

HUEVOS y OVOPRODUCTOS

El huevo de gallina consiste aproximadamente de un 9,5% de cáscara, 63% de clara y 27,5% de yema. La cáscara es bastante porosa, está constituida principalmente por carbonato de calcio y la recubre una cutícula proteica que constituye la barrera más importante contra la invasión bacteriana y regula el intercambio de gases (1). Un par de membranas separan la clara de la cáscara y otra rodea la yema. La cámara de aire localizada en el polo ancho del huevo, es relativamente pequeña en el huevo recién puesto y aumenta de profundidad a medida que pasa el tiempo.

La clara es una solución coloidal con 10,6% de proteínas, 0,9% de carbohidratos, 0,6% de minerales y trazas de lípidos. Al transcurrir el tiempo después de la postura, va perdiendo su consistencia y el pH se incrementa de 7,6 a 9,3. Varias proteínas que constituyen la clara poseen propiedades inhibitorias: conalbúmina, ovomucoide, lisozima, ovomucina, avidina, ovoflavoproteína. La lisozima disuelve las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas (2).

DETERIORO

El huevo al momento de la postura generalmente es estéril o posee pocos microorganismos. La contaminación de la cáscara ocurre en la cama de las aves y por el contacto con las heces. Para que un microorganismo produzca alteraciones en el huevo debe penetrar a través de los poros de la cáscara hasta a la membrana interna, crecer sobre la membrana y alcanzar la clara o la yema (3).

El almacenamiento a la temperatura de refrigeración no evita totalmente la alteración. Las bacterias asociadas con más frecuencia al deterioro son bacilos Gram-negativos: *Pseudomonas fluorescens* y otras especies, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Escherichia* y *Serratia* (3). Los mohos *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* y *Alternaria* se

encuentran entre las especies que producen alteración cuando los huevos son mantenidos en un ambiente muy húmedo (4).

Una vez que se quita la cáscara para producir los diferentes ovoderivados, son mayores las posibilidades de contaminación. Los factores que favorecen esta situación son: los métodos de rotura y separación de las cáscaras utilizados, la incorporación de huevos con podredumbre que no hayan sido detectados con la observación al trasluz del ovoscopio, la incorporación de “huevos claros”, que fueron incubados y no embrionaron y el efecto antimicrobiano de la clara desaparece cuando se mezcla con la yema (3).

MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Las bacterias del género *Salmonella* están asociadas a las aves y los huevos, siendo éstos los principales vehículos de su distribución e infección en el hombre. Colonizan el tracto gastrointestinal, principalmente el buche y el ciego, y se diseminan entre las aves a través de la ruta fecal-oral. En particular *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* presentan una afinidad por las aves y son invasoras. Pueden infectar el tracto reproductor de la gallina ponedora y así se transmiten verticalmente al huevo (6). *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* producen gastroenteritis en el hombre (1).

S. Enteritidis coloniza los tejidos del ovario y oviducto de la gallina (7) y cerca del 80% de las gastroenteritis humanas pueden ser « traced to » los ovoproductos contaminados (8).

La cáscara del huevo a la altura del útero es esponjosa y muy porosa, y al salir al exterior y como consecuencia del cambio de presión y de temperatura, permite la succión de bacterias presentes en la cloaca, región sumamente contaminada por su continuo contacto con las heces (3). Por otra parte, algunas bacterias pueden llegar a sobrevivir en el agua de lavado, por ejemplo *S. aureus*, y contaminar el interior de los huevos (9).

Pocas células de *Salmonella* son suficientes para infectar a un pollito recién nacido y un solo huevo contaminado, por transmisión vertical, en la incubadora es suficiente para distribuir ese patógeno hacia todos los huevos e infectar toda la incubadora por transmisión horizontal.

En un estudio se recuperaron de las granjas diferentes serovariedades de *Salmonella* del intestino de las aves (7,4 - 27,5%), huevos embrionados (0 - 2,8%), pollitos (0 - 19,2%), lauchas (15 - 21,4%), cáscara de huevos incubados (1,2 - 2,4%), contenido de huevos incubados (0,3%), camas (4 - 33%), alimento 1,6 - 5%). Los porcentajes de huevos incubados contaminados por otras bacterias provenientes de piso sucios (22,8 - 25,5%), pisos limpios (2 - 2,6%) y nidales limpios (0 - 1%). Las bacterias de huevos no incubados, en orden decreciente de frecuencia, fueron *Staphylococcus*, coliformes, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Salmonella* y *Proteus* (10).

Las salmonelas pueden crecer en un amplio rango de temperatura 4 - 54°C, aunque la mayoría de los serotipos no desarrollan a temperaturas inferiores a 7°C. Pueden proliferar a pH 4,5 - 9,5 y aún a pH 4 si está acidificado con ácido mineral. No crece en alimentos con $a_w = 0,93$ (11).

CUADRO 1. Valores de referencia para huevos y subproductos desecados o congelados (3, 5).

