

SALMONELOSIS Y HUEVOS

M^a CONCEPCIÓN PORRERO¹, MARÍA GARCÍA¹, ISABEL CUBILLO¹, ESTEFANÍA RIVERO¹, LAURA HERRERA¹, ELOY MARINO², EMMA SÁNCHEZ², SILVIA IÑIGO², MICRELA GARCÍA², FELIPE VILAS², LUCAS DOMÍNGUEZ¹ Y MIGUEL R. MORENO¹.

1 Grupo De Investigación Vigilancia Sanitaria Veterinaria (Visavet), Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid

2 Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Consejería de Sanidad y Consumo de la Comunidad de Madrid.

El informe preliminar titulado "Análisis de salmonelas en gallinas ponedoras" elaborado recientemente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha vuelto a poner de actualidad un tema, la salmonelosis, al que hace poco tiempo ya nos referíamos en estas mismas páginas [Moreno et al., 2005].

Este informe refleja el esfuerzo de la Unión Europea para conseguir en todos los Estados Miembros cifras comparables de presencia de salmonelas en ponedoras, que sirvan como punto de partida para establecer los objetivos a corto y medio plazo, así como los métodos correspondientes que permitan llegar al control de estas bacterias, y de esta forma minimizar los problemas de Salud Pública que estas bacterias ocasionan.

Los datos de prevalencia españoles en este informe, nos colocan entre los países en los que la situación en las aves de puesta es más desfavorable, aunque, como podremos ver a través de los datos que vamos a presentar, ello no signifique que en el caso de los huevos, el producto de mayor consumo obtenido en esta actividad ganadera, y a través del que mayoritariamente estas bacterias llegan a la población humana, la situación no haya mejorado de forma significativa en los últimos años.

La asociación entre huevos de gallina y salmonelas no es muy antigua y está íntimamente ligada al serovar Enteritidis. Durante muchos años el serovar más frecuente en los casos de toxiinfecciones alimentarias fue Typhimurium y los alimentos más frecuentemente implicados, la carne y los productos cáрни-

cos. Sin embargo, desde mediados de los años setenta se empezó a observar un incremento constante del serovar Enteritidis, que llegó a principios de los 90 a desplazar incluso a Typhimurium de la primera posición en la lista de serovares asociados con la salmonelosis humana. Además, la **pandemia producida por el serovar Enteritidis está ligada, en la mayor parte de los casos, al consumo de huevos o alimentos elaborados con huevos.** Esta asociación todavía no ha sido bien explicada, ya que tradicionalmente el serovar Enteritidis tenía su principal reservorio en roedores y no en aves. Este hecho, se ha intentado relacionar al menos con dos circunstancias bien diferenciadas: la utilización de rodenticidas biológicos conteniendo este serovar y la erradicación del serovar Gallinarum, frente al que Enteritidis presenta inmunidad cruzada. Independientemente de la causa, **lo cierto es que Enteritidis es en la actualidad el serovar de *Salmonella* más frecuente tanto en gallinas como en huevos,** lo cual no significa que sea el único, ni necesariamente esta situación vaya a permanecer inalterada en el futuro. **Si no se toman medidas estructurales, los esfuerzos que se están haciendo en controlar este serovar, pueden derivar en que sea desplazado por otros tan patógenos para el hombre como Enteritidis.**

A pesar del reconocimiento generalizado acerca de la importancia que la presencia de salmonelas en los huevos tiene para la salud pública, hemos encontrado muy pocas referencias de estudios en los que se haya cuantificado la presencia de salmonelas en huevos de mesa (tabla 1) y por tanto es difícil, al igual que ocurría en las gallinas, precisar cuales son los niveles existentes.



