



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE QUIMICA

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DEL  
HUEVO  
Y SUS DERIVADOS**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

FRANCISCO ALEJANDRO DOMINGUEZ PINEDA



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE: **ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ**

VOCAL: **AURORA IRMA ORTEGÓN ÁVILA**

SECRETARIO: **HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ**

1er. SUPLENTE: **RUTH EDITH MARTIN FUENTES**

2º SUPLENTE: **LILIANA ROCÍO GONZÁLEZ OSNAYA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: **FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

**Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez**

SUSTENTANTE (S):

**FRANCISCO ALEJANDRO DOMÍNGUEZ PINEDA**

## Contenido

<b>Resumen</b>	1
<b>Objetivos</b>	2
<b>Metodología</b>	2
<b>Capítulo 1: El mercado del huevo</b>	3
<b>Capítulo 2: El huevo: Definición, Estructura y Composición</b>	14
El huevo fresco	15
Definición	16
Estructura del huevo	17
Cáscara y membranas	18
Clara o albumen	21
Yema	24
Composición y valor nutrimental del huevo	28
Proteínas	29
Lípidos	31
Vitaminas y minerales	34
Otros componentes	36
Recomendaciones acerca del consumo de huevo	38
<b>Capítulo 3: Formación del Huevo</b>	39
Puesta de huevos	40
Anatomía del aparato reproductor de la gallina	43
Desarrollo del aparato reproductor	45
Fisiología del ovario	53
El ovario. Órgano de síntesis de los esteroides sexuales	53
Oogénesis	55
Formación de la yema del huevo (Vitelogénesis)	57
Cronología y regulación de la deposición del vitelo	57
Origen de los constituyentes de la yema	60
Situación del oocito en la yema	61
Formación del huevo en el oviducto	62
Ovulación	62
Formación de las envolturas del huevo en el oviducto	63
Función secretora del infundíbulo	65
Secreción de la clara en el magnum	67
Actividad del istmo: Secreción de las membranas testáceas e iniciación de la cáscara	71
Actividad del útero: Formación de la cáscara del huevo	72
Oviposición	77
Alteraciones del huevo durante su formación	78

<b>Capítulo 4: Microbiología del huevo</b>	81
Contaminación microbiológica del huevo	82
Barreras físicas y químicas del huevo	85
Barreras físicas	85
Barreras químicas. Factores antimicrobianos del albumen y de la yema	88
<i>Salmonella</i> y Salmonelosis	96
Caracterización de la salmonelosis	100
<i>Salmonella</i> Enteritidis y el huevo	102
<i>Salmonella</i> Typhimurium y el huevo	104
Otros serotipos de <i>Salmonella</i> y el huevo	106
Mecanismos de contaminación del huevo	108
Transmisión horizontal	108
Transmisión vertical	114
Contaminación de los huevos antes de la oviposición	121
Contaminación de los huevos después de la oviposición	124
Impacto de <i>Salmonella</i> en la salud pública	129
Medidas de control y prevención	130
Diagnostico de <i>Salmonella</i>	131
Microbiota inicial	134
Microorganismos de alteración	134
Efecto del tratamiento sobre los microorganismos	138
Control	148
Virus	150
Enfermedad de Newcastle	150
Influenza aviar	155
<b>Capítulo 5: Ovoproductos</b>	167
Ovoproductos	168
Definición, tipos, clasificación, aplicaciones y composición nutrimental	171
Tipos	172
Clasificación	172
Aplicaciones	175
Composición nutrimental	176
Elaboración de ovoproductos	178
Pretratamientos	179
Filtrado	182
Homogenización	184
Pasteurización	184
Envasado	187
Congelación	187
Concentración	188

Deshidratación/Secado	188
Envasado y Embalaje	189
Almacenamiento	189
Aditivos	189
Especificaciones legales de los ovoproductos en seguridad alimentaria y calidad	191
<b>Capítulo 6: Microbiología de los ovoproductos</b>	193
Contaminación microbiológica de los ovoproductos	194
Huevos líquidos	194
Efectos del tratamiento sobre los microorganismos	194
Microorganismos de descomposición y alteración del huevo líquido	211
Microorganismos patógenos	214
Medidas de control	218
Huevos deshidratados	219
Efectos del tratamiento sobre los microorganismos	219
Microorganismos de descomposición y alteración del huevo deshidratado	224
Microorganismos patógenos	224
Medidas de control	225
Otros ovoproductos	225
<b>Capítulo 7: Calidad del huevo</b>	227
Clasificación de los huevos	228
Especificaciones	228
Calidad de huevo	237
Huevo entero	237
Cáscara	239
Albumen	241
Yema	258
Otros factores de calidad	260
Desarrollo de un HACCP	263
Diagramas de flujo	264
Identificación de peligros y PCC	265
Consideraciones sanitarias a los procesos productivos de centros de clasificación y embalaje de huevos e industrias de ovoproductos	269
Desarrollo de tablas de gestión y monitorización de PCC	272
Registro de vigilancia y monitorización	273
Verificación del sistema	280
Consejos en el manejo de huevos por los consumidores	282
<b>Capítulo 8: Conclusiones y Sugerencias</b>	285



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales propiedades funcionales de las proteínas del huevo en sistemas alimenticios.....	5
<b>Tabla 2.</b> Importaciones y Exportaciones de huevo fresco.....	77
<b>Tabla 3.</b> Tabla 3. Composición de las distintas partes del huevo.....	18
<b>Tabla 4.</b> Proteínas de la clara de huevo.....	23
<b>Tabla 5.</b> Composición de la yema del huevo y sus partes integrantes (gránulos y plasma). Porcentaje del extracto seco de la yema. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Lípidos de la yema del huevo.....	27
<b>Tabla 7.</b> Contenido de energía y macronutrientes del huevo.....	28
<b>Tabla 8.</b> Contenido en aminoácidos del huevo .....	29
<b>Tabla 9.</b> Comparación de los aminoácidos esenciales de la proteína del huevo con la proteína de referencia. ....	30
<b>Tabla 10.</b> Composición de los lípidos del huevo .....	32
<b>Tabla 11.</b> Contenido en vitaminas del huevo.....	35
<b>Tabla 12.</b> Contenido en minerales del huevo.....	36
<b>Tabla 13.</b> Longitudes y pesos de los distintos segmentos del oviducto. Tiempo de permanencia del huevo en la formación y su contribución a la formación del huevo.....	65
<b>Tabla 14.</b> Efecto del peso específico de la cáscara del huevo y del tiempo de la competición bacteriana sobre el momento de la primera alteración fluorescente de los huevos.....	86
<b>Tabla 15.</b> Efecto del peso específico de la cáscara de huevo y del tiempo de la competición bacteriana sobre la incidencia total de la contaminación por <i>Pseudomonas</i> de los huevos después de ocho semanas de almacenaje.....	87
<b>Tabla 16.</b> Porcentaje de huevos de calidades de cáscara diferentes penetrados por diversas especies de <i>Salmonella</i> en 24 horas.....	87
<b>Tabla 17.</b> Factores antimicrobianos en el albumen del huevo de gallina.....	89



<b>Tabla 18.</b> Microbiota de la superficie de la cáscara del huevo y del interior de los huevos alterados.....	135
<b>Tabla 19.</b> Microbiota de los huevos de diferentes aves.....	135
<b>Tabla 20.</b> Géneros bacterianos aislados en los diversos tipos de huevos podridos .....	137
<b>Tabla 21.</b> Porcentaje de huevos ligeramente sucios penetrados por bacterias durante el almacenamiento de 9 meses a 1.7- 4.4°C y 65- 80% de humedad relativa, según el método de limpieza empleado.. .....	141
<b>Tabla 22.</b> Influencia del lavado de los huevos en la alteración durante y después del almacenamiento .....	142
<b>Tabla 23.</b> Usos de los ovoproductos.....	168
<b>Tabla 24.</b> Propiedades funcionales de los ovoproductos para la industria alimentaria.....	176
<b>Tabla 25.</b> Aditivos para alimentos permitidos para los productos y derivados del huevo.....	190
<b>Tabla 26.</b> Especificaciones físicas y químicas de los huevos y ovoproductos .....	191
<b>Tabla 27.</b> Especificaciones para metales pesados y metaloides huevos y ovoproductos.....	191
<b>Tabla 28.</b> Especificaciones microbiológicas de los huevos y ovoproductos.....	192
<b>Tabla 29.</b> Especificaciones para residuos de medicamentos en huevos y ovoproductos.....	192
<b>Tabla 30.</b> Reducción del número de algunos grupos microbianos y <i>Salmonella</i> durante la pasteurización de la clara de huevo líquida.....	199
<b>Tabla 31.</b> Reducción del número de algunos grupos microbianos y <i>Salmonella</i> durante la pasteurización del huevo entero líquido.....	200
<b>Tabla 32.</b> Características de la termorresistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en los ovoproductos líquidos.....	201
<b>Tabla 33.</b> Contenido de proteína soluble en el huevo entero líquido sometido a un tratamiento térmico o PEF seguido de un tratamiento térmico con trietil citrato (TC) al 2%.....	208
<b>Tabla 34.</b> Efecto de la congelación sobre la microbiota del huevo entero líquido pasteurizado y no pasteurizado .....	211

<b>Tabla 35.</b> Cambios producidos por diferentes géneros de bacterias aisladas originariamente en huevo líquido y después inoculadas en cultivo en huevo estéril.....	213
<b>Tabla 36.</b> Métodos comerciales y experimentales para la eliminación de la glucosa en los huevos líquidos.....	222
<b>Tabla 37.</b> Tiempos y temperaturas de almacenamiento en cámara caliente para destruir a <i>Salmonella</i> spp. en el albumen del huevo desecado.....	223
<b>Tabla 38.</b> Características cualitativas de los huevos de las diferentes categorías.....	229
<b>Tabla 39.</b> Clasificación de los huevos según su peso.....	232
<b>Tabla 40.</b> Efectos del vanadio y cromo en las U.H.....	249
<b>Tabla 41.</b> Efectos del ácido ascórbico sobre el vanadio y en las U.H.....	249
<b>Tabla 42.</b> Reducción del pH debido a la modificación de la atmosfera en CO <sub>2</sub> .	255
<b>Tabla 43.</b> Pérdidas de peso en huevos aceitados y sin aceite.....	255
<b>Tabla 44.</b> Influencia del aceitado en las U.H.....	256
<b>Tabla 45.</b> Influencia de la posición en el almacenaje.....	257
<b>Tabla 46.</b> Influencia del intervalo de recolección en las U.H.....	257
<b>Tabla 47.</b> Porcentaje de manchas de sangre o de carne a las 70 semanas de vida.....	261
<b>Tabla 48.</b> Peligros y PCC identificados en el proceso de clasificación y embalaje de huevos.....	267
<b>Tabla 49.</b> Peligros y PCC identificados en el proceso de fabricación de huevo, clara o yema líquida pasteurizada.....	268
<b>Tabla 50.</b> Tabla de gestión: Centro de clasificación y embalaje de huevos.....	274
<b>Tabla 51.</b> Tabla de gestión en la fabricación de huevos, clara y yema líquida pasteurizada.....	275
<b>Tabla 52.</b> Tabla de gestión en la fabricación de huevos, clara y yema líquida pasteurizada.....	276
<b>Tabla 53.</b> Ficha control en la producción de huevos de naves granjas.....	277

<b>Tabla 54.</b> Ficha control limpieza y desinfección.....	277
<b>Tabla 55.</b> Ficha de control de higiene y buenas practicas de fabricación.....	278
<b>Tabla 56.</b> Ficha de control de temperaturas. ....	279
<b>Tabla 57.</b> Ficha control transportes.....	279
<b>Tabla 58.</b> Parte de incidencias.....	280

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Consumo per cápita de huevo fresco de 1994 al 2011.....	6
<b>Figura 2.</b> Producción nacional de huevo fresco hasta el 2011.....	6
<b>Figura 3.</b> Estados productores de huevo fresco hasta el 2011.....	7
<b>Figura 4.</b> Casos de enfermedades gastrointestinales atribuibles al consumo de alimentos en México del 2000 al 2010. ....	9
<b>Figura 5.</b> Microorganismos involucrados en las ETA'S en México 2010.....	10
<b>Figura 6.</b> Resultados del muestreo de diferentes grupos de alimentos durante el 2010.....	10
<b>Figura 7.</b> Estructura del huevo.....	17
<b>Figura 8.</b> Estructura de la cáscara del huevo.....	20
<b>Figura 9.</b> Partes anatómicas del ave relacionadas con la reproducción. ....	40
<b>Figura 10.</b> Esquema de la formación del huevo en la gallina. ....	41
<b>Figura 11.</b> Ovario y Oviducto. ....	42
<b>Figura 12.</b> Desarrollo esquemático del ovario y del oviducto en la gallina.....	45
<b>Figura 13.</b> Ubicación del aparato reproductor de la gallina en la cavidad abdominal.....	46
<b>Figura 14.</b> Estructura de la pared de un folículo en fase de crecimiento rápido. ...	47
<b>Figura 15.</b> Estructura detallada de la granulosa y de la zona radiata.. ....	48
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática del oviducto de la gallina.....	50
<b>Figura 17.</b> Estructura de la pared del oviducto.....	51
<b>Figura 18.</b> Estructura de una glándula útero-vaginal o “nido espermático”.....	51
<b>Figura 19.</b> Resumen de las principales funciones de las hormonas esteroideas del ovario.....	54
<b>Figura 20.</b> Resumen de las fases de crecimiento y maduración de la yema del huevo.....	56

<b>Figura 21.</b> Representación esquemática de un corte transversal de la yema después de la ovulación .....	58
<b>Figura 22.</b> Desarrollo ponderal del óvulo durante la fase de gran desarrollo. ....	58
<b>Figura 23.</b> Incorporación de carotenoides en la yema. ....	59
<b>Figura 24.</b> Evolución del peso de la yema y de la duración de la fase de gran crecimiento en función de la edad de la gallina.....	59
<b>Figura 25.</b> Representación de interacciones hormonales durante la ovulación. ....	63
<b>Figura 26.</b> Modelo matemático de un ciclo ovulatorio con una serie de tres huevos. ....	63
<b>Figura 27.</b> Esquema del sistema hipotálamo hipofisario en las aves y sus relaciones vasculares. ....	64
<b>Figura 28.</b> Esquema de la formación del huevo en la gallina. ....	66
<b>Figura 29.</b> Esquema de la formación de las distintas envolturas del huevo en el oviducto. ....	66
<b>Figura 30.</b> Modificaciones de las células epiteliales del magnum debido a la secreción de la clara. ....	68
<b>Figura 31.</b> Depósito de cuatro proteínas del albumen en la yema en función del tiempo que el huevo permanece en el magnum. ....	68
<b>Figura 32.</b> Relación entre la edad de la gallina y las U. Haugh y % de huevos de 2ª categoría. ....	70
<b>Figura 33.</b> Efecto del tiempo y de la temperatura de almacenamiento del huevo sobre las Unidades Haugh. ....	71
<b>Figura 34.</b> Evolución del contenido en agua de la clara y del peso de la cáscara durante la permanencia del huevo en el útero. ....	72
<b>Figura 35.</b> Evolución de las proporciones de cada tipo de albumen durante el tiempo de permanencia del huevo en formación en el útero. ....	74
<b>Figura 36.</b> Presencia del hueso medular en la gallina ponedora.....	77
<b>Figura 37.</b> Curva epidémica (Epi-curve) que muestra el comportamiento de los casos de salmonelosis de la cepa JEGX01.0004, reportados por el CDC en los Estados Unidos desde enero a diciembre de 2010. ....	98
<b>Figura 38.</b> Patogénesis de la contaminación de los huevos por <i>Salmonella</i> .....	109

<b>Figura 39.</b> Signos y lesiones del tracto respiratorio por ENC.....	152
<b>Figura 40.</b> Signos nerviosos: tortícolis y parálisis por ENC.....	152
<b>Figura 41.</b> Caída de la puesta y alteración de la calidad de los huevos por ENC. .....	153
<b>Figura 42.</b> Las aves afectadas por HPAI pueden presentar hinchazón de la cabeza y la cara, además de hemorragia en la piel y patas. ....	156
<b>Figura 43.</b> La decoloración del color púrpura de la cresta puede ser un indicador de la HPAI.....	156
<b>Figura 44.</b> Representación esquemática de una partícula del virus de la gripe...	157
<b>Figura 45.</b> Principales rutas migratorias del mundo y localización geográfica de los brotes registrados del virus H5N1.. ....	158
<b>Figura 46.</b> Brotes notificados al OIE de influenza aviar H7N3 en aves de corral y aislados del virus a través del monitoreo de las aves silvestres en América desde el 2002 al 2012.....	165
<b>Figura 47.</b> Proceso general de obtención de ovoproductos.....	178
<b>Figura 48.</b> Huevos destinados a la elaboración de ovoproductos.....	180
<b>Figura 49.</b> Ovoscopiado y detector automático de huevo sucio y fisurado respectivamente.....	181
<b>Figura 50.</b> Ovoscopiado de huevos.....	181
<b>Figura 51.</b> Cascadoras automáticas.....	183
<b>Figura 52.</b> Cascado y separación de sus partes. ....	183
<b>Figura 53.</b> Esquema de los diferentes tratamientos térmicos en la elaboración de ovoproductos .....	186
<b>Figura 54.</b> Contaminación del huevo líquido por la máquina rompedora de huevos infectada con <i>Serratia marcescens</i> .....	196
<b>Figura 55.</b> Efecto del pH sobre el valor $D_{56.6^{\circ}\text{C}}$ correspondiente a SE y <i>L. monocytogenes</i> en clara de huevo líquida calentada.....	204
<b>Figura 56.</b> Envasado y almacenamiento de huevos.....	234
<b>Figura 57.</b> Información de la etiqueta de huevos frescos envasados. ....	235

<b>Figura 58.</b> Croquis de un centro de clasificación y envasado de huevos.....	236
<b>Figura 59.</b> Técnica de la luz ultravioleta.. .....	238
<b>Figura 60.</b> Prueba de la frescura.....	239
<b>Figura 61.</b> Prueba de la flotabilidad para determinar la frescura del huevo. ...	239239
<b>Figura 62.</b> Equipo requerido para realizar la determinación del peso específico. ....	241
<b>Figura 63.</b> Determinación del pH en el albumen. ....	242
<b>Figura 64.</b> Parámetros en la medición de las U.H.....	243
<b>Figura 65.</b> Esquematación de las U.H. con la frescura del huevo.....	243
<b>Figura 66.</b> Edad de la gallina, U.H. de aves nacidas en 1992. ....	245
<b>Figura 67.</b> Muda forzada. U.H. de aves nacidas en 1992.....	245
<b>Figura 68.</b> Variación del peso del albumen.....	245
<b>Figura 69.</b> Variación de la altura del albumen.....	246
<b>Figura 70.</b> Variación de las U.H. . ....	246
<b>Figura 71.</b> Pérdida de peso en almacenaje. ....	251
<b>Figura 72.</b> Pérdida de peso en función del medio ambiente (%HR).....	252
<b>Figura 73.</b> Pérdida de peso en función del medio ambiente (temperatura °C) ...	252
<b>Figura 74.</b> Pérdida de peso en función de la temperatura.....	253
<b>Figura 75.</b> Pérdidas de CO <sub>2</sub> con el tiempo.....	253
<b>Figura 76.</b> Influencia de la temperatura en almacenaje .....	254
<b>Figura 77.</b> U.H. en función del pH del albumen.....	254
<b>Figura 78.</b> Almacenaje en atmósfera rica en CO <sub>2</sub> . ....	255
<b>Figura 79.</b> Almacenamiento con envases herméticos.....	256
<b>Figura 80.</b> Intervalo entre dos recogidas de huevos. ....	258
<b>Figura 81.</b> Evolución de cationes en el albumen.....	259

<b>Figura 82.</b> Índice de yema en función de la temperatura.....	260
<b>Figura 83.</b> Esquema metabólico de algunas fuentes de alimentación como factores de calidad organolépticos.....	261
<b>Figura 84.</b> Diagrama de flujo de un centro de clasificación y embalaje de huevos .....	264
<b>Figura 85.</b> Diagrama de flujo de la fabricación de ovoproductos líquidos pasteurizados.....	265



## Abreviaturas utilizadas en el texto

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AFSSA</b>	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>AHA</b>	American Heart Association
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>CDC</b>	Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos
<b>CENAVECE</b>	Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades
<b>COFEPRIS</b>	Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
<b>DGE</b>	Dirección General de Epidemiológica
<b>DGIAAP</b>	Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera
<b>ECDC</b>	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>ENC</b>	Enfermedad de Newcastle
<b>ETA´S</b>	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FSA</b>	Food Safety Agency
<b>HACCP</b>	Hazard Analysis and Critical Control Points
<b>HPAI</b>	Influenza Aviar de Alta Patogenicidad
<b>IA</b>	Influenza Aviar
<b>IEC</b>	Comisión Internacional del Huevo
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
<b>INFOSAN</b>	The International Food Safety Authorities Network
<b>INIFAP</b>	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
<b>HPA</b>	Health Protection Agency
<b>LPAI</b>	Influenza Aviar de Baja Patogenicidad
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>PFGE</b>	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>PROAN</b>	Proteína Animal, SA de CV
<b>PROFECO</b>	Procuraduría Federal del Consumidor
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de Agricultura, Ganadería , Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
<b>SE*</b>	Secretaría de Economía
<b>SE</b>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<b>SENASICA</b>	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
<b>SIAP</b>	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
<b>SIICEX</b>	Sistema de Integral de Información de Comercio Exterior
<b>SSA</b>	Secretaría de Salud de México
<b>ST</b>	<i>Salmonella</i> Typhimurium
<b>TCMA</b>	Tasa media de crecimiento anual
<b>UE/CE/EC</b>	Unión Europea/Comunidad Europea/European Community
<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonia
<b>U.H.</b>	Unidades Haugh
<b>UNA</b>	Unión Nacional de Avicultores de México
<b>USDA</b>	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
<b>USDA-APHIS</b>	United States Department of Agriculture-Animal and Plant Health Inspection Service
<b>USDA-FSIS</b>	United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service
<b>UTEP</b>	Unidad Técnica Especializada Pecuaria
<b>WHO/OMS</b>	Organización Mundial de la Salud

## Resumen

Los huevos están incluidos dentro del grupo de alimentos proteicos. Este alimento tiene larga tradición de consumo y en casi todas las culturas ha sido muy apreciado por la facilidad de su obtención, por ser barato, por sus cualidades culinarias y por contener una cantidad apreciable de nutrimentos, y con amplio aprovechamiento dentro de la industria alimentaria. México cuenta con más de 142 millones de gallinas ponedoras, cuya producción en 2011 ascendió a 2.5 millones de toneladas [UNA, 2010]. México, es el principal consumidor de huevo fresco en el mundo con 22.8 kilogramos per cápita, y el sexto productor mundial de huevo y es autosuficiente en la producción de este alimento [UNA, 2010]. Alrededor del mundo, la producción y el consumo de huevos va en aumento, debido a la gran variedad de platillos y postres en donde es utilizado.

Durante los dos últimos decenios, la *Salmonella* Enteritidis (SE) ha surgido como la causa principal de infecciones humanas en muchos países [CDC, 1996; Anónimo, 2008]. A pesar de que las fuentes de infección de la mayoría de los brotes en el hombre no son reconocidas, investigaciones epidemiológicas realizadas en diferentes naciones, han involucrado a los huevos o subproductos como vehículo de transmisión de SE a los consumidores [CDC, 1996; Hennessy, 1996; FAO/WHO, 2002; CDC, 2010; EFSA, 2012]. Lo anterior se ha atribuido a la excepcional capacidad de esta variante sérica para colonizar el tejido ovárico de las gallinas y estar presente en el contenido de los huevos con cáscara intacta.

Para que un microorganismo produzca alteraciones en el huevo debe penetrar a través de los poros de la cáscara hasta la membrana interna, crecer sobre la membrana y alcanzar la clara o la yema. Dentro de los microorganismos asociados con más frecuencia al deterioro se encuentran bacterias Gram negativas y hongos. Además de *Salmonella*, otros patógenos suelen estar asociados con los huevos y ovoproductos.

Es por todo lo anterior, que este trabajo pretende proporcionar un resumen de la información disponible y actual sobre la microbiología del huevo de gallina y ovoproductos, con el objetivo de conocer y evaluar los principales problemas microbiológicos y los diferentes factores que influyen en la prevalencia, la proliferación y la transmisión de algunos microorganismos patógenos presentes en dicho grupo de alimentos.

## Objetivos

- Hacer una revisión bibliográfica de los aspectos más importantes relacionados con la producción de huevo y sus derivados, con especial atención en la parte microbiológica.
- Dar a conocer el método de análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos (HACCP) en la producción de huevos y ovoproductos.
- Generar un documento que sirva como apoyo a proyectos de investigación, o a personas interesadas en el tema.

## Metodología

Se realizó la búsqueda de publicaciones en bancos virtuales de información, empleándose para la búsqueda palabras claves como "Microbiología del huevo", "Desarrollo de *Salmonella* en huevo", "*Salmonella* en cáscaras de huevo" por mencionar algunos, además, se consultaron referencias de los artículos revisados.

El criterio de selección de las revisiones se basó inicialmente en la fecha de publicación, tomando en cuenta sobre todo, aquellas de los últimos cinco años, considerando los de mayor relevancia e importancia del artículo.

También se utilizaron como material de apoyo tesis de licenciatura, maestría y doctorado de universidades nacionales e internacionales, se revisaron artículos de revistas nacionales, libros recientes, resúmenes de congresos, entrevistas y comunicados de prensa electrónicos, así como notas electrónicas de periódicos nacionales e internacionales, manuales de procedimientos y/o de información, emitidos por instituciones de índole nacional e internacional y normas nacionales e internacionales.

Capítulo 1

# **El mercado del huevo**

# EL MERCADO DEL HUEVO

El huevo es un alimento que tiene un aporte nutrimental muy completo tanto por la variedad de nutrientes que contiene, como por su elevado grado de utilización por nuestro organismo. Los compuestos que lo forman cumplen funciones importantes para la salud. Como alimento, el huevo ha jugado un papel primordial en la estrecha relación establecida entre los productos de origen animal y la dieta humana, sobre todo debido a las importantes cantidades de proteínas, entre ellas, la ovoalbúmina, de elevado valor biológico por su contenido en aminoácidos indispensables. Todo ello va acompañado de un costo relativamente bajo, en relación a otras proteínas animales de similar calidad [Papadopoulou *et ál.*, 1997].

No solo el huevo forma parte de la alimentación humana, recientemente se emplean sus subproductos procesados como ingredientes por las diferentes propiedades tecnológicas que aporta en la industria alimentaria (Tabla 1). Las proteínas de la clara se emplean por sus propiedades funcionales, entre las que destaca la formación de espumas empleadas en merengues, pasteles, mousses y panes especiales. La capacidad emulsionante de la lecitina y el colesterol presentes en la yema son de gran importancia en mayonesas, salsas, cremas, helados [Ricke *et ál.*, 2001] y en otros productos [Baker y Bruce, 1994].

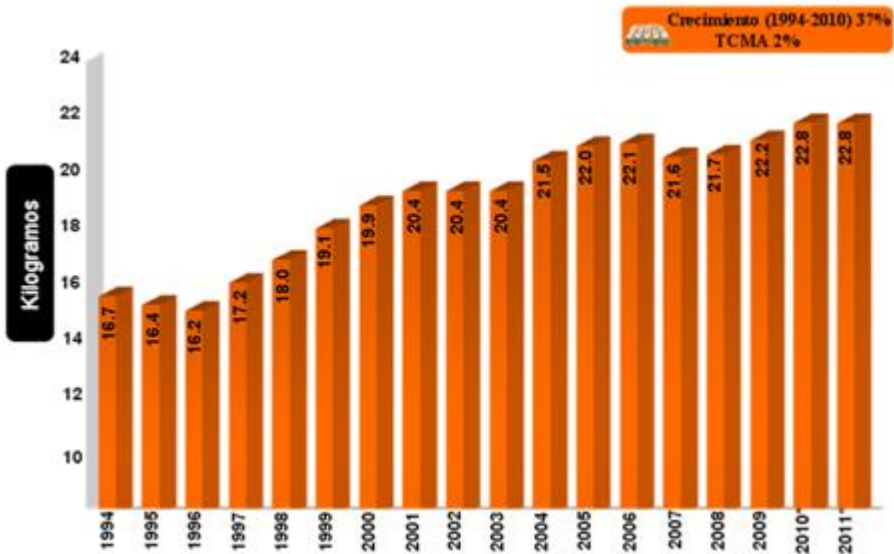
En la actualidad, a nivel mundial, y según datos de la FAO la producción de huevo para plato se sitúa en 48,5 millones de toneladas. Asia es la región del mundo de mayor producción de huevo para plato, seguida por el continente Europeo y este a su vez por el continente Americano. La FAO afirma también que el huevo es uno de los alimentos más nutritivos de la naturaleza debido a la calidad de sus proteínas y a la gran cantidad de vitaminas, minerales y sustancias esenciales que aporta. Así mismo, los alimentos como el huevo para plato, se denominan alimentos de "proteína completa", siendo una fuente excelente de proteína de alta calidad.

**Tabla 1.** Principales propiedades funcionales de las proteínas del huevo en alimentos. Fuente: Badui, 2006; Gil y Ruiz, 2010].

Propiedad	Descripción	Aplicaciones/Alimento
<b>Capacidad de ligar grasa y sabores</b>	Las proteínas de la clara pueden utilizarse como acarreadores de sabor o modificadores del sabor en alimentos procesados	Productos de panificación bajos en grasa, variedades de pan
<b>Gelificante</b>	Las proteínas de la clara y yema forman una red capaz de atrapar agua y sustancias de bajo peso molecular	Cárnicos, pasteles, panadería y quesos
<b>Colorante</b>	Los pigmentos de la yema contribuyen al color anaranjado-amarillo de muchos alimentos	Panadería, repostería, pastas alimenticias, salsas
<b>Clarificante</b>	La coagulación de la clara permite atrapar partículas disueltas en un líquido	Bebidas
<b>Acabado brillante</b>	La yema proporciona a la corteza un color café dorado característicos de los productos horneados	Productos de panificación y glaseados
<b>Coagulante</b>	Se produce por la desnaturalización de las proteínas de la clara y de la yema por efecto del calor o mecánico	Repostería, platillos culinarios (huevo cocido, tortilla)
<b>Capacidad anticristalizante</b>	Evita la cristalización de la sacarosa	Turrón, Chocolatería
<b>Aglutinante</b>	Permite la unión de los diferentes componentes de un producto gracias a la capacidad de formar geles, propiedad característica de la clara y yema	Productos cárnicos
<b>Espesante</b>	Da cuerpo para mejorar la presentación del alimento	Salsas, toppings y alimentos preparados
<b>Protección aislante</b>	Evita que los productos absorban agua	Panadería y masa congelada

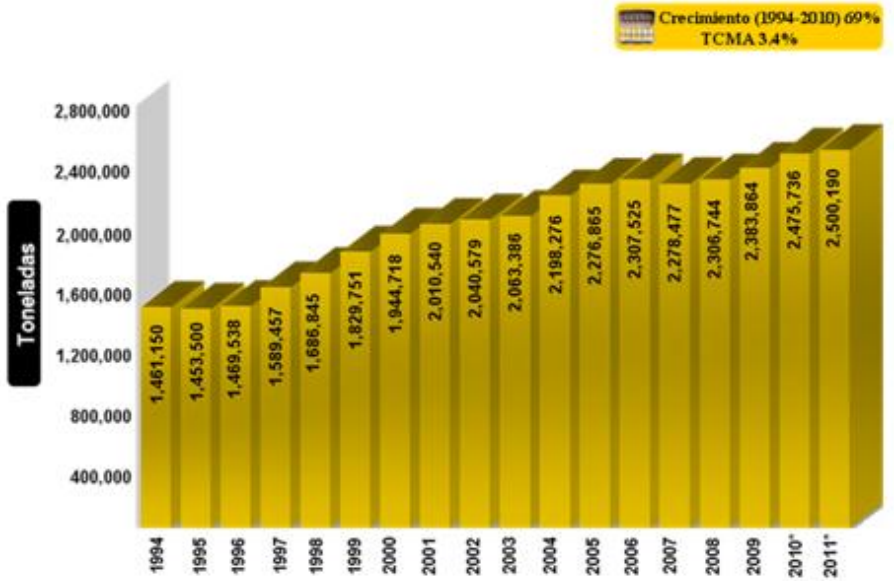
De acuerdo a los reportes de la FAO y UNA en el año 2011, el consumo per cápita de huevo en México fue de 22.8 kilos (Figura 1), lo que lo ubica como el primer país a nivel mundial en consumo de huevo fresco. Así mismo, los reportes de la Unión Nacional de Avicultores mencionan que durante el 2011 se produjeron 2.5 millones de toneladas de huevo para plato (Figura 2), posicionándose México en el 6° lugar a nivel mundial en producción de huevo para plato. Siendo el estado

de Jalisco con una producción de 1.2 millones de toneladas de huevo al año, el estado que aporta el cincuenta por ciento de éste alimento a nivel nacional [SAGARPA, 2011], siguiéndole Puebla, Sonora, La Laguna, Nuevo León, Yucatán, Sinaloa y Guanajuato (Figura 3), mientras que el Distrito Federal es el mayor consumidor de huevo por el número de habitantes que tiene.



**Figura 1.** Consumo per cápita de huevo fresco de 1994 al 2011.

Fuente: UNA. Donde: \*: Datos no confirmados; TCMA: Tasa media de crecimiento anual.



**Figura 2.** Producción nacional de huevo fresco hasta el 2011.

Fuente: UNA. Donde: \*: Datos no confirmados; TCMA: Tasa media de crecimiento anual.



**Figura 3.** Estados productores de huevo fresco hasta el 2011.  
Fuente: UNA.

Como se puede observar en la Figura 1, el consumo per cápita ha ido en ascenso, en 2002 era de 20.4 kilos y en 2006 fue de 22.1 kilos; es decir, se incrementó 2 kilos más por persona. Dicho incremento, se debe básicamente al precio y a los hábitos de consumo, ya que es un producto que presenta ciertas bondades alimenticias y cuenta con versatilidad en su preparación, por lo que sigue ocupando un papel importante en la dieta de los mexicanos de todos los estratos económicos.

Casi el cien por ciento del huevo que consumen los mexicanos es nacional, el huevo que se importa, es básicamente un producto vendido en la frontera americana, que en porcentaje es mínimo en comparación a lo que se consume, por ejemplo, en 2006 las importaciones equivalen 0.78% de lo ingeren en México (Tabla 2).

**Tabla 2.** Importaciones y exportaciones de huevo fresco. Fuente: SIICEX/ SE\*, SIAP.

Año	2002	2003	2004	2005	2006	Promedio
<b>Importaciones (toneladas)</b>	9,733	26,560	6,404	9,133	17,923	13,471
<b>Exportaciones (toneladas)</b>	323	213	844	188	83	330

Respecto a los países de destino de las exportaciones mexicanas, se reconocen a 10 países africanos, países del medio oriente como Dubái y los Emiratos Árabes



Unidos y recientemente Irán y Hong Kong [PROAN, 2012] y se está en la búsqueda de nuevos contratos con Kuwait.

En el país existen aproximadamente 400 empresas productoras de huevo que representan un 63% de la producción nacional, sin embargo solo dos de ellas concentran, cada una, más de 10% del mercado. De acuerdo con el UNA, es la empresa Proteína Animal (PROAN), mejor conocida como San Juan, la que tiene mayor presencia en el mercado con 13.25%, siendo la segunda mayor empresa productora a nivel mundial, seguida por Bachoco que mantiene 12.7%.

Muchas empresas del sector alimentario utilizan huevo o sus derivados procesados como ingrediente básico o complementario para la elaboración de otros alimentos. De acuerdo a la FAO los ovoproductos o derivados del huevo son “los productos obtenidos a partir del huevo, de sus diferentes componentes o sus mezclas, una vez quitadas la cáscara y las membranas y que están destinados al consumo humano; podrán estar parcialmente completados por otros productos alimenticios o aditivos; podrán hallarse en estado líquido, concentrado, desecado, cristalizado, congelado, ultracongelado o coagulado.”

En México el 8% de la producción de huevo se comercializa de forma procesada o industrializada [FAO] y ésta va en aumento [SAGARPA]. Esto se debe, por una parte, a la evolución de la industria alimentaria, que cada vez demanda materias primas y presentaciones comerciales más adecuadas a su proceso productivo evitando las complicaciones de manipular grandes cantidades de huevos frescos y sus residuos (cáscaras), además de la facilidad de su transporte y almacenamiento, reflejándose en un mejor y mayor control de dichos productos y en el costo final [Messens, *et ál.*, 2002].

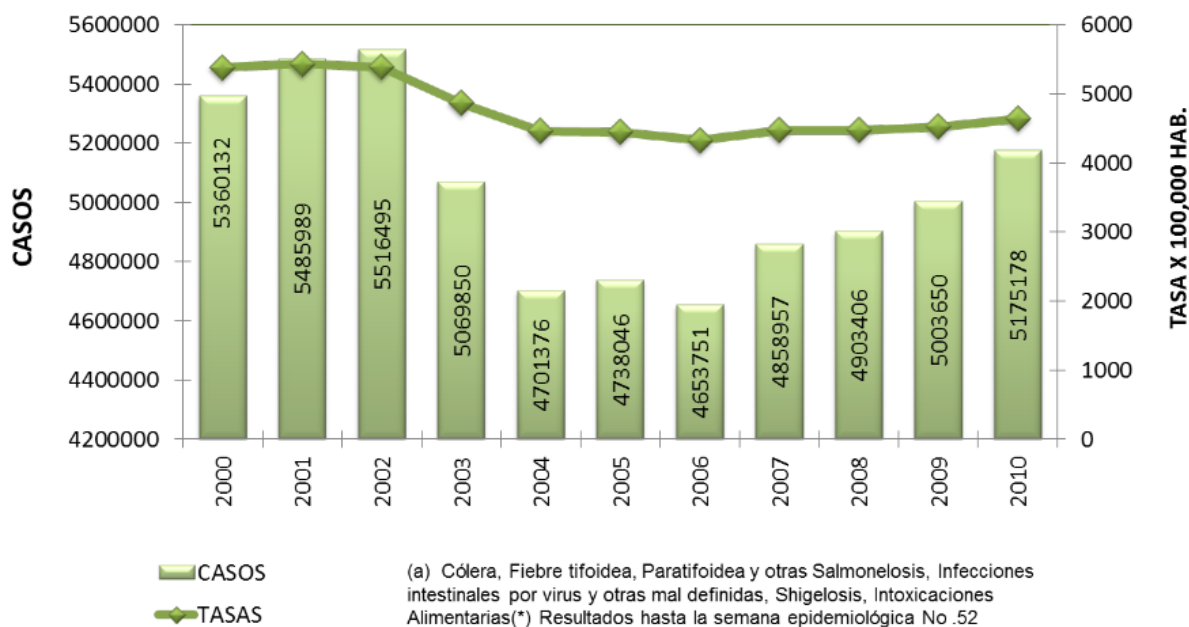
Como ejemplo, la empresa Avidel de México, lleva 10 años procesando huevos en polvo, destinando 40% de su producción a la exportación; actualmente abastece en Rusia, Arabia Saudita y Japón. PROAN procesa y exporta ovoproductos líquidos y deshidratados, en vías a empezar a salir el huevo cocido o duro listo para consumir al mercado [PROAN]. También estos derivados van dirigidos al mercado nacional para panificación, mayonesas, pastas, confiterías y restaurantes, siendo las principales empresas Unilever, Bimbo y Wal-Mart [PROAN].

En México el sector avícola participa con el 63.2% de la producción pecuaria; de esta participación el 30.1% corresponde a la producción de huevo. De acuerdo a los reportes de la FAO 2008, la producción diaria de huevo se comercializa principalmente a granel, el 70% en empaques cerrados doceneras y el 22% en dieciochoneras y en un 8% se comercializa de forma procesada o industrializada. La industria avícola genera alrededor de 1, 072,000 empleos, de los cuales 178,000

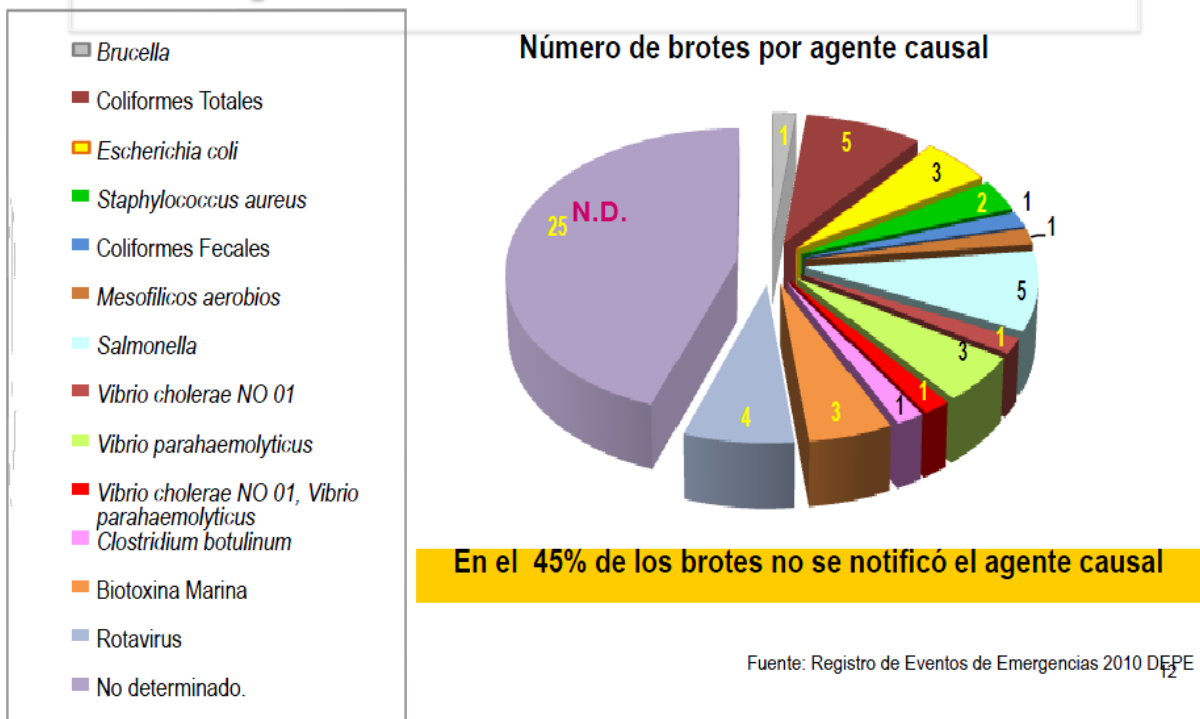
son directos y 892,000 indirectos, destacando que el 30% de los empleos los genera la rama del huevo [SAGARPA].

Por lo que el sector avícola mexicano se encuentra ante el gran reto de la integración industrial y comercial para competir internacionalmente, no sólo ante los tratados que México ha suscrito con diferentes países y regiones del mundo, sino también en el ámbito de un mercado cada vez más global que exige un producto de mejor calidad y libre de riesgos de contaminación (física, química o microbiológica) que pueden afectar al consumidor nacional y/o internacional.

