RIESGOS DE DETERIORO Y CONTAMINACIÓN DEL HUEVO POR *SALMONELLA*

K. De Reu y col.

XVI European Symp. on the Quality of Eggs and Egg Products. Nantes, mayo 2015

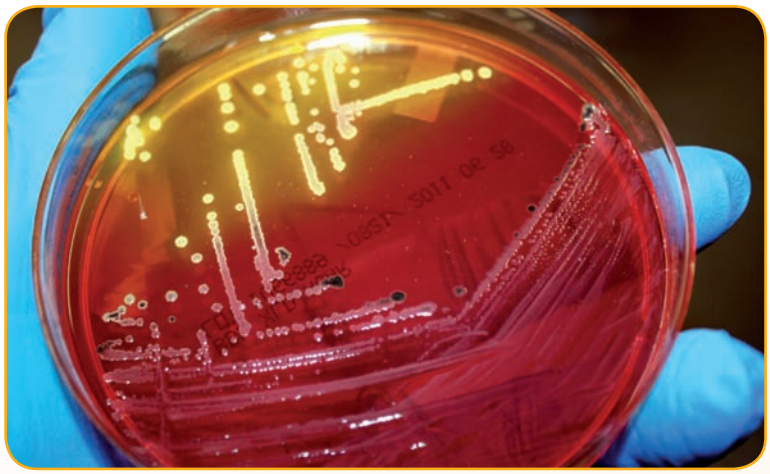
Introducción

El huevo tiene varios mecanismos físicos y químicos de defensa que protegen sus contenidos de la invasión y la multiplicación microbiana. Mientras que las membranas de la cáscara del huevo y de la cáscara impiden físicamente la penetración microbiana en el albumen, la membrana vitelina reduce la penetración en el componente más nutritiva del huevo, la yema. Las chalazas también actúan como barreras físicas contra la penetración de bacterias en la yema para mantener a esta en una posición central. Finalmente, las diversas propiedades antimicrobianas del albumen, su viscosidad y su pH alcalino inhiben la proliferación bacteriana y contribuyen a impedir la invasión de la yema. Las propiedades de las principales proteínas antimicrobianas presentes en el albumen se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de las principales proteínas antimicrobianas en el albumen.

Proteína	Características
Ovotransferina	Iones metálicos quelantes (particularmente Fe^{3}+ y también Cu^{3}+, Mn^{2}+ , Co^{2}+, Cd^{2}+, Zn^{2}+ y Ni^{2}+)
Ovomucoide	Inhibición de la tripsina.
Lisozima	a) Hidrólisis de enlaces β(1-4) glucosídicos de la pared celular bacteriana de peptidoglucanos- que actúan específicamente sobre el polímero del ácido murámico n-acetil glucosamina n-acetil, dividiendo el vínculo entre ellos. b) Floculación de las células bacterianas. c) Formación de oligosacáridos a partir de la pared celular bacteriana de tetrasacáridos por transglicosilación.
Ovoinhibidor	Inhibición de varias proteasas
Ovoflavoproteína	Quelante de la riboflavina, haciendo que no esté disponible para las bacterias que lo requieren.
Avidina	Quelante de la biotina, haciendo que no esté disponible para las bacterias que la requieren.

(*) De Reu, 2006



Para estudiar la penetración en la cáscara y la contaminación bacteriana del contenido del huevo, así como los factores de riesgo que concurren en ello, en la bibliografía se pueden encontrar diferentes métodos a nivel de laboratorio. Sin embargo, los métodos que se aplican más frecuentemente son uno basado en el agar, con el que se puede visualizar la penetración bacteriana de la cáscara y otro con huevos intactos para estudiar la contaminación del contenido de los mismos.

Vías de contaminación

Hay dos posibles vías de infección bacteriana de los huevos: vertical y horizontalmente. En la ruta transovárica -transmisión vertical-, la yema –aunque con poca frecuencia-, el albumen y/o las membranas se contaminan directamente como resultado de una infección bacteriana de los órganos reproductivos, es decir, el ovario o el tejido del oviducto, antes de que se recubran por la cáscara. La transmisión vertical puede originarse a partir de la infección de los ovarios de las ponedoras a través de una infección sistémica, o de una infección ascendente desde la cloaca contaminada a la vagina y al final del oviducto. Diferentes investigadores están convencidos de que la ruta vertical es la vía más importante para la contaminación por *Salmonella enteritidis* -SE- de los huevos por su capacidad para colonizar el ovario y el oviducto de las gallinas a largo plazo.