ESTUDIO DE PRESENCIA DE SALMONELAS EN HUEVOS

Entre los años 2003 y 2005 se han realizado tres programas anuales de seguimiento de los niveles de salmonelas en los huevos comercializados en la Comunidad de Madrid, lo que nos permite disponer de un marco temporal en el que se puede analizar la evolución de este relevante parámetro. La puesta en marcha de estos programas responde a la preocupación de la Dirección General de Salud Pública y Alimentación de la Consejería de Sanidad y Consumo de la Comunidad de Madrid por conocer la dimensión real de este problema de Salud Pública dentro del ámbito específico de su territorio y evaluar la eficacia de las medidas que desde el propio sector y las distintas administraciones se está haciendo por controlarlo.

El marco de muestreo se estableció utilizando la información disponible sobre la estructura del sector alimentario en 2002 (Alimarket, 2003) y quedó integrado por 31 cadenas de establecimientos que incluían hipermercados, grandes supermercados, supermercados y tiendas descuento.

Para optimizar el procedimiento se estableció como unidad de trabajo la visita, definida como el acto de acudir a un establecimiento y adquirir envases que aseguraran una cantidad mínima de 10 huevos de todas las marcas presentes en aquel momento que cumplirían las características indicadas en la **tabla 2**. Se estableció que a priori este procedimiento permitiría obtener una media de cuatro muestras por visita, y que por tanto para obtener 200 muestras se debían realizar 50 visitas. **El tamaño de muestra se fijó en 200** conside-

Si no se toman medidas estructurales, los esfuerzos que se están haciendo en controlar este serovar, pueden derivar en que sea desplazado por otros tan patógenos para el hombre como Enteritidis.

rando una prevalencia esperada alrededor del 10%.

Entre las magnitudes disponibles para completar el diseño del muestreo se eligió como punto de partida el tamaño de los establecimientos atendiendo al criterio de ser la magnitud más relacionada con el volumen de ventas. Por ello, las 50 visitas programadas se distribuyeron proporcionalmente al tamaño de los establecimientos, que fueron visitados entre una y nueve veces. Este procedimiento basado en 50 visitas permite disminuir el error de la estimación final si se llevan a cabo dos o más ciclos en las visitas (pasando de 50 a 100, a 150, etc.).

- Detección de salmonelas en el laboratorio: en todos los casos se ha empleado como unidad de análisis

laboratorial la decena de huevos, realizándose dos determinaciones de salmonelas: en cáscara y en contenido.

La presencia de salmonelas en cáscaras se ha hecho a partir de las cáscaras de los diez huevos, en tanto que para la determinación en contenido se ha partido de una alícuota de 25 gramos tomada tras la mezcla de las claras y yemas de los diez huevos integrantes de la unidad de análisis.

La fase de enriquecimiento no selectivo se ha realizado mezclando con la ayuda de un homogenizador de palas las cáscaras de los diez huevos con 500 ml de agua de peptona tamponada e incubando después a 37 °C durante 16 horas. En el caso del análisis de contenido, la alícuota de 25 ml se mezcla con 225 ml de agua de peptona tamponada, incubando en las mismas condiciones.

Tras esta incubación, el protocolo de trabajo es el mismo en ambos casos y consiste en las siguientes fases:

Enriquecimiento selectivo: se realiza simultáneamente en caldo Muller-Kauffmann con novobiocina y

Tabla 1.- Detección de salmonelas en huevos.

País y fecha	% total (n)	% contenido	% cáscara	Referencia
Thailandia,	(830)	3,9	13,2	Saitanu et al, 1994
EEUU (Arkansas)	(100)	0	1	Schutze et al., 1996
Korea	(135)	0	0	Chang, 2000
Trinidad		7,6	3,8	Adesiyun , 2005

Tabla 2.- Requisitos establecidos en el muestreo

Marcas comerciales	Todas las existentes en el establecimiento en el momento de muestreo
Categoría	“L” – en su defecto, “XL” – en su defecto, “M”
Número de envases	Hasta conseguir al menos diez huevos
Color de huevos	Indiferente
Variedades	“Batería” y “campero”.
Exclusiones	Huevos enriquecidos

en caldo selenito verde brillante, sembrando un mililitro del caldo de enriquecimiento no selectivo en cada uno de ellos e incubando a 37 °C durante 20 h.