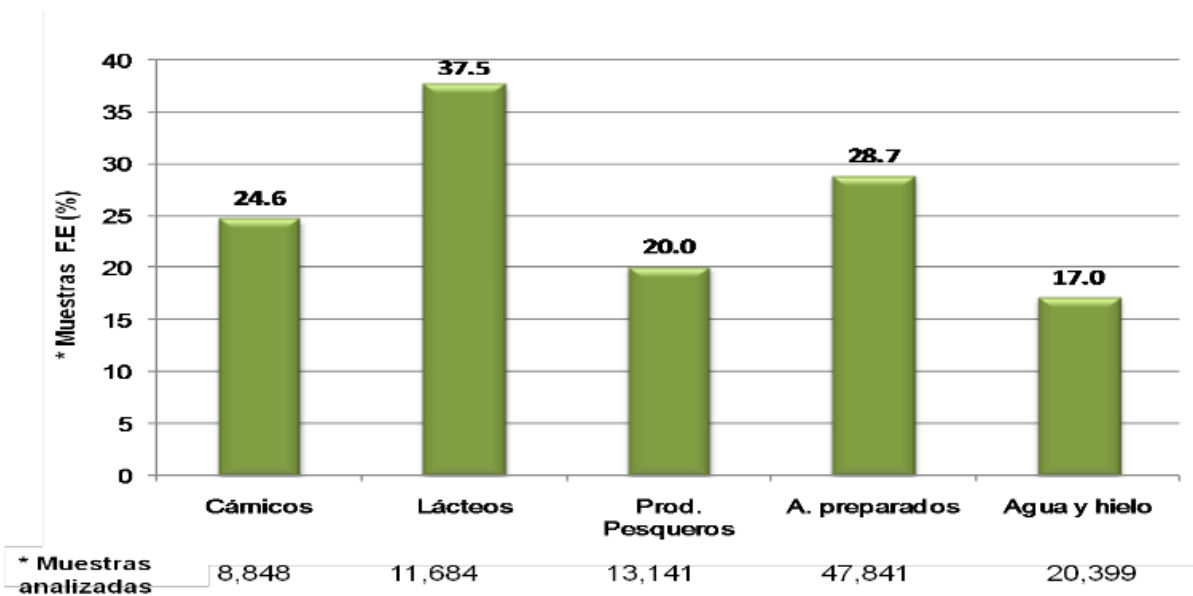
Durante el 2010 se reportaron 5, 175,178 casos de enfermedades asociadas al consumo de alimentos en México [COFEPRIS; CENAVECE] (Figura 4). En ese mismo año, se reportaron 56 brotes que dieron lugar a 1,435 casos de enfermedades diarreicas e intoxicaciones asociadas al consumo de alimentos y agua [COFEPRIS]. En la mayoría de los casos, los estudios epidemiológicos no revelan una asociación entre los casos/brotes, los alimentos involucrados y los microorganismos causales de las enfermedades transmitidas por alimentos (Figura 5). Durante el 2010, un total de 101,913 muestras de alimentos fueron analizadas por las autoridades sanitarias estatales encontrándose 25.9% contaminadas microbiológicamente (Figura 6).



**Figura 4.** Casos de enfermedades gastrointestinales atribuibles al consumo de alimentos en México del 2000 al 2010. Fuente: DGE /SSA.



**Figura 5.** Microorganismos involucrados en las ETA'S en México 2010.  
Fuente: Registros de Eventos de Emergencias 2010.



**Figura 6.** Resultados del muestreo de diferentes grupos de alimentos durante el 2010.  
Fuente: Proyecto de Calidad Microbiológica de Alimentos Potencialmente Peligrosos, Informe 2010. Comisión de Operación Sanitaria/ COFEPRIS

El huevo de forma natural se encuentra protegido de la contaminación exterior gracias a la barrera física que le proporciona su cáscara y membranas y a barreras químicas antibacterianas presentes en su composición [Taylor y Martin, 1929; Simkiss, 1968; O'Leary y Busta, 1974; Mayes y Takeballi, 1983; Lock y Board, 1992; Baron *et ál.*, 1997; Baron, Gautier y Brule, 1997; Cuguenec *et ál.*, 2000; Mine, 2000].

A pesar de ello y de las medidas adoptadas en las granjas de producción [Mench *et ál.*, 2010], en algunas ocasiones, bacterias como *Salmonella* pueden llegar al huevo [Stokes *et ál.*, 1956; Humphrey *et ál.*, 1989a, 1991a; Mawer *et ál.*, 1989; Bradshaw *et ál.*, 1990; De Reu *et ál.*, 2006; Gantois *et ál.*, 2009; Howard *et ál.*, 2012], lo que si se combina con una manipulación, cocinado o conservación inadecuados puede desembocar en una infección alimentaria. La lucha contra estas enfermedades es un objetivo prioritario de la política comunitaria en salud pública y su incidencia debe reducirse progresivamente.

En la actualidad el huevo y sus derivados se consideran la principal vía de infección para el hombre, siendo *Salmonella* la responsable de la mayoría de las epidemias de infección intestinal ocurridas; siendo el serotipo Enteritidis el mayor implicado por consumo de huevos contaminados [Humphrey, 1994b; Mead *et ál.*, 1999; Chávez *et ál.*, 2001; Delmas *et ál.*, 2006; Rivoal *et ál.*, 2009; Raspoet *et ál.*, 2011; Scalla *et ál.*, 2011; Carrasco *et ál.*, 2012; Martelli y Davis, 2012] y ovoproductos [Schmid *et ál.*, 1996; Hayes *et ál.*, 1999].

La salmonelosis es una de las infecciones alimentarias de mayor importancia a nivel mundial [CDC, 1990a; Abigail y Whitt, 1994; Hennessy *et ál.*, 1996; USDA-FSIS, 1998; Braden, 2006]. Está provocada por una bacteria que se encuentra de forma natural en el intestino de los animales y del hombre [Parra *et ál.*, 2002]. Los alimentos implicados de forma más frecuente en esta infección suelen ser los huevos, la carne de aves [Roberts, 1983; Palmer *et ál.*, 2000; Bailey *et ál.*, 2001], pescados y mariscos [Reilly y Twiddy, 1992; Heinitz *et ál.*, 2000; Hatha *et ál.*, 2003; Lunestad y Borlaug, 2009; Wan Norhana *et ál.*, 2010] y productos lácteos [Johnson *et ál.*, 1990; Headrick *et ál.*, 1998; Oliver *et ál.*, 2005; Instituto de Estudios del Huevo, 2006; INIFAP, 2007; Lejeune y Rajala-Schultz, 2009], si se toman crudos o poco cocinados, y los alimentos cocinados que se mantienen a temperatura ambiente durante un tiempo más o menos prolongado [Martelli y Davies, 2012].

En México la Secretaría de Salud reporta anualmente unos 70,000 casos de salmonelosis en humanos. Los serotipos que frecuentemente se reportan son: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Choleraesuis* [INIFAP, 2007], tomando en cuenta que este tipo de infecciones se han notificado de manera ocasional, aunque se sospecha que la frecuencia de los casos puede ser mayor [Chávez *et ál.*, 2001, COFEPRIS].

Este tipo de ETA'S, tienen un impacto económico y social. De acuerdo con la COFEPRIS hay una disminución en la productividad de las personas por ausentismo o bajo en el trabajo, pérdidas económicas para el país, aumenta la demanda de medicamentos, servicios médicos y hospitalarios, hay un impacto negativo sobre el turismo y un impacto negativo en el desarrollo del comercio nacional e internacional. Un ejemplo de lo anterior ocurrió en el año 2002 donde se observó un fuerte incremento de las importaciones (Tabla 2), motivado por la necesidad de incrementar las compras de huevo fresco para la reposición de pie de cría, pollo para engorda y ponedoras que fueron eliminadas en la región Lagunera a consecuencia del brote de la enfermedad de Newcastle.

Un ejemplo reciente de lo anterior, ocurrió el pasado mes de junio del año 2012 en el estado de Jalisco, donde se detectó un brote de gripe aviar. La enfermedad ha causado la muerte de cerca de 200 mil aves, mientras que otras 600 mil han sido sacrificadas como medida de precaución; como consecuencia de esta enfermedad, se apunta que, y según datos preliminares, hay pérdidas por 50 millones de dólares [IEC, 2012]. Esto, solo por mortandad de aves. El panorama se complica si se tiene en cuenta una reducción de la postura y cierre de fronteras al huevo de Jalisco en el mercado nacional. Además el brote ocasionó el incremento en los precios del pollo y del huevo, 3.87% y 15.76%, respectivamente [INEGI, 2012]; insistiendo que no hay ningún riesgo en comer huevo y pollo, ya que, la influenza aviar no es una enfermedad de transmisión por alimentos (más adelante se estudiará sobre la influencia aviar en este trabajo).

Sin embargo no solo *Salmonella* es responsable de las ETA'S causadas por el consumo de huevo y sus derivados, existen otros géneros bacterianos contaminantes y/o causantes de la descomposición del huevo que, si se encuentran en cantidades altas o si se tratara de un microorganismo patógeno, pueden representar un riesgo para la producción avícola y la salud pública [Mancera *et ál.*, 2005]. Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran *E. coli* [Jin *et ál.*, 2008], *Listeria monocytogenes* [Hughey *et ál.*, 1989; Foegeding y Leator, 1990; Foegeding y Stanley, 1990; Laird *et ál.*, 1991; Muriana *et ál.*, 1996; Palumbo *et ál.*, 1996], *Bacillus cereus* [Anderson *et ál.*, 1995; Anónimo, 2005; Baron *et ál.*, 2007; Pina-Pérez *et ál.*, 2009; Jan *et ál.*, 2011], *Staphylococcus aureus* [Haeghebaert *et ál.*, 2002; Loir *et ál.*, 2003], *Campylobacter jejuni* [Doyle, 1984], *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Flavobacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Hafnia* spp., *Klebsiella* spp., y *Yersinia* spp. [Bruce y Drysdale, 1994; Mancera, 2005] entre otros.

Por todo lo anterior, la seguridad alimentaria debe garantizarse a lo largo de toda la cadena, desde la producción hasta el consumidor final del alimento, y ninguna

de las partes implicadas puede bajar la guardia en sus responsabilidades, porque afectará al resto de los eslabones. El sector productor de huevos aplica sistemas de prevención y control de la *Salmonella*, entre otras medidas higiénicas encaminadas a obtener productos seguros y de calidad. El consumidor, así como el manipulador de alimentos en empresas de restauración y comedores colectivos, son responsables de mantener la higiene en el momento de la compra, la conservación, la preparación y consumo de los alimentos. En México el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), a través de la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGIAAP) en coordinación con la Unión Nacional de Avicultores, ofrece a la industria avícola información necesaria y de gran utilidad en la implementación de las Buenas Practicas Pecuarias en Producción de Huevo para Plato [SAGARPA], que habrá de aplicarse en la producción primaria para reducir contaminación microbiana y/o riesgos zoonosarios que puedan estar presentes. Con la finalidad de que las unidades de producción cumplan con las exigencias y estándares nacionales e internacionales, favoreciendo que los productores tengan una mayor apertura a los mercados nacionales e internacionales.

Capítulo 2

**El Huevo:  
Definición, Estructura y  
Composición**

# EL HUEVO FRESCO

*“El huevo es un diseño de la naturaleza excepcional. Una estructura que protege una gran cantidad de proteínas que pueden dar lugar a una tortilla, un soufflé, un cocodrilo o a un águila imperial.”*  
*Leonart, 2006*

Los huevos están incluidos dentro del grupo de alimentos proteicos. Este alimento tiene una larga tradición de consumo y en casi todas las culturas ha sido muy apreciado por la facilidad de su obtención, por ser barato, por sus cualidades culinarias y por contener nutrimentos muy apreciados desde el punto de vista nutricional y con un amplio aprovechamiento dentro de la industria alimentaria.

Sobre la historia del huevo no se conoce a ciencia cierta cuándo se domesticó la primera ave, aunque la historia lo sitúa en la India alrededor del año 3200 a.C. La historia de los egipcios y los chinos demuestra que existía un consumo de huevos desde el año 1400 a.C. En España, Columela dejó documentado en sus escritos “Los doce libros de la Agricultura” todo lo relativo a la crianza de aves de corral. Se cree que Cristóbal Colón llevó las primeras gallinas a América.

El huevo es parte del proceso de reproducción de los animales ovíparos, contiene los nutrientes necesarios para alimentar a un posible embrión y al animal hasta que está en condiciones de adaptarse al medio externo.

Los más consumidos son los huevos de gallina, mientras que los de otras aves como pato, oca, pavo, avestruz y codorniz se consumen esporádicamente y representan un porcentaje muy bajo en la ingesta habitual. Por este motivo, en este trabajo de revisión se abordará exclusivamente el estudio de los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*).



# DEFINICIÓN

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996, que trata sobre huevos, productos y sus derivados, se entiende por huevo al producto de la ovulación de la gallina (*Gallus domesticus*) y otras especies de aves que sean aceptadas para consumo humano. Los huevos de otras aves se designaran indicando además la especie de que procedan. Sin embargo éstos no son los únicos huevos comestibles ya que los de otras aves domesticas como pato, paloma, codorniz, ganso, oca, avestruz y pavo y de aves silvestres como chorlito, cigüeña y gaviota también pueden usarse como alimentos para el ser humano. De igual manera se pueden aprovechar los huevos provenientes de tortugas, iguanas y muchas variedades de peces como arenque y esturión, la única diferencia está en que los huevos de gallina son los más consumidos.

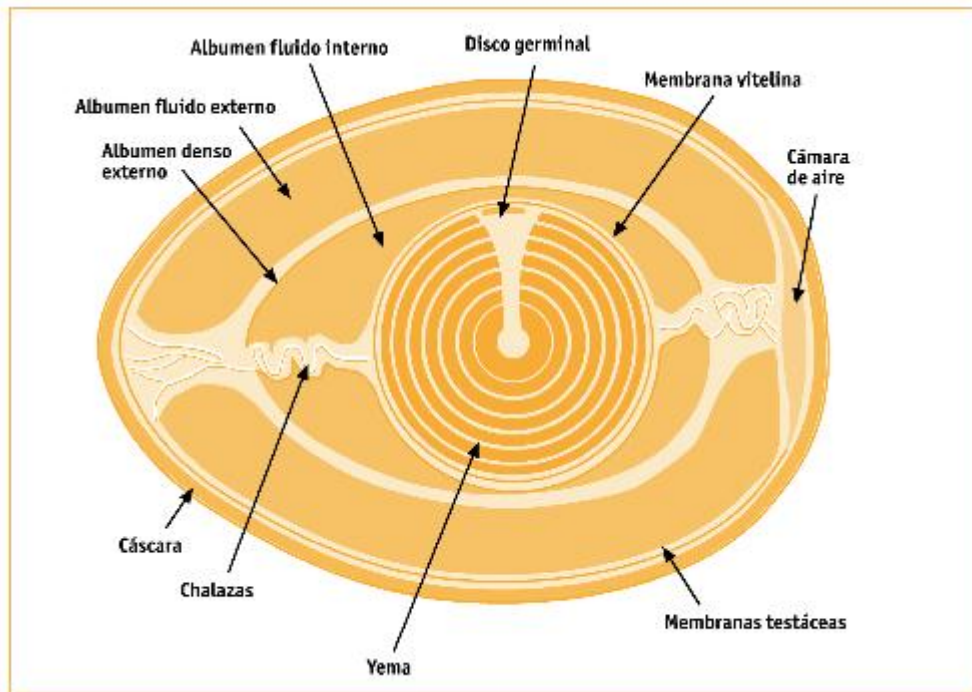
La misma Norma también define al huevo fresco como, aquel que presenta un olor y sabor característico, que observado al ovoscopio, aparecerá completamente claro, sin sombra alguna, con yema centrada apenas perceptible, cámara de aire equivalente al tiempo transcurrido, teniendo como máximo 15 días después de la postura.

El huevo tiene una estructura compleja derivada de su función reproductiva. No olvidemos que está previsto que albergue y alimente durante el tiempo de la incubación (21 días) al embrión que debe desarrollarse dentro de la gallina y dar lugar al nuevo pollito. Los huevos comerciales (no fecundados, y por lo tanto sin embrión) contienen el óvulo, que es la yema, protegido por la clara y la cáscara (Figura 7).

# ESTRUCTURA DEL HUEVO

El huevo tiene una estructura diseñada por la naturaleza con el fin de proteger y mantener el futuro embrión hasta su eclosión y dar lugar a un pollito [Haines, 1939]. Por ello su contenido es de gran valor nutritivo, capaz por sí mismo de dar origen a un nuevo ser vivo.

La gallina pone huevos independientemente de que éstos sean fecundados por un gallo. En las estirpes modernas de gallinas, seleccionadas genéticamente para conseguir una alta producción de huevos, cada 25 horas, el óvulo, que es la yema, se desprende del ovario y en su camino hacia el exterior a través del oviducto va rodeándose de envolturas (clara y cáscara) especialmente diseñadas para su protección [Gantois *et ál.*, 2009; Howard *et ál.*, 2012].



**Figura 7.** Estructura del huevo. Fuente: Sastre *et ál.*, 2002.

A simple vista, el corte transversal de un huevo duro permite diferenciar nítidamente las partes fundamentales de su estructura (Figura 7): la cáscara, la clara o albumen y la yema, separadas entre sí por medio de membranas que mantienen su integridad. El peso medio del huevo está en torno a los 60 g, de los cuales aproximadamente la clara representa el 60%, la yema el 30% y la cáscara, junto a las membranas, el 10% del total (Tabla 3).

**Tabla 3.** Composición de las distintas partes del huevo (%). Fuente: Herron y Fernandez, 2004; Gil y Ruiz, 2010; Naviglio *et ál.*, 2012.

<b>Componente</b>	Huevo entero	Cáscara	Clara	Yema
<b>Agua</b>	74	1	88.5	46.7
<b>Proteínas</b>	13	3.8	10.6	16.6
<b>Carbohidratos</b>	1	-	0.9	1
<b>Lípidos</b>	10	-	0.03	32.6
<b>Sales Minerales</b>	0.1	95.2	0.6	1.1
<b>Proporción del peso</b>		10.3	56.9	32.8

Dentro del huevo, la yema, por su composición rica en nutrientes, es un medio idóneo para el rápido desarrollo de microorganismos [Howard, 2003]. En cambio la clara tiene mecanismos de protección naturales contra ellos [Howard, 2003; Gantois *et ál.*, 2009; Howard *et ál.*, 2012]. Por esta razón es importante tener en cuenta la estructura del huevo para comprender cómo debe ser manipulado con el fin de garantizar la máxima seguridad del alimento final [Instituto de Estudios del Huevo, 2007].

En este sentido es importante mencionar que el huevo cuenta con barreras físicas y químicas que lo protegen de forma natural contra la contaminación por microorganismos [Taylor y Martin, 1929; Simkiss, 1968; O’Leary y Busta, 1974; Mayes y Takeballi, 1983; Lock y Board, 1992; Baron *et ál.*, 1997; Baron, Gautier y Brule, 1997; Cuguennec *et ál.*, 2000; Mine, 2000; Howard, 2003; Gantois *et ál.*, 2009; Howard *et ál.*, 2012].

### **Cáscara y membranas**

La cáscara es la primera barrera de defensa que posee el huevo [Howard, 2003]. Entre sus funciones están:

- La contención y el transporte del contenido.
- La exclusión de patógenos y microorganismo que puedan dañar y descomponer al contenido.
- El soporte del desarrollo embrionario.

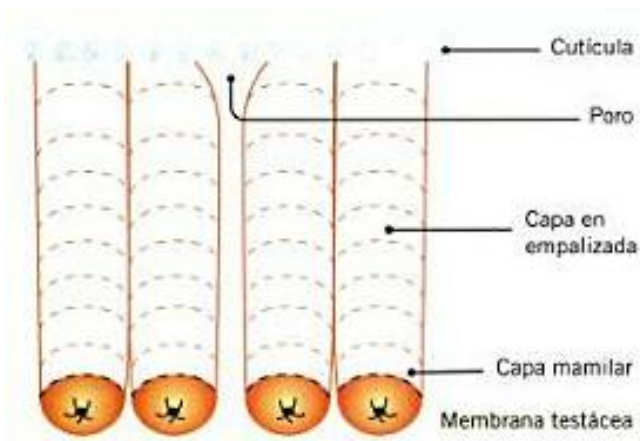
Cuando observamos en detalle la cáscara podemos observar la complejidad de su estructura (Figura 8):

- ❶ En la parte externa existe en primer lugar una cutícula o película, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de grosor, formada principalmente por proteínas, queratina principalmente, (90%) y pequeñas cantidades de lípidos y carbohidratos. La principal función de esta película de naturaleza

mucoproteica consiste en cerrar los poros (disminuye la porosidad de la cáscara), formando una barrera física contra la penetración de microorganismos [Simkiss, 1968; Mayes y Takeballie, 1983]. También evita la pérdida de agua y da un aspecto brillante al huevo. Tras la puesta se presenta en forma húmeda, luego se seca y se va deteriorando y, entre los dos y cuatro días desde la puesta, desaparece. Si el huevo se lava o se frota, puede desaparecer antes [Fromm, 1963; Mayes y Takeballie, 1983].

- ② La cáscara está constituida en su mayor parte por una matriz cálcica (carbonato de calcio 87-97%) con un entramado en cuya composición están presentes pequeñas cantidades de proteínas y mucopolisacáridos que rodean a un componente mineral en el que el calcio es el elemento más abundante y de mayor importancia. En dicha matriz se encuentran concentraciones mucho menores de sodio, magnesio, zinc, manganeso, hierro, cobre, aluminio y boro. La matriz es atravesada por poros, cuyo número varía entre 7,000-17,000 por huevo [Mayes y Takeballie, 1983; Instituto de Estudios del Huevo, 2002]. Son especialmente numerosos en la zona del polo ancho del huevo [Walden *et ál.*, 1956], donde aparece la cámara de aire (Figura 7). Los poros están llenos de fibras proteicas que entorpecen el paso de los microorganismos [Mayes y Takeballie, 1983] (Figura 8).
- ③ La capa en empalizada está formada por las columnas de carbonato cálcico que se van formando y entrelazando [Instituto de Estudios del Huevo, 2002].
- ④ La capa mamilar está constituida por núcleos o conos anclados a las fibras de la membrana testácea externa y sobre los que se realiza la calcificación [Creger *et ál.*, 1976; Stemberger *et ál.*, 1977; Baumgartner *et ál.*, 1978].
- ⑤ Las membranas (membranas testáceas) que recubren el interior de la cáscara son dos, la interna y la externa, están formadas por un entramado de fibras constituidas por proteínas tipo colágeno y elastina [Baker y Balch, 1962; Balch y Cooke, 1970; Harris *et ál.*, 1980; Wong *et ál.*, 1984; Arias *et ál.*, 1991] rodeado por una cubierta de polisacáridos y ambas rodean el albumen o clara y proporcionan protección contra la penetración microbiana [Moran y Hale, 1936; Garibaldi, 1958]. La membrana interna tiene una fina estructura de fibras de queratina entrelazadas y la presencia de lisozima en la matriz albuminosa impide la entrada de algunos microorganismos y retarda la entrada de otros [O'Leary y Busta, 1974; Cuguenec *et ál.*, 2000; Gantois *et ál.*, 2009]. La membrana externa es

mucho más porosa y sirve como asentamiento para la formación de la cáscara.



**Figura 8.** Estructura de la cáscara del huevo. Fuente: Sastre *et ál.*, 2002.

Las membranas testáceas se encuentran fuertemente pegadas entre sí cuando el huevo es puesto por la gallina. Poco tiempo después de la puesta, debido a la contracción del volumen del contenido del interior del huevo al enfriarse (la temperatura corporal de la gallina es de 39°C, la misma del huevo recién puesto) penetra aire en el polo grueso, por su mayor concentración de poros, y se separan en esta zona las membranas para constituir la cámara de aire [Wangensteen *et ál.*, 1970; Kutchai y Steen, 1971] (Figura 7).

A medida que el huevo pierde frescura, pierde también agua a través de los poros de la cáscara en forma de vapor de agua y la cámara de aire se expande. Un huevo sometido a altas temperaturas "envejece" antes. La altura de la cámara de aire es una de las medidas más evidentes de la frescura de un huevo (en términos de calidad, independientemente de los días transcurridos tras la puesta). Los huevos de categoría A (huevos frescos) deben tener una altura de la cámara de aire no superior a 6 mm [Instituto de Estudios del Huevo, 2007].

La calidad o resistencia de la cáscara depende principalmente del metabolismo mineral de la gallina y, a su vez, de las características genéticas de cada raza y estirpe. Otros factores relacionados con las aves (edad, enfermedades) o su medio ambiente (temperatura) influyen sobre la calidad de la cáscara, a través del metabolismo mineral. El color de la cáscara es un carácter estrechamente unido a la herencia y depende de la concentración de unos pigmentos denominados porfirinas depositados en la matriz cálcica y no afecta a la calidad, ni a las propiedades nutritivas del huevo. Los diferentes niveles de coloración dependen del estado individual de la gallina. La alimentación o el sistema de cría

no influyen en el color de la cáscara (blanco o moreno) y tampoco en su intensidad (si se trata de un huevo de color).

La integridad y limpieza de la cáscara son factores que determinan si un huevo es apto para su consumo. Solo los huevos limpios y con la cáscara íntegra pueden ser destinados al consumo directo como huevos frescos (de "categoría A" o "México extra"). Cuando la cáscara está sucia o deteriorada es posible que los microorganismos penetren al interior del huevo. Por esta razón no pueden comercializarse como huevos de categoría A los huevos cuyas cáscaras presenten suciedad o fisuras y deben procesarse mediante un tratamiento térmico para garantizar su inocuidad. Los huevos rotos se consideran no comestibles y deben ser desechados [Instituto de Estudios del Huevo, 2007].

La creencia popular sugiere que ingerir la cáscara de huevo triturada permite aprovechar la gran cantidad de calcio que contiene. Sin embargo, la forma química en que se encuentra ese calcio hace que no sea aprovechable por nuestro organismo [Gil y Ruiz, 2010].

## **Clara o albumen**

En la clara se distinguen dos partes según su densidad: el albumen denso y el fluido, que a su vez presenta cuatro zonas diferenciadas (Figura 7):

- Densa interna (1g; 3%) dispuesta en forma de filamentos que van desde la yema hasta los dos extremos del huevo constituyendo las chalazas.
- Interna fluida (6 g; 17%)
- Densa externa, (20 g; 57%) masa gelatinosa que rodea la anterior y se extiende a ambos extremos del huevo.
- Fluida externa, representa un 23% del total de la clara (8 g), está en contacto con las membranas testáceas y se visualiza al abrir el huevo.

El albumen denso rodea a la yema y es la principal fuente de riboflavina y de proteína del huevo.

El albumen fluido es el más próximo a la cáscara. Cuando se casca un huevo fresco se puede ver la diferencia entre ambos, porque el denso rodea la yema y esta flota centrada sobre él. A medida que el huevo pierde frescura, el albumen denso es menos consistente y termina por confundirse con el fluido, quedando finalmente la clara muy líquida y sin apenas consistencia a la vista.

Sujetando la yema, se encuentran unos engrosamientos del albumen denominados chalazas, están dispuestos en forma de filamentos que van desde

la yema hasta los dos extremos del huevo (Figura 7) y son responsables de la sujeción de la yema en el centro del huevo. Cuanto más prominente es la chalaza, más fresco es el huevo.

La clara o albumen está compuesta básicamente por agua (88%) y proteínas (cerca del 11%). Como puede verse en la Tabla 3, los restantes componentes están en muy pequeña proporción y apenas revisten importancia nutricional. La proteína más importante, no solo en términos cuantitativos (54% del total proteico), es la ovoalbúmina, cuyas propiedades son de especial interés tanto desde el punto de vista nutritivo como culinario y tecnológico (Tabla 1 y 4). La calidad del albumen se relaciona con su fluidez y se puede valorar a través de la altura de su densa capa externa.

El pH de la clara del huevo fresco es de 7.6- 7.9. Este valor aumenta hasta 9.7 durante el almacenamiento [Mayes y Takeballie, 1983], como consecuencia de la pérdida de difusión del CO<sub>2</sub> disuelto a través de la cáscara [Wangensteen *et ál.*, 1970; Kutchai y Steen, 1971].

Las proteínas del huevo han sido muy estudiadas y se han podido separar puras y conocer sus propiedades [Evans *et ál.*, 1958; Bengtsson *et ál.*, 1977; Meslar y White, 1978; Burley y Valdehra, 1979; Beveridge *et ál.*, 1980; Fichtali *et ál.*, 1993; Hammershøj *et ál.*, 1999; Chang y Chen, 2000; Merkle y Ball, 2000; Hammershøj *et ál.*, 2001; Weijers *et ál.*, 2002; Chiou, 2003; Castellani *et ál.*, 2005; Badui, 2006; Liang y Kristinsson, 2007; Le Floch-Fouéré *et ál.*, 2009; Alamprese *et ál.*, 2012]. En la tabla 4 se recogen las características más importantes para los objetivos de este trabajo.

### **Ovoalbúmina**

Es la proteína más abundante de la clara y representa más de la mitad del contenido proteico, muestra una relativa estabilidad frente al calor (se desnaturaliza entre los 72 y 84°C). Es una fosfoglucoproteína y es rica en cisteína y metionina, presenta cuatro grupos SH y dos uniones disulfuro. El número de éstas últimas aumenta durante el almacenamiento, se transforma en S-ovoalbúmina más termoestable que la proteína original [Gil y Ruiz, 2010]. La ovoalbúmina tiene propiedades gelificantes y espumantes [Badui, 2006].

### **Conalbúmina**

También denominada ovotransferrina, es una proteína no fosforilada formando una cadena polipeptídica. Contiene restos de manosa y glucosamina. Tiene gran poder quelante de metales divalentes y trivalentes. La capacidad secuestrante del hierro le confiere propiedades antioxidantes y antimicrobianas [Garibaldi, 1959; Mayes y Takeballi, 1983; Lock y Board, 1992]. Es sensible a la desnaturalización térmica (entre 57 y 65°C).

Tabla 4. **Proteínas de la clara de huevo.**

Proteína	Cantidad total (%)	Propiedades
Ovoalbúmina	54	Agente gelificante Antibacteriana
Conalbúmina	12	Fija iones metálicos Antibacteriana
Ovomucoide	11	Inhibidor de serinas proteasas Inhibe a la tripsina de vacuno pero no la humana
Lisozima	3.4	Antibacteriana
Ovomucina	3.5	Antibacteriana Factor de viscosidad
Flavoproteínas	0.8	Fija riboflavina
Ovomacroglobulina	0.5	Inhibidor de serina, cisteína, tiol y metalo proteasas Antimicrobiana
Ovoinhibidor	1.5	Inhibidor de serinas proteasas (tripsina, quimotripsina y enzimas microbianas)
Avidina	0.05	Fija biotina
Cistatina	0.05	Inhibe cisteína peptidasas Antimicrobiana

### **Ovomucoide**

Es una proteína rica en glucosamina y aminoácidos azufrados. Contiene nueve puentes disulfuro, lo que la hace resistente a la coagulación por calor. Contiene manosa y galactosa. El ovomucoide es un factor antitripsina [Stevens, 1991; Baron, Gautier y Brule, 1997]. Cuando la clara esta coagulada y dura se digiere rápidamente en el intestino porque se desnaturaliza la proteína. Si la clara esta cruda puede resistir a la digestión.

### **Ovomucina**

Es una glucoproteína que contribuye a la viscosidad de la clara. Forma con la lisozima un complejo insoluble en medio acuoso dependiendo del pH. Este complejo es responsable de la estructura gelificada de la capa espesa del albumen. La disociación de este complejo actúa durante el almacenamiento de los huevos, a medida que el pH se eleva, y es responsable de la licuefacción del albumen. Es estable al calor. La ovomucina es un inhibidor de la hemaglutinación vírica [Gil y Ruiz, 2010].

### **Lisozima**

La clara de huevo contiene aproximadamente 7% de globulinas, incluyendo la lisozima, esta proteína hidroliza las paredes celulares de ciertas bacterias, en especial los mucopolisacáridos de las Gram positivas [Board, 1969; Hughey y Johnson, 1987; Cuguennec *et ál.*, 2000]. Se inactiva por calor en función del pH y temperatura.



### **Avidina**

Glucoproteína en forma tetrámera, con cuatro subunidades idénticas, en cada una de las cuales se fija una molécula de biotina [Baron *et ál.*, 1997]. Actualmente se utiliza en la detección de tumores cancerígenos y como agente precursor de tratamientos oncológicos. Tiene una alta estabilidad térmica y frente a las enzimas proteolíticas.

### **Cistatina**

Formada por una cadena de unos 120 residuos de aminoácidos. Tiene una potente actividad inhibidora de cisteína peptidasas [Stevens, 1991], pero no actúa sobre las serinas peptidasas (tripsina, quimotripsina).

### **Yema**

La yema es la porción amarilla del huevo; esta recubierta por una membrana transparente denominada vitelina, que la separa de la clara y la protege de una posible rotura [Burley y Vadehra, 1989]. En la yema se encuentran las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo y por ello es la parte nutricionalmente más valiosa. Su contenido en agua es de aproximadamente el 50% (Tabla 3).

Los sólidos o materia seca se reparten equitativamente entre proteínas y lípidos, quedando una fracción pequeña para vitaminas, minerales y carotenoides. Estos últimos son compuestos de efecto antioxidante y los responsables del color amarillo, que varía en tono e intensidad en función de la alimentación de la gallina.

En su interior se encuentra el disco germinal o blastodisco (Figura 7), que es un pequeño disco claro en la superficie de la yema, lugar en el que se inicia la división de las células embrionarias cuando el huevo está fecundado. Ocasionalmente pueden encontrarse huevos con dos yemas. Esto es debido a que la gallina produce en una misma ovulación dos óvulos en lugar de uno, que es lo corriente. Este accidente fisiológico es más común en las aves al principio del período de puesta.

Las manchas de color rojizo o marrón que a veces aparecen en el interior del huevo no deben confundirse con el desarrollo embrionario, sino que son simplemente células epiteliales procedentes del oviducto que se han desprendido al formarse el huevo y que no presentan problema alguno para su consumo. Pueden retirarse fácilmente con la punta de un cuchillo limpio. Si en el proceso de clasificación las manchas se ven al trasluz (al pasar el huevo por la cámara de miraje en el centro de embalaje) no se considera el huevo como de categoría A [Instituto de Estudios del Huevo, 2007].

La yema es una emulsión de grasa en agua [Le Denmant *et ál.*, 2000]. El extracto seco supone un 50%, del cual un 31.1% es de proteína y un 65.8% es de lípidos, con gran cantidad de lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en colesterol. Los carbohidratos unidos a proteínas no suponen más del 0.2% y son polisacáridos de manosa y glucosamina. Los elementos minerales más abundantes son calcio, potasio y fósforo.

Estructuralmente, la yema está constituida por una fase continua (78%) denominada plasma, formada de proteínas globulares y LDL, con un 49% de agua y una fase dispersa (20%) que contiene partículas uniformemente distribuidas en la fase continua, formadas por proteínas globulares y lipoproteínas de alta densidad (HDL) [Burley y Cook, 1961; McCully *et ál.*, 1962; Saari *et ál.*, 1964; Causeret *et ál.*, 1991; Dyer-Hurdon y Nnanna, 1993; Li-Chan *et ál.*, 1995; Anton y Gandemer, 1997; Le Denmant *et ál.*, 1999; Laca *et ál.*, 2010].

En la tabla 5 se reflejan los valores medios de los componentes de esta fracción del huevo.

**Tabla 5.** Composición de la yema del huevo y sus partes integrantes (gránulos y plasma). Porcentaje del extracto seco de la yema. Fuente: Belitz *et ál.*, 2009.

Fracción	Lípidos (%)	Proteínas (%)	Minerales (%)
<b>Yema</b>	63.5	32.4	2.1
<b>Gránulos</b>	6.9	16.1	
<b>Lipolivetinas (HDL)</b>	3.5	12.3	1.4
Fosvitina	-	4.6	
LDL	2.5	0.3	
<b>Plasma</b>	59.3	13.9	
Livetina	-	10.6	1.5
LDL	59.4	6.6	

### Proteínas del plasma

**Lipovitelininas (16%).** Son lipoproteínas (LDL) pobres en cisteína. Presentan un 88% de lípidos. Los fosfolípidos son principalmente fosfatidilcolina (lecitina) y fosfatidiletanolamina (cefalina) [McCully *et ál.*, 1962; Saari *et ál.*, 1964; Anton, 1998; Anton *et ál.*, 2003].

**Livetina (10%).** Es una proteína globular hidrosoluble que puede separarse en varias fracciones alfa, beta, gamma. Se comporta de modo idéntico a las proteínas del suero sanguíneo, seroalbúmina,  $\alpha$ -glucoproteína y  $\gamma$ -globulina de la gallina [McCully *et ál.*, 1962].

### **Proteínas de los gránulos**

**Lipovitelinas (68%).** Son lipoproteínas (HDL) ricas en azufre. La fracción lipídica representa un 20%, compuesta por 35% de triglicéridos, 60% de fosfolípidos y un 5% de colesterol [Burley y Cook, 1961]. Es muy rica en cisteína y predominan las cadenas ácidas (ácido aspártico y glutámico).

**Fosvitina (4%).** Es una proteína con gran cantidad de fósforo (10% de la proteína), rica en serina (30%), no contiene cisteína y fija fácilmente el hierro [Ito *et ál.*, 1983]. Formando un complejo soluble que contribuye al transporte del hierro en la yema [Greengard *et ál.*, 1964]. También interactúa con magnesio y calcio [Ishikawa *et ál.*, 2007].

**Lipoproteínas LDL (16%).** Estas lipoproteínas son pobres en cisteína, contienen un 84% de lípidos, de los cuales un 31% son fosfolípidos, un 3.7% es colesterol y un 65% son triglicéridos [Anton *et ál.*, 2003].

### **Lípidos**

Los lípidos, como se ha mencionado anteriormente, se encuentran en la yema formando parte de las lipoproteínas. Los ácidos grasos que se encuentran en los triglicéridos de la yema son principalmente y en orden de importancia ácido oleico, palmítico, esteárico y linoleico [Gil y Ruiz, 2010]. En la tabla 6 se detalla el porcentaje de los distintos fosfolípidos que forman parte de la yema.

### **Vitaminas y minerales**

La yema es más rica en vitaminas que la clara; sobre todo contiene vitamina A, ácido pantoténico y tocoferol. La composición más detallada se verá más adelante en este capítulo.

### **Otros componentes**

La yema del huevo contiene, aproximadamente, 1% (referido a extracto seco) de carbohidratos. Entre los que se encuentran libres están glucosa, manosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ribosa.

El color anaranjado de la yema se deba a la presencia de carotenoides asociados a lipoproteínas y xantofilas (luteína y zeaxantina). Estos pigmentos son relativamente estables y no se pierden ni se alteran durante el cocimiento. El color depende de la dieta de la gallina. Si ésta obtiene gran cantidad de plantas con pigmentación amarilla-anaranjada, estas serán depositadas en la yema. Si se alimentan con una mezcla que contenga maíz amarillo y alfalfa tendrán una yema de color amarillento, mientras aquellas que ingieran trigo o cebada producirán yemas de colores claros. Una dieta sin color, por ejemplo basada en maíz blanco dará yemas casi sin color [UTEF/ INIFAP].

Algunas veces se descubre un anillo verdoso alrededor de la yema de los huevos duros. Esto es resultado de la presencia de azufre y hierro dentro del huevo los cuales reaccionan en la superficie de la yema. Esto sucede si los huevos han sido cocidos previamente o si el agua de cocimiento contiene gran cantidad de hierro. Se puede evitar si se cocen a temperaturas y tiempos apropiados y se enfrían rápidamente los huevos cocidos [Instituto de Estudios del Huevo, 2007].

**Tabla 6.** Lípidos de la yema del huevo. Fuente: Belitz *et ál.*, 2009.

<b>Fracción</b>	<b>Lípidos totales (%)</b>	<b>Fracción fosfolipídica (%)</b>
<b>Triglicéridos</b>	66	-
<b>Fosfolipídica</b>	28	-
<b>Fosfatidilcolina</b>	-	73
<b>Fosfatidilcolamina</b>	-	15.5
<b>Lisofosfatidilcilona</b>	-	5.8
<b>Esfingomielina</b>	-	2.5
<b>Lisofosfatidilcolamina</b>	-	2.1
<b>Plasmalógenos</b>	-	0.9
<b>Fosfatidilinositol</b>	-	0.6
<b>Colesterol, ésteres de colesterol y otros</b>	6	-

# COMPOSICIÓN Y VALOR NUTRIMENTAL DEL HUEVO

Los huevos forman parte de una dieta saludable. Un huevo de aproximadamente 60 gramos de porción comestible aporta 85 kilocalorías, lo que supone un 4% de la Cantidad Diaria Recomendada para un adulto, que necesita 2.000 calorías al día. Con este pequeño aporte energético, contiene el 7% de la cantidad diaria de proteína recomendada y una amplia variedad de nutrientes como las vitaminas A, B8, B12, D, folatos, hierro, fósforo, selenio, yodo y zinc en varias cantidades. Ello hace al huevo un alimento nutricionalmente denso: rico en diversos nutrimentos y con bajo aporte energético (Tabla 7).

A la hora de hacer una valoración sobre el contenido en nutrientes es preciso considerar que la composición del huevo, para determinadas sustancias nutritivas, no es constante y se pueden encontrar valores muy dispares. Esto se debe a que la composición de los piensos de la gallina, así como el sistema de crianza, tienen una influencia directa sobre el contenido de nutrimentos del huevo. Por ejemplo, si se presta atención a los macronutrimentos, son los lípidos los que pueden tener mayor variabilidad en función de la composición del pienso. Otro ejemplo lo constituye el contenido de vitaminas liposolubles y, sobre todo, de vitamina D, hasta tal punto que se pueden encontrar tablas de composición donde no se incluye este nutrimento. En cuanto a los oligoelementos, su concentración está estrechamente relacionada con la composición del pienso de las gallinas [Naber, 1979; Hargis, 1988; Hargis y Van Elswyk, 1993; Van Elswyk *et al.*, 1999].

De las muchas fuentes bibliográficas consultadas para dar una composición media de los nutrientes presentes en el huevo, se ha elegido la base de datos nutricionales USDA *National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24* (2011), por ser completa en micronutrimentos y estar actualizada.

**Tabla 7.** Contenido de energía y macronutrimentos del huevo\*. Donde: \*: Composición del huevo: peso total 58 g (cáscara 8 g, clara 33.4 g, yema 16.6 g). Calculada utilizando la USDA *National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24* (2011). \*\*: Porción comestible.

<b>Nutrimentos y aporte calórico</b>	Entero**	Clara	Yema
<b>Agua (g)</b>	37.92	29.25	8.68
<b>Energía (kcal)</b>	72	16	53
<b>Proteínas (N x 6.25) (g)</b>	6.29	3.64	2.63
<b>Lípidos (g)</b>	4.97	0.06	4.41
<b>Carbohidratos (g)(por diferencia)</b>	0.39	0.24	0.60
<b>Cenizas (g)</b>	0.43	0.21	0.28

## Proteínas

Aunque existen otros alimentos de alto valor proteico, en este aspecto el huevo es un alimento excepcional. Tanto la clara como la yema de huevo contienen proteínas (Tabla 3), mientras que en la clara se encuentran en una solución acuosa, en la yema van unidas a sustancias lipídicas. La composición proteica del huevo es considerada de alto valor biológico (94 en una escala de 100) [Instituto de Estudios del Huevo], ya que contiene todos los aminoácidos esenciales y en la proporción adecuada "ideal" (sin que se dé un déficit o un exceso de ninguno), para cubrir las necesidades de las personas (Tabla 8). Su calidad supera incluso a la proteína de la leche, pescado y carne [Vollmer *et ál.*, 1999]. Por ello, se utiliza como patrón de referencia para la evaluación de la calidad proteica de los alimentos [Herron y Fernandez, 2004].

