGAGTCGGCGCGCCTGATCTGAGGGTGTGTGGGGG
GGGGATGGGTGGCTTAAGTTGTGGGTAGTTTATACCGGAAATGGCTGCCCTTCG
GATTAGAGTGTCTGGTGGTTAGGTGGTCAGCGTGTCTCCGTTGGTGGGAGCGGTG
CCGCTTACTTTTCGGGGGGGTGGGAGGAAGCTAGTAAAGACTCTGTGGGGTGCCG
TTTCACTTGGGGTTTGAGAGGGGTGGAGAGACACTGGGGCGTATTATTGCATCCG
CTCATACGTATTCCCTTGCACCTGAGATATGGAGGAGTGA

Secuencia: *Acinetobacter* sp. 263XG7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

TTAAGGGAACCCCTAGGCATCACGTGTCAGAGCGTGGCAGGAGTAGCTTGCTACT
TTACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGA
CAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGG
GACCTTCGGGCCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
TGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTT
TGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACCGAGATTAATACTCTTGAT
AGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGT
GGCCAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGAT
ACTGGTTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCTTGTGTAGCGGTGAGA
TGCCTAGAGATCTGGCGGAATATAGATGGCGGGGGCAGGGATCTCGGCTGATACT
GACAGTAAGGTGCGGAGGATGCGGCGCCGCCAGAAAGGGGTTGCCCCCCCAGTG
CGTGCCCTGCGCCGAAATCTATGACCCGCCCCCGCCGCGCGACGGAAGGTAG
CGGCGGTCCCTCTCCCCGGCTATACTGACAGCTGTCTGGCGTGCCCGGTGATACA
ATACACCCCTGAGATAAAAAAAGGGATTGTCGTTGTTGGCCTCGTGGTCGTG
TCTTCTGGGTGTGGTGGTGGTGGCGGTGGGGGGCCTTTTGGTTGGGGTCTGCGTTG
TGTGGGGTGTTGGGGGGGGGGGTGGTGGCGCGTGGTTGTGGTGTGTTGTGTTTGC
GTCGGCGGCCTCGGGGTGTGTGGTGGTTCGTTCTTGGTGTGTGGGCTGGGTGTGC

GTGGGTCGGTGGTGCGGGGGGTGTGGCGGTGGGGCGTTGCGTCCGGGCGGTGTGT
GGCTCGTCTGTGCTGGGGGGTGTGCGCGTGGTGTGGCCGGCGGTGTCGCTGCTGT
GCCGTGCGGTGTTGGGTGTGGCGCGGTGGTTGGGTCTGGGTGGTCTTGTTCTTGTT
TTGC