Detección inmunoenzimática: se ha desarrollado aplicando el sistema VIDAS (bioMérieux) que consta de las siguientes fases:

Siembra en caldo M de 0,1 ml procedentes de cada uno de los caldos de enriquecimiento e incubación a 37 °C durante 6 h.

Inoculación de los cartuchos VIDAS con 1 µl de caldo M previamente hervido durante 15 minutos.

- Aislamiento de salmonelas: en todos los casos en los que el sistema VIDAS da resultado positivo se ha procedido al aislamiento de salmonelas a partir de los caldos de enriquecimiento sembrando por agotamiento en tres medios sólidos: agar SM ID 2 (bioMérieux) y agar xilosa lisina deoxicolato (XLD). Las colonias con morfología sospechosa de salmonela en cualquiera de estos medios se aíslan y se identifican empleando el sistema multisustrato API 20E (bioMérieux) y se serotifican por aglutinación con sueros comerciales. En los casos dudosos la identificación se verifica por una técnica de PCR específica del género *Salmonella*.

Cómo se puede apreciar en la **figura 1**, entre 2003 y 2005 se ha detectado un descenso marcado y constante de los niveles de salmonelas en los huevos investigados, que caen desde 24,8% de decenas positivas en 2003 hasta únicamente 7,1% en 2005. Además, estas salmonelas se han detectado mayoritariamente en la cáscara de los huevos, lo que indica que se trata de una situación susceptible de ser abordada con distintas medidas complementarias aplicables tanto en los animales como en los propios huevos.

También se aprecia un descenso notable en el porcentaje de marcas comerciales en las que se han detectado salmonelas, que ha pasado de ser 55% en 2003 (23/42) a 49% en 2004 (19/39) y a sólo 29% en 2005 (12/42).

Por lo que se refiere a los serovares identificados (**figura 2**) Enteritidis ha sido en cada uno de los tres años el serovar predominante (40-50% de los aislados de cada año) y el único junto con Infantis que se ha encontrado en los tres estudios. Además, los datos de 2005 indican que no sólo se ha producido en descenso en el número de aislados, sino también en el de serovares, que desciende desde 12-15 (2003-2004) a tan sólo cinco.

SALMONELAS EN PONEDORAS Y SALMONELAS EN HUEVOS: RELACIONES

El informe de la EFSA al que hacemos referencia pone de manifiesto que la probabilidad de que un huevo contenga salmonelas depende, entre otros factores, de la prevalencia de salmonelas en cada manada productiva y de la frecuencia con la que las gallinas infectadas pongan huevos contaminados, coincidiendo la mayor parte de los estudios en que la proporción de huevos con salmonelas suele ser inferior al 3%.

Los trabajos en los que se analizan factores de riesgo de la presencia de salmonelas en gallinas ponedoras son muy escasos y sus conclusiones señalan como factores de riesgo al número de animales, a la coexistencia de animales con distintas edades y a la utilización de sistemas en seco de eliminación de heces.

Recientemente, Prevost et al. (2006) han propuesto un modelo matemático para predecir los niveles de huevos contaminados procedentes de granjas con salmonelas. **El modelo asume que el número de huevos contaminados procedentes de gallinas que únicamente tienen salmonelas en el digestivo es despreciable y que por tanto el mayor riesgo proviene de las gallinas con infección sistémica, lo cual no refleja nuestra percepción del tema, pero se ajusta bien a los datos experimentales previamente publicados por otros autores** (Bichler et al., 1996; Portáis et al., 1996) que muestran que, tras un pico elevado de huevos infectados durante la primera semana (que alcanza valores del 40%), el nivel desciende drásticamente en las siguientes hasta valores de 1 a 3% que se mantienen al menos durante siete semanas.