**Tabla 8.** Contenido en aminoácidos del huevo\*. Donde: \*: Composición del huevo: peso total 58 g (cáscara 8 g, clara 33.4 g, yema 16.6 g). Calculada utilizando la *USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 (2011)*. \*\*: Porción comestible.

Aminoácidos (g)	Entero**	Clara	Yema
Ácido aspártico	0.665	0.407	0.257
Ácido glutámico	0.838	0.518	0.327
Alanina	0.368	0.235	0.139
Arginina	0.410	0.216	0.182
Cisteína	0.136	0.096	0.044
Fenilalanina	0.341	0.229	0.113
Glicina	0.216	0.138	0.081
Histidina	0.154	0.097	0.069
Isoleucina	0.336	0.221	0.144
Leucina	0.544	0.339	0.232
Lisina	0.457	0.269	0.202
Metionina	0.190	0.133	0.063
Prolina	0.257	0.145	0.107
Serina	0.486	0.267	0.220
Tirosina	0.250	0.153	0.113
Treonina	0.278	0.150	0.114
Triptófano	0.084	0.042	0.029
Valina	0.429	0.270	0.158

En 2007, la FAO/OMS, estableció nuevos patrones de aminoácidos esenciales en función de la edad, ya que las necesidades de aminoácidos esenciales son distintas en las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo humano [Suarez *et ál.*, 2006; González-Torres *et ál.*, 2007], siendo la más exigente el de los niños de 1-2 años [Gil y Ruiz, 2010]. Si se comparan estos aminoácidos con los que tiene la proteína del huevo entero (Tabla 9), se observa que todos están en cantidades superiores al patrón. Además, la proteína del huevo se considera una fuente de proteína altamente digestible ya que más del 95% de la proteína del huevo es

digerida y resulta disponible para cubrir las distintas necesidades del organismo [Millward, 2004].

**Tabla 9.** Comparación de los aminoácidos esenciales de la proteína del huevo con la proteína de referencia. Donde: \*: Basada en los requerimientos de aminoácidos para el preescolar (1-2 años). \*\*: Calculada a partir de los datos de la tabla 7 y 8. Fuente: FAO/OMS; Gil y Ruiz, 2010.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Proteína de referencia* (mg/g)</b>	<b>Proteína del huevo** (mg/g)</b>
<b>Fenilalanina + Tirosina</b>	46	93
<b>Histidina</b>	18	24
<b>Isoleucina</b>	31	53
<b>Leucina</b>	63	86
<b>Lisina</b>	52	72
<b>Metionina + Cisteína</b>	26	51
<b>Treonina</b>	27	44
<b>Triptófano</b>	7.4	13
<b>Valina</b>	42	68

Por esto la proteína del huevo es una gran fuente de nutrimentos en las primeras etapas de la vida, para el desarrollo del feto en la etapa embrionaria y en los niños en crecimiento, al existir una necesidad proteica de mayor tanto en cantidad como calidad. Pero también es esencial para los deportistas que tratan de ganar músculo y en personas mayores, ya que les ayuda contrarrestar la pérdida de masa muscular asociada a la edad [Chernoff *et ál.*, 2004; Evans, 2004; Ribera, 2006; Sastre, 2006]. Estudios recientes demuestran que cuando las mujeres mayores incrementan su consumo proteico, también incrementan la densidad mineral del hueso y desciende el riesgo de rotura ósea, especialmente de la cadera.

En las personas que quieren perder peso, el huevo, gracias a su elevado contenido en proteínas, puede ser de gran ayuda, ya que las investigaciones sobre el comportamiento del huevo en relación al índice glucémico y a la capacidad saciante muestran que una dieta con mayor consumo de proteína y menor de carbohidratos estabiliza el nivel de azúcar en la sangre entre las comidas, lo que reduce la tentación de picar entre horas [Layman, 2004; Vander Wal *et ál.*, 2005]. En concreto, se ha descrito el importante papel de la leucina, isoleucina y valina en el control de la síntesis de tejido muscular y de la leucina en el control de la saciedad [Vander Wal *et ál.*, 2005; Layman y Walker, 2006; Miguel, 2005], el huevo es una fuente concentrada de este nutriente. Por ello puede ser de interés incorporar huevos en la forma más natural y con menos grasa añadida (pasados por agua, cocidos) al desayuno o a media mañana, por ejemplo, como

forma de llegar a la hora de la comida sin sentir sensación de hambre [Vander Wal *et ál.*, 2005; Miguel, 2005].

El huevo tiene un protagonismo especial en dietas hiperprotéicas. Antiguamente, estas dietas se basaban en altos niveles de proteína procedentes de carnes o lácteos que aportan además muchas grasas, lo que no ocurre en el caso del huevo, ya que este alimento permite separar la clara, donde está el mayor contenido en proteínas, de la yema, donde el contenido en lípidos es importante, pudiendo de esta forma aumentar el consumo de proteínas con bajo aporte energético [Gil y Ruiz, 2010].

Diversas investigaciones han revelado que, a partir de hidrolizados de proteína de la clara, se pueden obtener péptidos capaces de reducir la presión arterial en ratas hipertensas pero no la presión arterial de ratas normotensas. Estos péptidos han demostrado actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina *in vitro* y actividad antihipertensiva en animales de experimentación. Estos estudios, que requieren confirmación en los seres humanos, abren una puerta para una futura utilización de estos péptidos bioactivos como aditivos o ingredientes funcionales en el tratamiento o prevención de la hipertensión [Miguel *et ál.*, 2005; López-Fandiño *et ál.*, 2007].

Los huevos no aportan purinas (que se transforman en ácido úrico en el organismo) y son especialmente interesantes en la alimentación de personas que padecen gota [Ortega, 2002].

## **Lípidos**

El contenido en lípidos de la yema presenta un interés que merece ser comentado. De acuerdo con los datos expuestos en la tabla 10. El huevo es uno de los alimentos de origen animal con menor contenido en grasa saturada y en el que la relación entre ácidos grasos insaturados y saturados (índice AGI/AGS) es considerada más aceptable y por tanto recomendable (aproximadamente 0.5), ya que se sitúa por encima de los valores recomendados (0.35) [Codony, 2002].

Está bien establecido que la modificación del perfil en ácidos grasos del pienso permite cambiar la composición en ácidos grasos de la yema [Leeson, 1993; Walzem, 1996; Betancourt *et ál.*, 2009]. Este cambio se basa, fundamentalmente, en la variación inversa ente las fracciones de ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos monoinsaturados [Noble y Cochi, 1990], mientras que los ácidos grasos saturados permanecen prácticamente constantes [Baucells *et ál.*, 2000; Betancourt *et ál.*, 2009]. En este sentido, en la actualidad encontramos en el mercado huevos enriquecidos en omega-3, esto es posible gracias a la



incorporación de semillas y/o aceite de linaza, semillas de chía, semillas de girasol, semillas de comino negro, aceites vegetales, aceite de pescado, aceite de algas (*Cryptocodinium cohnii*), inulina, lisados de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), grasa de caballo y ajo en la ración de las gallinas [Caston y Leeson, 1990; Jiang, Ahn y Sim, 1991; Jiang *et ál.*, 1992; Caston *et ál.*, 1994; Hammershøj, 1995; Herbert y Van Elswyk, 1996; Scheideler y Froning, 1996; Konjufca *et ál.*, 1997; Nitsan *et ál.*, 1999; Ayerza y Coates, 2000; Lewis *et ál.*, 2000; Meluzzi *et ál.*, 2001; De Swaaf *et ál.*, 2003; Beynen, 2004; Bourre y Galea, 2006; Cabrera *et ál.*, 2006; De Swaaf *et ál.*, 2007; Cachaldora *et ál.*, 2008; Betancourt *et ál.*, 2009; Shang *et ál.*, 2010; Ramírez *et ál.*, 2011; Petrović *et ál.*, 2012; Yalçın *et ál.*, 2012].

**Tabla 10.** Composición de los lípidos del huevo\*. Donde: \*: Composición del huevo: peso total 58 g (cáscara 8 g, clara 33.4 g, yema 16.6 g). Calculada utilizando la USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 (2011). \*\*: Porción comestible.

<b>Lípidos (g)</b>	<b>Entero**</b>	<b>Clara</b>	<b>Yema</b>
<b>Triglicéridos</b>	4.327	-	4.428
<b>Ácidos grasos saturados</b>	1.550	-	1.585
<b>Ácidos grasos monoinsaturados</b>			
<b>Total</b>	1.905	-	1.949
<b>ácido oleico</b>	1.736	-	1.776
<b>ácido eicosanoico</b>	0.014	-	0.014
<b>Ácidos grasos poliinsaturados</b>			
<b>Total</b>	0.682	-	0.698
<b>ácido linoleico</b>	0.574	-	0.587
<b>ácido linolénico</b>	0.017	-	0.017
<b>ácido araquidónico</b>	0.071	-	0.073
<b>ácido eicosapentaenoico</b>	0.002	-	0.002
<b>ácido docosahexaenoico</b>	0.018	-	0.019
<b>Colesterol (mg)</b>	213	-	213
<b>Lecitina</b>	1.15	-	1.11
<b>Cefalina</b>	0.23	-	0.219

Esto permite aumentar los niveles de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), que son ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena muy larga cuyo consumo ha demostrado reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y mejorar las funciones visuales y mentales [Leeson, 1993; Baucells *et ál.*, 2000; Lewis *et ál.*, 2000; Michella y Slaugh, 2000; Schumann *et ál.*, 2000; Castro-González, 2002]. Un huevo enriquecido, aunque existe una gran variabilidad de contenido y proporción de ALA/EPA/DHA, puede llegar a cubrir prácticamente el 100% de la ingesta diaria recomendada [Instituto de Estudios del Huevo].

Pero, al igual que sucede con todos los alimentos que poseen una cantidad mayor de determinados nutrientes, el abuso puede resultar perjudicial. De hecho,

el exceso de ácidos grasos omega-3 en la dieta puede provocar defectos en la coagulación sanguínea [Instituto de Estudios del Huevo].

Ahora que se sabe más sobre los riesgos de las grasas denominadas "trans" es bueno recordar que no hay en el huevo grasas de este tipo [Milinsk *et ál.*, 2003].

Es destacable la riqueza del huevo en ácido oleico (Tabla 10) presente también en el aceite de oliva y valorado porque ejerce una acción beneficiosa en los vasos sanguíneos reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares y hepáticas.

El huevo es la principal fuente de fosfolípidos de la dieta y contribuye a satisfacer de forma significativa las necesidades en ácido linoleico y linolénico, ácidos grasos esenciales que el organismo no puede sintetizar [Milinsk *et ál.*, 2003]. Además se encuentran en la yema otros fosfolípidos como la lecitina y cefalina, que son responsables de la acción emulgente en la elaboración de margarinas, mayonesas, productos de panadería y pastelería, pastas alimenticias entre otros (Tabla 1) [Anton y Gandemer, 1997; Le Demant *et ál.*, 1999; Le Demant *et ál.*, 2000; Badui, 2006; Gil y Ruiz, 2010; Laca *et ál.*, 2010], además son valiosos debido a su importancia biológica [Badui, 2006; Hatta *et ál.*, 2008; Laca *et ál.*, 2010]. Estudios realizados por el grupo de Koo en 2001, revelaron el papel de la fosfatidilcolina (lecitina) de la yema y la absorción intestinal de colesterol. En modelos de animales se ha demostrado una reducción significativa en la absorción intestinal de colesterol por acción de la lecitina [Jiang *et ál.*, 2001]. Parece ser que esto depende del grado de saturación de los grupos acilo de la fosfatidilcolina.

Por otra parte, esta el colesterol, cuyo contenido es de aproximadamente 426 mg/100 g de huevo (porción comestible). Este dato hizo que en los años setenta disminuyera su consumo, al conocerse los resultados de estudios que relacionaban la ingesta de colesterol de la dieta sobre los niveles de colesterol plasmático (el presente en la sangre) [Simopoulus y Salem, 1992; Herron y Fernandez, 2004], ahora se sabe que el efecto sobre los lípidos de la sangre en personas sanas es mínimo. En general está demostrado el efecto del consumo de grasas saturadas y trans en el aumento de los niveles de colesterol en sangre. Por ello, restringir el consumo de estas grasas es más efectivo en el perfil lipídico del plasma sanguíneo que reducir el colesterol de la dieta [Hegsted *et ál.*, 1965; Keys *et ál.*, 1965; Pyöralä, 1987; Grundy y Denke, 1990; Rudel *et ál.*, 1990; Hayes *et ál.*, 1991; Hopkins, 1992; Khosla y Hayes, 1992; AHA, 2000].

Aunque la mayor parte de los alimentos ricos en colesterol suelen ser también ricos en grasas saturadas, el huevo no lo es (Tabla 10). Un huevo tiene unos 200

mg de colesterol, pero tiene más grasas insaturadas que saturadas y solo 72 kilocalorías (Tabla 7 y 10).

En concreto, diferentes estudios realizados han demostrado que no existe una asociación entre el consumo de huevos y la aparición y desarrollo de enfermedades cardiovasculares [Hu *et ál.*, 1999; McNamara, 2002; Ballesteros *et ál.*, 2004; Kritchevsky, 2004; Nakamura *et ál.*, 2006; Natoli *et ál.*, 2007; Qureshi *et ál.*, 2007]. Las recomendaciones nutricionales de la AHA mantienen el máximo de 300 mg de colesterol por persona y día pero han rectificado y no limitan el consumo de huevos [Herron y Fernandez, 2004; Naviglio *et ál.*, 2012]. Es importante destacar que otros compuestos del huevo como los ácidos grasos poliinsaturados, antioxidantes (carotenoides, vitamina E, selenio), fosfolípidos (lecitina y esfingomielina), vitaminas del grupo B y folato pueden contribuir a contrarrestar el posible efecto negativo del consumo de colesterol [Nyberg *et ál.*, 2000; Ridgway, 2000; Eckhardt *et ál.*, 2002; Ohvo-Rekila *et ál.*, 2002; Noh y Koo, 2003; Noh y Koo, 2004; Clark *et ál.*, 2006].

Los intentos realizados para conseguir una disminución del contenido en colesterol de los huevos, mediante selección genética o modificación de la dieta de la gallina no han dado resultados, debido probablemente a la importancia del colesterol en el desarrollo embrionario del pollito [Washburn y Nix, 1974; Hargis, 1988; Burley y Vadehra, 1989; Naber, 1990; Hartmann *et ál.*, 2000; Hartmann *et ál.*, 2003; Elkin, 2007; Gil y Ruiz, 2010; Naviglio *et ál.*, 2012].

## **Vitaminas y minerales**

En el huevo se encuentran cantidades abundantes de vitaminas, en especial vitamina B12, biotina, ácido pantoténico, riboflavina, vitamina D, niacina, vitaminas A, E y B1 (Tabla 11). Una ventaja de este alimento es que contiene tanto vitaminas hidrosolubles como liposolubles, que pueden ayudar a cubrir una parte considerable de las necesidades diarias [Instituto de Estudios del Huevo]. El huevo contiene todas las vitaminas con excepción de la vitamina C.

La biotina, ácido pantoténico, B1, B6, ácido fólico y la B12 se concentran mayoritariamente en la yema mientras que el 50% de la B2 está depositado en el albumen.

**Tabla 11.** Contenido en vitaminas del huevo\*. Donde: \*: Composición del huevo: peso total 58 g (cáscara 8 g, clara 33.4 g, yema 16.6 g). Calculada utilizando la *USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 (2011)*. \*\*: Porción comestible.

<b>Vitaminas</b>	<b>Entero**</b>	<b>Clara</b>	<b>Yema</b>
<b>A (µg)</b>	70	0	63
<b>Ácido fólico (B9) (µg)</b>	23	1	24
<b>Ácido pantoténico (B5) (mg)</b>	0.719	0.063	0.496
<b>Biotina (B7) (µg)</b>	90.98	20.34	70.58
<b>Cianocobalamina (B12) (µg)</b>	0.50	0.07	0.52
<b>D (UI)</b>	18	0	18
<b>Niacina (B3) (mg)</b>	0.037	0.031	0.002
<b>Piridoxina (B6) (mg)</b>	0.070	0.001	0.065
<b>Riboflavina (B2) (mg)</b>	0.239	0.147	0.088
<b>Tiamina (B1) (mg)</b>	0.031	0.002	0.028
<b>Tocoferol (E) (mg)</b>	0.70	0	0.70
<b>Otros compuestos de interés</b>			
<b>Colina (mg)</b>	125	0.4	112
<b>Betaina (mg)</b>	0.3	0.04	0.16

La vitamina A es importante para el normal funcionamiento y desarrollo celular y, especialmente, esencial para la visión. Los alimentos de origen vegetal contiene precursores de vitamina A pero solo los productos de origen animal aportan esta vitamina de forma pre-formada [Barron, 2001].

Destacar, que el huevo es uno de los pocos alimentos que aporta cantidades apreciables no solo de vitamina D o colecalciferol, sino también del metabolito 25-(OH)-colecalciferol, de mayor actividad biológica [Carbajal, 2005; Larrosa *et ál.*, 2007].

La vitamina E o tocoferol es conocida por su gran poder antioxidante, ya que neutraliza la acción degenerativa de los radicales libres y previene la oxidación celular. Es uno de los nutrientes que ha sido comprobado y conseguido su enriquecimiento a través de la alimentación de la gallina [Galobart *et ál.*, 2002; Vishwanathan *et ál.*, 2010], y que tiene demostrada acción funcional.

La vitamina B2 o riboflavina esta implicada en diferentes rutas metabólicas del organismo. Además importante para el crecimiento corporal y la producción de glóbulos rojos, selenio (12%), potente antioxidante, y vitamina K (31%), que interviene en la coagulación sanguínea.

La vitamina B12 o cianocobalamina interviene en la formación de células sanguíneas y del tejido nervioso.

El ácido fólico tiene efectos parecidos a la colina (como se verá más adelante) en relación a su importancia durante la gestación.

La biotina es otro nutriente esencial que se encuentra en el huevo, vinculado a la protección de la piel y al mantenimiento de las funciones corporales. Y aunque la microbiota intestinal es capaz de sintetizar y aportar esta vitamina al organismo, el consumo durante la lactación está recomendado para contrarrestar las pérdidas a través de la leche. Pero no es asimilada si se consume el huevo crudo (debido a la avidina); por ello es siempre recomendable calentar las claras hasta su coagulación.

Tanto la clara como la yema del huevo contienen una amplia variedad de minerales (Tabla 12), destacando la contribución a la ingesta diaria recomendada de zinc (10 %), selenio (18%), hierro (10,5 %) y yodo (16 %) [Gil y Ruiz, 2010]. Es remarcable que el zinc aportado por el huevo se absorbe mejor que el de los alimentos de origen vegetal [Stahl *et ál.*, 1986; Sandstrom *et ál.*, 1987; Stahl *et ál.*, 1988]. También es destacable la riqueza en selenio, ya que está bien establecido su papel frente al estrés oxidativo.

Está claramente demostrado que la composición del huevo puede variar debido a distintos factores como la alimentación, la genética y la edad de las gallinas. Sin embargo, cambios importantes con repercusión práctica a nivel nutricional, únicamente se han descrito en los lípidos (por ejemplo ácidos grasos omega-3, CLA), las vitaminas liposolubles, la riboflavina, ácido pantoténico, biotina y B12 y algunos minerales (yodo y selenio) lo que permite la producción de huevos enriquecidos en diferentes componentes de interés nutricional y/o funcional.

**Tabla 12.** Contenido en minerales del huevo\*. \*: Composición del huevo: peso total 58 g (cáscara 8 g, clara 33.4 g, yema 16.6 g). Calculada utilizando la *USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24 (2011)*. \*\*: Porción comestible.

<b>Minerales (mg)</b>	Entero**	Clara	Yema
<b>Calcio</b>	25	2	23
<b>Cobre</b>	0.051	0.008	0.013
<b>Yodo</b>	0.024	0.001	0.022
<b>Hierro</b>	0.72	0.01	0.59
<b>Magnesio</b>	6	4	1
<b>Manganeso</b>	0.019	0.004	0.009
<b>Fósforo</b>	89	4	81
<b>Potasio</b>	67	54	18
<b>Sodio</b>	70	55	8
<b>Zinc</b>	0.55	-	0.52
<b>Selenio</b>	0.015	0.006	0.009

## Otros componentes

### Luteína y zeaxantina

La luteína y la zeaxantina son dos nutrientes reconocidos recientemente y que han colocado al huevo dentro de la categoría de "alimentos funcionales", es

decir, los que aportan beneficios nutricionales más allá de los que corresponden a su contenido de nutrientes básicos, por lo anterior, vale la pena destacar que las recomendaciones sobre el consumo de luteína y xantofilas son consistentes con las recomendaciones dietéticas actuales [Instituto de Estudios del Huevo]. La luteína y la zeaxantina son unos pigmentos de la familia de los carotenoides y se encuentran en los vegetales verdes y en la yema de huevo.

Se ha demostrado que estos carotenoides tienen un importante efecto antioxidante, antimutagénico y anticarcinogénico [Ribaya-Mercado y Blumberg, 2004; Sajilata *et ál.*, 2008]. Y por ello los huevos se han considerado alimentos funcionales [ADA, 2003]. En concreto, se ha demostrado que la ingestión de luteína y la zeaxantina reduce el riesgo de cataratas y previene la degeneración macular. Ya que estos compuestos están presentes en el cristalino y la región macular de la retina donde ejercen una acción antioxidante [Lyle *et ál.*, 1999; Moeller *et ál.*, 2000; Curran-Celentano *et ál.*, 2003].

También se ha demostrado que la luteína ejerce una acción antiinflamatoria con un importante papel en la prevención de enfermedades coronarias y desarrollo de algunos tipos de cáncer [Dwyer *et ál.*, 2004; Ribaya-Mercado y Blumberg, 2004].

El huevo es el único alimento de origen animal que aporta luteína y zeaxantina, y aunque su contenido es inferior al de algunas fuentes de origen vegetal, la biodisponibilidad es superior [Handelman *et ál.*, 1999; Chung *et ál.*, 2004]. Se ha descrito que 100 g de yema contiene 1723 µg de luteína y 1257 µg de zeaxantina, además su contenido aumenta de forma directamente proporcional a su concentración en el pienso de las gallinas.

### **Colina**

Por otra parte, el huevo es la mejor fuente dietética de lecitina o fosfatidilcolina, que aporta colina al organismo. La colina es una amina terciaria esencial, imprescindible para mantener la integridad de la membrana. Tanto la colina como el ácido fólico son donadores de grupos metilo y, junto con la vitamina B12, evitan el aumento de la concentración de homocisteína en sangre (aumento que se relaciona con el incremento de riesgo cardiovascular), ya que facilitan la transformación de homocisteína en metionina. También es importante para el normal desarrollo y funcionamiento cerebral. Según recientes investigaciones, la colina es indispensable para la formación y desarrollo del centro de la memoria situado en el hipotálamo, durante el desarrollo embrionario. Por ello la ingestión y biodisponibilidad de la colina durante el último periodo de gestación y primera etapa de la vida, tiene una importante repercusión sobre el desarrollo y mantenimiento de la capacidad de memoria [Zeisel, 2004].

En paralelo, el consumo de colina mejora la función mental en personas con déficit de acetilcolina como son los enfermos de Alzheimer y personas mayores con demencia presenil. Además la colina se relaciona con la función renal, incrementa la secreción de bilis y previene su estancamiento en la vesícula, evitando la formación de cálculos y favoreciendo su disolución o eliminación [Fischer *et ál.*, 2005]. También es importante la relación entre la colina y el metabolismo del colesterol. Hay evidencias de que la fosfatidilcolina o lecitina así como la esfingomielina de la yema del huevo, tienen efectos hipocolesterolémicos y antiaterogénicos ya que reduce la absorción de colesterol [Jiang *et ál.*, 2001; Noh y Koo, 2003].

Un huevo contiene aproximadamente 250-3000 mg/100g de colina, mayoritariamente integrado en el fosfolípido fosfatidilcolina o lecitina de la yema. La ingesta recomendada se sitúa en 550 y 425 mg/día para hombres y mujeres, respectivamente [Carbajal, 2005]. Aunque la colina puede encontrarse en alimentos de origen vegetal, la lecitina de la yema de huevo es más aprovechable por nuestro organismo [Instituto de Estudios del Huevo].

### **Recomendaciones acerca del consumo de huevo**

Durante la década de los años 40 la población ha sido prevenida sobre el consumo de huevos a causa de las preocupaciones sobre el riesgo de enfermedades coronarias. Estas se basaban en tres observaciones: la primera, que los huevos son una rica fuente de colesterol dietético; la segunda, que cuando se suministra experimentalmente, el colesterol dietético incrementa el colesterol en suero sanguíneo y tercera, que el elevado nivel de colesterol sérico predice la incidencia de enfermedad coronaria. Sin embargo, los datos sobre personas que hacían vida normal muestran que el consumo de huevos no está asociado con altos niveles de colesterol. Es más, en su conjunto la literatura epidemiológica no apoya la idea de que el consumo de huevos sea un factor de riesgo coronario. Entre los nutriólogos existe una creciente apreciación de que la salud se deriva de unos hábitos dietéticos generales más que de evitar determinados alimentos, y ha habido un cambio en el tono de las recientes recomendaciones dietéticas, que han pasado de los mensajes de "restricción" a los que promueven pautas dietéticas saludables.

Las guías más recientes de la American Heart Association no incluyen ya una recomendación para limitar el consumo de huevo, sino que promueven la adopción de prácticas de consumo que se asocian con buena salud. Basándose en la evidencia epidemiológica, no existen razones para pensar que tales prácticas no puedan incluir huevos.

Capítulo 3

# Formación del Huevo

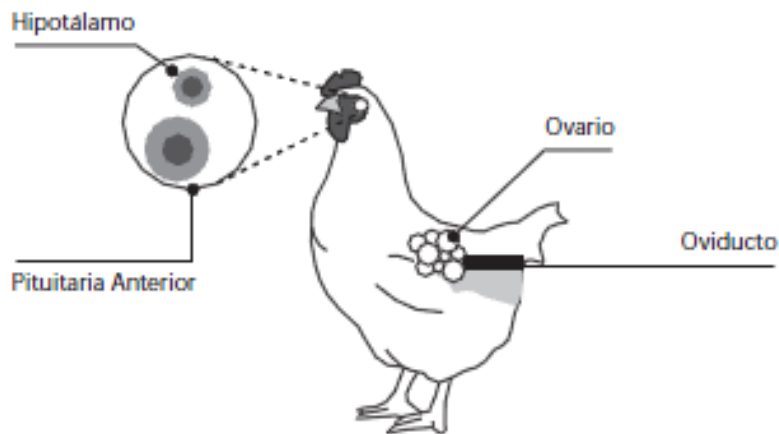


# PUESTA DE HUEVOS

El huevo es uno de los primeros alimentos utilizados por el hombre y su consumo esta ampliamente distribuido en la población mundial. Es tan común que a veces nos olvidamos que es parte del proceso de reproducción de las aves, por ello contiene todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de un hipotético futuro embrión.

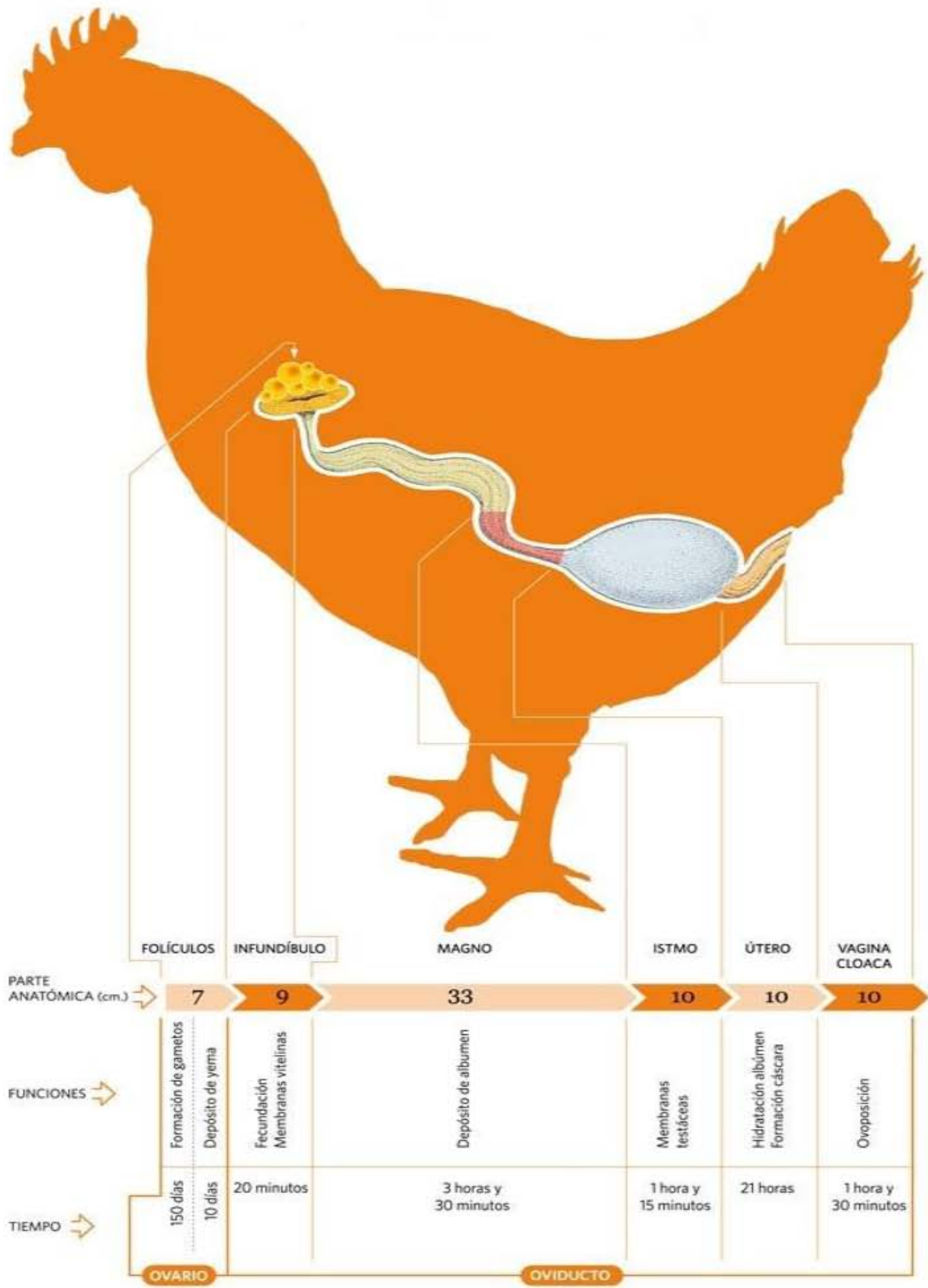
La formación de un huevo supone un gran esfuerzo fisiológico por parte de la gallina que es capaz de depositar alrededor de 7.7 g de proteína, 7 g de lípidos, 2 g de calcio y 40 g de agua, entre otros, casi cada día [Buxadé, 1994; Barroeta, 2002].

En la formación del huevo intervienen dos estructuras anatómicas diferentes: el ovario, para la yema, y el oviducto, para la clara y la cáscara. La ovulación es, precisamente, la que permite el paso de una estructura a la otra (Figura 10 y 11). Sin embargo, no podemos obviar el importante papel que desarrollan en la reproducción el cerebro (hipotálamo y pituitaria anterior o adenohipófisis), el hígado y el sistema óseo (Figura 9).



**Figura 9.** Partes anatómicas del ave relacionadas con la reproducción.

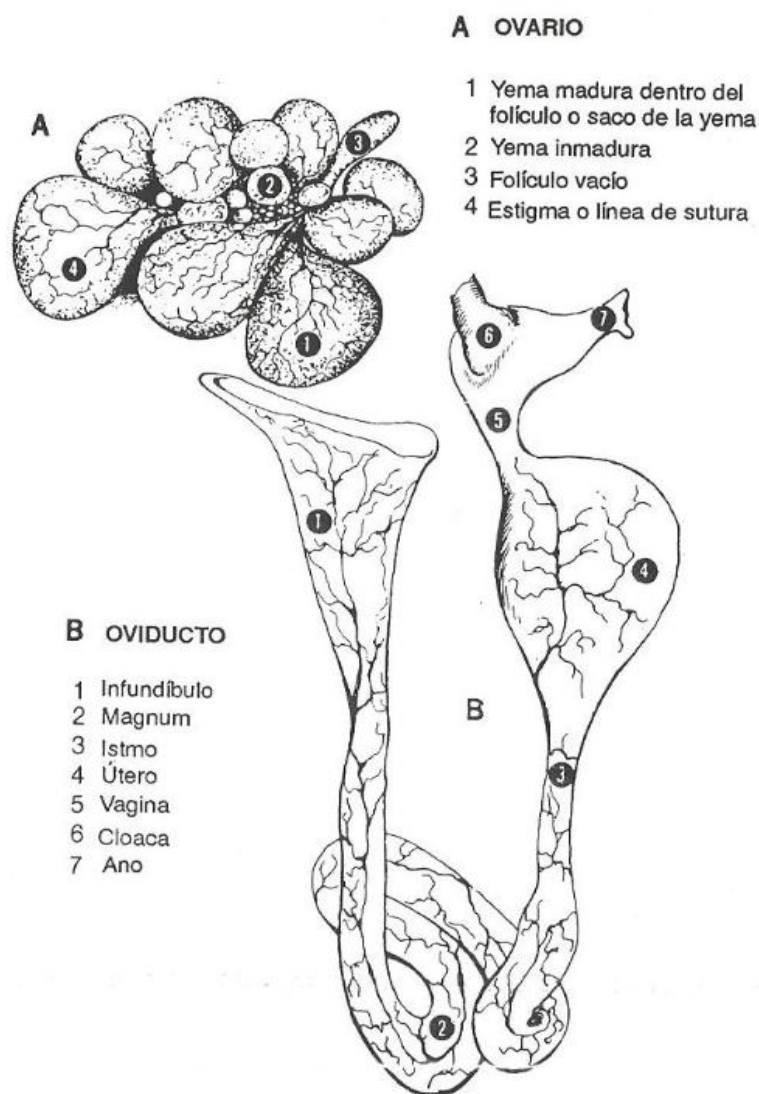
La reproducción de las aves es un fenómeno de características muy diferentes al de los mamíferos, tanto desde el punto de vista del aparato genital como del mecanismo neuroendocrino que lo regula.



**Figura 10.** Esquema de la formación del huevo en la gallina.

Podríamos resumir que desde el punto de vista anatómico las diferencias estriban en la falta de ovario derecho, en la existencia de un oviducto muy largo y de funcionamiento complicado y un útero muy particular. En el aspecto histológico se observa que la gallina no forma cuerpo lúteo [Marrone, 1983] y finalmente se comprueba la inexistencia de ciclo sexual tal como lo conocemos [Buxadé, 1994].

Si a esto añadimos que el huevo es incubado fuera del claustro materno, tendremos un cuadro: ovulación, ovoposición e incubación en las aves frente a ovulación, gestación, parto y lactación en mamíferos [Cole, 1973].



**Figura 11.** Ovario y Oviducto.

# ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA GALLINA

En las aves, el aparato reproductor de las hembras esta compuesto por dos partes esenciales: ovario y oviducto. Se trata de un aparato "impar" dado que, en el ave adulta, exclusivamente el ovario y el oviducto izquierdo son funcionales [Okubo *et ál.*, 1997]. No obstante, en muchas especies no domesticadas (aves de rapiña y algunas otras) subsiste el ovario derecho. La existencia del oviducto derecho es aún más infrecuente que la del correspondiente ovario [Sauveur y De Reviers, 1991].

## **Desarrollo del aparato reproductor**

### **En fase embrionaria**

Hasta el tercer día de la vida embrionaria (desarrollo de las crestas genitales) las células germinales primordiales se acumulan de forma simétrica a derecha e izquierda del embrión [Ukeshima y Fujimoto, 1984]. No obstante, a medida que el embrión se va desarrollando, el incremento de dichas células es de 2 a 5 veces más rápido en la parte izquierda que en la derecha. Hasta el séptimo día, la diferenciación sexual de la gónada (macho-hembra) no es definitiva: esto explica el hecho de que cuando una gónada derecha se desarrolla muestra características masculinas.

Normalmente, en el momento de la eclosión del polluelo, el ovario derecho no es más que un resto de tejido medular ubicado encima de la vena cava caudal. Si, durante el primer mes de vida de la pollita, se destruye el ovario izquierdo, el ovario derecho residual todavía es capaz de evolucionar, convirtiéndose en un ovotestículo [Ukeshima, 1994].

En cuanto al oviducto, se desarrolla de forma simétrica a partir del cuarto día de incubación. El oviducto derecho deja de aumentar al octavo día e inicia su regresión a partir del decimoprimeros. El oviducto izquierdo, entre el decimosegundo y el decimotercer día, se diferencia en varios segmentos, pero aun no se comunica con la cloaca [Ukeshima, 1994].

### **A nivel de la pollita**

#### **El ovario**

En el momento de la eclosión (nacimiento del ave), el ovario izquierdo pesa alrededor de 0.3 gramos básicamente, esta constituido por tejido conjuntivo (estroma ovárico) que envuelve una serie de capilares sanguíneos y de células,

denominadas intersticiales, capaces de sintetizar hormonas esteroideas. En esta fase, todos los folículos están ya presentes.

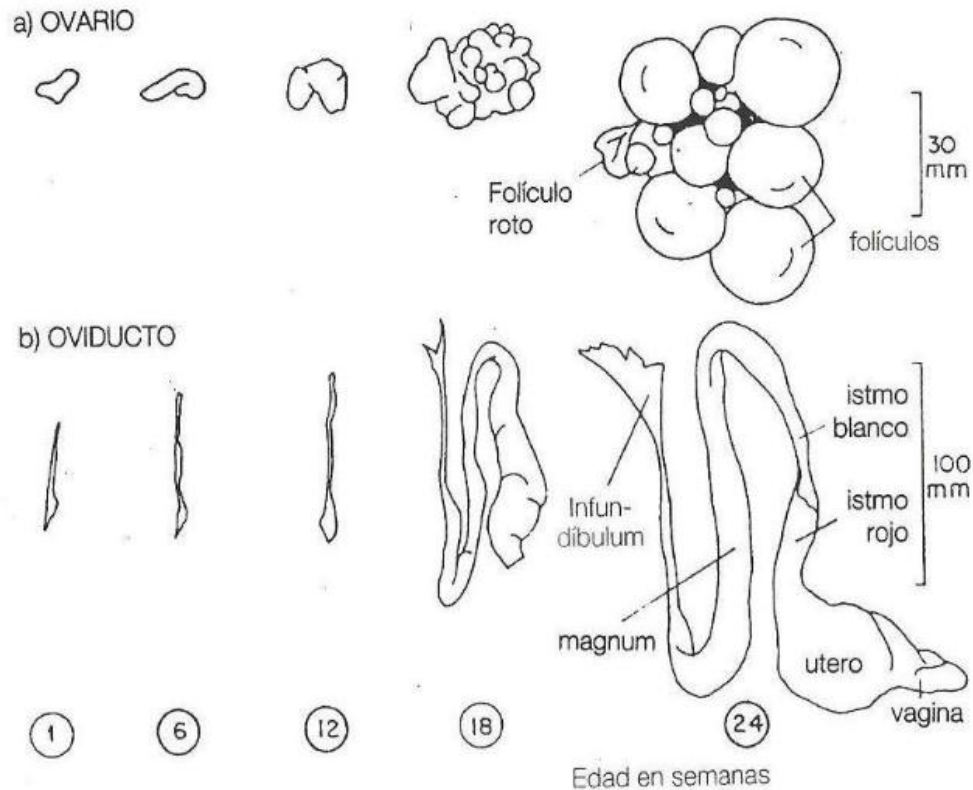
Durante las primeras semanas de vida, el ovario evoluciona de forma muy lenta llegando a tener, a la edad de 12 semanas, una longitud aproximada de 1.5 cm. En este momento está formado por una parte central o "medula" (muy vascularizada) y por una cubierta o "córtez". Inicialmente, esta cubierta es lisa pero, a partir de la quinta semana, aparecen una serie de estrías que aumentan en número y en profundidad con gran rapidez; el tejido medular se desarrolla hacia el exterior, y la diferenciación entre la medula y el córtez, se va haciendo cada vez más difícil.

A medida que tiene lugar el desarrollo de los folículos, el córtez va adquiriendo un aspecto más granuloso. En el transcurso de las tres semanas que preceden a la madurez sexual (puesta del primer huevo, 20 semanas), el peso del ovario es de 5 a 60 gramos aproximadamente. Este incremento está relacionado con la síntesis de hormonas esteroideas, las cuales dependen, a su vez, de la acción de hormonas hipofisarias LH (Hormona Luteinizante) y FSH (Hormona Folículo Estimulante).

### **El oviducto**

Después del nacimiento del ave, el desarrollo del oviducto es sensiblemente proporcional al del ovario (Figura 12b). La longitud de aquél aumenta de forma espectacular cuando se aproxima a la madurez sexual, pasando de 15 a 70 cm, gracias a una hiperplasia masiva.

Cuando el ave es joven su epitelio no está diferenciado y carece de células secretoras, las cuales no aparecen hasta poco antes de la maduración sexual. Es en este momento cuando se establece la comunicación entre el oviducto y la cloaca.



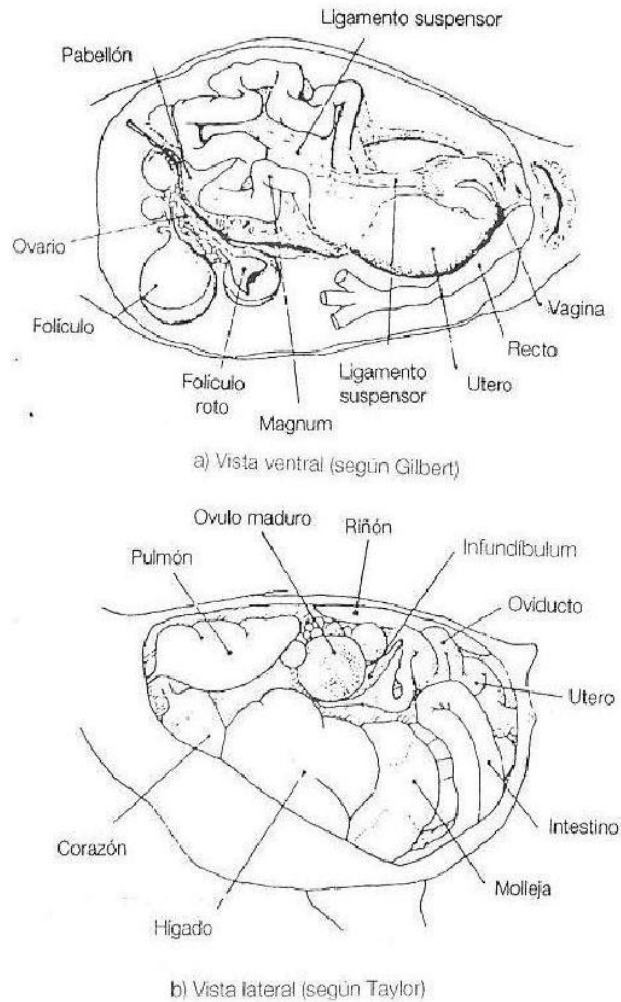
**Figura 12.** Desarrollo esquemático del ovario y del oviducto en la gallina.