Hay dos posibles vías de infección bacteriana de los huevos: vertical y horizontalmente

En la transmisión horizontal los microorganismos penetran a través de la cáscara al pasar el huevo a través de una cloaca altamente contaminada en el momento de la puesta, a menudo, por visibles deposiciones fecales. Después de la oviposición, la cáscara se contamina en toda su superficie. Al estar mojado y entrar en un entorno con una temperatura de unos 20 ° C por debajo de la temperatura corporal de la gallina, el huevo se enfría inmediatamente, con lo que su contenido se contrae y la presión negativa que se establece en su interior hace penetrar las bacterias a través de la cáscara. Sin embargo, el huevo presenta una compleja serie de barreras defensivas a los organismos contaminantes que, aun pudiendo atravesar con éxito la cáscara, pueden ver detenido o demorado su desarrollo.

Tipo de la flora bacteriana

La microflora de la cáscara del huevo está dominada por bacterias Gram-positivas, mientras que las Gram-negativas están mejor equipados para superar las defensas antimicrobianas del contenido del mismo. Debido a su tolerancia a las condiciones secas, las bacterias Gram-positivas que pueden originarse en el polvo, el suelo o las heces pueden sobrevivir en la cáscara. Los huevos podridos contienen normalmente un conjunto de bacterias Gram-negativas y algunos organismos Gram-positivos. Algunos de los tipos de deterioro más comunes son miembros de los géneros *Alcaligenes, Pseudomonas, Escherichia, Proteus* y *Aeromonas* -Mayes y Takeballi, 1983; Board y Tranter, 1995-. Esto indica que las bacterias Gram-negativas están bien equipadas para superar las defensas antimicrobianas del huevo. De acuerdo con estos últimos autores, las propiedades internas de los huevos favorecen la supervivencia y el crecimiento de organismos contaminantes que son Gram-negativos y tienen un requerimiento nutricional relativamente simple y la capacidad de desarrollarse a bajas temperaturas.

Nosotros hemos encontrado que la contaminación natural de la cáscara del huevo está dominada por *Staphylococcus spp* Gram-positivos, que también parecen ser la microflora dominante en el aire de los gallineros. Como principales contaminantes del contenido del huevo se hallan: bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli, Salmonella* y *Alcaligenes sp.* y bacterias Gram-positivas, como *Staphylococcus lentus, Staphylococcus xylosus* y *Bacillus sp.*

Influencia de la carga bacteriana sobre la contaminación del huevo

Aunque nosotros hemos visto que la probabilidad de penetración de la cáscara de huevo se correlaciona con la contaminación de

ésta, es menos evidente la contaminación del contenido del mismo. La contaminación de la cáscara podría ser importante para la vida comercial y la seguridad alimentaria de los huevos y los productos de huevo en base a la hipótesis de que la contaminación bacteriana del contenido del huevo podría provenir de la penetración de la cáscara por las bacterias depositadas sobre su superficie después de la puesta -ruta horizontal-.

Influencia del sistema de alojamiento

Con la introducción de los sistemas de alojamiento alternativos para las gallinas ponedoras en la UE, desde 2006 hasta el 2012, la investigación se centró en la contaminación bacteriana de los huevos, tanto de la cáscara como de su contenido. La contaminación de la cáscara con bacterias aeróbicas de los producidos por gallinas sobre yacija generalmente es comparable con los procedentes de jaulas enriquecidas o convencionales. Sin embargo, hay estudios que indican una carga bacteriana mayor en los huevos producidos fuera de los nidales en comparación con los recogidos en los mismos o bien en jaulas enriquecidas. Las principales diferencias encontradas por nosotros en estudios experimentales –2006- entre los huevos procedentes de jaulas enriquecidas o bien de gallinas sobre yacija luego hemos visto que son menos pronunciadas en condiciones comerciales –2009-. El efecto de sistema de alojamiento sobre la contaminación de la cáscara con grupos específicos de bacterias es variable. Hay poca información sobre la influencia del sistema de alojamiento en la contaminación del contenido del huevo y nuestras investigaciones no indican grandes diferencias entre los distintos sistemas, a excepción de lo indicado sobre los recogidos en el suelo.