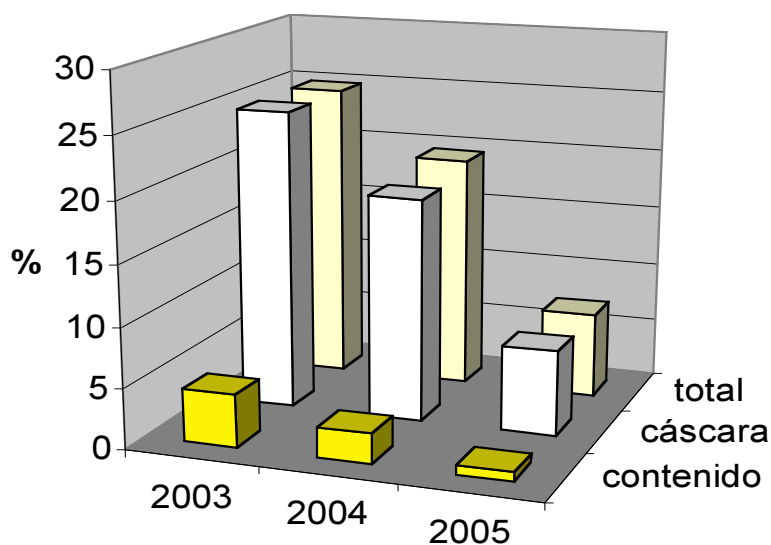
Este modelo pone de manifiesto la influencia de la frecuencia de recontaminación de los animales en la persistencia de las salmonelas en las explotaciones de ponedoras. El descenso del riesgo de reinfección entre los animales que se han recuperado de la infección está íntimamente ligado a su respuesta inmunitaria (que impide que vuelvan a ser susceptibles), que tiene así una gran influencia en los niveles de contaminación de los huevos. Este modelo permite por tanto entender y analizar las relaciones entre las estrategias de vacunación y de selección genética y la producción de huevos contaminados con salmonelas.

Ya que las únicas salmonelas que son altamente patógenas para las gallinas son las pertenecientes al serovar Gallinarum (biovares Gallinarum y Pullorum), la presencia de otros serovares de salmonelas en gallinas ponedoras y en huevos es un riesgo que se tiene que valorar en términos de Salud Pública. Por eso, en la actualidad se han puesto en marcha distintas líneas de investigación para tratar de entender qué diferencia a las estirpes, cepas o serovares de *S. enterica* que son responsables de los casos de salmonelosis humana y cuáles son sus principales reservorios.

A la luz de los resultados obtenidos de los huevos investigados, el descenso que se ha puesto de manifiesto en la presencia de salmonelas en los huevos comercializados en Madrid podría reflejar el impacto de las diferentes medidas que han puesto en mar-



Figura 1.- Resultados de detección de *S. enterica* en huevos comercializados en la Comunidad de Madrid.



pletamente implantado un plan de vigilancia y autocontrol de salmonelosis y que hayan demostrado su eficacia con análisis negativos (serovares Enteritidis y Typhimurium) durante al menos seis meses. Además, se establece un protocolo de verificación de las medidas de bioseguridad en estas explotaciones que valora todas las posibles vías conocidas de entrada de salmonelas y la existencia de medidas de protección adecuadas en cada una de ellas.