### En la gallina adulta

#### El ovario: Situación

En la gallina adulta, el ovario está situado en la parte superior de la cavidad abdominal (Figura 13), debajo de la arteria aorta y de la vena cava posterior. Se apoya sobre el riñón y el pulmón y, por la parte inferior, sobre el saco aéreo abdominal izquierdo.

El riego arterial del ovario es variable, incluso entre los individuos de una misma especie. En la mayoría de los casos la irrigación sanguínea arterial procede de la arteria renal anterior y la circulación de retorno se realiza por dos venas ováricas que desembocan en la vena cava superior. La inervación está muy desarrollada, especialmente en dirección a los folículos.



**Figura 13.** Ubicación del aparato reproductor de la gallina en la cavidad abdominal.

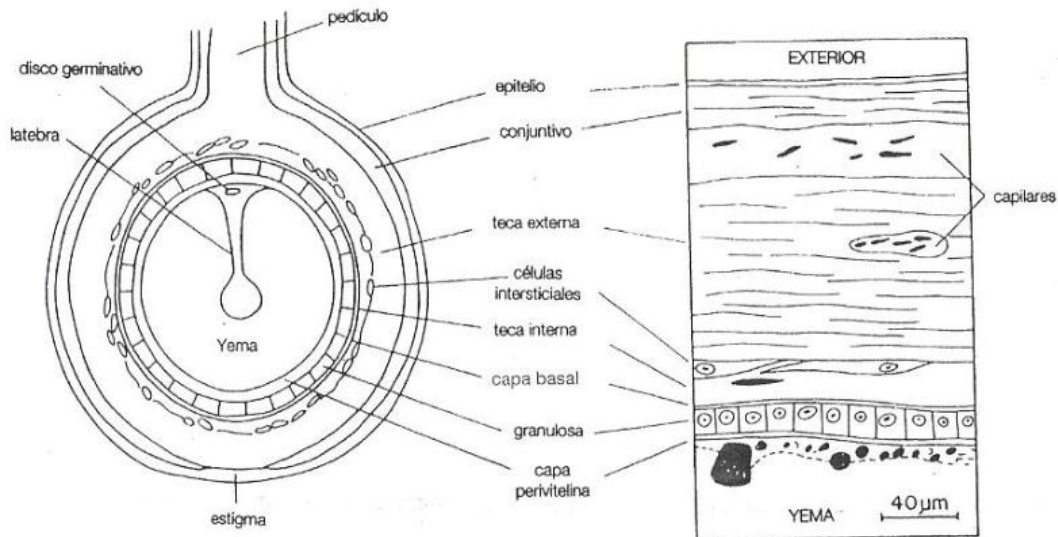
### El ovario: Estructura

Al no ser posible, en el ovario adulto, la distinción entre “medula” y “córTEX”, se habla normalmente de masas celulares, algunas de las cuales contienen los oocitos (zona parenquimatosa) y otras, fundamentalmente, tejido medular y vasos sanguíneos (zona vascular).

El ovario adulto muestra el aspecto de un racimo de uvas, debido a la presencia de 7 a 10 gruesos folículos portadores [Williams y Sharp, 1978], cada uno de ellos, de una yema que se halla en fase de crecimiento acelerado (Figura 12a). Junto a ellos se encuentran muchos pequeños folículos (más de 1000) y también uno o dos folículos vacíos (estadio postovulatorio), que degeneran rápidamente.

La estructura de estos folículos se ha descrito en numerosas ocasiones [Williams y Sharp, 1978; Etches, 1990; Sauveur y De Reviers, 1991]. En estado maduro, y desde el interior al exterior, se distinguen, como se presenta en la figura 14:

- Una capa perivitelina acelular, segregada por la granulosa,
- Una capa monocelular: la granulosa,
- Una capa llamada basal,
- Dos tecas, una interna y otra externa, que contienen células intersticiales,
- Una capa de tejido conjuntivo (salvo en la zona del estigma, lugar donde se producirá la rotura folicular),
- Un epitelio superficial.



**Figura 14.** Estructura de la pared de un folículo en fase de crecimiento rápido.

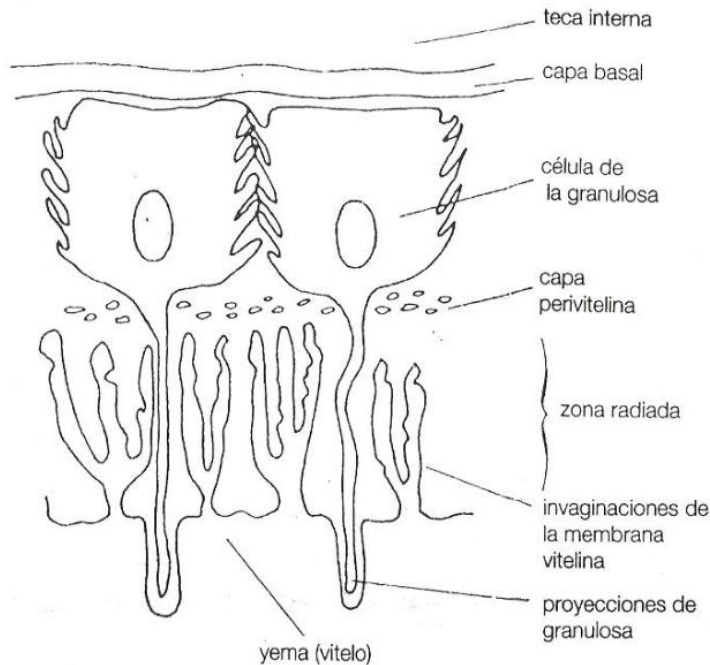
Las estructuras que relacionan las células de la granulosa y el vitelo (o yema) contenido en el folículo varían con el transcurso del tiempo. Tal y como se expone en la figura 15, cuando el folículo alcanza un diámetro de 2 mm, las excrescencias de la granulosa forman interdigitaciones con la membrana vitelina que se hacen cada vez más complejas. Esta estructura (denominada zona radiata) desaparece cuando el folículo alcanza un diámetro de 15 mm, jugando, sin duda alguna, un papel fundamental en la transferencia de los constituyentes de la yema.

Cada folículo está unido al ovario por un pedículo por donde penetran de 2 a 4 arterias que se extienden por la teca externa dividiéndose en conductos más pequeños (arteriolas) los cuales, a través de la teca interna, llegan a formar una densa red capilar alrededor de la capa basal.

En lo que al sistema venoso se refiere, está presente a varios niveles, el más profundo de los cuales se sitúa en la teca interna.



Las fibras nerviosas siguen un trayecto parecido al de las arteriolas. La red capilar es poco densa en la región del estigma o línea de dehiscencia folicular. Esta estructura permite, en principio, que la ovulación no produzca hemorragias; sin embargo, si ésta tiene lugar, la yema adquiere una mancha de sangre.



**Figura 15.** Estructura detallada de la granulosa y de la zona radiada. Esta disposición se presenta cuando el folículo tiene un diámetro comprendido entre 2 y 15 mm.

### Situación del oviucto

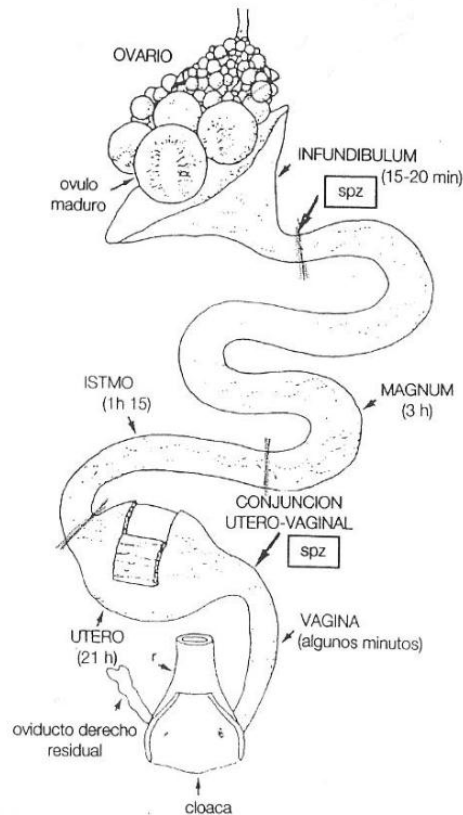
El oviducto se presenta como un estrecho conducto de color rosa pálido que se extiende desde la región del ovario hasta la cloaca (Figura 10b). En el caso de la gallina, su longitud total es cercana a los 70 cm y su peso, en vacío, próximo a los 40 g. Se encuentra suspendido mediante un repliegue ventral del riñón izquierdo. Su estructura es sumamente elástica y adaptable y sus secciones o partes cumplen misiones importantes en la formación del huevo, proporcionándoles nada menos que la clara, las membranas testáceas y la cáscara (Figura 10).

El riego arterial del oviducto, realizado a partir del sistema arterial general, tiene lugar a 4 (y, en ocasiones, incluso a 5) niveles. La inervación de la zona distal está especialmente desarrollada y juega un papel esencial en la progresión del huevo que se está formando y en la oviposición, pero no en el control de las secreciones.

### Estructura y función del oviducto

Al oviducto se le puede dividir en cinco partes netamente diferenciadas, en la figura 16 vienen expuestos los distintos segmentos del oviducto, pudiendo distinguir:

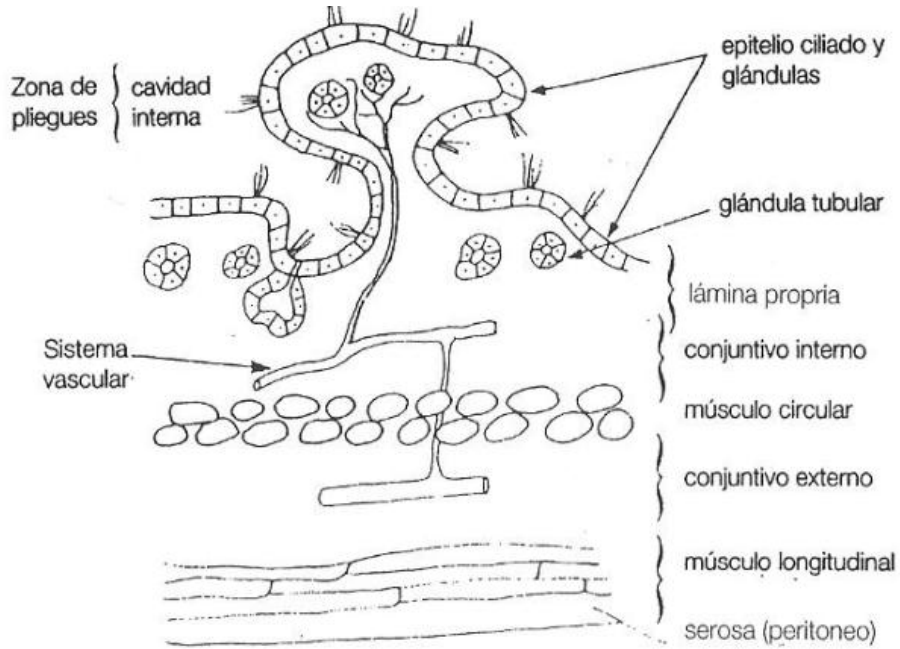
- El infundíbulo o pabellón: Es el primer segmento del oviducto. Tiene forma de embudo o paraguas invertido y es una zona muy fina prácticamente transparente y elástica. El tamaño aproximado es de 9 cm (Figura 10 y 11). Por lo común inactivo, excepto inmediatamente después de la ovulación, su función es de captador de óvulos o yemas para hacerlas entrar en el oviducto, iniciando la formación de las chalazas [Burley y Vadehra, 1989; North y Bell, 1993].
- El magnum: Es la parte más larga del oviducto, de ahí su nombre. Su pared es muy elástica y presenta grandes pliegues. Dispone de una gran cantidad de células y glándulas secretoras. Su longitud promedio es de 33 cm. El magnum es la parte del oviducto donde se secreta la albumina o clara.
- El istmo: Parte relativamente corta, de aproximadamente 10 cm de longitud. Comparado con el magnum presenta un diámetro ligeramente mas reducido. Los repliegues están menos acentuados que en el segmento anterior y es fácil distinguir una primera parte mas blanquecina que la parte final (istmo rojo) en función de su nivel de vascularización. La principal función del istmo consiste en segregar las membranas testáceas.
- El útero o glándula coquiliaría o cascarógena (shell gland): Se distingue de las partes anteriores descritas por su forma de bolsa y por el espesor de su pared muscular, sector muy vascularizado, con una mucosa secretora importante y la presencia de multitud de pliegues en distintas direcciones. Tiene una longitud aproximada de 10 a 12 cm., y cumple la misión de segregar la cáscara del huevo.
- La vagina: Este segmento une el útero con la cloaca. Es una parte estrecha y muscular. Existe una zona muy estrecha llamada "unión útero-vaginal" que tiene un papel de gran importancia en la progresión y conservación de los espermatozoides [Sauveur y De Reviers, 1991]. La pared interna presenta pliegues longitudinales, pero destaca la ausencia de glándulas secretoras. Es un órgano alargado que no participa en la formación del huevo, sino únicamente en su expulsión gracias a sus poderosas fibras musculares lisas circulares.



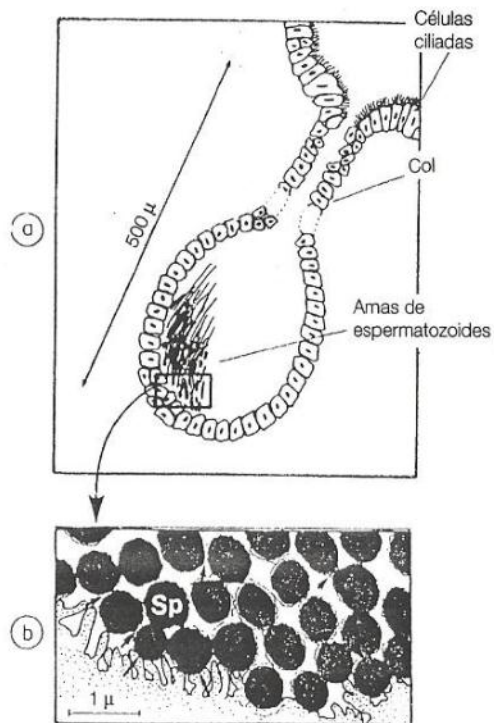
**Figura 16.** Representación esquemática del oviducto de la gallina. Donde spz: zonas de almacenamiento de espermatozoides.

La pared del oviducto, con independencia del segmento que se considere, está constituida por un conjunto de siete capas que, de dentro hacia afuera, son (Figura 17):

- El epitelio secretor que cubre a los repliegues. Esta formado por dos tipos principales de células (ciliadas y caliciformes) que se encuentran en proporciones variables según la parte del oviducto de que se trate.
- Una capa denominada lamina propia que contiene las glándulas tubulares pluricelulares.
- Una capa conjuntiva interna.
- Una capa de fibras musculares circulares.
- Una capa conjuntiva externa.
- Una capa de fibras musculares longitudinales.
- Una capa serosa externa (peritoneo).



**Figura 17.** Estructura de la pared del oviducto.



**Figura 18.** Estructura de una glándula útero-vaginal o "nido espermático". La figura b permite ver los numerosos contactos (flechas) entre espermatozoides y micro-vellosidades de las células epiteliales y entre los propios espermatozoides.

Son las células epiteliales caliciformes y de las glándulas tubulares las que aseguran, en cada nivel, la síntesis y la secreción de los compuestos proteicos específicos (proteínas del albumen, de las fibras de las membranas testáceas, de la trampa proteica de la cáscara, de la cutícula). Las células epiteliales ciliadas no tienen actividad de secreción proteica pero probablemente intervengan ayudando a la ascensión de los espermatozoides por el oviducto [Sauveur y De Reviere, 1991].

En la base del infundíbulo y, sobre todo a nivel de la unión útero-vaginal, las invaginaciones propias de la mucosa constituyen "nidos espermáticos" donde quedan, o pueden quedar, almacenados los espermatozoides (Figura 18). Se trata de glándulas tubulares no ramificadas con una longitud comprendida entre los 0.25 y los 0.50 mm; su pared está formada por una única capa de células no ciliadas que, sin embargo, presentan, fuera del cuello, unas micro-vellosidades que entran en contacto con los espermatozoides.

# FISIOLOGÍA DEL OVARIO

Se ha mencionado que el ovario es el lugar donde esta ubicada la yema del futuro huevo. Inicialmente, se haya contenida en el interior de un folículo. El ovario es el lugar donde, bajo el control de la hipófisis, tiene lugar la síntesis de las hormonas esteroideas y el de la gametogénesis femenina. Se señalan estas funciones antes de pasar a explicar la formación del huevo dado que está regulada, precisamente, por los esteroides.

## **El ovario. Órgano de síntesis de los esteroides sexuales**

### **Las hormonas gonadotropas hipofisarias de las aves**

La hipófisis anterior es absolutamente indispensable para el desarrollo y el mantenimiento de la actividad ovárica. Su extirpación (hipofisectomía) conlleva a una atrofia de las gónadas que puede ser compensada con la inyección diaria de extractos hipofisarios. Existe, tanto en las aves como en los mamíferos, tres hormonas gonadotropas, siendo las de más interés:

- FSH, la cual es responsable del crecimiento folicular y la producción de estrógenos por el ovario [Hammond *et ál.*, 1981].
- LH, también es responsable del desarrollo del ovario, pero su papel fundamental esta en la ovulación [Wilson y Sharp, 1973; Etches, 1990]. Detectar estas dos hormonas por separado en la hipófisis es muy difícil.
- LTH o prolactina, aparte de ser responsable de los fenómenos de la incubación, comportamiento maternal y de la muda, interviene en el metabolismo del agua, así como presenta una acción antagónica a la FSH y LH, de ahí que su predominio relativo inhiba la puesta.

Estas tres hormonas se secretan en las aves de forma continua; la LH se produce en cantidades mucho menores que la FSH, si bien periódicamente estas cantidades se elevan bajo la influencia de los impulsos nerviosos producidos a nivel del oviducto (ovulación).

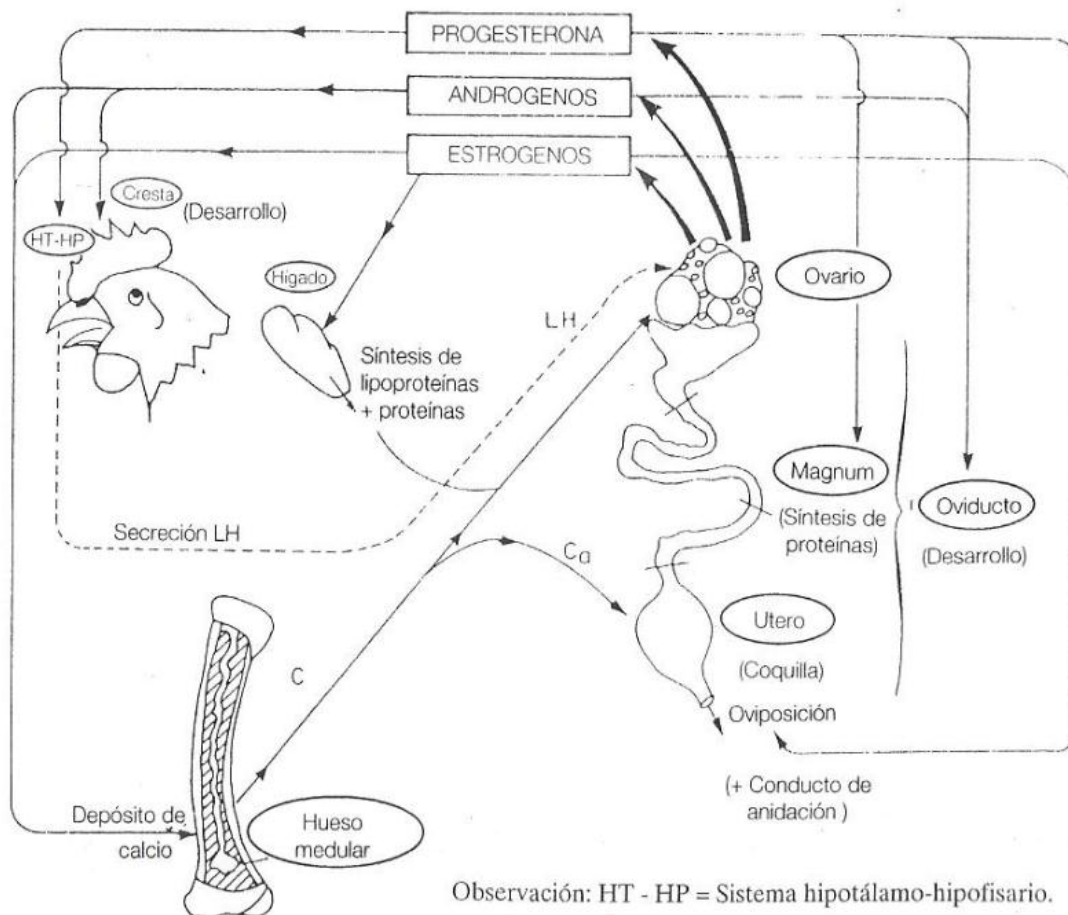
### **Esteroides del ovario: secreción y función**

Por otra parte, bajo el control de las hormonas gonadotropas hipofisarias, el ovario segrega las hormonas ováricas: estrógenos, andrógenos y progesterona. La secreción de las mismas se realiza de forma cíclica en función del estadio en que se encuentre la ovulación.

Los estrógenos (estrona y estradiol) son sintetizados, probablemente, por las células intersticiales de las tecas foliculares.

Su síntesis aumenta a medida que la gallina se va aproximando a su madurez sexual para disminuir de nuevo en dos a cuatro días si la gallina deja de poner (muda). En el ave adulta los folículos de mayor tamaño generan prácticamente la totalidad de los estrógenos, si bien antes de acontecer la ovulación el folículo preovulatorio sintetiza progesterona.

Las funciones de los estrógenos son variadas puesto que participan prácticamente en el control de todas las fases de formación del huevo (Figura 19), ya que intervienen en el crecimiento del oviducto, en la síntesis de proteínas de la yema y del albumen, en la síntesis de lípidos de la yema, así como en la formación del hueso medular y transporte de calcio. También juega un cierto papel en la aparición de los caracteres sexuales secundarios y en la separación de los huesos de la pelvis [Sauveur y De Reviers, 1991].



**Figura 19.** Resumen de las principales funciones de las hormonas esteroides del ovario.

Los andrógenos por su parte, pueden tener un doble origen (células intersticiales del estroma del ovario y de la teca). Intervienen en el crecimiento de la cresta y junto con los estrógenos son los responsables del desarrollo de los caracteres

sexuales secundarios y del desarrollo del oviducto, así como del almacenamiento de calcio en el esqueleto [Menher, 1969; Buxadé, 1994]. Su secreción también es importante en el momento de la muda.

La progesterona proviene en su mayor parte, de la granulosa del folículo preovulatorio y, en menor medida, del folículo postovulatorio. En algunos casos la función de la progesterona es antagonista a la de los estrógenos y andrógenos como en el caso del crecimiento del oviducto. En otros casos coopera con los estrógenos en la síntesis de ciertas proteínas del albumen. Interviene en los ritmos de ovulación y oviposición (contracciones pre-oviposición). En el caso de huevos de dos yemas los niveles de progesterona son muy superiores.

## **Oogénesis**

En estado embrionario y al final de la primera semana de desarrollo ya se inicia el proceso de la oogénesis; correspondiente al momento de la transformación de las células germinales primordiales en oogonias. Estas oogonias sufren repetidas divisiones mitóticas, dando lugar a los denominados oocitos primarios, que son células diploides (que contienen  $2n$  cromosomas) en situación de profase meiótica. En el momento de la eclosión el núcleo del mencionado oocito se encuentra precisamente en fase de paquitena (subdivisión de la profase I) para evolucionar posterior y lentamente hacia la fase de diploneta (subdivisión de la profase I) en la que permanece meses o incluso años (Figura 20). Únicamente unas 24 horas antes de tener lugar la ovulación en el folículo preovulatorio o listo para ovular, tiene lugar un proceso de división reduccional, por lo cual nos queda un oocito haploide ( $n$  cromosomas), denominado oocito secundario, y la expulsión del primer corpúsculo o glóbulo polar. La expulsión del segundo corpúsculo polar se realiza tras la ovulación y fecundación en el infundíbulo.

En el caso de las aves cabe recordar que la hembra es heterogamética, es en este proceso cuando queda determinado el sexo del futuro embrión y no, como en el caso de los mamíferos, por el gameto masculino.

En la zona cortical del ovario izquierdo y antes del comienzo de la puesta pueden encontrarse una gran cantidad de folículos (2,000 a 12,000), incluidos en un estroma conjuntivo muy vascularizado. De todos estos folículos solo una pequeña cantidad llegaran a la madurez. Para que se esto ocurra deberá llegar a feliz termino un proceso de crecimiento folicular basado en le deposición del vitelo o yema del huevo.



Localización anatómica	Fases	Edad	Duración	Diámetro del óvulo	Peso del óvulo	Sustancias depositadas	Gametogénesis
↑ OVARIO	Fase crecimiento lento	1 d		10-20 $\mu$	?	gotitas lipídicas	Oocito I (2n)
		6 sem.		50-100 $\mu$	?		
		18 sem.		1 mm	?		
----- SELECCION INDIVIDUAL DE LOS OVULOS -----							
	Fase intermedia		50 d	4 mm	0,06 g	Proteínas	Inicio de la migración
	Fase de gran crecimiento		8-10 d	35 mm	18 g	Lípidos Lipo-proteínas proteínas Ca, Mg, Fe	Rotación ↓ División reduccional ↓ Oocito II (n)
↓ OVIDUCTO				Ovulación			Fecundación ↓ División de maduración ↓ Inicio de divisiones embrionarias ↓ Oviposición

**Figura 20.** Resumen de las fases de crecimiento y maduración de la yema del huevo (únicamente la primera fase es común en todos los folículos).

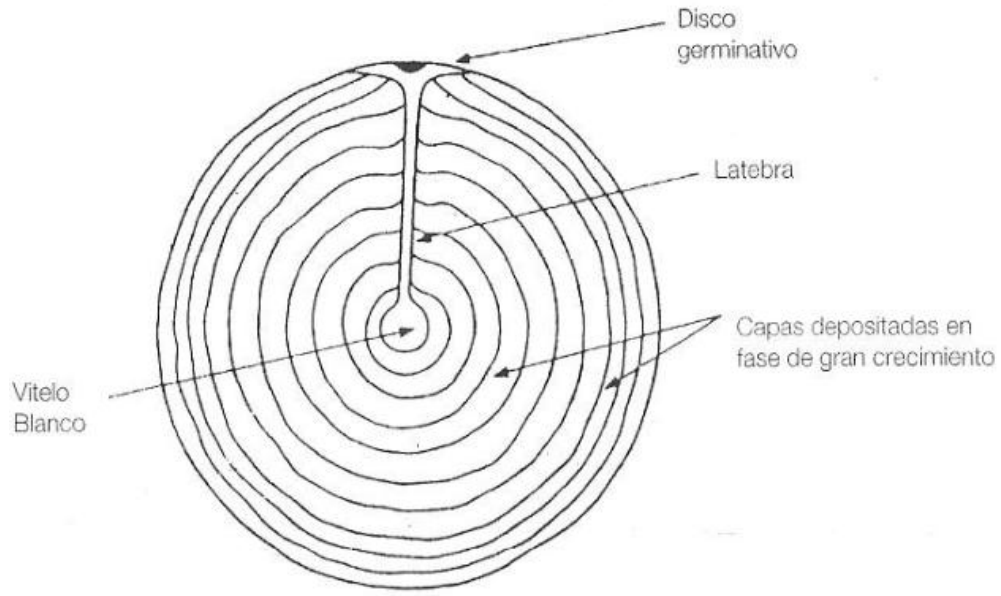
# FORMACIÓN DE LA YEMA DEL HUEVO (VITELOGÉNESIS)

## **Cronología y regulación de la deposición del vitelo**

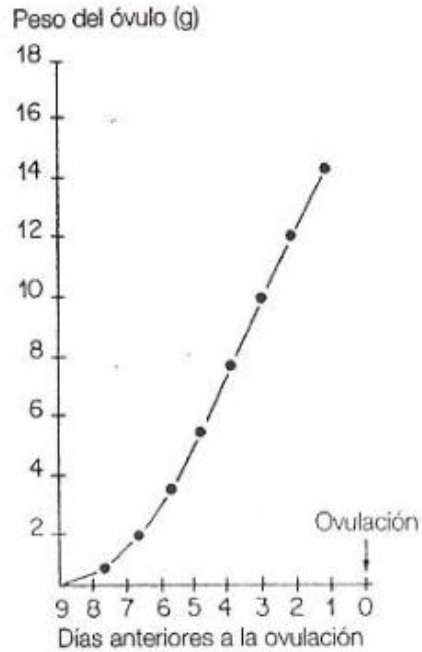
La vitelogénesis o deposición del vitelo o yema del huevo en el interior del folículo ovárico, es un proceso muy largo que se inicia en la pollita cuando es muy joven y concluye justo antes de la ovulación. Para ello, el ave recurre, exclusivamente, a elementos constituyentes aportados por vía sanguínea.

Este proceso puede dividirse en tres fases principales que están resumidas en la figura 20:

- Fase inicial de crecimiento lento. Cuando tiene lugar la eclosión de un polluelo hembra, cada uno de los óvulos que están contenidos en su ovario tiene un tamaño comprendido entre 1 y 2 centésimas de milímetro. Este diámetro se multiplica por cuatro a las seis semanas y alcanza 1 mm a los 4-5 meses de edad, una vez que se han depositado en dichos óvulos algunas gotitas de lípidos. En este momento cesa el crecimiento común de todos los óvulos; algunos de ellos permanecerán con la dimensión descrita durante meses e incluso años.
- Fase intermedia. Después de que un folículo determinado haya sido "elegido" de entre un amplio conjunto de folículos indiferenciados, su tamaño pasa, en unos 60 días, de 1 a 4 mm. Este incremento es posible por la deposición de, fundamentalmente, proteínas, aunque también de algunos lípidos [Johnson, 2000]: el conjunto constituye lo que se denomina vitelo blanco (Figura 21).
- Fase de gran crecimiento. Durante los 8 o 10 días que preceden a la ovulación, el crecimiento del óvulo es muy rápido y su peso pasa de unos 200 mg a 15-18 g., (Figura 22). La yema formada presenta alternancias más o menos claras de color cuya coloración varía en función del tipo y concentración de carotenoides del alimento consumido por la gallina (Figura 23). Simultáneamente tiene lugar la migración del oocito hacia la superficie folicular (Figura 21). La duración de esta fase de gran crecimiento puede estar comprendida, en casos extremos, entre 6 y 14 días para la gallina.



**Figura 21.** Representación esquemática de un corte transversal de la yema después de la ovulación. Cada capa corresponde al depósito formado en un día durante la fase de gran desarrollo.

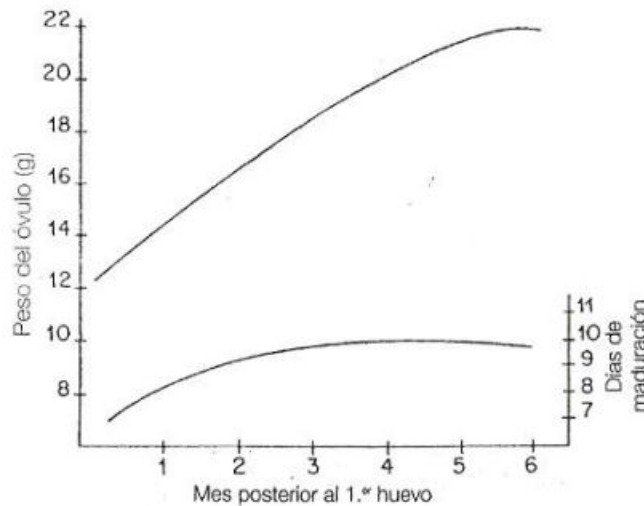


**Figura 22.** Desarrollo ponderal del óvulo durante la fase de gran desarrollo.



**Figura 23.** Incorporación de carotenoides en la yema.

La velocidad con la que tiene lugar el crecimiento rápido de la yema cambia también en función de la edad del animal. Así, en un huevo puesto al inicio del periodo de puesta, la yema no suele pesar más de 12 gramos mientras que, al final de la misma, puede llegar a los 23 gramos., (Figura 24).



**Figura 24.** Evolución del peso de la yema y de la duración de la fase de gran crecimiento en función de la edad de la gallina.

La yema prácticamente alcanza su peso máximo en el quinto mes de puesta, pero desde el segundo mes, el tiempo de maduración queda establecido alrededor de los 9 o 10 días. Consecuentemente, la gallina adquiere, a medida que envejece, una mayor capacidad para acumular yema en un folículo dado, aunque, paralelamente, disminuye el número de folículos que, en un momento concreto, están en evolución [Sauveur y De Reviers, 1991].

## Origen de los constituyentes de la yema

Recordando, la yema se trata de una emulsión de aceite en agua, formada por proteínas y lípidos con gran cantidad de lipoproteínas (además de minerales y pigmentos). Ninguna de estas sustancias es sintetizada por el ovario; todas ellas son aportadas por vía sanguínea y proceden, en su mayoría, del hígado, cuya actividad lipogénica se multiplica por 10 cuando el ave alcanza su madurez sexual [Johnson, 2000].

Como se revisó en el capítulo 1, las proteínas de las yemas pueden clasificarse en dos categorías:

- Proteínas del plasma (las livetinas), que entre un 50 y 60% de estas proteínas proceden del hígado, el porcentaje restante proviene de la dieta [Sauveur y De Reviers, 1991; Barroeta, 2002].
- Proteínas de los gránulos (las fosvitinas y lipoproteínas), son sintetizadas en un 100% por el hígado [Sauveur y De Reviers, 1991].

En conjunto, durante el periodo de puesta el hígado de una gallina puede sintetizar diariamente del orden de 2.5 gramos de proteínas destinadas a la yema en formación. Esto, supone aproximadamente, el triple que la síntesis de base existente antes de iniciarse la puesta [North y Bell, 1993].

Las mencionadas síntesis hepáticas de las proteínas y de los lípidos de la yema están estrictamente controladas por los estrógenos, y de hecho, pueden ser inducidas en animales jóvenes (incluso en machos) a través de inyecciones de estrógenos: en este caso, las proteínas específicas de la yema aparecen en el plasma unas 20 horas después de la inyección.

Los estrógenos actúan sobre el hígado a tres niveles [Sauveur y De Reviers, 1991]:

- Induciendo la síntesis de ácidos nucleicos específicos de las proteínas de la yema.
- Incrementando la síntesis de proteínas no específicas (livetinas).
- A más largo plazo, aumentando la masa hepática.

En el caso de la pollita, la síntesis hepática de lipoproteínas específicas de la yema se inicia a partir de la decimoctava semana. No obstante, disminuye rápidamente si la gallina deja de poner.

Durante el día, el nivel de la mencionada síntesis se puede considerar notablemente constante y se corresponde con el depósito constante de la yema en el ovario. Para facilitar su transporte por vía sanguínea, estas lipoproteínas forman con el calcio un complejo soluble capaz de penetrar en el óvulo (por pinocitosis). Este complejo, después de algunas reorganizaciones moleculares, se vuelve insoluble. Probablemente algunos minerales presentes en la yema, como el hierro y el zinc, también sean transferidos con el complejo indicado, mientras que el sodio y el potasio llegan a su destino en forma libre.

La xantofila, pigmento carotenoide derivado del alimento consumido por el ave, es transferido al torrente sanguíneo y de ahí pasa a la yema. En consecuencia, la mayor cantidad se deposita en la yema durante el tiempo de consumo de alimento y no en el periodo de oscuridad, en el que no consume alimento [Barroeta, 2002]. Esto da la presencia de capas claras y oscuras en la yema, dependiendo de la disponibilidad del pigmento en la dieta. Se producen de 7 a 11 capas en la yema (Figura 23). La formación de la yema es bastante uniforme, el grosor total de estas capas claras y oscuras es alrededor de 1.5 a 2 mm, en un periodo de 24 horas.

### **Situación del oocito en la yema**

Durante la fase de crecimiento folicular lento, el oocito permanece situado en la parte central del óvulo. En el transcurso de la fase intermedia, avanza hacia la superficie dejando una especie de rastro o huella denominado latebra (Figura 14 y 21). Posteriormente, durante la fase de depósito rápido de la yema, el oocito permanece en la superficie. Al final de esta fase, la yema del huevo experimenta una rotación en el interior del folículo gracias a una ligera separación que se origina entre la membrana vitelina y la pared folicular. La yema se orienta en función de su peso y el polo más ligero (que contiene al disco germinativo) se desplaza hacia la parte superior. Esta orientación condiciona los ejes ulteriores de la división embrionaria.

# FORMACIÓN DEL HUEVO EN EL OVIDUCTO

## Ovulación

La ovulación se produce cuando el folículo alcanza la madurez y se libera la yema que será captada por el oviducto. Esta ruptura se produce a nivel del estigma, que es la parte de la pared folicular exenta de capilares sanguíneos (Figura 14).

Pero la gallina no ovula de forma continuada cada día. La liberación de la yema esta controlada por hormonas producidas en la pituitaria y en los propios folículos, ambos bajo control del programa de luz. Para que la ovulación se produzca han de confluir dos fenómenos. Uno, que el folículo más grande (F1) madure y sea capaz de producir progesterona [Johnson, 2000]. En segundo lugar, que se produzca la liberación de hormona luteinizante (LH) desde el cerebro, fenómeno que solo ocurre en un margen de 6 a 8 horas al día "período abierto" y siempre después de iniciarse el periodo de oscuridad.

Entre ambas, progesterona y LH, existe un mecanismo de retroalimentación positiva "feed back" que continúa hasta la fase preovulatoria produciéndose la ruptura del folículo (Figura 25). La liberación de la yema desde el ovario se produce de 8 a 10 horas después del pico de LH y la puesta del huevo totalmente formado se realiza unas 24 horas después [Barroeta, 2002]. La siguiente ovulación se produce unos 30 minutos más tarde, es decir que las oviposiciones se realizan de día (periodo de luz) y se van retrasando en el tiempo (Figura 26).

Por lo tanto, la gallina pone huevos durante varios días consecutivos, es decir una serie (20-40 huevos), y después estará 1 o 2 días sin poner. El número de huevos de la serie marca la tasa de producción que lógicamente va disminuyendo con la edad. Es interesante señalar que el tamaño de la yema va disminuyendo a lo largo de la serie y en forma inversa al grosor de la futura cáscara, presentando los huevos primeros de la serie una menor viabilidad embrionaria [Sauveur y De Reviers, 1991; Barroeta, 2002].

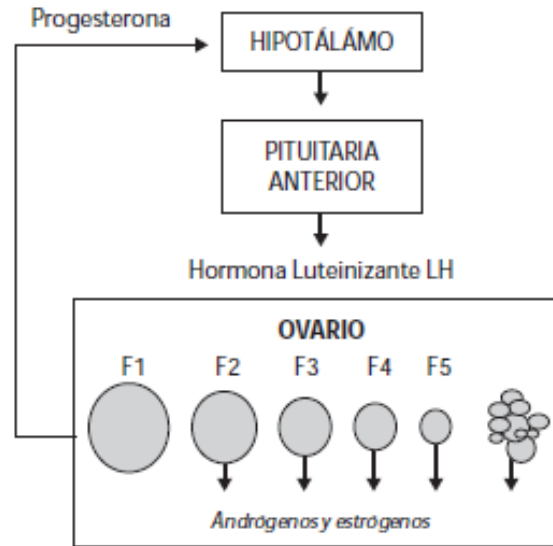


Figura 25. Representación de interacciones hormonales durante la ovulación.

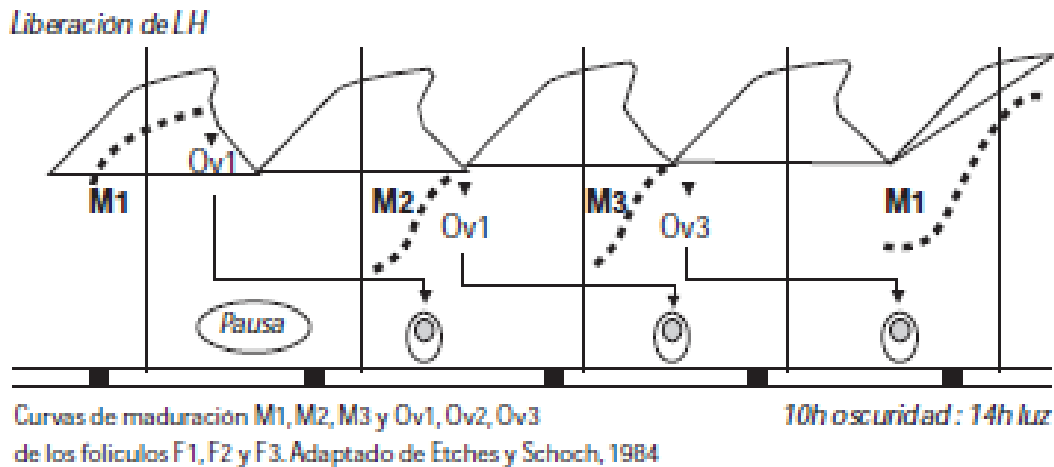


Figura 26. Modelo matemático de un ciclo ovulatorio con una serie de tres huevos.

### Formación de las envolturas del huevo en el oviducto

Para la elaboración de un huevo coinciden una serie de mecanismos humorales y endocrinos que actúan sincronizadamente. El mecanismo nervioso a través de la luz actúa como importante factor desencadenante, el cual pone en marcha una serie de resortes hormonales de singular importancia [Castello, 1989]. Los ojos de las aves, al ser receptores de la intensidad y duración lumínica, transmiten vía nerviosa por los núcleos ópticos una excitación que afecta al hipotálamo, zona en la que se liberan hormonas que, estimulando el lóbulo anterior de la hipófisis, son responsables del mantenimiento de la actividad gonadal (Figura 27).

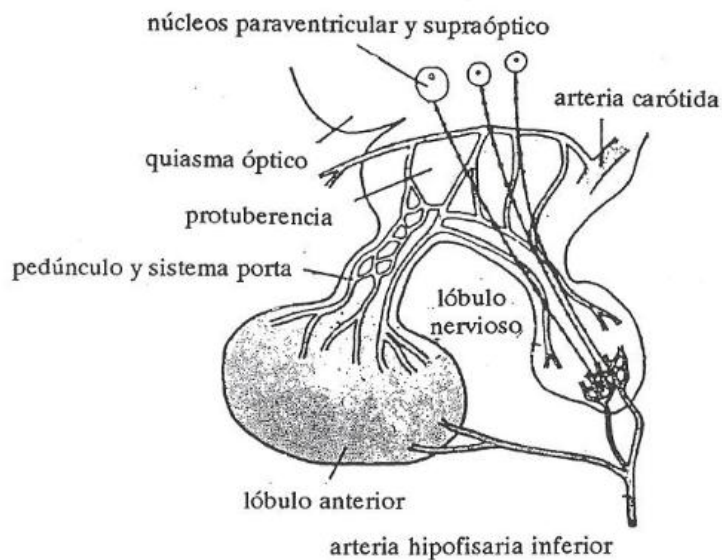


La zootecnia moderna, basándose en estos hechos y en el comportamiento neuro-endocrino de las aves domesticas, ha logrado producciones continuas cuando las aves primitivas sólo podían producir unas pocas docenas de huevos anuales, al alargarse los días en primavera.