Los estudios de Van Hoorebeke y col. –2010- también muestran que es muy poco probable que un cambio de las jaulas convencionales a las alternativas y a otros sistemas sin jaulas se traduzca en un aumento de infecciones por *Salmonella*, sino más bien lo contrario.

Aspectos de la cáscara que afectan a la contaminación bacteriana

Las rutas de infección a través de la cáscara y la contaminación de los huevos con 7 cepas bacterianas filogenéticamente diferentes han mostrado resultados interesantes. La penetración de la cáscara de huevo tiene relación con diversas características de la misma y la identidad de las cepas. Contrariamente a la deposición de la cutícula, la superficie de la cáscara, su grosor y el número de poros no influyen en la penetración bacteriana de la misma. También hemos observado que las bacterias Gram-negativas, móviles y no agrupadas penetran en la cáscara con más frecuencia, siendo las *Pseudomonas sp.* y *Alcaligenes sp.* las invasores primarias, seguidas de la SE. En comparación con las cepas no de *Salmonella*, la SE era un invasor primario del huevo entero. Las cepas de SE relacionadas con el huevo no tienen especial capacidad para contaminar los huevos enteros en comparación con otros serotipos de *Salmonella*.

Nuestros resultados no siempre han sido confirmados por otros investigadores. La defensa de la cutícula ha sido, por ejemplo, cuestionada por Nascimento y col. –1992- y Messens y col. –2005-, utilizando huevos rellenados de agar. Otros investigadores encontraron que la SE tenía capacidades especiales para sobrevivir en el albumen en comparación con otros serotipos de *Salmonella*. En otros estudios hechos para relacionar la porosidad de la cáscara con la penetración bacteriana se han obtenido resultados variables.

La contribución más importante de la cáscara es proporcionar una protección mecánica –Board y Tranter 1995– al formar una barrera física contra la contaminación microbiana externa. Nosotros no encontramos ninguna relación entre el grosor de la misma y la probabilidad de las bacterias, incluyendo la SE, para penetrar en el huevo. Las membranas de la cáscara son barreras muy efectivas a la penetración de bacterias y, al mismo tiempo, tienen propiedades antibacterianas.

Influencia de la condensación y la edad de gallina

Durante el almacenamiento y el transporte del huevo hasta el consumo deben evitarse unas excesivas fluctuaciones de temperatura porque esto provoca la condensación de humedad y un posterior crecimiento microbiano, con la posible penetración en el interior del mismo. Nosotros hemos observado que un corto período de sudoración del huevo influye en la penetración de la cáscara pero no tiene ningún impacto en la contaminación del contenido del mismo pues si bien aquella propicia la penetración bacteriana con SE, tiene un pequeño y no significativo impacto en la contaminación

de todo el huevo. La mayor supervivencia del agente patógeno en las cáscaras de los huevos rellenados de agar podrían explicar la mayor penetración de esas cáscaras. El bajo impacto de la condensación en toda la contaminación de los huevos se puede explicar por una misma supervivencia de la SE en la cáscara de huevos enteros con y sin condensación, y por las defensas antimicrobianas del albumen. Cuanto mayor sea la contaminación del huevo entero que se encuentra al final de la puesta, en comparación con la de un momento anterior muestra que los huevos más viejos pueden ser más susceptibles a la contaminación.

Programas de control de la contaminación por *Salmonella*

La SE es considerado el único patógeno que actualmente presenta un mayor riesgo de enfermedades transmitidas por huevos en la Unión Europea. Los huevos y los ovoproductos son los alimentos más incriminados en los brotes causados por la SE, pero en algunas ocasiones también son susceptibles a la contaminación con otros patógenos, como *B. cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* y *Campylobacter* -EFSA 2014-. Gran parte de la investigación sobre la contaminación del huevo se centra en la *Salmonella* y especialmente la SE.