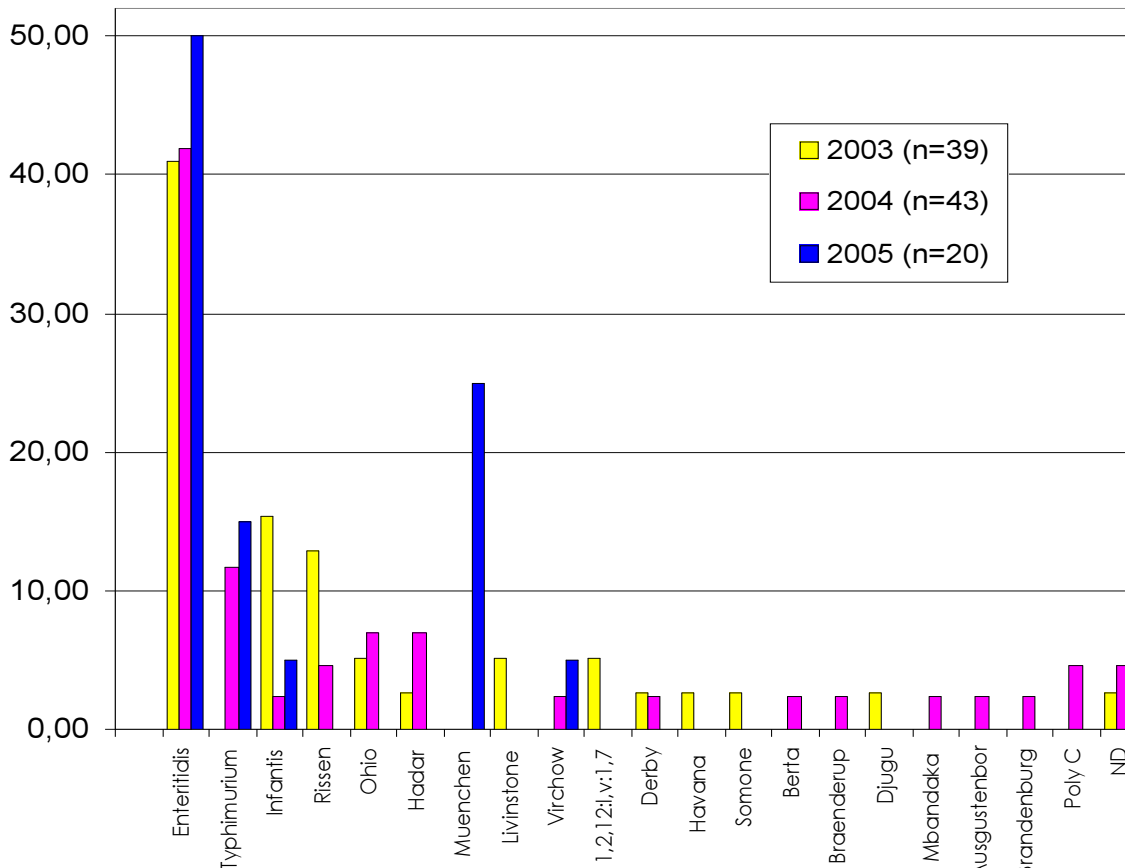
La confirmación de la presencia de cualquiera de estos dos serovares de *S. enterica* en las explotaciones de ponedoras implica la paralización de los movimientos de las aves vivas, salvo su salida con destino a sacrificio, que se realizará siempre en mataderos autorizados para esta

cha tanto por la administración como por el sector.

En las gallinas ponedoras, la Orden PRE/1377/2005, de 16 de mayo de 2005, establece medidas de vigilancia y control de salmonelosis en explotaciones de gallinas ponedoras a efectos del establecimiento de un Programa Nacional. El artículo 8 de esta Orden indica que la vacunación de las futuras ponedoras es obligatoria, salvo para las explotaciones que tengan com-

finalidad o en lugares expresamente autorizados. Es importante destacar que el sacrificio de estos animales se debe realizar adoptando todas las medidas necesarias para reducir al máximo la contaminación del propio matadero, lo que implica sacrificio al final de la jornada de trabajo y subsiguiente desinfección de todas las instalaciones. Por último, la carne de estos animales sólo se podrá destinar al consumo humano

Figura 2.- Distribución porcentual de los serovares identificados en huevos comercializados en la Comunidad de Madrid.



tras aplicar un tratamiento térmico industrial o de otro tipo que asegure la eliminación de las salmonelas y que esté autorizado por la legislación comunitaria sobre higiene de alimentos.