El proceso de la formación del huevo se inicia con la maduración de un óvulo, que alcanza el tamaño y peso de una yema normal. Cuando una yema esta lo suficientemente madura, es separada del ovario mediante un influjo hormonal (ovulación), siendo captada por el infundíbulo.

La captación de la yema por parte del infundíbulo constituye la primera etapa de la actividad del oviducto. La yema entra 24-26 horas antes de la salida del huevo a nivel de la cloaca (ovoposición).

En la tabla 13 podemos ver las longitudes y pesos de los distintos segmentos del oviducto así como el tiempo que permanece el huevo en formación en cada segmento y las secreciones que tienen lugar en los mismos. Lo anterior se esquematiza con la ayuda de las figuras 28 y 29.



**Figura 27.** Esquema del sistema hipotálamo hipofisario en las aves y sus relaciones vasculares.

**Tabla 13.** Longitudes, pesos y función de los distintos segmentos del oviducto. Tiempo de permanencia del huevo en la formación y su contribución a la formación del huevo. Fuente: Castello, 1989; Sauveur y De Reviere, 1991; Buxadé, 1994.

Segmento	Longitud (cm)	Peso (g)	Tiempo	Función	Contribución a la formación del huevo	
					Parte	Cantidad total (%)
Infundíbulo	9	1	20 min.	Fertilización, chalazas, membrana vitelina	Yema	33
Magnum	32	17.6	3h. 30 min.	albumen, agua e iones	Albumen	56
Istmo	10	4.4	1h. 15 min.	Membranas testáceas	Membrana	0.3
Útero	11	13.5	21 h.	Hidratación, albumen, cáscara	Cáscara	10.6
Vagina	10	5	1h. 60 min.	Ovoposición	Mucus	0.1

Tras la eclosión del folículo, llega el óvulo al pabellón o infundíbulo, esta parte recoge al óvulo merced a sus propios movimientos que realiza. Desde este momento hasta la oviposición, el huevo en formación discurre a lo largo del oviducto de acuerdo con una cronología ya reflejada en las figuras 28 y 29 y tabla 13. En este proceso de tránsito suceden las siguientes etapas:


- Conclusión de la membrana vitelina en el infundíbulo.
- Secreción de las proteínas del albumen o clara en el magnum.
- Secreción de las membranas de la cáscara en el istmo.
- Hidratación del albumen y secreción de la cáscara en el útero.
- Oviposición.

### **Función secretora del infundíbulo**

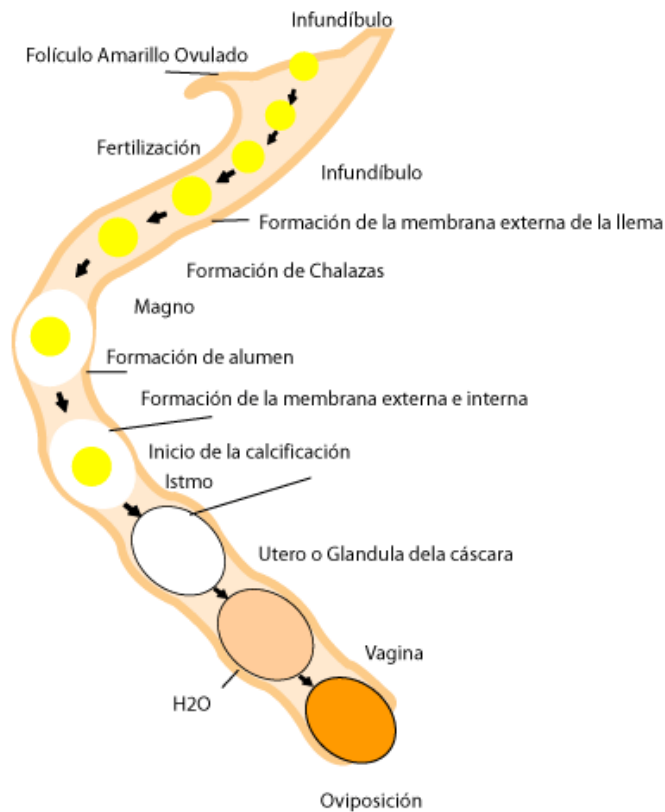
La actividad secretora del infundíbulo se limita a asegurar el depósito de la capa externa de la membrana vitelina [Burley y Vadehra, 1989]. Esta capa esta constituida por pequeñas fibras de composición muy parecida a la del albumen denso y representa casi los dos tercios (5 a 8  $\mu\text{m}$ ) del espesor total de la membrana (8 a 11  $\mu\text{m}$ ). Dicha capa juega un papel muy importante en la protección de la yema contra las transferencias de agua procedentes de la clara durante la formación del huevo.

Parte Anatómica (cm)		Funciones	Tiempo
Ovario	7 Folículos		
		Depósito de yema	10 días
	9 Infundíbulo	Fecundación M. Vitelinas	20m
Oviducto	33 Magno	Deposito Albumen	3h30m
	10 Istmo	Membranas testáceas	1h15m
	10 Útero	Hidratación Albumen Formación cáscara	21h
	10 Vagina Cloaca	Ovoposición	1h30m

De 24 a 26 horas



**Figura 28.** Esquema de la formación del huevo en la gallina.



**Figura 29.** Esquema de la formación de las distintas envolturas del huevo en el oviducto.

## **Secreción de la clara en el magnum**

La composición detallada de la clara de huevo se estudio en el capítulo anterior. En esencia se trata de una solución acuosa de proteínas y de otros componentes como carbohidratos y minerales (Tabla 3). La clara de un huevo contiene cerca del 11% de proteínas. Todas ellas sintetizadas y segregadas por el magnum [Okubo *et ál.*, 1997].

### **Síntesis de las proteínas de la clara en las células del magnum**

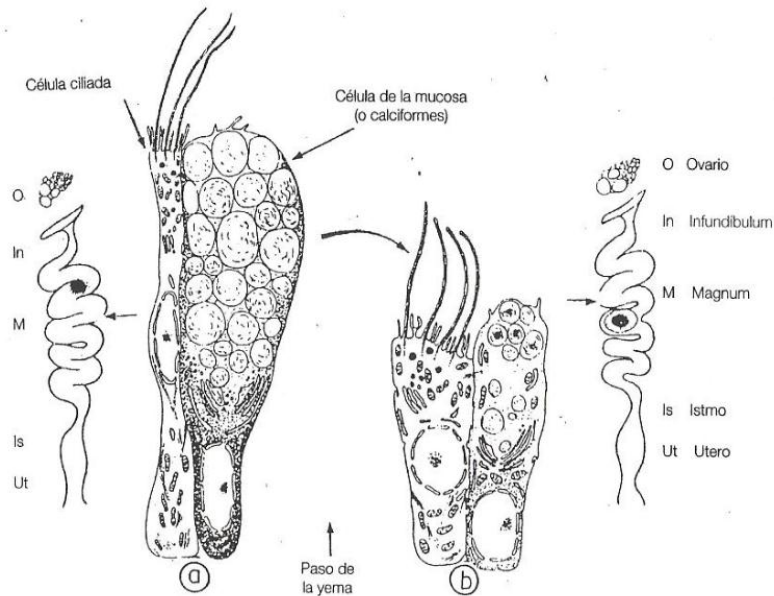
Al contrario de lo que sucede con las proteínas de la yema, cuya síntesis, como ya se ha comentado, no se efectúa en el ovario sino en el hígado, las proteínas de la clara se sintetizan, a nivel "local", por la pared del magnum.

Esta síntesis tiene lugar de manera casi continua entre el paso de dos yemas consecutivas y es especialmente elevada inmediatamente después de uno de estos pasos como lo demuestra el elevado consumo de oxígeno por parte del magnum, consecuencia de su actividad metabólica. De esta forma, la cantidad de proteínas almacenadas en las células del magnum (Figura 30) no es nunca muy superior a la depositada sobre una yema [Sauveur y De Reviers, 1991].

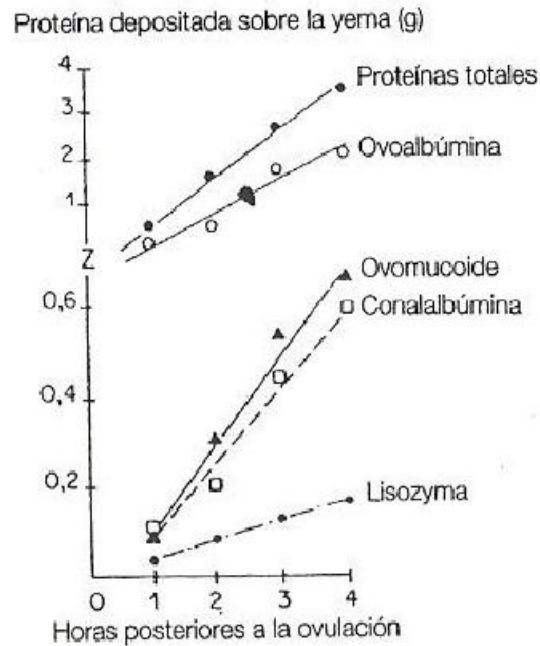
Cuando se produce una carencia alimenticia en aminoácidos indispensables para la síntesis de las proteínas de la clara, se pone en evidencia a partir del segundo huevo puesto tras el inicio de dicha carencia [Sauveur y De Reviers, 1991; Barroeta, 2002].

Existe una cierta especificidad de los tipos de células en lo que a la síntesis de las diferentes proteínas de la clara se refiere, pero los datos de que se disponen en la actualidad son bastante escasos. Sí sabemos que son las células caliciformes del epitelio las que segregan la avidina y la ovomucina; por su parte, la ovoalbúmina y la lisozima son segregadas por las células de las glándulas tubulares. Esta realidad es la que explica enfermedades como la bronquitis infecciosa puedan inducir la aparición de claras fluidas; en efecto, el virus afecta fundamentalmente a las células caliciformes provocando que la síntesis de ovomucina, responsable de la estructura del albumen, se detenga [Sauveur y De Reviers, 1991; Barroeta, 2002].

La síntesis de las proteínas del albumen está regida por las hormonas esteroides del ovario (Figura 19). Esta regulación es sin duda alguna, extremadamente compleja, puesto que la síntesis de cada proteína parece controlada por un equilibrio diferente entre estrógenos, progesterona e incluso testosterona [Buxadé, 1994]. Así la síntesis de avidina (la más estudiada) exige un tratamiento previo con estrógenos seguido de una breve descarga de progesterona.



**Figura 30.** Modificaciones de las células epiteliales del magnum debido a la secreción de la clara. Figura a. Antes del paso de la yema: el epitelio mide de 20 a 30 µm de altura; las células ciliadas son comprimidas por las células con mucosidad "a mucus" las cuales están llenas de gránulos de secreción. Figura b. Después del paso de la yema: el epitelio no mide más de 13-18 µm de altura, dado que las células de la mucosa han vertido ya su contenido.



**Figura 31.** Depósito de cuatro proteínas del albumen en la yema en función del tiempo que el huevo permanece en el magnum.

Como queda expuesto en la figura 31, el nivel de al menos cuatro de las proteínas que contiene la clara es función lineal del tiempo postovulación. Es posible que, en el caso de otras proteínas no estudiadas aquí, las cosas sean diferentes.

### **Depósito de proteínas de la clara sobre la yema**

La yema penetra en el magnum unos 15 o 20 minutos después de la ovulación y lo abandona al cabo de unas 3 horas y media. Según va avanzando recibe las proteínas acumuladas en las células epiteliales en forma de gránulos de secreción, cuya expulsión a la luz del magnum esta garantizada por las invaginaciones de las membranas celulares que, al fusionarse con las de los gránulos permiten su liberación. Dicha secreción se pone de manifiesto a través de una disminución importante del volumen celular (Figura 30).

En las glándulas subepiteliales pluricelulares se pone en marcha un proceso de síntesis similar al descrito, varias horas antes de que tenga lugar el paso de la yema. Ello explica el hecho de que el canal de estas glándulas se halle repleto con las proteínas segregadas (ovoalbúmina, sobretodo), cuando la yema llega a su nivel [Sauveur y De Reviers, 1991; Buxadé, 1994].

La distensión tisular debida al paso de la yema provoca la llegada masiva de todas las proteínas a la luz principal del oviducto, como se desprende del depósito que puede provocarse sobre una yema artificial introducida en el infundíbulo sin que haya ovulación. El cuerpo extraño introducido es recubierto con normalidad por el albumen y por la correspondiente cáscara, lo anterior pone en manifiesto que la deposición de proteínas del albumen parece hacerse como respuesta al estímulo físico provocado por el peso de la yema y la formación de la cáscara en el útero tendría el mismo estímulo. Sin embargo este tipo de "estímulo mecánico" no es estrictamente indispensable para poder observar dicho fenómeno; no es extraño, sobre todo al final del periodo de puesta, que encontremos huevos sin yema [Sauveur y De Reviers, 1991; Barroeta, 2002].

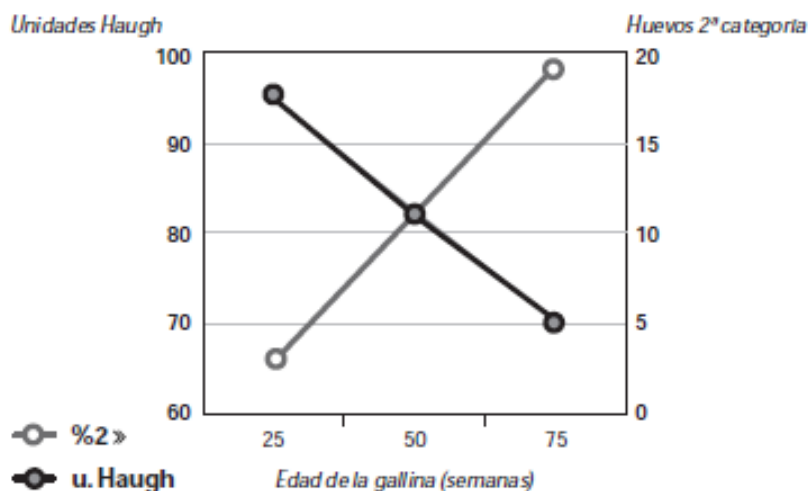
### **Secreción de agua y de minerales en el magnum**

Cuando el huevo en formación abandona el magnum, el albumen tiene una forma de masa espesa gelificada que contiene alrededor de 15 gramos de agua, es decir, la mitad del que será el contenido final de agua del huevo terminado. Asimismo, la clara posee ya el 80% de su contenido final en sodio; del 60 al 70% de calcio y magnesio, y el 50% de cloro [Arad, 1989]. Únicamente el potasio es aportado en poca cantidad por el magnum. No obstante, hay que señalar que del 20 al 30% del calcio y del magnesio segregados no están presentes en estado libre sino combinados con las proteínas del albumen.

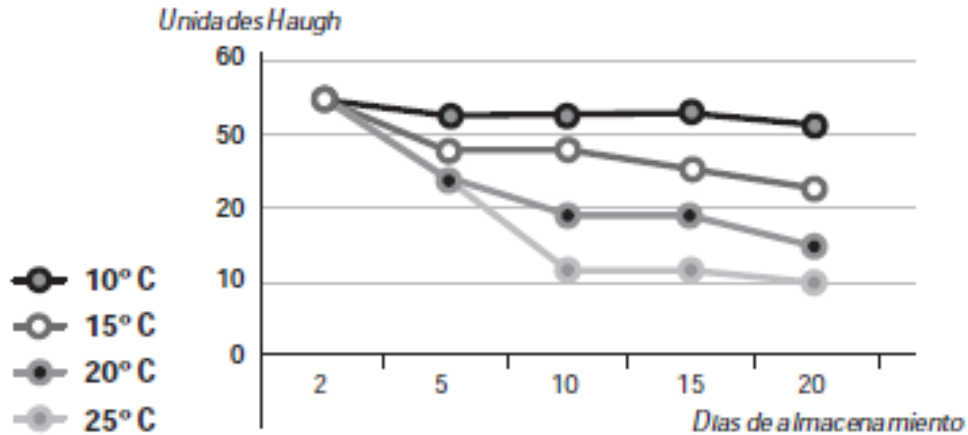
El proceso de hidratación y estructuración del albumen acaba en el útero, fase conocida como "plumping" (este proceso se detalla más adelante). Finalmente se constituyen las cuatro capas de albumen que se han detallado anteriormente (Figura 7). Se produce una rotación del huevo en el útero dando lugar a la torsión de las fibras proteicas del albumen denso, formándose las chalazas. Por lo tanto el útero complementariamente al magno, es responsable de las propiedades fisicoquímicas de la clara y de la situación de la yema, es decir su función es determinante en la calidad interna del huevo [Barroeta, 2002].

Esta estructura se desintegra tras la puesta del huevo, transformándose el albumen denso en fluido. Al mismo tiempo y conforme el huevo pierde frescura, se pierde dióxido de carbono incrementándose el pH (a partir de 7.6), el agua emigra hacia la yema y la cáscara. Finalmente el proceso se agrava con la descentralización e incluso ruptura de la yema, empeorando los problemas organolépticos y de contaminación microbiana [Barroeta, 2002].

Por lo tanto la calidad del albumen se relaciona con la fluidificación del mismo y se puede valorar a través de la altura de su capa densa externa. Las Unidades Haugh (U.H.) son una medida que correlaciona esta altura en mm con el peso del huevo. Los valores de las U. H. pueden variar de 0 a 100 y en general valores superiores a 70 se consideran aceptables en términos de calidad. Las U.H. disminuyen con la edad del lote de gallinas y el tiempo de almacenamiento del huevo (Figura 32). La disminución es mayor si los huevos se mantienen en condiciones de temperatura y humedad relativa incorrectas. (Figura 33).



**Figura 32.** Relación entre la edad de la gallina y las U. Haugh y % de huevos de 2ª categoría.



**Figura 33.** Efecto del tiempo y de la temperatura de almacenamiento del huevo sobre las Unidades Haugh.

### **Actividad del istmo: Secreción de las membranas testáceas e iniciación de la cáscara**

En este tramo del oviducto el huevo permanece entre 60 y 75 minutos y durante este periodo, y a medida que va avanzando, se va recubriendo a ritmo constante de fibras proteicas cuyo entrelazado da lugar a las denominadas membranas testáceas (Figura 7 y 29).

El material secretado por istmo proviene, fundamentalmente, de las glándulas tubulares; estas sustancias, en contacto con el agua, se dilatan y van formando una red fibrosa muy densa.

Parece poco probable que exista un control endocrino de la secreción de las membranas testáceas: posiblemente, sea la propia distensión de las paredes del istmo, provocada por el avance del huevo en formación, la que sirva de estímulo para desencadenar la mencionada secreción [Sauveur y De Reviers, 1991].

En la parte final del istmo (denominado istmo rojo) es donde tiene lugar la secreción de las fibras proteicas que van a constituir la base o zona inferior (capa mamilar) de la matriz orgánica de la cáscara [Fernández, 2003] (Figura 8). Estas fibras quedan entrelazadas con las de la membrana testácea externa, asegurando así la solidez de unión de la cáscara. También envuelven el núcleo mamilar proteico, alrededor del cual empieza, en la zona del istmo rojo, la cristalización del carbonato cálcico [North y Bell, 1993].



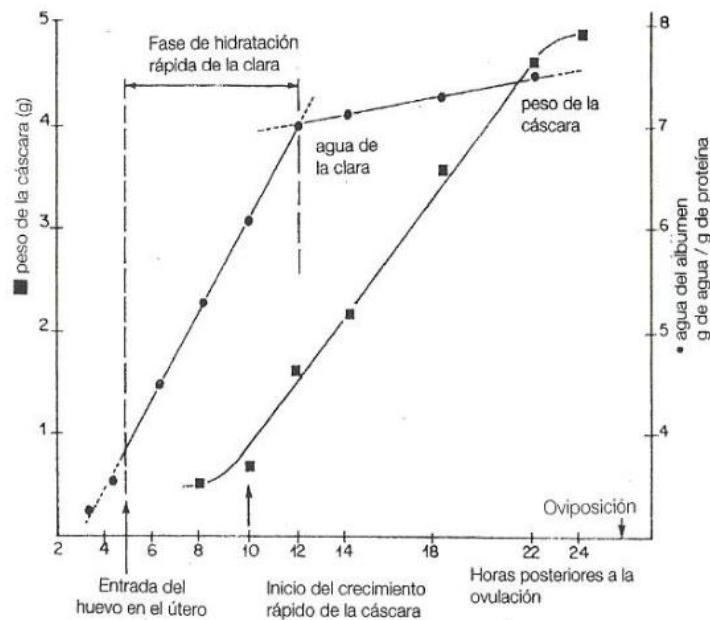
## Actividad del útero: Formación de la cáscara del huevo

Al útero llega el huevo en formación aproximadamente unas 5 horas después de la ovulación [Okubo *et ál.*, 1997]. En consecuencia, ha recorrido con una notable rapidez los primeros 50 cm del oviducto. No obstante en el útero permanecerá unas 20 horas (Figura 28) antes de ser expulsado. Por lo tanto, es evidente que la formación de la cáscara es un proceso mucho mas lento que el de la formación de la clara (aunque más rápido que el de la formación de la yema, que dura varios días).

Cuando el huevo sale del istmo, recubierto por sus dos membranas testáceas tiene un aspecto arrugado, debido a la escasa hidratación de las proteínas del albumen, como se mencionó anteriormente, la primera actividad que tiene lugar en el útero es la de completar esta hidratación [Sauveur y De Reviere, 1991; Barroeta, 2002].

### Hidratación de la clara en el útero

Durante las 6 o 7 horas de estancia del huevo en el útero, el contenido de agua en la clara se duplica, pasando de 3.5 a 7 gramos/gramo de proteína (Figura 34).



**Figura 34.** Evolución del contenido en agua de la clara y del peso de la cáscara durante la permanencia del huevo en el útero.

A este periodo se le suele conocer como “plumping” porque concluye con una hinchazón del huevo y con un tensado de las membranas de la cáscara. Esta adición de agua viene acompañada por una secreción mineral compuesta básicamente por sodio, potasio y bicarbonato. A las 12 horas de haber tenido

lugar la ovulación, es decir, cuando el futuro huevo ya lleva unas 7 horas en el útero, se ralentiza enormemente el "plumping". Solo el potasio sigue acumulándose en la clara, mientras que el sodio es parcialmente reabsorbido [Sauveur y De Reviers, 1991].

Si por cualquier accidente la gallina expulsara en esta fase el huevo al exterior, éste aparecería totalmente formado pero desprotegido, es decir, sin cáscara. Es el denominado huevo en fáfara que en ocasiones aparece al inicio del periodo de puesta o cuando tiene lugar el "síndrome de caída de puesta con huevos en fáfara" [Sauveur y De Reviers, 1991; Barroeta, 2002].

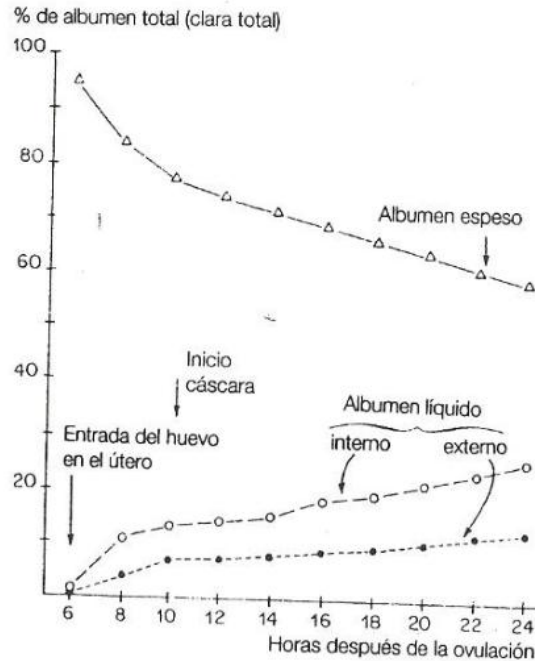
Una oviposición prematura, debida a contracciones demasiado precoces, se ve acompañada, generalmente, por una inhibición total de la capacidad de calcificación. A título experimental se puede reproducir este mismo fenómeno colocado en la pared del útero un simple lazo de hilo quirúrgico. En este caso, cuando termina la fase de "plumping" el huevo es expulsado sistemáticamente sin que se efectuó ningún depósito de cáscara [Sauveur y De Reviers, 1991].

Es durante el proceso de hidratación de la clara en el útero cuando aparecen las distintas capas visibles del huevo terminado: el albumen denso, el albumen fluido interno y externo y las chalazas (Figura 7 y 29). A la salida del istmo estas capas apenas si son visibles; en realidad, en este punto sólo existe el albumen denso. La aparición de todas las capas descritas es consecuencia de la lenta rotación que sufre el huevo en el interior del útero; esta rotación da lugar a una torsión de las fibras proteicas del albumen espeso lo que libera las zonas de albumen fluido.

Consecuentemente, se disminuye el volumen del albumen denso mientras aumenta el del albumen fluido (Figura 35). De esta forma, el útero contribuye, junto con el magnum, a determinar las características fisicoquímicas de la clara de huevo, características que dependen mucho de la proporción de albumen denso y que son importantes a la hora de considerar la calidad interna del huevo (como se estudiara en el capítulo 6).

### **Formación de la cáscara del huevo**

Transcurridas unas 10 horas desde la ovulación, y mientras continua la hidratación de la clara, se inicia el desarrollo de los cristales de carbonato cálcico; este desarrollo se prolonga de forma lineal en el tiempo hasta las 22 horas del inicio de la formación del huevo (Figura 34). La velocidad de formación de la cáscara, durante estas 12 horas, es de unos 0.30 a 0.35 gramos/hora; ello supone una media de 130 mg de calcio y 190 mg de iones carbonato por hora [Sauveur y De Reviers, 1991; Buxadé, 1994].



**Figura 35.** Evolución de las proporciones de cada tipo de albúmen durante el tiempo de permanencia del huevo en formación en el útero.

En el útero se reconocen dos secciones diferenciadas y se presentan varios tipos de células secretoras.

La parte craneal del útero es de forma tubular (2cm; 5 horas de permanencia) y es responsable, además de la hidratación de la clara, comentada anteriormente, de la organización de las fibras de la membrana testácea externa dentro de los núcleos de la capa mamilar, repercutiendo sobre la fijación posterior de los cristales de carbonato cálcico y, por lo tanto, en la solidez de la futura cáscara [North y Bell, 1993].

La parte mayor del útero, es una bolsa glandular donde se realiza la calcificación propiamente dicha, adquiriendo el tejido una coloración rojiza durante el proceso de mineralización. El huevo se encuentra en una solución sobresaturada de carbonato cálcico que se va depositando, en forma de calcita, alrededor y sobre las fibras que constituyen la membrana testácea externa en núcleos o conos concretos. Esta capa cristalina basal y los cristales que irradian constituyen los cuerpos mamilares, que crecen y se fusionan formando la capa mamilar (Figura 8) [North y Bell, 1993; Barroeta, 2002]. Durante este proceso ya se van definiendo los poros que atravesarán la cáscara [Barroeta, 2002]. A partir de aquí, continúa una fase de calcificación rápida dando lugar a la capa empalizada y, posteriormente, se produce un cambio de orientación de los cristales formándose la capa de cristales verticales.

La pigmentación de la cáscara, cuando existe (la presencia de pigmentos en la cáscara tiene un control genético), se inicia de forma muy débil en la capa empalizada de los cristales (Figura 8). El proceso de la pigmentación es especialmente importante al final de la calcificación y la mayoría de los pigmentos (porfirinas) tienen una ubicación superficial en la cáscara. Estos pigmentos provienen, al menos en el caso de la gallina, de la hemoglobina transformada por las propias células uterinas [Sauveur y De Reviers, 1991; Buxadé, 1994; Barroeta, 2002].

La cutícula que recubre la cáscara es segregada a partir de las 22 horas del inicio de la formación del huevo. Como se reviso en el capítulo anterior, se le atribuye papeles importantes en cuanto a la resistencia a la rotura de las cáscaras, así como barrera contra posibles contaminaciones externas de los huevos. Cuando se hace un lavado mecánico de los huevos, la mayor parte de la cutícula se elimina.

Es importante mencionar, que la formación de la cáscara, que ocurre entre las 10 y 22 horas tras la ovulación, tiene lugar entre las ocho de la noche y las ocho de la mañana, como media; esto es en gran parte durante el periodo de oscuridad [Buxadé, 1994].

### **Mecanismos de formación de la cáscara**

Al igual que en el caso del magnum, la mucosa uterina se compone de un epitelio formado por células ciliadas y caliciformes bajo el que se ubican glándulas tubulares (Figura 17). También aquí, los diferentes tipos de células tienen una cierta especificidad de acción en la formación de la cáscara; así, el transporte de calcio es el principal cometido de las células epiteliales (ciliadas o no), si bien este transporte es posible que se realice también por vías paracelulares. En cuanto a la producción de iones bicarbonato está asegurado por la actuación de las células de las glándulas tubulares y, en menor grado, por las células caliciformes del epitelio.

El fluido uterino también contiene los precursores de las proteínas que constituyen la matriz orgánica de la cáscara. La parte orgánica representa un 2% del total de la cáscara y esta constituida por una mezcla de proteínas y glucoproteínas (70 %) con un 11 % de polisacáridos. Esta matriz se integra en el crecimiento de las columnas de calcita, dando elasticidad y consistencia a la cáscara.

El alimento es la principal fuente de calcio, necesario para la formación de la cáscara (2g). Diversos mecanismos fisiológicos permiten que la concentración de  $Ca^{2+}$  en sangre se mantenga relativamente constante y elevada, con la finalidad

de conseguir un depósito de cáscara regular [Sauveur y De Reviere, 1991; North y Bell, 1993; Buxadé, 1994; Barroeta, 2002]:

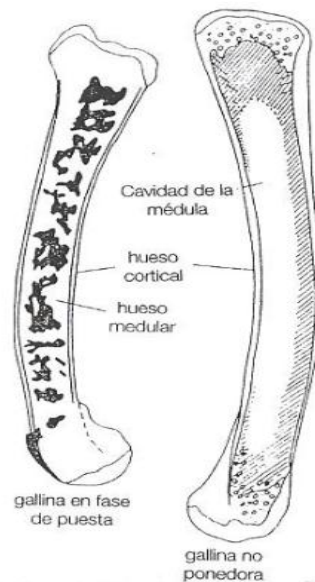
- Modificaciones fisiológicas. Durante el periodo de puesta, se incrementan las tasas de absorción, depósito y almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se produce una mayor transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la sangre a la superficie donde precipita el ion carbonato.
- Se produce una mayor apetencia específica por el calcio, es decir, un mayor consumo diario y horario. Así que la utilización de una fuente de calcio extra, a parte del pienso, y el momento de administración son fundamentales para mantener una buena calidad de cáscara. Si recordamos que la cáscara se deposita de forma continuada durante 20 horas y fundamentalmente de noche y que se produce un pico de consumo 2 horas antes del período de oscuridad, es lógico que se utilicen fuentes de calcio de absorción lenta sobre todo durante la tarde-noche.
- Además en el tejido óseo de la gallina madura existe una red trabecular que actúa de reserva de calcio para la formación del huevo, hueso medular (12% del esqueleto). El hueso medular se forma 10-14 días antes de iniciarse la puesta de huevos (Figura 36) [Mehner, 1969]. Ahora bien, se necesita un aporte dietético continuado de calcio para mantener este depósito. Además, la gallina prioriza su función reproductora y podría llegar a descalcificarse. De hecho la formación de 6 huevos supondría la pérdida de 40% del total del calcio del esqueleto.

Cualquiera que sea la fuente de calcio, es necesario que sufra una serie de transformaciones químicas que lo hagan asimilable [Mehner, 1969]. Si esto no ocurre, dicha fuente cálcica permanece en estado sólido y transita por el intestino sin ser absorbida. El ácido clorhídrico segregado por el proventrículo origina una disociación iónica que permite su absorción.

Durante este proceso que tiene lugar en el tubo digestivo y coincidiendo con la fase de máxima absorción de calcio y deposición del mismo en la cáscara, se aprecia un aumento de la acidez en duodeno, buche y molleja [Buxadé, 1994].

La regulación o adaptación del intestino para modificar el nivel de absorción de calcio en función de las necesidades está relacionada con la vitamina D. El metabolito activo de la vitamina D es el 1.25-dihidroxicolecalciferol y una función del mismo es aumentar la permeabilidad de la mucosa intestinal al calcio [Mehner, 1969; Buxadé, 1994].

Cuando las exigencias de calcio se ven incrementadas, como en el caso de la formación de la cáscara, el nivel de dicho metabolito se ve aumentado (regulado por estrógenos) y también se observa una mayor secreción ácida por parte del buche (láctico) y del proventrículo (clorhídrico), lo que facilitaría una mayor disposición de calcio absorbible.



**Figura 36.** Presencia del hueso medular en la gallina ponedora. En la gallina ponedora (izquierda) la cavidad medular del hueso está llena mientras que está vacía en la no ponedora.

## Oviposición

La expulsión del huevo ya formado mediante contracciones de las paredes del útero permite su paso a la vagina y unos minutos después su salida al exterior. La mayoría de las aves ponen el huevo con el polo fino hacia adelante, pero en el caso de la pata, el huevo sufre un giro de 180° justo antes de que tenga lugar la oviposición. Las dos situaciones descritas han sido observadas en el caso de la gallina [Sauveur y De Reviere, 1991; Buxadé, 1994].

Los factores que intervienen o determinan la oviposición no están muy claros. En un principio se consideraba que la hormona del lóbulo posterior de la hipófisis arginina-vasotocina y la hormona adiuretina, así como los estímulos nerviosos generados por el propio huevo en el último tramo del oviducto podrían provocar por vía refleja las contracciones de los músculos abdominales que facilitan la expulsión del huevo.

Trabajos citados por Gálvez y Fernández (1971) indican que tras la inyección de oxitocina tiene lugar la expulsión del huevo antes de la completa calcificación de la cáscara. Se sugiere por tanto que la hormona del lóbulo posterior de la hipófisis

es la encargada de originar las contracciones de los músculos del útero para la expulsión del huevo.

El grosor y consistencia de la cáscara o el tiempo de permanencia del huevo en el útero son factores que recogidos por vía refleja podrían desencadenar dicha descarga hormonal.

Si bien las teorías expuestas parecen dar respuesta a los mecanismos que desencadenan la expulsión del huevo ya formado, queda en cierta forma cuestionada en cuanto la extirpación del lóbulo posterior de la hipófisis no impide la expulsión del huevo. Se deduce que los mecanismos que intervienen en este fenómeno de la oviposición son muy complejos y no conocidos en su totalidad.

### **Alteraciones del huevo durante su formación**

No es extraño que se conozcan numerosas alteraciones del huevo después de entender el largo y complejo proceso de formación. Muchas de ellas se deben a alteraciones en la funcionalidad del oviducto bien sea por enfermedades, causas externas de estrés o problemas nutricionales.

A continuación, vamos a describir las alteraciones más frecuentes relacionadas con el proceso de formación de la yema.

- Reabsorción o ruptura del folículo y pérdida del contenido en la cavidad abdominal, provocándose el desarrollo de una peritonitis. Este fenómeno suele producirse por causa de un estado de subalimentación o durante la fase de muda.
- Huevos de doble yema. Se producen dos ovulaciones al mismo tiempo y siguen su proceso conjuntamente. Estas ovulaciones múltiples se producen en gallinas jóvenes y también en estados de sobrealimentación. Suelen acompañarse de problemas de cáscara, ovulaciones erráticas y prolapsos de oviducto.
- Manchas de Sangre. Ocasionalmente, al romperse la pared folicular puede arrastrarse una región vascularizada lo que provoca la aparición de sangre en la superficie de la yema.
- Coloraciones extrañas. El color de la yema depende de la concentración, actividad y tipo (relación rojos/amarillos) de carotenoides que contiene el pienso de las aves, pigmentos que deben aportarse de forma continuada durante los diez días de crecimiento rápido del vitelo. Existen sustancias liposolubles que pueden provocar problemas de pigmentación (gospol del

algodón, ciertos aditivos, componentes de plantas silvestres, etc). Por supuesto que los problemas patológicos pueden afectar en el proceso de pigmentación.

- Olores extraños. Este problema generalmente está relacionado con el almacenamiento, si bien la utilización de sustancias liposolubles que contengan algún compuesto que provoque olores extraños puede ser vehiculado hasta la yema. Este es el caso de la utilización en el pienso de harinas o aceites de pescado y/o colza y la presencia de lanolina entre otros.

En relación a las alteraciones más frecuentes del albumen:

- Clara fluida. Además de la pérdida de densidad del albumen que se produce de forma normal con la edad y el almacenamiento, algunas enfermedades víricas afectan a su proceso de formación. En concreto la bronquitis infecciosa altera las células caliciformes responsables de la síntesis de ovomucina y por lo tanto de la estructura de gel del albumen.
- Manchas de carne. La causa más frecuente es resto de tejido procedente del oviducto. Ocasionalmente se alude a una partenogénesis espontánea, es decir el desarrollo embrionario de un ovulo no fecundado. En algunos casos no son orgánicos sino restos de calcita.
- Huevo sin yema. La presencia de un cuerpo extraño en el magnum puede provocar el depósito del albumen y la continuación del proceso de formación sin la yema. Sobre todo se produce en pollitas jóvenes.

Finalmente, en relación a las alteraciones más frecuentes de la cáscara:

- Huevos en fáfara. No se ha producido correctamente la calcificación. Sobre todo se produce en pollitas jóvenes y la causan perturbaciones durante el proceso de mineralización.
- Huevos arrugados. Puede ser causa de una hidratación incompleta del albumen lo que impide la distensión total de las membranas testáceas. Su incidencia puede estar relacionada con la presencia de enfermedades víricas.
- Huevos diana (Target egg). Se encuentran dos huevos a nivel del útero. El lugar donde contactan las cáscaras se produce un anillo o zona plana.



- Huevos translucidos. Puede ser a causa de una fusión incorrecta de las columnas en empalizada de calcita o por una ruptura de las membranas testáceas. Se produce un trasvase de agua hasta el interior de la cáscara.
- Pandeo ecuatorial. Por un cambio en el tono muscular del oviducto que se refleja en un engrosamiento de la cáscara en el punto de contracción.
- Cáscara áspera o rugosa. Suelen presentarse en huevos marrones por un depósito extra de calcio.
- Huevos pálidos. Incorrecto depósito de porfirinas en la cáscara. La incidencia es mayor conforme aumenta la edad.
- Huevos sucios. Puede producirse manchas de sangre o heces por un defecto durante la ovoposición. También puede ser causa de una contaminación posterior, por ejemplo heces, marcas de la jaula, contaminación fúngica, restos de insectos, etc. Hay que recordar que la capa de mucina se deposita en último lugar y permanece húmeda tras la salida del huevo.
- Huevos rotos, fisurados. Suele ser por causa de un impacto externo. No olvidemos que el huevo realiza un transporte y manipulación antes de llegar al lugar de consumo. Otro ejemplo es la incisión de una uña de la gallina.

Capítulo 4

# **Microbiología del Huevo**

# CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL HUEVO

El huevo es una estructura destinada a permitir el desarrollo del embrión en un ambiente estéril bajo unas determinadas condiciones de incubación. Los poros de la cáscara, que juegan un papel vital en el intercambio gaseoso entre el embrión en desarrollo y el medio ambiente, actúan de modo negativo sobre la capacidad de conservación del huevo facilitando la pérdida de agua, CO<sub>2</sub> y permitiendo el acceso de microorganismos desde el exterior de la cáscara.

Antes de la oviposición se admite que el huevo es "prácticamente" estéril, aunque esto solamente es cierto para las bacterias responsables de la putrefacción. En el caso de otros microorganismos (*Salmonella Enteritidis*) la transmisión vertical juega un papel nada desdeñable en la contaminación de este alimento.

De manera general, la contaminación microbiana del huevo puede producirse por dos vías [Bruce y Drysdale, 1994; Martelli y Davies 2012]:

- Transmisión vertical, transovárica u oviductal: contaminación del albumen y/o membrana vitelina y/o la yema por microorganismos que se encuentran en el ovario de la gallina o durante su paso por el oviducto. Se produce en el proceso de formación [Humphrey, 1999; Messens, 2005]. Esta ruta de contaminación es consecuencia de bacterias que invaden e infectan el aparato reproductor del ave [Lister, 1988; Howard, 2003]. Y es la principal vía de contaminación por SE.
- Transmisión horizontal o transcascárida: contaminación posterior a la puesta, cuya causa suele ser ambiental. Esta vía supone la contaminación inicial de la superficie del huevo, seguida de la penetración subsiguiente del microorganismo en el albumen o, en algunos casos, directamente en la yema [Bichler *et ál.*, 1996; Gast y Holt, 2000; Gast *et ál.*, 2002], debido a contaminación fecal en la superficie de la cáscara [EFSA, 2005]. Es la forma más habitual de contaminación del huevo. Esta forma es la más habitual por contaminación microbiana de los componentes del huevo [Humphrey, 1994].

De todas ellas, la contaminación endógena (transmisión vertical) es la que juega un papel más relevante en la transmisión de SE, la incidencia de esta vía de infección del huevo ha sido evaluada de manera diferente por los distintos autores [Humphrey *et ál.*, 1989; Gast y Beard, 1990; Gast, 1994; Gantois *et ál.*, 2009;

Howard *et ál.*, 2012; Martelli y Davies, 2012]. Aunque estudios realizados por diferentes autores han mencionado la contaminación por SE a través de la cáscara [Lancaster y Crabb, 1953; Rizk *et ál.*, 1966; Baker, 1990; Gantois *et ál.*, 2009; Botey-Saló *et ál.*, 2012], seguida de la penetración de esta bacteria.

En el caso de bacterias de descomposición hay la posibilidad de que el ovario se halle contaminado por estos microorganismos como consecuencia de infecciones ascendentes [Harry, 1963]. Por tanto, se admite que en torno al 90% de los huevos son estériles en el momento de la puesta [Brooks y Taylor, 1955].

Aparte de la contaminación endógena de los huevos durante su formación, la forma más habitual es la contaminación microbiana de la cáscara, que se produce a partir de las heces, en los nidales, en los sistemas colectores hasta el centro de clasificación, de manos de los operarios, etc., siendo particularmente vulnerables los huevos con fisuras, los huevos rotos y cualquier otro tipo de deficiencia, lo que los convierte en fuentes de infección para huevos sanos, a los que contaminan [ICMSF, 2001].

Existen múltiples factores que inciden en la contaminación: la carga microbiana de la cáscara (número y tipo de microorganismos presentes), las condiciones de almacenamiento y manipulación (temperatura ambiente, humedad relativa, composición de la atmósfera) y factores intrínsecos del huevo, como pH, nutrientes y barreras físicas y químicas (inhibidores y factores antinutricionales).

El calor acelera la actividad de las enzimas y puede alterar los huevos; la humedad permite el desarrollo de moho tanto en el interior como en el exterior de los huevos y la consecuente aparición de olores y manchas anormales. La luz y el oxígeno disminuyen la resistencia de la cáscara a la penetración microbiana. El envejecimiento fluidifica la clara, que deja de soportar y proteger a la yema, que por adherencia a la cáscara no tarda en contaminarse.