La observada prevalencia de la *Salmonella* en la cáscara del huevo y en su contenido es variable, dependiendo de si las investigaciones se basaron en huevos muestreados al azar o en otros procedentes de gallinas infectadas naturalmente. En granjas infectadas naturalmente con SE Dewaele y col. –2012– han encontrado contaminación de un 0,18 a un 1,8% en las cáscaras y de un 0,04% a un 0,4% en el contenido de los huevos. En 2003, la Comisión Europea publicó el Reglamento 2160/2003 que obliga a los Estados miembros a tomar medidas eficaces para detectar y controlar la salmonela y otros agentes zoonóticos, no sólo a nivel de la producción primaria sino también en otras etapas de la cadena de producción. Esta legislación especifica los requisitos generales para establecer un programa nacional de control –PNC- para la *Salmonella*. Una Directiva posterior -2003/99/CE– está destinada a garantizar que las zoonosis, los agentes zoonóticos y la resistencia a los antimicrobianos son monitoreados adecuadamente, y que los brotes de origen alimentario se investigan adecuadamente. Más tarde, las exigencias mínimas de los PNC en explotaciones de puesta se han plasmado en los Reglamento 1168/2006 y 1177/2006, modificados por el Reglamento 517/2011. La aplicación de los programas de control de *Salmonella* en la UE ha dado lugar a una clara disminución de la incidencia de la infección por SE en las gallinas, así como de las infecciones humanas debidas a este serotipo.

La *Salmonella enteritidis* es considerado el único patógeno que actualmente presenta un mayor riesgo de enfermedades transmitidas por huevos en la Unión Europea

Influencia de la temperatura y el tiempo de almacenamiento del huevo

Nosotros hemos encontrado que el nivel de contaminación de la cáscara por la flora total aerobia y las bacterias Gram-negativas disminuye en un período de almacenamiento de nueve días o más, tanto en los huevos no refrigerados como en los refrigerados. La supervivencia de la *Salmonella* en la cáscara es posible y se ve reforzada por las bajas temperaturas, estando inversamente relacionada con la temperatura de almacenamiento y la humedad relativa -Humphrey, 1994; Messens y col., 2006-. En el albumen del huevo la SE crece lentamente y sólo de forma limitada debido a el mismo contiene múltiples componentes antimicrobianos, incluyendo la pared celular bacteriana y ADN -Gantois y col., 2009-. A menos de 8 °C la *Salmonella* es incapaz de crecer en el albumen -EFSA 2014- y a 4 °C se observa un efecto bactericida en unos pocos días.

Resumen

Los consumidores y los operadores de empresas alimentarias son cada vez más conscientes de los problemas de seguridad alimentaria, microbiológica y química. La contaminación microbiológica de los huevos tiene implicaciones importantes. En los huevos puede haber contaminación interna, lo que conduce a su deterioro y, en el caso de un agente patógeno, a riesgo de enfermedades por la seguridad del producto. Los huevos son una de las principales fuentes de contaminación citados en relación con la salmonelosis humana, siendo la *Salmonella Enteritidis* –SE- el serotipo aislado más frecuentemente, con dos posibles vías de infección, vertical y horizontal.

En la vertical, el contenido del huevo se contamina directamente como resultado de una infección bacteriana de los órganos reproductivos, los ovarios y el tejido del oviducto -ruta transovárica-, mientras que en la horizontal los microorganismos penetran a través de la cáscara. La SE parece tener capacidades especiales para colonizar el tracto reproductivo de la gallina y sobrevivir en el albumen en comparación con otros serotipos de *Salmonella* y otras bacterias. Varios estudios apoyan la idea de que la ruta de contaminación vertical puede ser más importante para la SE. El agente causante de los importantes brotes humanos en la UE –2012- evidencia como causa los huevos y los ovoproductos, con el 66,7% de los casos.

Diferentes factores juegan un papel en los riesgos para el deterioro y contaminación por *Salmonella* de los huevos. Se discuten algunos de esos factores a partir de diferentes mecanismos físicos y químicos de defensa que protegen el contenido del huevo de la invasión y la multiplicación microbiana, como son la cáscara y el contenido del huevo, la frescura de éste, el enfriamiento, las condensaciones en la cáscara, las carga bacteriana en la misma, las especies bacterianas, el sistema de alojamiento de las aves, la prolongación de la vida comercial de los huevos, etc. Finalmente se discuten los riesgo de contaminación por SE en las explotaciones de puesta y el impacto de los programas de control de *Salmonella* en la UE, con o sin vacunación obligatoria contra la misma. •