Criterios	Valores de referencia ufc/mL		
	Huevo líquido crudo	Ovoproductos pasterizados	Productos elaborados secos
Recuento de colonias	$m = 10^4$ $M = 10^6$ $n=5, c = 2$	$m = 10^4$ $M = 10^6$ $n=5, c = 2$	$m = 10^4$ $M = 10^6$ $n=5, c = 2$
<i>S. aureus</i>	-	-	$m = 10$ $M = 10^3$ $n = 5, c = 1^*$
<i>E. coli</i>	$< 10^2$	-	$m = <3$ $M = 10$ $n = 5, c = 2^*$
Coliformes	-	-	$m = 10$ $M = 10^3$ $n = 5, c = 2$
<i>Enterobacteriaceae</i>	-	$m = 10$ $M = 10^3$ $n = 5, c = 2$	$m = 10$ $M = 10^3$ $n = 5, c = 2$
<i>Salmonella</i>	$m = 0,$ $n = 10,$ $c = 0$	negativo en 25 g	$m = 0, n = 10,$ $c = 0$
* flan de huevo			

Otros patógenos, como *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, ocasionalmente suelen estar asociados con los huevos u ovoproductos (1).

ANALISIS MICROBIOLÓGICO

PRUEBA PRESENCIA-AUSENCIA DE *Salmonella*

a. En el caso de huevos enteros, lavar la cáscara con una solución al 0,1% de dodecil-sulfato de sodio y desinfectar con una dilución al 8% de lavandina comercial (hipoclorito de sodio 5,25%) recién preparada. Cascar y pesar el contenido en condiciones de asepsia.

b. Agregar 25 g de muestra a 225 mL de diluyente en una bolsa plástica estéril y homogeneizar en un 'masticador' durante 2 minutos, o en un frasco con 20 perlas de vidrio estériles de 2 mm de diámetro y mezclar mediante agitación mecánica o manual. Tomar tantas unidades de 25 g como sean necesarias. Incubar 4-6 hs a 30°C.

c. Añadir al cultivo anterior un volumen de caldo RV de doble concentración. Incubar a 42,5°C durante 16-18 hs.

d. Con un asa sembrar en estrías el cultivo anterior sobre placas de agar XLDN. Incubar 18-24 hs a 37°C. Observar las colonias negras con halo rojo.

CALDO RV. Peptona de soja 9 g, cloruro de sodio 14,2 g, fosfato monopotásico 2,8 g, cloruro de magnesio hexa-hidratado 72 g, verde de malaquita oxalato 0,072 g, agua destilada 1 L. Esterilizar 120°C durante 15 minutos.

AGAR XLDN. Extracto de levadura 3 g, L-lisina.HCl 5 g, xilosa 3,75 g, lactosa 7,5 g, sacarosa 7,5 g, Na desoxicolato 2,5 g, cloruro de sodio 2,5 g, tiosulfato de sodio 6,8 g, citrato férrico amónico 0,8 g, rojo fenol 0,08 g, agar 15 g, agua 1 L. Una vez fundido y enfriado a 50°C, agregar 10 mL de solución filtrada por membrana (poros de 0,2 µm) de novobiocina al 0,1%. No esterilizar en autoclave (3, 12).

El procedimiento para *Salmonella* de alimentos es diferente de su aislamiento a partir de muestras clínicas pues suelen encontrarse en bajo número y con un estrés fisiológico. Es necesario una revitalización y un enriquecimiento durante no menos de 18 hs cuando se analizan alimentos que han sido sometidos a tratamientos térmicos o de secado (12).

En un estudio comparativo la prueba de PCR luego del enriquecimiento, no detectó *Salmonella* en un 10% de los casos pero los métodos de cultivo dieron positivo en la totalidad de las muestras (13).

En el cuadro 1 se dan valores de referencia para huevo líquido, ovoproductos y productos elaborados.

CONFIRMACIÓN

Tomar con la aguja algunas de las colonias presuntamente de *Salmonella* y sembrar por punción los tubos con medio SIM, agar urea y medio de Hugh y Leifson y por estría el de agar Mac Conkey. Incubar 10-24 hs a 37°C.

AGAR UREA. Peptona 1 g, glucosa 1 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato monopotásico 2 g, rojo fenol 0,012 g, agar 15 g, agua destilada 1 L. Esterilizar en autoclave y enfriar a 50°C, agregar 50 mL de una solución de urea al 40% filtrada por membrana con poros de 0,2 µm (3).

AGAR MAC CONKEY. Peptona 20 g, lactosa 10 g, bilis de buey desecada 5 g, rojo neutro 0,03 g, cristal violeta 0,001 g, agar 15 g, agua destilada 1 L. No esterilizar en autoclave (12).

Si se empleó otro medio selectivo para el aislamiento, sembrar con una aguja por punción y estría en LIA y TSI. Incubar 24 hs a 37°C.

LIA. Peptona 5 g, extracto de levadura 3 g, glucosa 1 g, L-lisina 10 g, citrato férrico amónico 0,5 g, tiosulfato de sodio 0,04 g, púrpura de bromocresol (al 1%) 2 mL, agar 15 g, agua destilada 1 L. Esterilizar a 120°C.