Como se ha venido mencionado, el huevo de forma natural se encuentra protegido de la contaminación exterior gracias a la barrera física que le proporciona su cáscara y membranas y a barreras químicas antibacterianas presentes en su composición [Taylor y Martin, 1929; Simkiss, 1968; O'Leary y Busta, 1974; Mayes y Takeballi, 1983; Lock y Board, 1992; Baron *et ál.*, 1997; Baron, Gautier y Brule, 1997; Cuguenec *et ál.*, 2000; Mine, 2000].

A pesar de ello, en algunas ocasiones, bacterias patógenas como *Salmonella* spp. pueden llegar al huevo [Stokes *et ál.*, 1956; Humphrey *et ál.*, 1989a, 1991a; Mawer *et ál.*, 1989; Bradshaw *et ál.*, 1990; De Reu *et ál.*, 2006; Gantois *et ál.*, 2009; Howard *et ál.*, 2012], lo que si se combina con una manipulación, cocinado o

conservación inadecuados puede desencadenar en una infección alimentaria. En el caso de *Salmonella*, siendo el serotipo Enteritidis el mayor implicado por consumo de huevos contaminados, se han estudiado los mecanismos por los cuales dicha bacteria entra y sobrevive en el interior del huevo [Gantois *et ál.*, 2009], pero para otros microorganismos, aun se desconocen los medios.

Sin embargo no solo *Salmonella* es responsable de las ETA'S causadas por el consumo de huevo y sus derivados, existen otros géneros bacterianos contaminantes y/o causantes de la descomposición del huevo que, si se encuentran en cantidades altas o si se tratara de un microorganismo patógeno, pueden representar un riesgo para la producción avícola y la salud pública [Mancera *et ál.*, 2005].

# BARRERAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL HUEVO

Los distintos componentes del huevo aparte de ofrecer protección al embrión le proporcionan sustento durante el tiempo que dura la incubación. Para evitar el expolio de nutrimentos por parte de los microorganismos, el huevo cuenta con un sistema de barreras físicas (cáscara, membranas testáceas y saco albuminoso) y químicas (albumen y yema).

## **Barreras físicas**

La importancia relativa de las estructuras del huevo que contribuyen a retardar la penetración, en orden de importancia decreciente, son: cutícula > membrana interna > cáscara > membrana externa [Lifshitz *et ál.*, 1964]. Evidentemente, los poros que atraviesan la membrana externa permiten que los microorganismos soslayen estas barreras y permiten la entrada fácil de las bacterias de alteración y patógenas. Por esta razón, casi todos los países rechazan como no comestibles los huevos cuyas claras están rezumando hacia la superficie exterior. De modo parecido, si la cáscara está muy sucia, el desarrollo microbiano es mayor y es probable que los microorganismo penetren antes y en mayores cantidades [Rosser, 1942; Hartung y Stadelman, 1963].

La superficie externa de la cáscara está recubierta con la cutícula, considerada la primera barrera física del huevo contra bacterias, levaduras y hongos que puedan penetrar y alcanzar la yema [Howard, 2003]. Si la cutícula está dañada, existe una mayor sensibilidad en la entrada microbiana [Seviour y Board, 1972; Board y Halls, 1973; Bruce y Drysdale, 1994]. La humedad, la temperatura del huevo, la temperatura ambiente que rodea al huevo después de la oviposición y el lavado de los huevos son factores que afectan la integridad de la cutícula [Howard, 2003]. Cuando los huevos sucios se limpian con sustancias abrasivas, la cutícula resulta dañada [Fromm, 1963; Mayes y Takeballi, 1983], pero es medianamente resistente al agua, a los detergentes, o al restregado suave con un paño.

La cantidad de infiltración debida al daño está relacionada directamente con el grado hasta el cual los poros ya no están obturados con la cutícula. Incluso el daño localizado puede permitir la entrada bacteriana a través de unos cuantos poros. La protección ofrecida por la cutícula no dañada generalmente dura por lo menos 4 días [Mayes y Takeballi, 1983], después de los cuales empieza a fallar, presuntamente debido a las grietas que aparecen a medida que la cutícula se deseca [Baker, 1974; Mayes y Takeballi, 1983]. Los huevos sin cutícula, o los huevos tratados experimentalmente con compuestos químicos para eliminar la cutícula,

se alteran mucho más rápidamente que los huevos normales [Vadehra *et ál.*, 1970].

La incidencia de huevos contaminados con *Pseudomonas* y enterobacterias tiende a aumentar con la edad de las aves [Bruce y Johnson, 1978], lo que puede reflejar en parte la incidencia aumentada en huevos con cutículas de mala calidad a medida que aumenta la edad de las aves [Bruce y Drysdale, 1994].

La siguiente línea de defensa es la cáscara. La cáscara del huevo tiene numerosos poros; un huevo de gallina tiene unos 7,000-17,000 [Mayes y Takeballi, 1983; Bruce y Drysdale, 1994]. Los poros son más anchos en la parte puntiaguda y se van estrechando conforme se avanza hacia el polo romo del huevo (o polo ancho), siguiendo una trayectoria en espiral y son especialmente numerosos en la zona del polo ancho del huevo (donde aparece la cámara de aire) [Walden *et ál.*, 1956]. Esta es la razón de que las células presentes en el aire se encuentren generalmente en el polo ancho del huevo. Algunos poros malformados son más anchos, permitiendo que la entrada de microorganismos al interior del huevo sea más fácil [North, 1978].

El espesor de la cáscara del huevo también tiene gran importancia en la entrada de microorganismos al interior del huevo [Taylor y Martin, 1929]. Se ha visto que al incrementarse el espesor, también la longitud del poro aumenta. Lo anterior supone que, los poros más largos tomen forma en espiral, y por lo tanto, proporcionan dificultad a las bacterias para internalizarse en el huevo debido a la limitada movilidad por parte del poro [Mayes y Takeballi, 1983].

El número de poros por huevo tiende a aumentar con la edad del ave [Rahn *et ál.*, 1981]. Se ha indicado que la cáscara con peso específico elevado (es decir con menos poros) tiene mayor resistencia a la penetración bacteriana. La tabla 14 ofrece un ejemplo, que muestra que la alteración comenzó en 3 días cuando el peso específico de la cáscara era bajo, pero no comenzó hasta los 10-12 días cuando el peso específico era elevado.

**Tabla 14.** Efecto del peso específico de la cáscara del huevo y del tiempo de la competición bacteriana sobre el momento de la primera alteración fluorescente de los huevos. Fuente: Sauter y Peterson, 1969.

Tiempo de competición (min)	Peso específico de la cáscara		
	1.070	1.077	1.085
	Tiempo (días)		
1	8	10	12
3	4	10	12
5	3	11	12

Los porcentajes de huevos alterados después de ocho semanas a 10°C mostraron diferencias parecidas (Tabla 15). La penetración de *Salmonella* también era más rápida en las cáscaras de peso específico bajo (Tabla 16) Sin embargo, otras investigaciones averiguaron que la penetración de *Pseudomonas fluorescens* no dependía de la porosidad de la cáscara, sino que era influida por la edad del huevo y por el número de bacterias existentes en la superficie de la cáscara [Brooks, 1960; Hartung y Stadelman, 1963; Sparks y Board, 1984].

**Tabla 15.** Efecto del peso específico de la cáscara de huevo y del tiempo de la competición bacteriana sobre la incidencia total de la contaminación por *Pseudomonas* de los huevos después de ocho semanas de almacenaje. Fuente: Sauteur y Peterson, 1969.

Tiempo de competición (min)	Peso específico de la cáscara		
	1.070	1.077	1.085
	Huevos infectados (%)		
1	69.2	43.3	21.5
3	77.5	54.2	26.7
5	84.2	75.8	36.7

**Tabla 16.** Porcentaje de huevos de calidades de cáscara diferentes penetrados por diversas especies de *Salmonella* en 24 horas. Fuente: Sauteur y Peterson, 1974.

<i>Salmonella</i> spp.	Peso específico de la cáscara		
	1.070	1.080	1.090
	Huevos infectados (%)		
<i>S. Anatum</i>	19.4	7.5	3.8
<i>S. Brandenburg</i>	68.1	17.1	7.2
<i>S. Typhimurium</i>	82.1	48.7	21.2
Promedio de 12 <i>Salmonella</i> spp.	47.5	21.4	10.0

En la gallina ponedora, el estrés puede causar un daño del oviducto que se puede traducir en defectos estructurales en la cáscara del huevo y en una sensibilidad aumentada a la invasión bacteriana [Nascimento y Solomon, 1991]. La invasión microbiana avanza rápidamente cuando la cáscara del huevo esta agrietada [Brown *et ál.*, 1966].

Las cáscaras húmedas y sucias asociadas con un descenso de la temperatura facilitan la entrada de bacterias [Humphrey, 1999]. La reducción de la temperatura hace que la cámara de aire se contraiga, lo que se traduce en una presión negativa. Cuanto más rápido es el descenso de temperatura, tanto mayor es la diferencia de presión entre el interior y el exterior del huevo. A medida que la diferencia de presión se equilibra a través de la cáscara, a través de la misma son aspiradas agua y bacterias que son atrapadas en la superficie de la



membrana interna [Lock, 1991; Lock y Board, 1992; Martín, 2002]. Este fenómeno es más pronunciado a medida que el huevo envejece y la cámara de aire aumenta de volumen y es uno de los varios factores que determinan que los huevos almacenados sean más sensibles a la penetración.

Por el contrario, una temperatura alta, proveniente del agua para el lavado de huevos, puede ocasionar que los componentes del interior del huevo se hinchen y salgan a través de los poros de la cáscara, la creación de este fluido ocasiona que los microorganismos pasen a través de éste y puedan penetrar la cáscara [Howard, 2003].

De las dos membranas testáceas (la última barrera física antes de que lleguen los microorganismos al albumen), la externa es la más porosa y no proporciona una barrera a la entrada de microorganismos. La membrana interna suele retardar la entrada durante unos pocos días debido a su estructura fina [Gillespie y Scott, 1950; Elliot, 1954; Garibaldi y Stokes, 1958; Board, 1965a; O'Leary y Busta, 1974; Cuguenec *et ál.*, 2000; Martín, 2002; Gantois *et ál.*, 2009]. La protección excelente proporcionado por la membrana interna no es debida a su espesor y peso en comparación con la membrana externa, sino a la ausencia de poros en la membrana interna y a su compleja estructura [Moran y Hale, 1936]. Aunque aparentemente algunas bacterias móviles son capaces de penetrar serpenteando a través de las fibras de la membrana que se solapan apretadamente [Baker, 1974], los estudios de microscopia electrónica indican que la mayoría de las bacterias atraviesan la membrana a través de la matriz albuminosa. El núcleo de queratina de la membrana interna y su capa de polisacáridos no resultan afectados. Las zonas de hidrólisis que rodean las bacterias observadas en las membranas, confirman la hipótesis de que la penetración de la membrana es mediada por enzimas, debido a que ciertos microorganismo son capaces de hidrolizar estas proteínas [Stokes *et ál.*, 1956; Hartung y Stadelman, 1963; Brown *et ál.*, 1965; Martín, 2002].

Además, se ha observado que las membranas testáceas también poseen capacidad hidrofóbica. Esto reduce la disponibilidad de agua para los microorganismos y así se crea un ambiente poco favorable para su multiplicación [Martín, 2002].

### **Barreras químicas. Factores antimicrobianos del albumen y de la yema**

La tabla 17 resume los factores principales existentes en la clara de huevo que contribuyen a controlar el crecimiento de bacterias. Los más importantes son la lisozima, la conalbúmina, y el pH alcalino [O'Leary y Busta, 1974]. Todos los factores perjudiciales citados son aplicables al albumen denso; solo el pH es aplicable a las dos capas de albumen fluido [Baker, 1974].

**Tabla 17.** Factores antimicrobianos en el albumen del huevo. Fuente: Garibaldi, 1960; Board, 1969.

Componente	Actividad
Lisozima	Lisis de la pared celular de bacterias Gram positivas. Floculación de células bacterianas. Hidrolisis de enlaces $\beta$ -1,4-glucosídicos.
Conalbúmina	Quelación de hierro, cobre, y zinc, especialmente en pH elevado.
pH básico (9.1-9.6)	Proporciona un medio no apropiado para el crecimiento de muchos microorganismos. Aumenta la actividad de quelación de la conalbúmina.
Avidina	Fija la biotina, convirtiéndola en inaccesible para las bacterias que la necesitan.
Ovoinhibidor	Inhibe proteasas fúngicas.
Ovomucoide	Inhibe la tripsina, pero no influye en el crecimiento de las bacterias Gram negativas.
Otras proteínas	Inhiben la tripsina y quimotripsina. Inhiben serinas, cisteína, tiol y metalo proteasas. Se combina con la vitamina B6. Se combina con la tiamina. Quela el calcio. Inhiben ficina y papaína. Inhibe cisteína peptidasa.

La lisozima está presente en fluidos biológicos incluyendo la leche, la orina y la sangre [Howard, 2003]. La lisozima es inofensiva para los humanos excepto que provoca dermatitis atópica en niños [Mine y Yang, 2008]. En el huevo la lisozima representa el 3.5% del total de las proteínas contenidas en el huevo [Desert *et ál.*, 2001]. Su principal actividad es la lisis de la pared celular de bacterias Gram positivas [Cuguenec *et ál.*, 2000] y algunas Gram negativas [Ibrahim *et ál.*, 2001; Gast *et ál.*, 2005b; Rudra *et ál.*, 2006]. La hidrólisis de la pared se da por la ruptura de los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y la N-acetilglucosamina (NAG) del mucopéptido [Board, 1969]. Sin embargo, la mayoría de las ETA'S son ocasionadas por bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, que juegan un papel importante en la alteración del huevo [Board, 1964]. Las bacterias Gram positivas forman parte de la microflora inicial del huevo, razón por la cual, no son de gran importancia para la seguridad alimentaria. Esta microbiota probablemente, se deba a contaminación fecal al momento de la puesta [Board, 1964].

A pesar de esta actividad contra las bacterias Gram positivas, formadoras de esporas, como *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* [Alderton *et ál.*, 1974;

Chen *et ál.*, 1997] y especies de *Bacillus* spp. [Masayama *et ál.*, 2007] no son eliminadas por la lisozima.

La conalbúmina u ovotransferrina (sintetizada en el oviducto de las aves) es importante porque secuestra los iones metálicos, especialmente el hierro, cobre y zinc, haciéndolos inaccesibles para las bacterias [Garibaldi, 1960; Abdallah y Chahine, 1999; Mason y Macgillivray, 2002] y accesibles para el desarrollo del embrión [Huopalahti *et ál.*, 2007; Wu y Acero-López, 2012]. La conalbúmina presenta dos sitios de unión con los cuales secuestra dichos cationes. Estos sitios se encuentran en el C-terminal y N-terminal de la proteína [Howard, 2003]. Las bacterias Gram positivas, generalmente son más sensibles a la conalbúmina que las Gram negativas. Sin embargo, la sensibilidad de las bacterias a la actividad antibacteriana de la conalbúmina, se encontró que variaba ampliamente entre especies de bacterias: las especies más sensibles fueron *Pseudomonas* spp., *E. coli* y *S. mutans*, las más resistentes fueron *S. aureus*, *Proteus* spp., y *Klebsiella* [Valenti *et ál.*, 1980, 1982, 1983]. Algunas bacterias son capaces de crecer en presencia de conalbúmina, dichos microorganismos por lo general tienen una fase log prolongada y una tasa de crecimiento disminuida. La capacidad para crecer parece estar relacionada con el hecho de que la bacteria tenga un sistema activo para obtener minerales trazas esenciales (sideróforos).

Como ejemplo, para el crecimiento de *Micrococcus*, *Bacillus* y bacterias Gram negativas es particularmente retardado en presencia de la conalbúmina, probablemente debido a sus necesidades de hierro [Fenny y Nagy, 1952]. *Salmonella* es conocida por su alta demanda de hierro para su crecimiento y metabolismo [Howard, 2003]. Sin embargo, el albumen posee cantidades pequeñas de hierro, en comparación con la yema (Tabla 12), cuyo contenido en este metal es alto [Kilic *et ál.*, 2002]. Las bacterias son capaces de llegar al albumen, pero no de multiplicarse. Un estudio realizado en el 2001 por Gast y Holt demostró que serotipos de *Salmonella* fueron incapaces de crecer en el albumen debido a las condiciones adversas de éste. El crecimiento bacteriano en el huevo se hace evidente cuando las bacterias son capaces de alcanzar el contenido de la yema [Sharp y Whitaker, 1927].

Los mecanismos por los cuales el microorganismo obtiene minerales esenciales para su metabolismo (sideróforos), se ha propuesto para bacterias con altas demandas de hierro, que pueden sobrevivir en un medio tan excluyente de este nutrimento en particular. *Salmonella* tiene la capacidad de producir sideróforos que quelan el hierro proporcionándolo a la célula bacteriana y compitiendo así con la conalbúmina. Este sideróforo es una molécula de alta afinidad que no solo secuestra el hierro del albumen, sino también se lo puede quitar a la conalbúmina [Chart, 1993]. *Salmonella* también produce proteínas de membrana que reciben

el complejo hierro-sideróforo [Chart, 1993]. En *Salmonella*, el sideróforo enterobactina sirve como una molécula de transporte de hierro [Garibaldi, 1971].

Otro ejemplo de sideróforo, se encuentra en las pseudomonas que crecen en la clara de huevo, con frecuencia producen una mezcla de queladores verdes fluorescentes, denominados colectivamente "pioverdina". Este material tiene una gran afinidad por los iones metálicos esenciales para el crecimiento de *Pseudomonas*, y compite con éxito con la conalbúmina. A diferencia de la conalbúmina, la pioverdina libera los metales hacia la célula bacteriana [Elliot, 1954; Garibaldi, 1960; Elliot *et ál.*, 1964; Garibaldi, 1970]. La pioverdina está relacionada con, o puede ser idéntica a, los compuestos fluorescentes del transporte del hidroximato que actúan de modo parecido, permitiéndoles que penetren y se multipliquen [Garibaldi, 1970]. Las sales de hierro, de aluminio, de cobre, de manganeso, y de zinc incorporadas experimentalmente, saturaran la capacidad de fijación de la conalbúmina, siendo el exceso utilizable para el crecimiento microbiano [Garibaldi, 1960; Sauter y Peterson, 1969].

Cuando los huevos de gallina recién puestos tienen un pH comprendido en el intervalo 7.6-7.8, la pérdida de dióxido de carbono desde el huevo hacia la atmósfera hace que el pH de la clara de huevo aumente hasta 9.1-9.6 después de un intervalo de tiempo de 1-3 días de almacenaje a temperatura ambiente [Mayes y Takeballie, 1983]. La mayoría de las bacterias patógenas como *Salmonella* no crecen bien en este valor de pH [Romanoff y Romanoff, 1949]. El pH alcalino también aumenta la actividad queladora de la conalbúmina [Board, 1969; Guthrie, 1992; Humphrey y Whitehead, 1993; Latimer *et ál.*, 2002]. Se ha reportado que la adición de bicarbonato incrementa la actividad antimicrobiana de la conalbúmina hacia las cepas sensibles como *S. epidermis* y *S. saprophyticus*, pero no a las cepas resistentes como *S. aureus*. Se ha visto que cuando se añade el bicarbonato se forma un complejo y se cree que algunas bacterias tienen la dificultad para obtener el hierro para su propio uso. Por otro lado, la adición de EDTA mejoró la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* [Ko *et ál.*, 2008; Ko *et ál.*, 2009]. Actualmente se ha propuesto el uso de EDTA en películas de  $\kappa$ -carragenina, ya que estas películas han mostrado mejorar la actividad inhibidora de bacterias como *E. coli* y en menor actividad contra *S. aureus* y ST en pechugas de pollo [Seol *et ál.*, 2009], lo que hace pensar en un desarrollo parecido para los huevos.

Además de su actividad quelante, la conalbúmina posee otro mecanismo contra las bacterias, este segundo mecanismo consiste en una interacción directa con la membrana y la inducción al daño de las funciones biológicas de la misma membrana citoplásmica de la bacteria [Ibrahim *et ál.*, 1998, 2000].

Existe otro grupo de proteínas antimicrobianas que impiden el crecimiento de microorganismos en el albumen, cuya actividad consiste en la hidrólisis de proteínas del albumen ocasionando que sean inaccesibles para el microorganismo [Baron *et ál.*, 1977]. Entre ellas, el ovomucoide (inhibidor de la serina), la cistatina (inhibidor de la cisteína) y la ovostatina (Nagase *et ál.*, 1983; Stevens, 1991).

Un estudio reciente identificó 11 tipos de “gallinacinas” (son el equivalente a las  $\beta$ -defensinas de los mamíferos), descritas como péptidos antimicrobianos naturales que juegan un papel importante en la inmunidad innata [Sugiarto y Yu, 2004; Higgs *et ál.*, 2005; Hasenstein *et ál.*, 2006; Hasenstein y Lamont, 2007], expresadas en los segmentos del oviducto [Abdel Mageed *et ál.*, 2008]. La mayor expresión de estos péptidos se vio en el infundíbulo y la vagina [Ohashi *et ál.*, 2005]. Recientemente, Yoshimura *et ál.*, (2006) reportaron que la expresión de gallinacinas- 1, -2, y -3 aumentó en un intervalo de 24 horas como respuesta a la infección por SE o a la presencia de lipopolisacáridos (LPS) purificados en un cultivo de células vaginales. El estudio realizado por Abdel Mageed *et ál.*, (2008) confirmó que la expresión de la gallinacina-3 aumentó por la presencia de LPS *in vivo*. La inyección del LPS de *E. coli* en gallinas ponedoras, también indujo la expresión de gallinacinas en los folículos ováricos [Subedi *et ál.*, 2007]. La interacción entre las gallinacinas y los microorganismos da lugar a una desestabilización y permeabilización de la membrana bacteriana a través de una atracción electrostática entre el péptido catiónico y la membrana aniónica del microorganismo. La  $\beta$ -defensina-11 fue identificada en el albumen del huevo [Mann, 2007]. Sorprendentemente, el albumen contiene muchas proteínas que están conectadas de alguna manera a la unión de LPS o a su modificación. Existe un componente en la albumina que es similar a la aciloxiacilo hidrolasa de mamíferos, esta proteína es conocida por hidrolizar las cadenas acilo de los LPS bacterianos. Además se han identificado proteínas que contienen dominios BPI (proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad), estas proteínas tienen un efecto especial sobre las bacterias Gram negativas, la viabilidad de estas bacterias se compromete por el incremento de la permeabilidad que esta proteína produce en su membrana, lo cual acarrea una mayor susceptibilidad del microorganismo al efecto de otras enzimas capaces de degradar los peptidoglicanos y fosfolípidos de su membrana [Rojas, 2004] y además neutralizan los LPS de la bacteria [Elsbach y Weiss, 1998]. Se ha visto que tales dominios también se producen en TENP, una proteína recientemente identificada como un componente de la albumina [Guérin-Dubiard *et ál.*, 2006] y la ovocalixina-36 identificada como un componente de la cáscara [Gautron *et ál.*, 2006], esta última provoca un aumento de la permeabilidad con efecto bactericida y pertenece a un grupo de proteínas de adherencia específica para los LPS bacterianos. Mine *et ál.*, reportaron que extractos de proteínas de la cutícula y de

la matriz de la cáscara del huevo inhibieron el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *S. aureus*, demostrando que la proteína ovocalixina-36 altera la integridad de la membrana de las bacterias [Mine *et ál.*, 2003]. Por otro lado *E. coli* y SE fueron débilmente inhibidas en una etapa temprana durante la incubación (4 horas).

Recientemente, Silphaduang *et ál.*, (2006) fueron los primero en reportar la presencia de las histonas H1 Y H2B como proteínas antimicrobianas en el sistema reproductivo aviar, pero su significado funcional en el tracto reproductivo no está del todo claro. Kim *et ál.*, (2002) evidenciaron la expresión de las histonas H2A y H2B en la placenta humana, comprobando posteriormente que tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento *in vitro* de *E. coli* y *Streptococcus* del grupo B y sobre la actividad de la endotoxina de los LPS bacterianos.

No se sabe hasta qué punto estos componentes antibacterianos afectan diferentes serotipos de *Salmonella*. Sin embargo, llama la atención que la función de la mayoría de las proteínas de la albumina está ligada a la unión del LPS. Dado que la estructura del antígeno O del LPS es un determinante principal en la serotipificación de las cepas, puede ser que la estructura del LPS es indispensable para la sobrevivencia de SE, puesto que juega un papel importante en el mantenimiento y la organización de la membrana externa de esta bacteria, durante la formación de huevos *in vivo* y que el quimiotipo del LPS afectara el grado de unión con los componentes microbianos y por lo tanto la supervivencia bacteriana.

Recientemente, un análisis proteómico de la membrana vitelina del huevo reveló que componentes antimicrobianos de la albúmina (ovoalbúmina, lisozima, ovomucina y defensinas), constituyen un 60% del peso seco de la capa externa de la membrana vitelina [Mann, 2008]. La  $\beta$ -defensina-11 se identificó en la membrana vitelina.

Se considera que las inmunoglobulinas pertenecen al sistema antimicrobiano de defensa de los huevos de las aves. Los anticuerpos contra *Salmonella* se han detectado en la albumina y yema del huevo de forma natural y en pollos infectados experimentalmente [Schiemann y Montgomery, 1991; Desmidt *et ál.*, 1996]. Se ha sugerido que los anticuerpos transferidos a la yema después de una hiperinmunización de las gallinas no tiene ninguna influencia sobre la multiplicación de *Salmonella* en la yema [Takase *et ál.*, 1999; Görtler y Fehlhaber, 2004]. En contraste, Holt *et ál.*, (1996) describen una diferencia significativa en el comportamiento del crecimiento de SE bajo la influencia de anticuerpos. Estos autores, sin embargo, realizan sus experimentos mediante la inoculación de *Salmonella* en una mezcla de albúmina y yema, mientras que los dos estudios anteriores se basan en inoculaciones únicamente en la yema. Por lo tanto, existe

la posibilidad de que los componentes antimicrobianos de la albúmina tuvieron un efecto inhibitorio adicional sobre *Salmonella*. La función antimicrobiana exacta de las inmunoglobulinas en huevos de aves queda por determinarse. Por ejemplo el anticuerpo IgY es una inmunoglobulina presente en el suero sanguíneo de aves, reptiles y anfibios, que se transfiere por la hembra a partir del suero de la yema del huevo. La IgY difiere estructural e inmunológicamente de la IgG presente en los mamíferos [Davalos-Pantoja *et ál.*, 2000; Zhang, 2003], además presenta distinta estabilidad a diferentes parámetros fisicoquímicos, lo que la hace idónea como una herramienta inmunológica [Yolken *et ál.*, 1988; Otani *et ál.*, 1991], ambas están involucradas en la respuesta inmune secundaria. Por otra parte, existen muchas investigaciones que han demostrado una función inmune en la prevención del crecimiento bacteriano [Lee *et ál.*, 2002; Kim *et ál.*, 2004; Zhen *et ál.*, 2008]. Ya que su presencia en los componentes del huevo es normal, la IgY se considera segura para su consumo humano [Kollberg *et ál.*, 2003] y ha sido aprobada por la FDA como un aditivo alimentario GRAS (Generally Recognized As Safe) [Coleman, 1996]. Por lo tanto, ha recibido una creciente atención por sus posibles aplicaciones en medicina y alimentos fortificados, por ejemplo, para la profilaxis o terapia de distintas infecciones humanas y en el tratamiento o prevención de enfermedades entéricas [Carlander *et ál.*, 2000; Ibrahim *et ál.*, 2008; Xu *et ál.*, 2008]. Diversos estudios han demostrado su actividad antimicrobiana en bacterias como *Listeria monocytogenes* [Sui *et ál.*, 2009; Sui *et ál.*, 2011], SE y ST [Peralta *et ál.*, 1994; Yokoyama *et ál.*, 1998a, b; Lee *et ál.*, 2002].

De manera natural, cuando la gallina pone el huevo o, la yema contiene IgY y la albúmina o clara del huevo contiene IgM e IgA incorporándose a medida que el óvulo desciende por el oviducto. Los anticuerpos específicos contra *Salmonella* se han detectado en la albúmina del huevo y en la membrana vitelina de los pollos infectados o vacunados. En las aves reproductoras estos anticuerpos anti-*Salmonella* protegerán a los polluelos, aunque en las gallinas ponedoras son mucho más importantes porque contribuirán a disminuir la contaminación del huevo para consumo humano [Terzolo, 2011]. El agregado de yema de huevo o bien una mezcla de yema y albúmina de gallinas inmunizadas a cultivos de SE disminuye significativamente el crecimiento *in vitro* de la bacteria por la acción de los anticuerpos específicos. En otros experimentos realizados *in vitro* con IgY anti-SE extraída de la yema, se encontró que la IgY contra los flagelos de SE inhibe la motilidad aunque el número de células bacterianas viables se mantuvo sin cambios, mientras que la IgY principalmente dirigida contra los antígenos somáticos de SE realmente redujo el número de las bacterias viables [Terzolo, 2011, 2012]. De hecho, debido al aumento de aplicación de vacunas inactivadas en las gallinas ponedoras se ha logrado disminuir la incidencia de SE, tanto debido a una reducción la contaminación ambiental en la granja como también por una mayor protección de los huevos para el consumo humano.

Estos estudios han evaluado la actividad antimicrobiana de la IgY así como su potencial para la conservación de alimentos, sin embargo aun se necesita investigar con más detalles para proporcionar información sobre dicha propiedad contra microorganismos patógenos y bacterias de descomposición.



# SALMONELLA Y SALMONELOSIS

Los alimentos de origen animal son fuente de un importante número de infecciones en humanos. El riesgo, aunque es conocido, aún está en vía de caracterización y cuantificación a nivel global. En la actualidad, la salmonelosis es la zoonosis de mayor prevalencia en países desarrollados (junto con la campilobacteriosis). En Estados Unidos de América, Canadá, Inglaterra, Noruega y Dinamarca, entre otras naciones, se han comprobado brotes de salmonelosis transmitida por alimentos.

Se ha calculado que en Estados Unidos de América, la salmonelosis causa más de 18 mil hospitalizaciones y 500 defunciones anuales [WHO, 1997]. En Dinamarca, el costo de la infección en humanos se calcula en 15.5 millones de dólares anuales, en ese país se ha implementado un programa de control y erradicación de la infección en animales destinados al consumo, con costo anual de 14.1 millones de dólares que, sin embargo, se considera redituable en la medida en que se estima una reducción de 25.5 millones de dólares por concepto de las pérdidas ocasionadas por incumplimiento laboral y tratamientos médicos [INFOSAN, 2005; De Jong y Ekdahl, 2006; Pieskus *et ál.*, 2006]. Los datos relacionados con el costo de las enfermedades transmitidas por alimentos, por lo general no son calculadas ni publicadas en los países en desarrollo [INFOSAN, 2005]. Gracias a este programa, en la actualidad Dinamarca junto con Suecia son las dos naciones con menores niveles de salmonelosis en Europa [Wegener *et ál.*, 2003; WHO, 2007].

En algunos países, los problemas de salmonelosis han aumentado 20 veces entre las décadas de 1980 y 1990, y aunque existen ejemplos de países que han logrado limitar y aun revertir estos incrementos, en general la propagación de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium va en aumento [UE, 2002].

Entre 1930 y 1946 SE en huevos de pata causó epidemias de salmonelosis humana en Europa, aunque no se demostró que esto supusiera la transmisión transovárica [Scott, 1930; Humphrey, 1994].

Un análisis retrospectivo de casos de salmonelosis llevado a cabo en Noruega entre 1966 y 1996 sugiere que existe relación epidemiológica entre las aves y los humanos [Kapperud *et ál.*, 1998]. En el Reino Unido se comprobó que la salmonelosis se incrementa entre junio y agosto, lo que se atribuye a que los alimentos no son almacenados oportunamente en refrigeración justamente cuando la temperatura ambiental se eleva y también debido a la costumbre de consumir barbacoa durante el verano, ya que la carne no se cuece adecuadamente [WHO, 1997].

Durante la década pasada, el número de casos de salmonelosis registrado en Suecia se ha duplicado debido al aumento en el número de casos causados por SE. En ese país, durante 2001, 60% de los casos detectados fueron causados por cuatro serotipos: ST (22.1%), SE (17.7%), *Salmonella enterica* serotipo Newport (10%) y *Salmonella enterica* serotipo Heidelberg (5.9%) [Wierup et ál., 1995]. El costo de estos brotes ocasionó la implementación de un programa de control y erradicación de la infección en animales [WHO, 2007], programa similar al de Dinamarca.

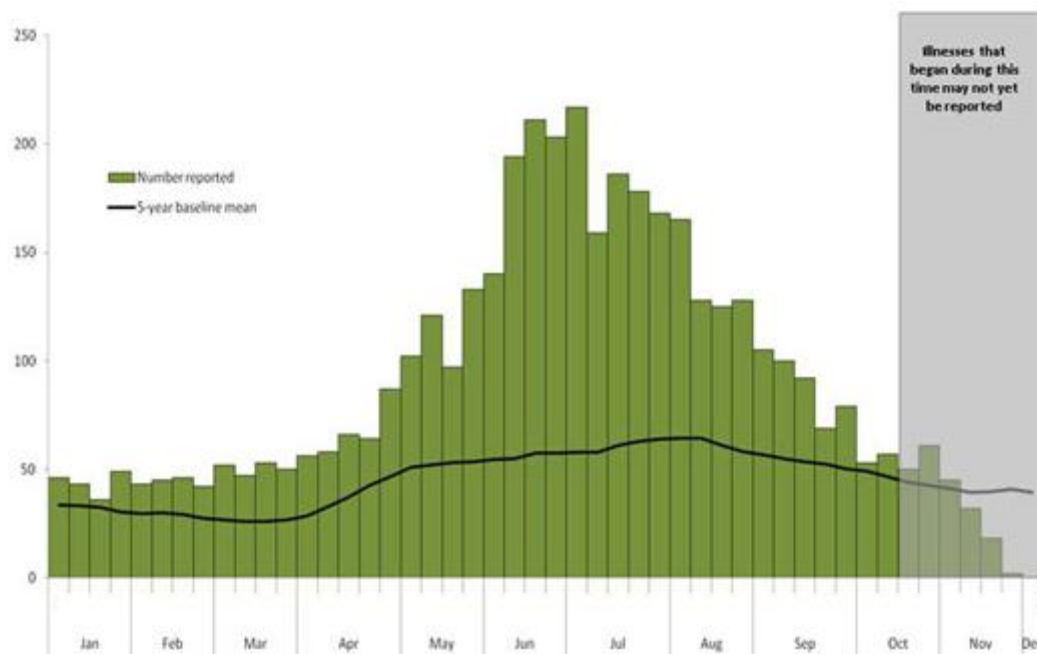
En Francia, en 2005, más de 70% de casos en humanos fueron ocasionados por tres serotipos: SE (33%), ST (32%) y *Salmonella* Hadar (6%) [Velge et ál., 2005].

En el 2008, la Unión Europea confirmó 131,468 casos de salmonelosis humana, siendo la segunda la zoonosis de mayor prevalencia (siendo la campilobacteriosis la primera) [Carrasco et ál., 2012]. También se detectaron los cinco serotipos más frecuentemente involucrados en casos de salmonelosis humana: SE (58%), ST (21.9%), *Salmonella* Infantis (11%), *Salmonella* Virchow (0.7%) y *Salmonella* Newport (0.7%) [Martelli y Davies, 2012]. En este contexto, las iniciativas para el control de *Salmonella* en las parvadas de gallinas comenzó al final de la década de los 80 e inicio de los 90 [Defra, 2007; AFSSA, 2009].

En Australia, la salmonelosis es la segunda enfermedad transmitida por alimentos (después de la campilobacteriosis), siendo el pollo y los huevos los principales vehículos de transmisión. Un estudio llevado a cabo durante el 2001- 2002, reveló que el 32% (5.4 millones de casos al año) de los habitantes sufre de enfermedades gastrointestinales, el 88% es a causa de *Salmonella* [Hall et ál., 2005]. En 2008, se registró un brote de salmonelosis en la región de Adelaide, al sur de Australia. El 94% de los casos fueron ocasionados por tres serotipos de *Salmonella*: ST, *Salmonella* Infantis y ST fago tipo 135a. De los alimentos involucrados el 62.8% fue por ingesta de carne de pollo y el 47.9% por el consumo de huevos [Fearnley et ál., 2011]. Australia junto con Nueva Zelanda han tenido números relativamente más altos de brotes por ST en comparación con países como Canadá, Estados Unidos y la Unión Europea [Dalton et ál., 2004].

En Estados Unidos, los serotipos SE y ST han sido reportados como los dos agentes etiológicos principales de salmonelosis en humanos [CDC, 2006]. Desde finales de los 70, SE ha sido el serotipo de mayor causa de salmonelosis, tanto en los Estados Unidos, Sur América y Europa. Entre 1985 y 1996 más de 600 brotes con más de 70 muertes fueron reportados a la CDC [USFDA, 1997]. El consumo de huevos o alimentos a base de huevo o que contienen huevo como ingredientes han sido descritos como la fuente del 75% de los brotes alimentarios como vehículos confirmados desde 1985 a 2006 [CDC, 2006]. Actualmente se ha estimado 1.4 millones de casos al año de salmonelosis [Voetsch et ál., 2004]. Para hacerle frente

a este problema de salud pública el CDC ha implementado programas de prevención a lo largo de los Estados Unidos, sin embargo los últimos datos entregados por el mismo CDC revelan que esta bacteria podría estar ganando la batalla, muestra de ello es el reporte dado en mayo de 2010, en donde el CDC identificó un aumento en los casos de salmonelosis a nivel nacional, este aumento se hace evidente en la curva epidémica Epi-curve (Figura 37) en donde puede observarse que en el periodo comprendido entre el 1° de mayo al 31 julio de 2010, fueron reportados un total de 1,953 casos de salmonelosis asociada a contaminación de la cáscara de huevo, específicamente de la cepa conocida como JEGX01.0004 por su patrón de electroforesis en gel de campo pulsante [CDC, 2010].



**Figura 37.** Curva epidémica (Epi-curve) que muestra el comportamiento de los casos de salmonelosis de la cepa JEGX01.0004, reportados por el CDC en los Estados Unidos desde enero a diciembre de 2010. Cada barra representa el número de casos reportados a partir de Enero a Diciembre; las enfermedades que se produjeron después del 28 de Octubre del 2010, todavía no pueden ser reportados debido al tiempo que pasa entre el momento que una persona se enferma y cuando se reporta la enfermedad. Esto normalmente toma dos o tres semanas para *Salmonella*. La línea que pasa a través de las barras representa el promedio de los casos reportados en los últimos 5 años correspondientes a cada mes.

En México los serotipos más frecuentemente aislados entre 1972 y 1999, son, en orden decreciente, SE, ST, *Salmonella* Derby, *Salmonella* Agona y *Salmonella* Anatum [Gutiérrez *et ál.*, 2000]. Estudios previos sobre fagotipificación de SE en México, demostraron la existencia de los fago tipos 4 y 8 [Mancera *et ál.*, 2004; Ontiveros *et ál.*, 2004]. Desde 1995 se ha realizado el asilamiento y fagotipificación de SE en diferentes estados de la república, identificándose diferentes fago tipos y

encontrando al fago tipo 4 como el de mayor número de aislamientos [Mancera *et ál.*, 1997; Ontiveros *et ál.*, 2004]. Los avances en el estudio de SE en México, repercuten de manera importante en la salud pública, así como en la producción avícola nacional, ya que diferentes países del mundo aplican restricciones a la importación de aves y huevo de países que estén considerados como infectados [USDA-APHIS, 1996].

La Secretaria de Salud reporta anualmente un promedio de 68,000 casos de infecciones causadas por bacterias del género *Salmonella*. Entre 2003 y 2005, Zaidi *et ál.*, (2006) colectaron 2,893 muestras fecales de pacientes con diarrea, 5,334 muestras de carne de pollo, puerco y res, y 1,882 muestras de intestinos de pollo, cerdo y bovino. Se aisló *Salmonella* no-Typhi en 12,8% de los pacientes con diarrea. Las dos serovariedades más frecuentes en estos últimos fueron Typhimurium (22,2%) y Enteritidis (14,5%). La primera se encontró en las carnes crudas de los tres tipos de animales analizados, siendo el cerdo el reservorio principal (10,2%), seguido por bovino (6,8%) y por último el pollo (4,6%) mientras SE se aisló casi exclusivamente de pollo. De tal manera que ST y SE fueron las serovariedades más frecuentemente aisladas de niños con diarrea; además, junto con *Salmonella* Typhi, han sido causa de sepsis y meningitis fatales [Zaidi *et ál.*, 2006].

La distribución global de los alimentos y el continuo movimiento de personas en todo el mundo, ha facilitado la propagación de este agente, lo que permite la introducción de serotipos emergentes de *Salmonella* en los países importadores. En humanos, la forma clínica de la infección por SE generalmente se manifiesta como un episodio de enterocolitis autolimitante, con síntomas que se resuelven en cinco días. El periodo de incubación es generalmente de 8 a 72 horas, los síntomas más comunes son diarrea acuosa y dolor abdominal. La mayoría de las personas se recuperan sin recibir tratamiento con antibióticos. Sin embargo, la diarrea puede ser severa y la persona puede requerir hospitalización. La susceptibilidad es mayor en niños, ancianos y personas inmunodeficientes. En estos pacientes, la infección puede diseminarse desde los intestinos hacia el torrente sanguíneo y de allí hacia otros sitios y puede causar la muerte, a menos de que la persona sea tratada inmediatamente con antibióticos [FAO, 2003].

En una amplia variedad de especies animales, SE causa infección intestinal sin signos, especialmente en aves. SE infecta silenciosamente los ovarios de gallinas en apariencia sanas y contamina los huevos antes de que el cascarón sea formado. En pollos menores de dos semanas de edad pueden ocurrir brotes de enfermedad clínica con alta mortalidad [Velge *et ál.*, 2005].

## Caracterización de la salmonelosis

El género *Salmonella* es representativo de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos que no forman esporas y que en este género en particular presentan tres tipos de antígenos: somático O, flagelar H y capsular Vi, cuyas propiedades de aglutinación se emplean para diferenciar a más de 2,500 serotipos. Cada año se aumentan nuevos serotipos a la lista de Kauffmann-White [Popoff *et ál.*, 2003].

El género *Salmonella* consta de sólo tres especies, *Salmonella bongori*, *Salmonella subterranea* y *Salmonella entérica*, esta última se divide en seis subespecies: *entericae*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Los serotipos de la subespecie *entericae* causan 99% de las salmonelosis en humanos y animales superiores [Uzzau *et ál.*, 2000]. Para fines prácticos de diagnóstico y epidemiología, la nomenclatura se basa en los nombres de los serotipos de la subespecie, por ejemplo *Salmonella enterica*, subespecie *entericae*, serotipo Enteritidis, se abrevia como *Salmonella* Enteritidis [Ward *et ál.*, 1987; Heyndrickx *et ál.*, 2005].

Para la realización de estudios más detallados de taxonomía y patogenia, los serotipos pueden subdividirse mediante el establecimiento de biotipos y fagotipos [Jones, 2000]. El biotipo es la variación bioquímica entre organismos del mismo serotipo, mientras que el fagotipo expresa la diferente susceptibilidad a la lisis por bacteriófagos de organismos del mismo serotipo [Ward *et ál.*, 1987].