En lo que hace referencia a los locales ocupados por estos animales, tras su vaciado, se procederá a aplicar medidas de limpieza y desinfección que garanticen la eliminación de las salmonelas.

En el caso de los huevos procedentes de las aves de estas explotaciones, éstos deberán ser destruidos bajo control oficial o, en su defecto, trasladados a un establecimiento autorizado para la elaboración de ovoproductos que sufran un tratamiento térmico que garantice la destrucción de las salmonelas.

En el caso específico de la contaminación de los huevos con salmonelas, es relevante destacar que el esmero en la higiene durante los procesos de clasificación, y en especial la eliminación de los huevos sucios de los canales comerciales, es una medida sencilla pero muy eficaz para disminuir drásticamente el riesgo de salmonelosis en los consumidores, ya que como señalan los resultados que acabamos de presentar, las salmonelas se encuentran mayoritariamente en el exterior del huevo y por tanto son vehiculadas por la suciedad que se adhiere a la superficie del huevo desde el momento de la puesta.

Existen algunos estudios que ponen de manifiesto la relevancia de los centros de clasificación de huevos, especialmente por la posibilidad de que se produzcan contaminaciones cruzadas y que por tanto se detecten salmonelas en huevos procedentes de explotaciones realmente libres de ella (Davies and Breslin, 2003), e igualmente es necesario mencionar la utilización de las técnicas de higienización de huevos como herramienta útil para el control de este problema (Musgrove et al., 2005).

A la luz de los resultados obtenidos, y a pesar de los altos niveles de salmonelas en ponedoras publicados por la EFSA, se pone de manifiesto que mediante la actuación simultánea en toda la cadena alimentaria, puede ser posible disminuir el riesgo que para el consumidor tiene la presencia de estos patógenos en el huevo.

En consecuencia, y debido a que la contaminación detectada en nuestro estudio, es fundamentalmente en cáscara, sería necesario prestar una particular atención a las medidas de control que se puedan aplicar directamente sobre éste alimento en paralelo con las que se están aplicando sobre los animales en las granjas, en tanto las medidas oficiales de control, recientemente implantadas en la producción primaria, reducen la pre-

Debido a que la contaminación detectada es fundamentalmente en cáscara, sería necesario prestar una particular atención a las medidas de control que se puedan aplicar directamente sobre éste alimento en paralelo con las que se están aplicando sobre los animales



valencia de salmonela en las manadas de ponedoras a cifras homologables con los países más avanzados de nuestro entorno y en consonancia con la importancia de este sector y el nivel de protección de la salud esperado por el consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

- Bichler, L.A., Nagaraja, K.V., and Halvorson, D.A. 1996. *Salmonella enteritidis* in eggs, cloacal swabs specimens, and internal organs of experimentally infected white leghorn chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 57: 489-495.
- Davies, R. H., and Breslin, M. 2003. Investigation of *Salmonella* contamination and disinfection in farm egg-packing plants. *J. Appl. Microbiol.*, 94: 191-196.
- EFSA. 2006. Preliminary report. Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in laying hens flocks of *Gallus gallus*. *EFSA J.*, 81: 1-71.
- Guard-Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ. Microbiol.*, 3: 421-430.
- Mollenhorst, H., van Woudenberg, C.J., Bokkers, E.G.M., and de Boer, I.J.M.. 2005. Risk factors for *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. *Poul. Sci.*, 84: 1308-1313.
- Moreno, M.A., Porrero, M.C., Téllez, S., García, M., y Domínguez, L. 2005. Salmonelosis ¿un peligro asumible?. *Profesión Veterinaria*, 15 (62): 64-69.
- Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K., Harrison, M.A., and Cox, N.A. 2005. *J. Food Protect.*, 68: 2367-2375.
- Prévost, K, Magal, P., and Beaumont. C. 2006. A model for *Salmonella* infection within industrial house hens. *J. Theor. Biol.*, 5:
- Rabsch, W., Tschape, H., and Bäumlner, A.J. 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microb. Infect.*, 3: 237-247.