TSI. Triptona 20 g, cloruro de sodio 5 g, lactosa 10 g, sacarosa 10 g, glucosa 1 g, sulfato amónico ferroso 0,2 g, tiosulfato sódico 0,2 g, solución al 2% de rojo de fenol 12 mL, agar 13 g, agua 1 L. Esterilizar a 120°C.

Las *Salmonella* no poseen ureasa ni oxidasa, fermentan glucosa, dan colonias incoloras a veces con el centro opaco en Mac Conkey, son móviles y ennegrecen el agar SIM.

Se observa reacción alcalina en el fondo del tubo de LIA. En el medio TSI la superficie inclinada es alcalina y el fondo ácido (12).

El Código Alimentario Argentino en el art. 519 establece que el huevo en polvo, la yema en polvo y la clara desecada deben estar libres de *Salmonella* viables (15).

CUADRO 2. Reacciones bioquímicas y serológicas típicas de *Salmonella* (1).

Prueba o sustrato		Positivo	Negativo	<i>Salmonella</i> *
Ureasa		Rojo púrpura	Sin cambio	Negativo
Glucosa	TSI	Fondo amarillo	Fondo rojo	Positivo
	Hugh y Leifson	Fondo amarillo	Sin cambio	Positivo
Caldo lactosa rojo fenol		Amarillo y/o gas	Sin cambio, no gas	Negativo **
Caldo sacarosa rojo fenol		Amarillo y/o gas	Sin cambio, no gas	Negativo
H ₂ S (TSI, LIA ó SIM)		Negro	No negro	Positivo
Prueba de indol		Rojo en la superficie	Amarillo en la superficie	Negativo
Prueba del rojo de metilo		Rojo	Amarillo	Positivo
Prueba de Voges Proskauer		Rosado a rojo	Sin cambio	Negativo
Medio citrato de Simmons		Crecimiento, medio azul	No crece, medio sin cambio	Variable
Descarboxilasa de la lisina	LIA	Fondo púrpura	Fondo amarillo	Positivo
	caldo	Púrpura	Amarillo	
Prueba flagelar polivalente		Aglutinación	No aglutinación	Positivo
Prueba somática polivalente		Aglutinación	No aglutinación	Positivo
Caldo dulcitol rojo fenol		Amarillo y/o gas	Sin cambio, no gas	Positivo***
Caldo KCN		Crecimiento	No crece	Negativo****
Caldo malonato		Azul	Sin cambio	Negativo*****
<p>* el 90% de las especies en 1 - 2 días; ** positivo en subespecie <i>arizonae</i> *** negativo en subespecies <i>arizonae</i>, <i>diarizonae</i>, <i>houtenae</i>, <i>indica</i> **** positivo en subespecies <i>houtenae</i>, <i>bongori</i> ***** positivo en subespecies <i>salamae</i>, <i>arizonae</i>, <i>diarizonae</i></p>				

El medio selectivo de enriquecimiento tiene por finalidad permitir que crezcan las *Salmonella* e inhibir el desarrollo de

otros microorganismos y en su formulación se utilizan compuestos químicos inhibidores (colorantes, agentes redox, etc.). Se eligen temperaturas y tiempos de incubación que faciliten el desarrollo del género investigado. Finalmente se utilizan medios de aislamiento gelificados con agentes selectivos donde estas bacterias crecen formando colonias características. Una vez aisladas las colonias se procede a su confirmación, pero la identificación final se realiza por serología en los centros de referencia, por ejemplo el Instituto Malbrán de la ciudad de Buenos Aires (14).

REFERENCIAS

1. Downes FP, Ito K. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4^a ed. American Public Health Association, Washington, p 357, 473.
2. ICMSF. 1998. Microorganisms in foods. 6. Microbial ecology of food commodities. Blackie Academic & Professional, London, p 475.
3. Mossel DAA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. 2^a ed. Acribia, Zaragoza, p 522, 608.
4. Jay JM. 2005. Modern Food Microbiology. 7^a ed. Springer, New York, p 198.
5. ICMSF. 1982. Microorganismos de los Alimentos. Vol. 2: Métodos de muestreo para el análisis microbiológico. Acribia, Zaragoza, p 111, 120.
6. Wigley P *et al.* 2005. Infect Immun 73: 2986-2990.
7. Keller LH *et al.* 1995. Infect Immun 63: 2443-2449.
8. Lu S *et al.* 2003. Infect Immun 71: 6734-6741.
9. Pearson J *et al.* 1987. Appl Environ Microbiol. 53: 2060-2065.
10. Barbour EK *et al.* 1982. Avian Diseases 26: 234-244.
11. Doyle MP *et al.*, eds. 1997. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Washington, p 129.
12. ICMSF. 1982. Microorganismos de los Alimentos. Vol. 1: Técnicas de Análisis Microbiológico. Acribia, Zaragoza, p 163.
13. Ohtsuka K *et al.* 2005. Appl Environ Microbiol 71: 6730-6735.
14. Eguer T, Caffer MI. 1988. Rev. Arg. Microbiol. 20: 151-158.
15. Código Alimentario Argentino. Cap 6. <http://www.anmat.gov.ar/codigo/caa1.htm>