Los diversos serotipos tienen diferentes grados de adaptación y patogenicidad para los humanos y las especies animales; por ejemplo, *Salmonella entérica* serotipo Typhi y *Salmonella enterica* serotipo Paratyphi causan enfermedades severas en humanos, conocidas como síndrome septicémico y fiebre tifoidea, pero estos serotipos no son patógenos para los animales. Asimismo, los serotipos *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Abortus-ovis* son, respectivamente, causantes de la tifoidea aviar y de abortos infecciosos en las ovejas, pero sólo ocasionalmente producen infecciones leves o asintomáticas en humanos. Existen, sin embargo, serotipos como *Salmonella Choleraesuis* que causa enfermedad severa en su principal portador, que es el cerdo, pero también puede causar enfermedad sistémica grave en humanos. Los serotipos SE y ST infectan tanto a humanos como a animales, pero en éstos, principalmente en los pollos, producen infecciones asintomáticas [Duchet *et ál.*, 1997; Uzzau *et ál.*, 2000]. En la segunda mitad del siglo XX ocurrieron dos cambios importantes en la epidemiología de la salmonelosis en el mundo; en primer lugar, el surgimiento de infecciones en humanos provocadas por el consumo de alimentos contaminados por SE, y en segundo, la múltiple resistencia a los antibióticos de cepas de ST [Velge *et ál.*, 2005].

Los factores responsables del incremento en el número de infecciones por SE en aves no han sido completamente dilucidados, por lo que es difícil detectar la infección en pollos aparentemente sanos. Se ha comprobado que SE causa infecciones sin signos clínicos aparentes, en una amplia gama de especies animales, especialmente en las aves domésticas, en las que no se han identificado brotes agudos con mortalidad [Ward *et ál.*, 1987]. Sin embargo, estos portadores sanos pueden diseminar la infección por la contaminación fecal de la carne y huevo. Resulta particularmente difícil detectar SE cuando el número de bacterias presentes es menor a nueve por pieza [Humphrey, 1994].

El dramático incremento de infección por SE fago tipo 4 en humanos en Europa desde 1980, sugiere que la bacteria ha adquirido recientemente nuevos genes de virulencia [Helmuth y Schroeter, 1994].

En años recientes se han secuenciado y comparado un mayor número de genomas microbianos, lo que ha permitido estimar la frecuencia de mutaciones. Una importante fuente de evolución son los mecanismos de recombinación que están implícitos en el proceso de replicación mediante la adquisición o pérdida de regiones que portan genes. Además, la transmisión horizontal de fragmentos de ADN puede ocurrir mediante plásmidos, islas genómicas, bacteriófagos, transposones y secuencias de inserción. Estos elementos móviles pueden proveer a los microorganismos, de ventajas para adaptarse e infectar a determinadas células [Ochman *et ál.*, 2000]. Los genes asociados con virulencia, también llamados islas de patogenicidad, se originan fuera de las bacterias como elementos móviles. Las islas de patogenicidad adquiridas contribuyen a la naturaleza virulenta de las bacterias en la medida en que contienen grupos de genes que incrementan la virulencia del microorganismo y pueden transformar un organismo benigno en uno patógeno. Hasta ahora, se han descrito 12 islas de patogenicidad para *Salmonella* spp, algunas de ellas son conservadas por todos los serotipos del género, pero algunas son específicas de ciertos serotipos [Velge *et ál.*, 2005].

Se ha comprobado que *Salmonella* Gallinarum puede generar inmunidad en la parvada contra el serotipo 09, es decir que presenta inmunidad cruzada con SE. Como consecuencia de esta característica inmunológica, se ha sugerido que en la medida que *Salmonella* Gallinarum se ha eliminado mediante la vacunación y el sacrificio de las aves infectadas, su erradicación pudo haber permitido el establecimiento de SE [Velge *et ál.*, 2005; Chacana y Terzolo, 2006]. En forma inversa, en el Reino Unido, el descenso de 50% en infección por SE en aves desde 1997, coincide con la introducción de nuevas vacunas vivas contra el serotipo 09, en sustitución de las vacunas con bacterias muertas en formalina [Ward *et ál.*, 2000].

Otra importante fuente de diversidad microbiana la constituyen los integrones, que generalmente llevan uno o más genes de resistencia a los antibióticos [Boyd *et ál.*, 2002]. Un inevitable efecto del uso de antibióticos es el surgimiento y diseminación de bacterias resistentes. Existen algunos biotipos y fagotipos del género *Salmonella* que son resistentes a penicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas, tetraciclinas, e incluso a fluoroquinolonas, esta resistencia se atribuye a mutaciones puntuales del gen *gyrA* [Angulo *et ál.*, 2000].

Teniendo en cuenta que los genes resistentes a los antibióticos pueden propagarse por integrones, además de transposones, islas genómicas y plásmidos, el tratamiento con agentes antimicrobianos contribuye al aumento de la población de bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos relacionados entre sí, y por ello el uso de antimicrobianos en el alimento de los animales puede tener efectos adversos para la salud humana [Velge *et ál.*, 2005], debido a su efecto de selección en la población bacteriana resistente.

### ***Salmonella* Enteritidis y el huevo**

Al comenzar la mitad de la década de los años 80, SE fue aislada cada vez con más frecuencia en las aves de corral y en los huevos de éstas [Dreesen *et ál.*, 1992]. Esto fue acompañado de un aumento súbito de la salmonelosis humana en varios países de Europa, de América del Norte y del Sur, que estaba relacionado epidemiológicamente con el consumo de alimentos, especialmente de aquellos que contiene huevo crudo o cocido insuficientemente [Hooper y Mawer, 1988; St. Louis *et ál.*, 1988; Humphrey, 1990; Rodríguez *et ál.*, 1990; Duguid y North, 1991; CDC, 1992; ACMSF, 1993; Binkin *et ál.*, 1993; Caffer y Eigner, 1994; Fantasia y Filetici, 1994; Glosnicka y Kunikowska, 1994; Mishu *et ál.*, 1994; Morse *et ál.*, 1994]. Si bien había un aumento simultáneo de los casos por SE en ambos continentes, los casos europeos estaban relacionados en su mayor tipo con el fago tipo 4 (PT4), mientras que los casos norteamericanos involucraban otros fago tipos [Khakria *et ál.*, 1991; Humphrey, 1994].

SE ha sido la causa de la mayoría de los brotes de salmonelosis humana reportados a nivel mundial, convirtiéndose rápidamente en una pandemia. A partir de 1981 y 1988, el número anual de aislamientos humanos de SE en Inglaterra aumentó de 392 a 12,522. En 1987, ninguno de los seis brotes de salmonelosis relacionados con huevos investigados en Inglaterra fue causado por este PT4 de SE. En 1988, 19 de 34 brotes por huevos fueron causados por este serotipo. En 1990, se informó que en el noreste de los Estados Unidos la incidencia de SE había aumentado más de seis veces desde 1976, especialmente en los meses de verano [Rodríguez *et ál.*, 1990]. Las frecuencias de aislamiento del mismo serotipo también aumentaron en las regiones del Atlántico medio y del Atlántico sur, y SE fue el segundo serotipo más frecuente citado. En los Estados

Unidos, se descubrió que los huevos con cáscara clase A o los alimentos que contenían huevos crudos o cocidos insuficientemente eran un origen importante de infecciones humanas por SE. Estos hallazgos suscitaron investigaciones a gran escala tanto en el Reino Unido como en los Estados Unidos. En los Estados Unidos, el 80% (298) de los 371 brotes de SE entre 1985 y 1999, fueron asociados al consumo de huevos [Patrick *et ál.*, 2004]. En el 2006, un total de 165,023 casos de salmonelosis fueron reportados en la Unión Europea, SE fue identificada en 62.5% de los casos, siendo el huevo el vehículo de transmisión [EFSA, 2007a]. Lo anterior, se ha debido a dos factores: su capacidad única para colonizar el ovario y el oviducto de las gallinas ponedoras y su propagación y persistencia en los criaderos de gallinas en todo el mundo [Thorns, 2000]. En éste último punto, hay evidencia de que SE se convirtió en endémica en las aves, como consecuencia, se ha llegado a una rápida propagación de la infección en las mayoría de las partes del mundo, posiblemente a través de embriones o pollitos contaminados. Esto es apoyado por la observación de que SE no se convirtió en endémica en las gallinas ponedoras de Australia, muy probablemente debido a sus estrictas normas sobre la importación de productos de origen animal [Fullerton, 2008].

SE se asocia típicamente con brotes relacionados con huevo [EFSA, 2010a]. En particular, SE fago tipo 4 ha estado estrechamente asociado con el consumo de huevos [Cogan y Humphrey, 2003]. SE no ha sido siempre, el serotipo más encontrado en las infecciones humanas, por ejemplo en el Reino Unido durante la década de los 70, ST junto con *Salmonella* Agona eran los serotipos más comunes [Cogan y Humphrey, 2003]. En el Reino Unido, un fuerte aumento de la salmonelosis se observó en la década de los 80. Esto debido en gran parte a una epidemia de SE fago tipo 4 que, inicio en el Reino Unido durante los años 1982-1983, alcanzando su máximo en 1993, para comenzar a disminuirse en 1997 [Defra, 2007]. En el Reino Unido algunas granjas de gallinas ponedoras se suscribieron al Consejo Británico de la Industria (BEIC) que proporciona un código de prácticas en higiene y normas de bienestar animal en las granjas. En 1998, y para las granjas inscritas en dicho Consejo, se inició la vacunación de las aves contra *Salmonella* [Ward *et ál.*, 2000; Cogan y Humphrey, 2003]. La mayoría de estas granjas han producido más del 80% de la venta de huevos al por menor en el Reino Unido. Desde la introducción de medidas de control de *Salmonella* en ponedoras, el número de infecciones humanas causadas por SE, sobre todo SE PT4, se ha reducido drásticamente [Cogan y Humphrey, 2003]. El número de aislamientos de SE PT4 de acuerdo a datos de la Agencia de Protección de la Salud (HPA) del Reino Unido. Ha disminuido de 15,564 en 1990 a 581 en el 2009 [HPA, 2010].

Los fago tipos de SE más frecuentemente aislados en los Estados Unidos durante los 80 fueron los fago tipos 8 y 4 [Altekruse *et ál.*, 1993; Thorns, 2000]. Durante los



años 1991- 1995 SE se aisló en un 35% de las gallinas ponedoras, y en 1999 en un 7%, probablemente como resultado de la mejora de la bioseguridad en las explotaciones agrícolas [Braden, 2006].

Las infecciones experimentales de las gallinas por vía intravenosa, han demostrado que el ovario y los folículos preovulatorios son colonizados con una frecuencia significativamente mayor por SE en comparación con los demás serotipos empleados (incluido ST). En un estudio realizado por Okamura *et ál.*, (2001a, b) observaron que el único serotipo encontrado en los componentes del huevo es SE. El éxito de SE en la transmisión transovárica puede estar asociado con la presencia, para este serotipo, de las fimbrias *SEF14* (que podrían estar implicadas en la colonización de los órganos reproductores) y del gen *yafD* (esencial para la resistencia en la albúmina) [Messens, 2005]. El aumento de la sobrevivencia de SE a 42°C y la producción de lipopolisacáridos que ayuda específicamente a la persistencia en el huevo, le confiere a SE una mayor capacidad de infectar de manera eficiente los huevos [EFSA, 2010b].

### **Salmonella Typhimurium y el huevo**

Tradicionalmente, ST ha sido el serotipo predominante de *Salmonella* implicado en los brotes relacionados con huevos. El predominio de ST en los huevos de gallina es bajo [Philbrook, 1960; Chapman *et ál.*, 1988].

ST tiene más de 80 fago tipos involucrados en los brotes por ETA'S, y estos se caracterizan normalmente, por tener una amplia gama de hospederos [Rabsch *et ál.*, 2002]. Algunos brotes de salmonelosis en humanos relacionados con huevo causados por ST se han reportado en la Unión Europea (3.5% frente a 77.2% causado por SE). Durante la década de los 90 ST fago tipo 104 se extendió en todo el mundo y es ahora común en la población animal, incluyendo a las aves de corral de muchos países. En el Reino Unido este fago tipo alcanzó su punto máximo en 1996 y ha disminuido desde entonces [Helms *et ál.*, 2005]. ST fago tipo 104 no parece infectar a las gallinas ponedoras, incluso cuando los huevos o los equipos de manipulación del huevo están infectados por este microorganismos. En condiciones experimentales se ha demostrado que este fago tipo es capaz de infectar los componentes del huevo con cáscaras intactas [Williams *et ál.*, 1998]. Okamura *et ál.*, reportaron una baja capacidad de que ST fago tipo 104 cause contaminación en huevos. Sin embargo, un aumento en el riesgo de contaminación por ST fago tipo 104 se ha observado si las gallinas se infectaron en el momento de la puesta [Okamura *et ál.*, 2010].

Ciertos fago tipos de ST, como DT2 y DT99, se han adaptado a sus hospederos: las aves silvestres, y la infección en gallinas ponedoras con estas cepas, es normalmente de corta duración. Estos fago tipos se han encontrado en aves de

corral (distintas a las ponedoras) y ocasionalmente en los lugares de la puesta como resultado de la contaminación de los piensos por los excrementos de sus hospederos [EFSA, 2010a].

Estudios realizados por Keller *et ál.*, (1997) y Gantois *et ál.*, (2008) han sugerido que SE y ST pueden tener el mismo potencial para colonizar el tracto reproductor de las gallinas y así infectar los huevos. Sin embargo, solo SE fue aislado de los huevos después de la puesta. Un resultado similar se obtuvo inoculando por vía oral e intravenosa a las gallinas con ST, observando que este patógeno no produce una contaminación en el interior ni en la superficie de los huevos puestos [Baker *et ál.*, 1980]. Okamura *et ál.*, (2001a) reportaron que después de una infección intravenosa de gallinas con ST, todos los huevos puestos fueron negativos para ST. Los mismos autores reportaron una inoculación vaginal que produce huevos positivos con ST [Okamura *et ál.*, 2001b]. También se demostró que ST puede persistir en la albúmina de huevo durante la formación del huevo, y que resiste la acción de la lisozima mejor que SE [Gantois *et ál.*, 2008].

Existen algunos reportes sobre la transmisión vertical de ST. Cox *et ál.*, (1973) reportaron un bajo nivel de contaminación en huevos (menor al 10%) por gallinas infectados con ST vía oral. Otro estudio realizado por Cason *et ál.*, (1993), inoculando ST por inmersión en un cultivo concentrado del patógeno durante la incubación de huevos fértiles con pollos de engorde a 42°C, encontraron que el 100% de las cáscaras y de las membranas de los huevos fueron ST positivos en 30 minutos después de la inoculación, pero solo el 38% eran todavía positivos después de 17 a 21 días de la inoculación. La mayoría de los pollos de engorde fueron negativos a ST aun cuando se detectó la presencia de ST en cáscaras y membranas del huevo. Durante otro estudio, se reportó que ST es capaz de penetrar la cáscara y las membranas del huevo e infectar a los embriones. Estos autores observaron que el patógeno se halló en el tracto digestivo de los embriones [Cason *et ál.*, 1994].

Los resultados de la vigilancia voluntaria en muestras de huevos en el Reino Unido durante el periodo 2003- 2010 muestran que ST se aisló solo cuatro veces, tres veces de los componentes de los huevos de pato y una vez de las cáscara de los huevos de gallina. SE fue aislado de huevos de gallina seis veces, cuatro de las cáscaras y dos de los contenidos del huevo. Otros serotipos fueron aislados cinco veces de los huevos de gallina, tres de los contenidos del huevos (*S. Pullorum*, *S. Liverpool* y *S. Montevideo*) y dos de las cáscaras (*S. Senftenberg*) [Martelli y Davies, 2012]. La información sobre la fuente de los huevos no está disponible.

Los brotes por ST debido al consumo de huevos están reportados en la literatura. En el periodo entre 1984 y 1995 se registraron 12 brotes en Gran Bretaña. Los brotes ocurridos en Francia e Italia por ST se han asociado al consumo de huevos

[Scuderi *et ál.*, 1996; Carraminana *et ál.*, 1997; Greig y Ravle, 2009]. ST afásica (que no expresa ninguna de las fases del antígeno flagelar H) en los huevos ha causado un gran brote en Francia en 2009 [AFSSA, 2009] y el fago tipo DT8 en huevos de pato contaminados ha causado importantes brotes de salmonelosis en humanos en Inglaterra, Irlanda del Norte y Éire [HPA, 2010b]. En Australia, donde SE no es endémica en parvadas de gallinas ponedoras, los brotes de salmonelosis por consumo de huevos involucran, en su mayoría, a ST, siendo las cáscaras de los huevos un problema reconocido [Fullerton, 2008]. En Europa SE ha sido reportado en su mayoría, como la causa de salmonelosis por ingesta de huevos (40.9% del total), mientras que ST se asocia principalmente a brotes por consumo de carne de cerdo (7.1% del total). En los brotes de salmonelosis de origen alimentario en 2008, la carne de cerdo era el vehículo reportado en 3.9% de los brotes verificados. En particular, la carne de cerdo podría haber contribuido al reciente aumento significativo de los casos de ST en humanos en los países de la Unión Europea [EFSA, 2010b].

### **Otros serotipos de *Salmonella* y el huevo**

Otros serotipos de *Salmonella* como, *S. Mbandaka*, *S. Livingstone*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Infantis* y *S. Virchow* también se han encontrado en gallinas ponedoras y en las superficies del huevo, aun cuando la frecuencia de su detección es baja [Chemaly *et ál.*, 2009]. Su incidencia varía mucho entre países [Poppe *et ál.*, 1992; Snow *et ál.*, 2007].

En un estudio sobre la colonización de los órganos reproductivos de las gallinas por diferentes serotipos, seguido de una infección intravenosa, solo SE y *S. Hadar* fueron encontrados en 15.8 y 10% respectivamente, en los huevos. Los otros serotipos (*ST*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg* y *S. Montevideo*) no se encontraron en la cáscara o en los contenidos del huevo [Okamura *et ál.*, 2001a]. Cuando las mismas cepas se inocularon artificialmente en gallinas por vía intravaginal con una alta concentración, el porcentaje de huevos contaminados (ya sea en la cáscara o en los contenidos) para SE, *ST*, *S. Infantis*, *S. Montevideo*, *S. Heidelberg* y *S. Hadar*, fueron respectivamente, 27.6, 3.1, 6, 9.4, 4.5 y 4.9%. Los contenidos de los huevos fueron contaminados solamente con SE (7.5%) y *ST* (3.1) [Okamura *et ál.*, 2001b]. En ambos estudios, las aves se inocularon con  $5 \times 10^6$  UFC [Okamura *et ál.*, 2001a, b]. En condiciones de granja, las aves entran en contacto con un menor número de microorganismos, y existe una correlación positiva entre el grado de contaminación del medio ambiente y el nivel de contaminación de los huevos [Gales *et ál.*, 2007].

En los Estados Unidos, los brotes de salmonelosis por consumo de huevos con *S. Heidelberg* han sido reportados, coincidiendo con el aumento de la prevalencia de este serotipo en las parvadas de aves de corral en los últimos años [Foley y

Lynne, 2008]. En gallinas inoculadas vía oral, *S. Heidelberg* fue capaz de colonizar los órganos reproductores y contaminar los huevos. La incidencia de la contaminación interna del huevo durante este estudio fue mayor para SE que para *S. Heidelberg* [Gast *et ál.*, 2007]. En un estudio con gallinas inoculadas vía intravenosa, se demostró que *S. Heidelberg* era capaz de sobrevivir en la albumina durante la formación del huevo, mientras que *S. Virchow* y *S. Hadar* no sobreviven [Gantois *et ál.*, 2008]. En otro estudio sobre la prevalencia de los distintos serotipos de *Salmonella* en los ovarios de gallinas de desecho en los Estados Unidos, el serotipo más frecuentemente detectado fue *S. Heidelberg* (56%), seguido de *S. Agona* (13%), *S. Oranienburg* (6.1%), *S. Mbandaka* (5.2%), *S. Kentucky* (3.5%), *S. Montevideo* (3.5%) and *S. London* (2.6%), y SE (2.4%) [Barnhart *et ál.*, 1991].

Se han realizado estudios para investigar la capacidad de *S. Virchow* para penetrar a través de la cáscara y multiplicarse dentro del huevo [Neill *et ál.*, 1985; Lublin y Sela, 2008]. El primer estudio llevado a cabo, confirmó la capacidad de *S. Virchow* para penetrar la cáscara del huevo [Neill *et ál.*, 1985], mientras que en la segunda penetración no se observó. Durante la infección experimental del contenido del huevo, *S. Virchow* fue capaz de multiplicarse en grandes cantidades en huevos almacenados a temperatura ambiente. En el almacenamiento a 6°C, *S. Virchow* sobrevivió durante 6 semanas, después de las cuales la disminución de la concentración disminuyó por debajo del nivel de detección [Lublin y Sela, 2008].

En algunos casos, los brotes por salmonelosis en humanos debido al consumo de huevos, se le han atribuido a los distintos serotipos de *Salmonella*. En un estudio publicado recientemente, de un total de 4,093 informes de brotes de origen alimentario a nivel internacional durante el periodo de 1996-2005, el 46.9% se debieron a *Salmonella*. De ellos, 513 eran por consumo de huevo. El número de huevos relacionado con serotipos distintos de SE y ST fueron 70 (de los cuales 39 en Europa y 23 en Estados Unidos). ST se vinculó a 47 brotes relacionados con huevo (de los 31 en Australia y Nueva Zelanda) y SE en 396 (de los cuales 326 en Europa). Los autores discuten el posible sesgo que se puede generar al atribuir las fuentes del alimento con los informes de los brotes, sin embargo, consideran estos resultados confiables [Greig y Ravel, 2009].

En el periodo de 1984 a 2009, seis brotes de salmonelosis por huevo fueron vinculados por estos serotipos en Inglaterra y Gales [Martelli y Davies, 2012].

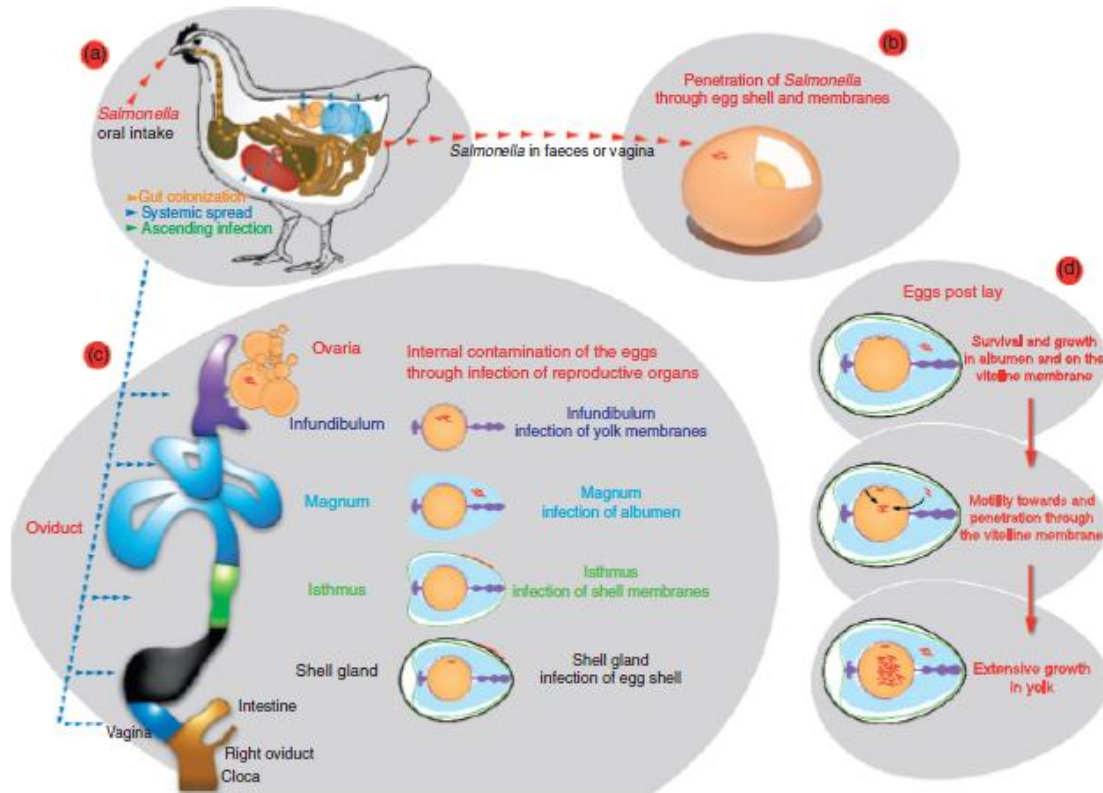
# MECANISMOS DE CONTAMINACIÓN DEL HUEVO

Generalmente, hay dos posibles vías de contaminación de los huevos por *Salmonella*. Los huevos pueden estar contaminados por la penetración a través de la cáscara de los huevos, ya sea porque el intestino este colonizado con este patógeno o por contaminación con heces durante o después de la oviposición (transmisión horizontal) [Messens *et ál.*, 2005b; De Reu *et ál.*, 2006]. La segunda vía es por la contaminación directa de las membranas de la cáscara del huevo, de la yema, de la albúmina o cáscaras de huevos antes de la oviposición, debido a la infección de los órganos reproductivos con SE (transmisión vertical) [Timoney *et ál.*, 1989; Keller *et ál.*, 1995; Miyamoto *et ál.*, 1997; Okamura *et ál.*, 2001a, b]. La figura 38 muestra una representación esquemática de la patogénesis del huevo. Aun no está claro cuál es la ruta más importante para SE de contaminar el contenido del huevo. Algunos autores afirman que la transmisión horizontal es la forma más importante de contaminar los huevos [Barrow y Lovell, 1991; Bichler *et ál.*, 1996], aunque la mayoría de los autores afirman que la transmisión vertical es la vía más importante [Gast y Beard, 1990; Miyamoto *et ál.*, 1997; Guard-Petter, 2001].

## **Transmisión horizontal**

Después de la oviposición, cualquier contaminación en el área de la puesta de huevos, tales como el ambiente durante la oviposición, el polvo, el nido de las aves y el ambiente durante la incubación, puede conducir a la contaminación de la superficie del huevo. La presencia de heces de las aves y de materia orgánica húmeda facilitan la supervivencia y el crecimiento de *Salmonella*, proporcionándole los nutrientes necesarios y un cierto grado de protección física. Estudios donde las cáscaras de los huevos son contaminados artificialmente con heces que contienen *Salmonella* y posteriormente se almacenan a 25°C, han demostrado que el crecimiento de la bacteria aumenta de 1 a 2 ciclos logarítmicos por día y de 4 a 5 ciclos durante los primeros tres días de almacenamiento [Schoeni *et ál.*, 1995]. Tal crecimiento indica que las heces pueden servir como una fuente de nutrientes para *Salmonella*. Sin embargo, *Salmonella* también puede sobrevivir y crecer en la cáscara del huevo en ausencia de contaminación fecal, especialmente si la temperaturas y la humedad relativa se mantienen bajas [Messens *et ál.*, 2006]. El que *Salmonella* pueda sobrevivir más tiempo a temperaturas bajas se debe, a su lento metabolismo inducido por las condiciones desventajosas en la superficie de la cáscara del huevo [Radkowski, 2002]. La superficie del huevo también puede

contaminarse durante la formación de la cáscara [Humphrey et ál., 1991a] como se revisará más adelante.



**Figura 38.** Patogénesis de la contaminación de los huevos por *Salmonella*. (a) *Salmonella* entra al tracto intestinal de la gallina por vía oral. Las bacterias que llegan a colonizar el lumen intestinal son capaces de invadir las células epiteliales del intestino. Como consecuencia, las células inmunitarias, más específicamente, los macrófagos son atraídos al sitio de la invasión y engloban a la bacteria. Esto permite que *Salmonella* pueda sobrevivir y multiplicarse en el medio ambiente intracelular del macrófago. Estos macrófagos infectados migran a los órganos internos, tales como los órganos reproductivos (propagación sistémica). Además de esta propagación, las bacterias también pueden acceder al oviducto a través de la cloaca. (b) Una posible vía de contaminación del huevo es por la penetración de *Salmonella* a través de la cáscara y membranas de la cáscara por la contaminación de la superficie del huevo. Esta contaminación de la superficie de la cáscara puede ser el resultado de una infección vaginal o por contaminación fecal. (c) La segunda ruta posible es por la contaminación directa de la yema, albúmina, membranas de la cáscara y la cáscara del huevo procedentes de la infección del ovario, infundíbulo, magnum, istmo y útero, respectivamente. (d) *Salmonella* una vez dentro de la albúmina o en la membrana vitelina es capaz de sobrevivir y crecer a pesar de las condiciones antibacterianas del albumen y de la yema. Después de llegar a este punto, puede crecer y desarrollarse extensivamente. Fuente: Gantois et ál., 2009.

A pesar de las barreras físicas y químicas que posee el huevo, numerosos autores han demostrado la penetración del huevo por diversas bacterias, incluyendo a *Salmonella* [Williams et ál., 1968; Humphrey et al., 1989b, 1991a; Messens et ál.,

2005a]. Miyato *et ál.*, (1998a) observaron que después de exponer huevos recién puestos en una suspensión de *Salmonella* durante 2 horas a 25°C, las cáscaras y el interior del huevo estaban contaminados. Varios estudios han investigado los factores que afectan la probabilidad de la penetración bacteriana, entre estos factores se menciona que las cáscaras de huevos recién puestos son más susceptibles a la penetración dentro de los primeros minutos después de la oviposición [Sparks y Board, 1995; Padron, 1990; Miyamoto *et ál.*, 1998a]. Se ha sugerido que durante los primeros minutos del huevo, la cutícula se encuentra inmadura y algunos poros pueden encontrarse abiertos. Por otra parte, cuando el huevo es expuesto a un ambiente más frío que la temperatura corporal de la gallina (42°C), se puede desarrollar una presión negativa permitiendo que la migración de las bacterias a través de la cáscara y de las membranas sea más fácil [Board, 1966; Bruce y Drysdale, 1994; Consejo, 1996]. Se ha planteado la hipótesis de que cuando el huevo caliente se encuentra en un ambiente húmedo y frío, las condiciones son ideales para la penetración de la cáscara [Berrang *et ál.*, 1999].

Además, la cutícula en los huevos más viejos se deshidrata y se seca, lo que resulta en su contracción, y los poros se encuentran más expuestos a la penetración de las bacterias [Mayes y Takeballi, 1983]. En estudios recientes [De Reu *et ál.*, 2006; Messens *et ál.*, 2007] se informó que la deposición de la cutícula es importante para la prevención de la penetración, y en ausencia de la deposición, la penetración es un acontecimiento frecuente. Sin embargo, algunos investigadores [Nascimento *et ál.*, 1992; Messens *et ál.*, 2005b] no observaron ninguna correlación entre la deposición de la cutícula y la penetración de *Salmonella* a través de la cáscara del huevo. Además, se encontró que la penetración de las bacterias es independiente del número de poros [Nascimento *et ál.*, 1992; Messens *et ál.*, 2005b; De Reu *et ál.*, 2006].

La calidad de la cáscara se define por la gravedad específica o peso específico de la cáscara, se ha planteado la hipótesis de que este parámetro juega un papel importante en la penetración de bacterias en el huevo (Tablas 14, 15 y 16). La edad de la gallina es otro factor que afecta la calidad de la cáscara y su contaminación. Se ha visto mayor contaminación en aves de edad avanzada [Jones *et ál.*, 2002]. Se ha observado que los factores de estrés tales como el movimiento de las jaulas o la vacunación, también pueden afectar la calidad de la cáscara [Roberts y Brackpool, 1994].

Como se mencionó anteriormente, la temperatura también es un factor importante que afecta a la penetración. Cuando se crea una diferencia de temperatura positiva entre el huevo (caliente) y una suspensión de bacterias (frío), la penetración se hace evidente [Mayes y Takeballi, 1983; Bruce y Drysdale, 1994]. Se cree que un gradiente positivo de temperatura combinado con la presencia

de humedad, proporcionan una oportunidad ideal para que las bacterias penetren en la cáscara del huevo [Berrang, 1999].

El uso de diferentes modelos de penetración, las diferencias en las cepas bacterianas usadas, la diferencia del número de bacterias inoculadas, la temperatura y humedad relativa durante el almacenamiento y las características del huevo (calidad de la cáscara y edad del huevo) pueden explicar en gran parte los resultados contradictorios que se han observado en otros estudios sobre la penetración de la cáscara.

La superficie de las cáscaras de los huevos se puede contaminar prácticamente con cualquier microorganismo excretado por las aves. Por lo que se refiere a serotipos diferentes de SE, éste es el origen más importante de la contaminación. En las parvadas de gallinas ponedoras se pueden aislar varios serotipos diferentes del género *Salmonella*. Ebel *et ál.*, (1992) examinaron 23,431 muestras cecales mezcladas procedentes de gallinas agotadas recogidas en 406 establecimientos de ponedoras para determinar el predominio de *Salmonella* spp., y de SE. Se aisló *Salmonella* en el 24% de las muestras, y SE en el 3% de las muestras. El predominio global de las muestras positivas a *Salmonella* fue el 86%. Un estudio de 42 parvadas de gallinas ponedoras agotadas encontró que el 76% de las mismas era positivo a *Salmonella*, siendo *S. Heidelberg* la más frecuente (56.5%) de los 14 serotipos detectados [Barnhart *et ál.*, 1991].

Se ha demostrado que la penetración de las membranas de la cáscara y de la cáscara no es una característica exclusiva de SE, otros serotipos de *Salmonella*, e incluso otras bacterias, son capaces de atravesar estas barreras [Sauter y Petersen, 1969, 1974; Mayes y Takeballi, 1983; Jones *et ál.*, 2002; De Reu *et ál.*, 2006]. En un estudio, se comparó la penetración de distintas especies bacterianas seleccionadas originalmente de aislamientos en los contenidos del huevo, este estudio se evaluó usando dos diferentes modelos de penetración del huevo [De Reu *et ál.*, 2006]. Los resultados indican que el grupo de bacterias Gram negativo que presentan movilidad, son las bacterias capaces de penetrar la cáscara de huevo con mayor frecuencia. El uso de un modelo de agar (huevos con agar y sumergidos en una suspensión bacteriana) mostró que *Pseudomonas* spp. (60%), *Alcaligenes* spp. (58%) y SE (43%) atravesaron la cáscara de huevo con más frecuencia. Sin embargo, el uso de huevos intactos sumergidos en una suspensión bacteriana mostró que las especies que se encontraron en el interior de los huevos son SE (33%), seguido de *Carnobacterium* spp. (17.5%) y *Acinetobacter baumannii* (14.8%). Los resultados de ambos estudios sugieren que la contaminación interna del huevo por la penetración a través de la cáscara, puede ser por diversas especies bacterianas pero, que SE tiene mecanismos que permiten su supervivencia y/o crecimiento en el interior del huevo, en contraste con otras especies bacterianas. En un estudio en parvadas de gallinas ponedoras



infectados de forma natural, se encontró que los serotipos SE, ST y S. Hadar fueron aislados de las cáscaras de los huevos, pero solo SE se aisló del interior del huevo [Humphrey *et ál.*, 1991a]. Curiosamente, solo un huevo fue positivo en ambos sitios, lo que sugiere que la contaminación interna del huevo es más probable que ocurra durante la formación del huevo en lugar de que penetre a través de la cáscara. Por otra parte, la prevalencia relativa de los serotipos distintos a SE (50%) en muestras fecales de gallinas ponedoras no es consistente en comparación con la alta prevalencia de SE en huevos (90%) [EFSA, 2007a]. Todos estos datos apoyan la idea de que la penetración de la cáscara del huevo y de las membranas del huevo no son una propiedad específica de SE y que otras características de este serotipo están relacionados con la contaminación de los huevos. Éstas podrían incluir la capacidad de colonizar el tracto reproductivo de la gallina, la supervivencia y multiplicación en el interior de los huevos, los cuales podrían contribuir a la asociación epidemiológica de SE con los huevos.

Las parvadas de gallinas están frecuentemente infectadas con *Campylobacter jejuni*, y sería de esperar que este patógeno también se encontrara en la superficie de los huevos. Sin embargo, de 226 huevos procedentes de gallinas colonizadas experimentalmente y que excretaban de modo activo *C. jejuni*, solo dos fueron positivas [Doyle, 1984]. Parece ser que el microorganismo tiene escasa capacidad para penetrar en el albumen de los huevos de gallina o de pava [Acuff *et ál.*, 1982; Doyle, 1984; Neill *et ál.*, 1985; Shane *et ál.*, 1986; Shanker *et ál.*, 1986]. El microorganismo se extingue rápidamente debido a las condiciones de humedad y temperatura que existen en la superficie del huevo durante el almacenamiento [Kollowa y Kollowa, 1989]. Consiguientemente, los huevos almacenados son negativos a *Campylobacter* [Shane *et ál.*, 1986]. Si bien existe un informe de un brote de campilobacteriosis relacionado con el consumo de huevos frescos cocidos insuficientemente [Finch y Blake, 1985], generalmente se considera que la transmisión de este patógeno por medio de huevos es improbable [Bruce y Drysdale, 1994].

A pesar de que la albúmina tiene varias sustancias antimicrobianas, una vez que las bacterias entran en el huevo, existe evidencia de que pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo. Howard *et ál.*, (2006) demostraron que ST puede sobrevivir dentro del huevo y crecer durante ocho semanas de almacenamiento, incluso a temperaturas de refrigeración. En otros estudios Howard *et ál.*, (2007) inocularon SE en el contenido de los huevos y se observó la supervivencia y el crecimiento de la bacteria en condiciones de temperatura baja durante ocho semanas de almacenamiento. Aunque no se encontró evidencia de deterioro en la membrana vitelina, si se observó la supervivencia de SE en la albumina y en la membrana vitelina, y en algunos casos, no se presentó crecimiento alguno

[Howard *et ál.*, 2007]. Esta investigación apoya la necesidad de una refrigeración rápida y el mantenimiento de la cadena de frío durante el almacenamiento.

El ambiente de producción representa el otro origen de los microorganismos existentes en la superficie del huevo. Éste incluye el contacto con heces, el material de los nidales, el polvo, las materias primas de los piensos, los envases para el envío y almacenaje, los seres humanos y otras criaturas como los roedores. Los porcentajes de alteración son considerablemente mayores en los huevos procedentes de ambientes contaminados masivamente [Harry, 1963; Smeltzer *et ál.*, 1979]. Algunos huevos provienen de granjas familiares pequeñas, donde la recogida es manual. Sin embargo, los huevos se producen cada vez más en grandes instalaciones semiautomatizadas donde las gallinas están alojadas en jaulas individuales. En estas instalaciones, los huevos ruedan por gravedad desde las jaulas a las bateas. Se ha indicado que este tipo de enjaulado produce huevos con porcentajes de contaminación más bajos que los correspondientes a los huevos puestos en nidales [Harry, 1963; Quarles *et ál.*, 1970; Carter *et ál.*, 1973]. Después, los huevos se trasladan a mano a bandejas de papel prensado y poliestireno y se transportan en cajas para observarlos al trasluz y clasificarlos. La naturaleza y la cantidad de la contaminación de la cáscara variarán con arreglo al sistema de almacenaje y con arreglo al tiempo que transcurra hasta que se recogen los huevos. Cuanto antes se recogan los huevos después de la puesta, tanto más escasa será la contaminación de la cáscara, incluso en condiciones desfavorables [North, 1984].

Los nidales deben estar limpios y secos, y las superficies en contacto con las cáscaras deben estar secas y exentas de heces y de otra suciedad visibles [Joyce y Chaplin, 1978; Smeltzer *et ál.*, 1979; Tullet, 1990]. Puesto que los huevos salen de la cloaca y pasan junto al ano de la gallina, la exención total de materia fecal es imposible. Los nidales cubiertos de heces húmedas, las manos húmedas de las personas que recogen los huevos, la puesta de huevos en pisos sucios, y el material húmedo, favorecen en conjunto la penetración de las bacterias de la superficie en la cáscara. Un periodo de tiempo decisivo es cuando los huevos se están enfriando a partir de la temperatura inicial de 40-42°C.

El ambiente de la puesta puede ser un origen potencialmente importante de *Salmonella* en la superficie externa del huevo. Por ejemplo, Jones *et ál.*, (1995) aislaron *Salmonella* en el 73, 64, 100 y 100% de las muestras de cintas transportadoras de huevos, de personas que recogen los huevos, de los ventiladores de aireación, y del agua de lavado respectivamente. En comparación, solo proporcionaron *Salmonella* el 8% de las cáscaras de los huevos y ninguno de los contenidos internos antes de la recogida. En el ambiente de las instalaciones de producción de huevos y en la superficie de los huevos, ha sido aislado un grupo diverso de serotipos de *Salmonella*, que incluye *S. Agona*, *ST*, *S.*

Infantis, S. Derby, S. Heidelberg, S. California, S. Montevideo y S. Mbandak. Las primeras investigaciones citadas por Cantor y McFarlane (1948) incluyeron a S. Thompson, ST, S. Bareilly, S. Oranienburg, S. Montevideo, S. Tennessee, S. Derby, S. Essen, y S. Worthington entre los serotipos aisladas en las cáscaras de huevos. Poppe *et ál.*, (1991) descubrieron que el 53% de los establecimientos canadienses productores de huevo seleccionados al azar tenía ambientes positivos a *Salmonella* mientras, que concretamente, el nivel correspondiente a SE era el 3%. Barnhart *et ál.*, (1991) averiguaron que, si bien el 76% de los establecimientos de ponedoras era positivo a *Salmonella*, solo el 2.4% de las aves muestreadas de estos establecimientos tenía los ovarios contaminados con *Salmonella*.

La desinfección eficaz de las instalaciones de producción, el control de roedores y otras plagas, la cloración del agua de bebida y la prevención de la contaminación cruzada se encuentran entre los factores que interrumpen la transmisión de SE a las parvadas futuras en una instalación de producción [McIlroy *et ál.*, 1989; O'Brien, 1990; Dawson, 1992; Edel, 1994; Giessen *et ál.*, 1994; Mason, 1994; Davies y Wray, 1995; Wierup *et ál.*, 1995]. La evaluación periódica del ambiente de puesta por lo que se refiere a SE ha sido utilizada en varios de estos programas de control para identificar las mandas infectadas.

### **Transmisión vertical**

Varias son las líneas de investigación que apoyan la idea de que la contaminación por SE en el huevo es más probable durante su formación en los órganos reproductivos que por la penetración de la cáscara de huevo, sobre todo porque se ha aislado a SE del tejido reproductivo de aves infectadas, en ausencia de colonización intestinal [Lister, 1988]. Además, SE parece ser capaz de sobrevivir en los tejidos reproductivos de gallinas infectadas de manera natural y experimentalmente. Cuando las infecciones son producidas por cepas de salmonelas invasoras, los macrófagos infectados migran hacia los órganos internos del ave y particularmente hacia los tejidos reproductivos: ovario, infundíbulo, magnum, istmo y glándula de la cáscara, indicando que la bacteria puede establecerse intracelularmente y escapar de los mecanismos de defensa del huésped. La presencia de *Salmonella* en los huevos, es consecuencia de la colonización de los tejidos reproductivos en gallinas ponedoras infectadas [Keller *et ál.*, 1995; Methner *et ál.*, 1995; Gast y Holt, 2000a].

Como se vio en el capítulo anterior, el oviducto se divide en cinco regiones funcionales, a partir del ovario: infundíbulo, magnum, istmo, útero y vagina. El infundíbulo captura el folículo ovulado, el magnum produce la albumina, el istmo forma las membranas de la cáscara del huevo, el útero forma la cáscara y la vagina está involucrada en la oviposición. Cuando *Salmonella* coloniza el oviducto, se podría incorporar en la albumina, membranas de la cáscara o en la

propia cáscara de huevo, dependiendo del sitio de la colonización (magnum, istmo, y útero respectivamente). Aunque SE ha sido aislada de la yema y de la albumina, de acuerdo con la mayoría de los autores, la albumina es más frecuentemente contaminada señalando el tejido del oviducto como el sitio de colonización [Gast y Beard, 1990; Humphrey *et ál.*, 1991a; Keller *et ál.*, 1995; Miyamoto *et ál.*, 1997; De Buck *et ál.*, 2004c], persistiendo allí de por vida sin dañar a la gallina. Sin embargo, cuando la yema se encuentra contaminada, se ha sugerido que el ovario es el sitio de colonización [Bichler *et ál.*, 1996; Gast y Holt, 2000a; Gast *et ál.*, 2002].

La isla de patogenicidad isla-2 (SPI-2) de *Salmonella*, es esencial en la capacidad de propagarse dentro del huésped y para causar una infección sistémica [Jones *et ál.*, 2001], esta isla se relaciona con la capacidad de la bacteria de sobrevivir en el interior de los macrófagos y de multiplicarse. El uso de una mutante por delección en el regulador de SPI-2 (*ssrA*), demostró que después de la infección por vía intravenosa de las gallinas ponedoras, el número de bacterias de la mutante *ssrA* eran significativamente menor en los oviductos y los ovarios en comparación con la cepa no mutada. Estos bajos números para la mutante en los órganos reproductores, apuntan a un papel para SPI-2 en la propagación o la colonización del tejido reproductivo [Bohez *et ál.*, 2008]. Se ha demostrado que la colonización de los órganos reproductivos también es una consecuencia de la diseminación sistémica después de una infección transmitida por vía aérea [Baskerville *et ál.*, 1992; Leach *et ál.*, 1999]. Se observó que la tasa de contaminación en los huevos era más alta después una infección por aerosoles que por vía oral en las gallinas ponedoras [Leach *et ál.*, 1999].

### **Colonización del ovario**

La invasión e infección de los ovarios puede originar la transmisión de SE al folículo, mientras que la infección del oviducto conduce a la deposición de microorganismos en el albumen. Las infecciones experimentales de gallinas con SE dieron como resultado la producción de huevos contaminados [Humphrey *et ál.*, 1989; Gast y Beard, 1990; Gast, 1994]. Parece ser que las infecciones del ovario de la gallina son actualmente más frecuentes. Las infecciones tienen como consecuencia la producción de huevos que se infecten o bien en el ovario o durante el tránsito del ovulo desde el ovario a lo largo del infundíbulo y oviducto antes que se formen la cáscara y sus membranas [Gast y Bard, 1990; Barnhart *et ál.*, 1991; Clay y Board, 1991; Baskerville *et ál.*, 1992].

Se ha observado que, la permeabilidad de los endotelios vasculares en el ovario, puede contribuir a la colonización de este sitio [Griffin *et ál.*, 1984]. Numerosos estudios experimentales indican que el ovario es más colonizado por SE que en el oviducto [De Buck *et ál.*, 2004b; Gantois *et ál.*, 2006; Gast *et ál.*, 2007], por lo tanto,

SE debe ser capaz de interactuar con las células de los folículos preovulatorios, siendo capaz de invadir y multiplicarse en estas células. Se ha demostrado que SE se puede unir a las células de la granulosa del folículo mediante diferentes mecanismos de adhesión [Thiagarajan *et ál.*, 1994]. Los altos números de bacterias en las membranas de los folículos preovulatorios, en comparación con la propia yema, sugieren que durante la transmisión transovárica, SE permanece unida a las membranas del vitelio del huevo. Un estudio previo ha sugerido también, que la contaminación de la yema se asocia con más frecuencia a la membrana vitelina que con los componentes de la yema [Gast y Beard, 1990; Gast y Holt, 2000a]. Se ha observado *in vitro* que la unión de SE a las células de la granulosa puede implicar la adhesión a la fibronectina (glicoproteína presente en el fluido folicular) [Thiagarajan *et ál.*, 1996a]. Por otra parte, se propuso que las fimbrias tipo 1 tienen un papel importante en el proceso de la adhesión [Thiagarajan *et ál.*, 1996a]. Esta evidencia ha sugerido que las fimbrias tipo 1 contribuyen a la colonización de las células de la granulosa [Thiagarajan *et ál.*, 1996a]. Howard *et ál.*, (2005) encontraron que los folículos inmaduros blancos son mucho más susceptibles a la invasión de SE que los más maduros, que son de color amarillo, tanto sean estos pequeños como grandes; la penetración de los folículos inmaduros puede llevar a la contaminación de los huevos después de la maduración, lo que significa que unas pocas gallinas de un lote pueden tener una infección transovárica de los huevos que persiste durante todo el ciclo reproductivo. Sin embargo, este argumento es cuestionable, ya que no todos los folículos blancos madurarán y los altos niveles de nutrientes disponibles en los folículos permiten la colonización e invasión, por lo tanto, es de esperar que esto conduzca a una mayor reproducción de las bacterias, que resultaría en la degeneración del folículo. [Kinde *et ál.*, 2000]. Dawoud *et ál.*, (2011) utilizaron un ensayo similar para evaluar la invasión del folículo por diferentes cepas de SE. Este estudio determinó que todas las cepas de SE fueron capaces de invadir los folículos después de 2 horas con una media porcentual de invasión del 0.016 a 0.034% en comparación con el 0.0003% de la cepa control negativa: *E. coli* K12.

El hecho de que *Salmonella* pueda interactuar con las células de los folículos preovulatorios, plantea la cuestión de si el serotipo Enteritidis posee algunas características intrínsecas que le permitan interactuar específicamente con estas células y, como consecuencia, transmitirse a los huevos. En un estudio, se demostró que entre seis serotipos de *Salmonella* inoculados vía intravenosa, SE colonizó los ovarios y los folículos preovulatorios en una mayor frecuencia que los otros cinco serotipos [Okamura *et ál.*, 2001a y b]. Gantois *et ál.*, (2008c) obtuvieron resultados similares en un modelo de infección por vía intravenosa, lo que demuestra la afinidad del serotipo Enteritidis por el ovario en comparación con otros serotipos de *Salmonella* (Hadar, Virchow e Infantis), excepto para ST. El

hecho de que SE y ST puedan ser igualmente capaces de colonizar el ovario va de acuerdo con los datos obtenidos por Keller *et ál.*, (1997).

Un estudio a gran escala utilizando múltiples cepas de serotipos de *Salmonella* debe llevarse a cabo con el fin de proporcionar más información acerca de los serotipos que pueden colonizar e invadir el ovario.

### **Colonización del oviducto**

Aunque varios estudios informaron que la membrana vitelina es el sitio más común de contaminación por *Salmonella* [Bichler *et ál.*, 1996; Gast y Holt, 2000a; Gast *et ál.*, 2002], otros autores apuntan a la albúmina como el sitio principal de contaminación en los huevos [Shivaprasad *et ál.*, 1990; Humphrey *et ál.*, 1991b; Keller *et ál.*, 1995], lo que indica que SE está colonizando los tejidos del oviducto. Miyamoto *et ál.*, (1997) observaron que los huevos en formación en un oviducto altamente contaminado es muy probable que sean positivos a *Salmonella*. La colonización del tracto reproductivo puede ser el resultado de una infección ascendente desde la cloaca [Reiber *et ál.*, 1995; Miyamoto *et ál.*, 1997], una infección descendente del ovario [Keller *et ál.*, 1995] y/o una propagación sistémica de *Salmonella*. Dependiendo del sitio de la contaminación, *Salmonella* se puede incorporar en cualquiera de los componentes del huevo.

### **Colonización de la vagina**

Varios autores se han centrado en el papel de la vagina en la producción de huevos contaminados con SE [Barrow y Lovell, 1991; Keller *et ál.*, 1995; Reiber *et ál.*, 1995; Miyamoto *et ál.*, 1999; Okamura *et ál.*, 2001a, b; Mizumoto *et ál.*, 2005]. Se cree que la infección intravaginal tiende a ascender solamente a las partes más bajas del oviducto y rara vez *Salmonella* es aislada desde el ovario y el oviducto superior cuando se inoculan por vía intravaginal [Miyamoto *et ál.*, 1997, 1998b; Okamura *et ál.*, 2001a, b]. Estos estudios se obtuvieron de huevos con alta contaminación después de la infección intravaginal, lo que indica un alto riesgo de contaminación (principalmente en la cáscara de huevo) cuando el huevo pasa a través de la vagina colonizada. Cuando el huevo es puesto, la penetración de la cáscara puede ocurrir, debido a la succión o aspiración de los microorganismos en los huevos por la presión negativa causada por el enfriamiento del huevo [Schoeni *et ál.*, 1995; Miyamoto *et ál.*, 1998a]. En un estudio comparativo con seis serotipos de *Salmonella*, se recuperó SE de la vagina a un nivel que es significativamente mucho más alto que el de los otros serotipos después de la inoculación intravaginal [Miyamoto *et ál.*, 1998a]. Los autores sugieren una mayor capacidad del serotipo Enteritidis para colonizar el epitelio vaginal. Aparentemente la invasividad de los serotipos está vinculada con el tipo

de LPS, siendo el tipo O9 (SE) el más invasivo seguido del tipo O4 (ST, *S. Heidelberg* y *S. Agona*) O7 (*S. Montevideo* y *S. Infantis*) y O8 (*S. Hadar*) [Mizumoto *et ál.*, 2005].

### **Colonización del Istmo y magnum**

Es evidente que los diferentes segmentos del oviducto pueden ser colonizados por SE. Utilizando diferentes modelos de infección, las glándulas tubulares del istmo fueron identificadas como el sitio de colonización predominante de SE en el oviducto [De Buck *et ál.*, 2004a]. La colonización del istmo puede dar lugar a la contaminación de las membranas de la cáscara de huevo. Estas observaciones están de acuerdo con otros estudios experimentales [Bichler *et ál.*, 1996; Miyamoto *et ál.*, 1997; Okamura *et ál.*, 2001a, b]. En principio, la contaminación de las membranas de la cáscara de huevo también puede ser una consecuencia de la penetración de *Salmonella* después de la deposición de la cáscara durante el paso a través de la vagina en lugar de contaminación directa de las membranas de la cáscara durante su paso por el istmo.

Numerosos estudios sugieren que SE migra con más frecuencia hacia la albúmina a través del oviducto superior [Gast y Beard, 1990; Hoop y Pospischil, 1993; Humphrey y Whitehead, 1993; Schoeni *et ál.*, 1995]. Recientemente, las habilidades de invadir y o proliferar el istmo y las células del magnum por diferentes serotipos de *Salmonella*, se evaluó a través de un cultivo de las células epiteliales del istmo y del magnum. Todos los serotipos probados fueron igualmente capaces de invadir y proliferar en las células epiteliales del istmo y del magnum, lo que sugiere que la invasión y proliferación de las células del oviducto no es una característica única de SE [Gantois *et ál.*, 2008c]. Gantois *et ál.*, (2008c), han demostrado también que SE y ST colonizaron en niveles más altos el oviducto que las otras serovariedades de *Salmonella* (*Heidelberg*, *Virchow* y *Hadar*). Esto está de acuerdo con un estudio realizado por Okamura *et ál.*, (2001a y b), en donde la infección por vía intravenosa demuestra que de los seis serotipos de *Salmonella*, solo SE y ST fueron capaces de colonizar los órganos reproductores en 4 y 7 días después de la inoculación.

Pollos de una año de edad infectados por vía oral con *S. Pullorum*, produjeron una gran cantidad de huevos contaminados (6.55%) durante el periodo de madurez sexual como consecuencia de la colonización de los órganos reproductores [Wigley *et ál.*, 2001]. Los aislamientos de SE y *S. Pullorum*, junto con *S. Gallinarum* y *S. Dublin*, forman un grupo de cepas que comparten el mismo tipo de antígeno del LPS (O1, 9, 12, características del serogrupo D). Un análisis comparativo del genoma de SE y *S. Gallinarum* indicó que estos serotipos son altamente relacionados y que *S. Gallinarum* puede ser descendiente directo de SE [Thomson *et ál.*, 2008].

## Factores de virulencia durante la colonización del oviducto

Con el fin de obtener una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que permiten que el serotipo Enteritidis pueda interactuar con el tracto reproductivo de la gallina y adaptarse a ese nicho ecológico particular, se llevó a cabo un estudio utilizando la tecnología de expresión *in vivo*, para identificar los genes expresados en el oviducto [Gantois *et ál.*, 2008b]. Este estudio identificó los genes implicados en la integridad de la pared celular, la regulación de operones fimbriales, metabolismo de aminoácidos y ácidos nucleicos, la respuesta al estrés y la motilidad durante la colonización del aparato reproductivo. Esto indica que el oviducto es un ambiente estresante y perjudicial para *Salmonella*, pero también indica que las bacterias pueden contrarrestar esto, permitiendo que puedan sobrevivir en este ambiente hostil y/o escapar de las defensas del huésped.

Las fimbrias son un factor que juegan un papel muy importante durante la adherencia de SE [De Buck *et ál.*, 2003, 2004b; Li *et ál.*, 2003]. La fimbria tipo 1 presente en *Salmonella* y en toda la familia de las enterobacterias, se ha descrito como la estructura que promueve la adhesión bacteriana y la invasión a las células. Li *et ál.*, (2003) fueron los primeros en identificar los sitios de unión de las fimbrias de SE en el oviducto de la gallina. La unión de las fimbrias tipo 1 se da principalmente en el infundíbulo y esta unión es a través de los glicoesfingolípidos y los gangliósidos de la mucosa del oviducto. De Bruck *et ál.*, (2003) demostraron que SE puede adherirse a las secreciones del oviducto. Estos autores mostraron que el receptor de adhesión también se localiza en las células tubulares del istmo y la adhesión se bloquea por la adición de manosa, lo que indica que la adherencia esta mediada por las fimbrias tipo 1 (manosa sensibles). Un estudio mostró que el gen *fimZ*, gen involucrado en la expresión del gen *fimA* (gen que codifica las diferente subunidades estructurales de las fimbrias tipo 1) se indujo durante la incubación a 42°C en la albúmina. Esto puede significar que cuando *Salmonella* se encuentra en el lumen del oviducto, en presencia de albumina, la transcripción de las fimbrias tipo 1 se activa, lo que resulta en la unión bacteriana a las células secretoras [Gantois *et ál.*, 2009].

Existen evidencias de que el LPS es también de particular importancia para la persistencia de SE en los tejidos del tracto reproductivo. El LPS es un componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y un patrón molecular para el reconocimiento por el sistema inmune innato. Por lo menos dos funciones diferentes se le han atribuido a los LPS con respecto a la infección del tracto reproductivo. Se ha sugerido que la composición de los LPS es importante en la supervivencia de SE dentro de los macrófagos y de las células aviares y en sitios donde SE puede residir en el oviducto [He *et ál.*, 2006]. Los diferentes niveles de unión, en diferentes serotipos de *Salmonella* en células vaginales, posiblemente también implican el papel de la estructura del LPS [Mizumoto *et ál.*,



2005]. Además, se ha demostrado que el alto peso molecular del LPS en SE se correlaciona con el aumento de la contaminación de los huevos [Guard-Petter *et ál.*, 1997]. Aunque el papel exacto del LPS de alto peso molecular no se conoce todavía, su presencia se ha correlacionado con una patología inusual del tracto reproductivo, aunque esto no se refleja en la contaminación del huevo [Parker *et ál.*, 2002].

Los sistemas de secreción tipo III -1 y -2 (T3SS T3SS-1 y -2) también desempeñan un papel importante en la contaminación de huevos. T3SS-1 está asociado con la invasión del epitelio intestinal [Zhou *et ál.*, 1999], mientras que T3SS-2 es responsable de la infección sistémica mediante la supervivencia intracelular de *Salmonella* en los macrófagos. Li *et ál.*, (2009) fueron los primeros en confirmar el papel patogénico de T3SS-1 y T3SS-2 en la invasión y supervivencia intracelular de SE en las células epiteliales del oviducto en pollos. Las funciones de T3SS-1 Y T3SS-2 también son requeridos por serotipos distintos a Enteritidis para invadir y sobrevivir dentro de las células epiteliales del oviducto en pollos [Jones *et ál.*, 2002], además un estudio reciente sugiere que la inactivación de *ssrA*, un regulador de T3SS-2, mostró que SE es incapaz de colonizar el tracto reproductivo en pollos [Bohez *et ál.*, 2008]. Los genes que codifican el T3SS se localizan en la isla de patogenicidad 1.

Las proteínas universales del estrés (*usp*) son componentes importantes de la resistencia de bacterias al estrés y en general se expresan en condiciones que afecten negativamente su crecimiento, pero la forma en que confieren dicha resistencia aun se desconoce [Sousa y McKay, 2001; Gustavsson *et ál.*, 2002]. Estudios en SE han identificado dos *usps* (*uspA*, *uspB*) [Raspoet *et ál.*, 2011], la producción de estas proteínas parece ser estimulada por las condiciones del oviducto. Raspoet *et ál.*, (2011) demostraron la presencia de estas proteínas después del contacto con la albumina de huevo. Estos autores inocularon cepas mutantes de *uspB* y *uspBA* vía intraoviducto en gallinas, observando una disminución en la colonización del magnum e istmo, órganos que producen la albumina y las membranas de la cáscara y por lo tanto, una disminución en la capacidad para contaminar huevos. El estudio demostró que los promotores de los genes *uspA* y *uspB* fueron activados durante la colonización del oviducto y en los huevos, lo que sugiere un papel para estos genes en la colonización y contaminación de los huevos. La transcripción de estas proteínas se induce durante la inhibición del crecimiento por una variedad de condiciones de estrés, incluyendo la necesidad de nutrientes, calor, estrés oxidativo y choque osmótico [Nystrom y Neidhardt, 1992; Farewell *et ál.*, 1998]. Por lo tanto, podría ser que el entorno estresante del tracto reproductivo y de la albúmina, activen la transcripción de ambos genes. Además de la temperatura del cuerpo de la gallina (42°C), la limitada disponibilidad de nutrientes en el oviducto, el pH, la

disponibilidad limitada de hierro y agente antimicrobianos encontrados en el moco del oviducto y albumina pueden ser responsable de la activación. La expresión de estos genes durante la colonización del oviducto facilitan la supervivencia de las bacterias en estos ambientes hostiles, por consiguiente, después de la colonización, es fácilmente que las bacterias se incorporen durante la formación del huevo y se desarrollen en la albúmina de huevo. Aunque los mecanismos moleculares que explican la capacidad protectora de estas proteínas bajo las condiciones de estrés sigue siendo desconocido, se ha sugerido un papel en la alteración de la composición de la membrana durante la fase estacionaria, lo que conduce a una mayor resistencia ambiental a estos factores de estrés [Farewell *et ál.*, 1998]. También se ha observado la presencia de *uspA* en ST inducida por estrés nutricional, oxidativo y temperatura, encontrándose altos niveles de esta proteína cuando ST se encuentra en fase estacionaria [Liu *et ál.*, 2007].

Se ha demostrado que la movilidad de *Salmonella* contribuye a la virulencia en las aves [Allen-Vercoe *et ál.*, 1999; Allen-Vercoe y Wood Ward-,1999] y es un factor importante en el desarrollo de SE en huevos contaminados [Cogan *et ál.*, 2004]. En un estudio, las cepas no móviles con mutaciones en los genes *fliC* y *motAB* relacionados con la expresión de fimbrias, son incapaces de multiplicarse en la albúmina debido a la ausencia de hierro en la misma. La ausencia de flagelos impide el movimiento a través de la albúmina hacia la yema del huevo, por lo que la proliferación se hace más difícil. Los datos presentados en este estudio sugieren que el potencial infeccioso de *Salmonella Pullorum* y *Salmonella Gallinarum* a través de huevos contaminados se reduce aún más debido a que estas bacterias carecen de flagelos y son incapaces de crecer en el huevo, contrario a lo que sucede con SE cuyas cepas mostraron un alto nivel de multiplicación aproximadamente del 5 al 10% de los huevos durante 8 días de almacenamiento [Cogan *et ál.*, 2004].

Se ha hecho evidente que el proceso de colonización del oviducto es complejo y depende de muchos factores incluyendo las fimbrias, flagelos, LPS, la estructura de la pared celular y la tolerancia al estrés. Aunque la mayoría, si no todos, los factores bacterianos, desempeñan un papel importante en la colonización del tracto reproductivo, y no son específicos del serotipo Enteritidis.

## **Contaminación de los huevos antes de la oviposición**

### **Contaminación por SE**

Curiosamente el crecimiento en huevos enteros cuando se almacenan a temperatura ambiente (20-25°C), no se producen cambios en el color, aroma ni en la consistencia del contenido de los huevos [Humphrey y Whitehead, 1993], lo

que sugiere que el proceso de degeneración de la yema depende de factores fisiológicos, tales como la temperatura. La degeneración de los folículos ováricos daría lugar a una disminución en el ciclo de producción por lo tanto, se tendrían huevos con yemas contaminadas. La medida o el grado en que el contenido de la yema fuera positivo después de la infección del ovario, no está del todo claro por ejemplo, después de la inoculación intravenosa, las células de SE se limitan a los tejidos intersticiales y no a la yema contenida en los folículos grandes [Barrow y Lovell, 1991]. Por otra parte, se ha sugerido que *Salmonella* es mucho más probable que se deposite en la parte exterior de la membrana vitelina, en lugar de la yema durante la colonización del ovario [Gast y Holt, 2001]. La inoculación de *Salmonella* en la membrana vitelina en un modelo *in vitro* de contaminación del huevo, demostró que algunas cepas fueron capaces de penetrar en el contenido de la yema en una frecuencia baja durante 24 horas de incubación a 30°C [Gast *et ál.*, 2005b], pero en un estudio similar, se reportó que los contenidos de las muestras de yemas eran negativas al patógeno después de la incubación a 42°C durante 24 horas [Guan *et ál.*, 2006]. Aunque la yema es rica en nutrientes, la presencia de SE en el interior de la yema es poco frecuente en huevos recién puestos contaminados de forma natural [Gast *et ál.*, 2008], pero la migración a través de la membrana vitelina podría conducir la multiplicación bacteriana en la yema [Gast y Holt, 2000a; Chen *et ál.*, 2005; Murase *et ál.*, 2005]. En un estudio se demostró que la multiplicación de SE en el exterior de la membrana vitelina resulta en la contaminación del interior de la yema a través de la penetración de ésta durante 36 horas a 30°C [Gast *et ál.*, 2008]. Esto sugiere una baja invasión de los contenidos de la yema por *Salmonella* durante la formación del huevo. Estos resultados apoyan la posibilidad de la incorporación de *Salmonella* en el huevo a través de la contaminación de la membrana vitelina.

La contaminación del albumen y/o de la cáscara del huevo se produce cuando *Salmonella* coloniza la parte superior del oviducto. De acuerdo con Keller *et ál.*, (1995), la infección durante la formación del huevo ocurre en este sitio, antes de la deposición de la cáscara de huevo. En efecto, después de la infección oral con SE, alrededor de un tercio de los huevos que se van formando fueron positivos en comparación con el 0.6% de los huevos recién puestos [Keller *et ál.*, 1995]. Esta reducción indica claramente que los factores antibacterianos de la albumina pueden ejercer un grado de control de SE durante la formación del huevo. El tiempo de formación del huevo es de 26 horas, el óvulo pasa 5 horas en el magnum, donde está rodeado por la albumina, seguido por la adición de las dos membranas de la cáscara en el istmo. Las restantes 21 horas son requeridos para la deposición de la cáscara en el útero, después de lo cual el huevo completado se mueve a través de la vagina para pasar a través de la cloaca y ser puesto [Solomon, 1997]. La supervivencia durante la formación del huevo podría ser una posible razón para el aislamiento selectivo de SE en huevos puestos, ya que este

serotipo posee los factores de resistencia a la albumina que están ausentes en ST [Rincón *et ál.*, 2011]. Un estudio reveló que SE y ST con igualmente capaces de colonizar los tejidos del tracto reproductivo y contaminar los huevos durante su formación antes de la oviposición. Sin embargo, solo SE se aisló a partir de los contenidos de los huevos después de la puesta [Keller *et ál.*, 1997], lo que sugiere estrategias de supervivencia de SE en el interior de los huevos formados. Sin embargo, ST DT104 muestra infectar los contenidos de los huevos después de la infección vía oral de gallinas ponedoras [Williams *et ál.*, 1998].

### **Factores de virulencia asociados con la contaminación del huevo**

La importancia del papel del LPS en conferirle protección a *Salmonella* contra la albúmina fue confirmada recientemente por Gantois *et ál.*, (2008a). Aplicando la tecnología de expresión *in vivo*, se observó que el gen *rfbH*, que participa en la síntesis de la cadena O ó antígeno O del LPS es inducido durante la formación del huevo a temperatura ambiente. Una cepa mutante de *Salmonella*  $\Delta rfbH$  inoculada en albúmina a temperatura ambiente y a 42°C fue incapaz de multiplicarse en huevos enteros, mientras que la cepa no mutada sobrevivió en la albúmina durante 24 horas. Esta atenuación probablemente fue causada por los componentes antibacterianos de la albúmina del huevo. Lu *et ál.*, (2003) sugirieron que los genes *yafD* y *xthA* juegan un papel esencial en la reparación del daño del ADN causado por la albúmina y por lo tanto una ventaja más para SE de sobrevivir en la formación de huevos de gallina. La presencia de estos genes se ha detectado en SE, ST y *E. coli* [Lu *et ál.*, 2003]. En un estudio reciente usando mutagénesis de transposones, se encontró que la mayoría de los genes asociados con la supervivencia de SE en la albumina a 37°C están involucrados en la estructura/función de la pared celular o bien en el metabolismo de ácidos nucleicos y aminoácidos [Clavijo *et ál.*, 2006]. En este estudio dos mutantes con inserciones de genes únicos de SE se utilizaron. Uno es homóloga a una endonucleasa de restricción y el otro es el operon *pef* que codifica genes para la biosíntesis de fimbrias. Ambos genes se transformaron en una cepa de ST, pero solo la primera le confirió un aumento en la supervivencia en la albumina. El mismo estudio también demostró que la supervivencia en la albumina a 37°C fue mayor para SE en comparación con ST y *E. coli*. Es sorprendente que muchas proteínas antimicrobianas del albumen se unen a los LPS de la pared celular de SE, por lo que, se ha sugerido que la pared celular y los genes de biosíntesis del LPS parecen tener un papel importante en la supervivencia en la albumina.

En un estudio, se observó una supervivencia similar para cepas SE y ST a 37 y 42°C [Guan *et ál.*, 2006]. Estos resultados están en contraste con otros estudios anteriores que demuestran un aumento en la supervivencia de SE a 37°C en la albúmina [Lu *et ál.*, 2003; Clavijo *et ál.*, 2006]. Estos últimos autores inocularon las cepas en albúmina de huevos de 1 semana de edad, mientras que el estudio

realizado por Guan *et ál.*, (2006) inoculó en albumina de huevos recién puestos. La albúmina de un huevos fresco tiene un pH de 8.16, aproximadamente, este pH aun es soportado en comparación con el pH de 9.26 de un huevo almacenado. La primera condición de pH aumentó el crecimiento de la bacteria en comparación con la albúmina del huevo almacenado [Messens *et ál.*, 2004]. Sin embargo, los resultados presentados por Humphrey y Whitehead, (1993) sugieren que el almacenamiento tiene poco impacto directo en la albúmina con respecto al crecimiento de SE. La lisozima y las concentraciones de ovotransferrina en la albúmina aumentan con la edad de la gallina durante todo el periodo de la puesta, reflejándose en un incremento del efecto bacteriostático del albumen en SE en la mitad y final del periodo de puesta, posiblemente influyendo en los resultados de los estudios anteriores [Sellier *et ál.*, 2007] y observándose la importancia de las barreras químicas del huevo durante su almacenamiento. El efecto bactericida de la albúmina a temperatura corporal de la gallina fue examinado en cinco serotipos de *Salmonella* [Gantois *et ál.*, 2008c]. Sorprendentemente, las cepas pertenecientes a los serotipos Enteritidis, Typhimurium y Heidelberg fueron capaces de sobrevivir en el ambiente hostil de la albúmina durante 24 horas, mientras que las cepas que pertenecen a los serotipos Virchow y Hadar fueron muy susceptibles a la albúmina, y, después de 24 horas casi todas las bacterias fueron eliminadas. Esto podría explicar por qué *Salmonella* Virchow y *Salmonella* Hadar casi nunca están asociadas con los huevos. Sin embargo, no se compararon suficientes aislamientos para sacar conclusiones generales de este estudio.

## **Contaminación de los huevos después de la oviposición**

### **Contaminación por SE**

El riesgo de infecciones en humanos por el consumo de huevos contaminados con *Salmonella* depende de las cuentas bacterianas presentes en el huevo. SE puede crecer en el contenido de los huevos contaminados de forma natural a temperatura ambiente [Humphrey y Whitehead, 1993]. Es evidente que esto supone una seria amenaza para la salud humana debido a que la contaminación en los huevos no conduce a cambios en el color, aroma ni en la consistencia de los contenidos de los huevos [Humphrey y Whitehead, 1993]. Durante las infecciones naturales y experimentales, algunos autores señalan a la albúmina como el componente del huevo más frecuentemente contaminado [Gast y Beard, 1990; Humphrey *et ál.*, 1991a], mientras que otros apuntan a la membrana vitelina como el sitio más común de contaminación [Bichler *et ál.*, 1996; Gast y Holt, 2000a, 2001; Gast *et ál.*, 2007]. La albúmina restringe el crecimiento de *Salmonella* porque contiene múltiples componentes antimicrobianos, induce daño a la pared celular y al DNA. A temperaturas <10°C, *Salmonella* es incapaz de crecer en la albúmina [Braun y Fehlhaber, 1995; Schoeni

et ál., 1995]. A temperatura ambiente, algunos de los resultados reportados son contradictorios y es difícil de comparar los diversos estudios debido a las condiciones que experimentales como, el número de células bacterianas inoculadas, el tipo de cepas, las temperaturas de incubación, la edad de los huevos y de las gallinas y de otros muchos factores [Humphrey y Whitehead, 1993; Braun y Fehlhaber, 1995; Schoeni et ál., 1995; Gast y Holt, 2000b]. Estudios recientes muestran que, a 20°C tras la inoculación con 39 UFC/mL en el albumen, las cepas de SE y cepas distintas al serotipo Enteritidis son capaces de crecer hasta >10<sup>6</sup> UFC/mL en 24 horas [Clavijo et ál., 2006], y ampliando el tiempo de incubación (dato no presentado), el número de UFC's aumenta aun más. La inoculación de la bacteria en la albúmina de huevos enteros resultó en un crecimiento más rápido que en la albúmina de huevo separada y también se detectaron altos números de *Salmonella* en la yema de huevo, lo que indica la migración hacia la yema [Cogan et ál., 2001; Messens et ál., 2004].

La rápida proliferación de *Salmonella* en las yemas de los huevos a 25°C ha sido reportada [Gast y Holt, 2000b]. Esto fue confirmado en un estudio reciente que muestra que todas las cepas se multiplicaron rápidamente en el contenido de la yema alcanzando recuentos del orden de 9 log células/mL después de 24 horas de incubación a 37 y/o 42°C [Guan et ál., 2006]. Los datos de huevos contaminados de forma natural [Humphrey y Whitehead, 1992] o de forma artificial [Gast y Beard, 1992] en gallinas, sugieren que hay un retraso antes de la penetración de la yema y un crecimiento rápido una vez alcanzada la yema en huevos almacenados a temperatura ambiente. Lo anterior, se cree que es debido a que la membrana vitelina de los huevos frescos inhibe la invasión de la yema por *Salmonella*. Gradualmente, la integridad de la membrana vitelina se perderá durante el almacenamiento, dando lugar a fugas de los nutrientes hacia la albumina. Esto permite que las bacterias migren a la membrana vitelina y se multipliquen e invadan la yema [Humphrey y Whitehead, 1993].

Un estudio reciente ha sugerido que el crecimiento del patógeno ocurrió en la membrana vitelina antes que ocurriera la penetración a través de ésta [Gast et ál., 2008]. Como se ha venido mencionando, la contaminación del contenido de la yema es poco frecuente [Gast y Holt, 2001; Gast et ál., 2003], pero si se produce, se da el rápido crecimiento de la bacteria [Gast y Holt, 2000b; Guan et ál., 2006]. Hay mucha controversia sobre el sitio de mayor deposición en el huevo; el uso de diferentes técnicas de aislamiento tiene un mayor impacto sobre el resultado del experimento, por lo tanto, el uso de imágenes en 3D con bioluminiscencia o fluorescencia podrían ayudar para conocer el sitio de mayor deposición de *Salmonella* en los huevos [Chen et ál., 1996].

El crecimiento de *Salmonella*, visto en huevos contaminados de forma natural es diferente de los observados en los huevos contaminados artificialmente. Esto

sugiere que el crecimiento es rápido en la mayoría de los huevos y la invasión de la yema es común [Braun y Fehlhaber, 1995; Chen et ál., 1996]. Sin embargo, las infecciones experimentales utilizan altos niveles de contaminación (10<sup>4</sup> células/huevo) [Chen et ál., 1996], muy probablemente no representan la contaminación natural de los huevos. Los datos obtenidos de los modelos artificiales de contaminación de los huevos, por lo tanto, deben de interpretarse con cuidado. Un modelo para la contaminación artificial de los huevos imitando la situación natural, fue desarrollado por Cogan et ál., (2001). Estos autores utilizaron un número bajo de células bacterianas en una solución con bajo contenido en nutrientes y hierro, detectándose un bajo crecimiento en los huevos, resultados comparables a los observados en los huevos contaminados de forma natural. Cuando pocas células de *Salmonella* se depositan en el albumen, muy poco crecimiento bacteriano se produce y SE puede sobrevivir gracias a la temperatura [Lock y Board, 1992; Hammack et ál., 1993; Gast y Holt, 2000b]. Humphrey y Whitehead (1993), observaron en huevos artificialmente contaminados, que el inóculo aumento 10 veces durante las primeras 24 horas después de la inoculación, según lo confirmado por Gast y Holt (2000b). La fase de crecimiento inicial puede implicar que la bacteria utilice sus reservas de hierro, que parecen ser suficientes para mantener cuatro generaciones. Cuando las reservas de hierro se agotan, las células entran en fase lag (de retardo), donde en la mayoría de los huevos, hay poco o ningún cambio en el número de células de *Salmonella*. Se ha postulado que puede haber fugas de los nutrientes de la yema, lo que conduce a una "atracción" bacteriana hacia la yema, semanas después del almacenamiento. Cogan y colaboradores [Baron et ál., 1997] proporcionan evidencia que indica que las bacterias se adhieren y penetran a través de la membrana vitelina (después de semanas de almacenamiento) y obtienen acceso al contenido de la yema con el fin de desarrollarse [Baron et ál., 1997].

### **Factores de virulencia asociados con la contaminación del huevo**

Es lógico suponer que todos los factores de *Salmonella* que juegan un papel en la supervivencia o en el crecimiento de la albumina durante la formación del huevo, también jueguen un papel en la supervivencia del huevo entero post-puesta. Usando la tecnología de expresión *in vivo*, se demostró que la expresión de *rfbH* de SE, un gen en la síntesis del antígeno O del LPS, se indujo fuertemente en huevos a temperatura ambiente [Gantois et ál., 2008a]. El gen *rfbH* ha demostrado ser crucial para el crecimiento en huevos a temperatura ambiente. Esto demuestra una vez más la importancia del LPS en la supervivencia en el albumen. Esto puede ser importante en las primeras semanas de almacenamiento de los huevos, durante las cuales, la membrana vitelina se deteriora gradualmente, lo que resulta en la liberación de nutrientes a la

albúmina, posiblemente “atrayendo” a las bacterias que pueden penetrar la membrana vitelina y se multipliquen en la yema, rica en nutrientes. Es tentador especular que la fuga de la yema en la albumina podría generar un gradiente de aminoácidos, azúcares u otros de sus componentes, provocando una quimiotaxis, es decir un movimiento hacia la membrana vitelina. Esta hipótesis es consistente con el hecho de que SE crece rápidamente en huevos solo después de 28 días de almacenamiento a temperatura ambiente [Gantois *et ál.*, 2008a].

Los flagelos son componentes necesarios para la migración bacteriana hacia la membrana vitelina en huevos entero [Baron *et ál.*, 1997]. Mutantes no móviles, como los mutantes *fliC* y *Motab*, eran incapaces de moverse a través de la albúmina a la yema de huevo, por lo que la proliferación no tuvo lugar [Baron *et ál.*, 1997]. Por otra parte serotipos no móviles como *S. Pullorum* y *Gallinarum* no son capaces de crecer en el contenido del huevo. La motilidad es un factor significativo en la quimiotaxis para moverse hacia mayores concentraciones de atrayentes y para evitar mayor concentraciones de repelentes al detectar cambios temporales en las concentraciones de los quimio-efectores [Cogan *et ál.*, 2004]. La quimiotaxis en *E. coli* es el mejor y más estudiado. La quimiotaxis permite que *E. coli* detecte aminoácidos, azúcares, dipéptidos e incluso cambios redox, temperatura y pH. En respuesta a estos cambios químicos, una cascada de señales de metilación/desmetilación y la fosforilación/desfosforilación se enciende. La unión de quimio-efectores a los receptores de membrana (quimiorreceptores) activa el operon *Che*, que transmite las señales a los motores flagelares. El resultado neto de esta cascada de señales es un cambio en la dirección de rotación del motor flagelar y por lo tanto la inducción de la motilidad hacia o fuera de un determinado gradiente. *Salmonella* contiene un sistema de quimiotaxis similar, al reaccionar a los estímulos de los quimio-efectores [Bourret *et ál.*, 1989; Sourjik, 2004].

La membrana vitelina comprende una matriz de colágeno cubierta con una capa de glicoproteínas [Mariconda *et ál.*, 2006]. Se cree que las fimbrias curli (*Sef17*) median la adherencia bacteriana a estas glicoproteínas tal como en la fibronectina [Bellairs *et ál.*, 1963]. La invasión de la yema de huevo y por lo tanto la multiplicación de una cepa deficiente en curli, una mutante de *agfA*, fue significativamente menor que la de la cepa no mutada de SE [Lock y Board, 1992]. Por lo tanto, se sugiere que las fimbrias curli son necesarios para unirse a la membrana vitelina con el fin de facilitar la invasión y la multiplicación de la yema [Baron *et ál.*, 1997]. La expresión de fimbrias curli ha sido investigada bajo condiciones pobres (fase estacionaria) y condiciones ricas (fase exponencial) de nutrientes para 15 diferentes cepas de *Salmonella* en pH alto y un ambiente restringido en hierro a 20°C [Baron *et ál.*, 1997]. Se ha encontrado una correlación entre la expresión de fimbrias curli durante la última fase exponencial y una alta



frecuencia en el crecimiento en huevos a temperatura ambiente. Esto sugiere que cuando las bacterias se mueven más cerca de la yema comenzarán a crecer de forma exponencial, y por lo tanto, las cepas que muestran un mejor crecimiento en huevos son aquellas que son capaces de expresar fimbrias curli. El hecho de que los genes que codifican las fimbrias curli parecen ser ubicadas dentro del género *Salmonella* [Collinson *et ál.*, 1991], no significa que todos los serotipos de *Salmonella* son igualmente eficaces para multiplicar en huevos debido a que la expresión de las fimbrias curli puede ser regulada de manera diferente dependiendo de los factores ambientales desencadenantes y de la fase de crecimiento bacteriano.

### **Contaminación de los huevos por diferentes serotipos de *Salmonella***

Numerosos estudios han comparado el crecimiento en huevos entre distintos serotipos de *Salmonella* usando varios métodos artificiales de contaminación del huevo [Lock y Board, 1992; Hammack *et ál.*, 1993; Messens *et ál.*, 2004]. Sin embargo, de acuerdo con la mayoría de los estudios, la capacidad de sobrevivir y crecer en la albumina a temperaturas diferentes de la temperatura de las gallinas, no es un rasgo específico del serotipo Enteritidis.

Recientemente, existen estudios que han comparado la penetración de otros serotipos de *Salmonella* utilizando modelos de contaminación *in vitro* descritos por Gast y colaboradores [Doran *et ál.*, 1993; Gast *et ál.*, 2005b; Guan *et ál.*, 2006; Murase *et ál.*, 2006; Gantois *et ál.*, 2008c]. En este modelo, la yema de huevo y el albumen se separan y la yema es inoculada con 100 UFC de *Salmonella* sobre la superficie exterior de la membrana vitelina, después la albumina de huevo se vierte suavemente sobre la yema. Todos los reportes coinciden en que los serotipos distintos a Enteritidis son capaces de invadir la membrana vitelina multiplicándose en la yema. Además la multiplicación de los diferentes serotipos de *Salmonella*, se evaluaron mediante la inoculación de un número muy pequeño de células de *Salmonella* en huevos frescos de acuerdo con el modelo de infección descrito por Cogan y colaboradores [Cogan *et ál.*, 2001; Gantois *et ál.*, 2008c]. Excepto por el serotipo Typhimurium, no se observó diferencia significativa entre el serotipo Enteritidis y las cepas que pertenecen a los serotipos Heidelberg, Virchow y Hadar, lo que sugiere que las estrategias de multiplicación dentro de los huevos a la temperatura ambiente, no son únicos para el serotipo Enteritidis. La cepa de ST muestra la frecuencia más baja de invasión en la yema [Gantois *et ál.*, 2008c]. Sin embargo, este hallazgo está en fuerte contraste con lo observado por Cogan y colaboradores [Baron *et ál.*, 1997], que muestra la frecuencia más alta en la invasión de la yema del serotipo Typhimurium. A pesar de la variabilidad observada dentro de estos experimentos, los patrones de crecimiento diferentes del serotipo Enteritidis, se han observado en los huevos post-puesta [Baron *et ál.*, 1997].

## Impacto de *Salmonella* en la salud pública

El huevo de gallina es considerado un alimento sano y de gran valor nutricional, siendo una fuente excelente de proteínas de alta calidad. Su consumo es cada vez más significativo, dada la actual tendencia de los consumidores de adquirir productos “saludables y naturales”. Debido a las características antes mencionadas, se ha observado que quienes lo consumen principalmente son niños y ancianos, vale decir que estos son los grupos de edad más susceptibles de una población, por lo que adquirir huevos de óptima calidad tanto nutritiva como microbiológica es fundamental. Cabe señalar que en la producción casera, el manejo general de las gallinas es deficiente, prácticamente no se realizan controles sanitarios y la higiene del entorno es mínima, lo anterior incrementa la posibilidad de producir huevos con diversos grados de contaminación, que exponen la salud de quienes los consumen. En este contexto se debe mencionar que las enfermedades transmitidas por alimentos han sido reconocidas como el problema de salud pública más extendido en la actualidad, un claro ejemplo son las infecciones causadas por *Salmonella* transmitidas principalmente por productos provenientes de aves de corral (huevos y carne). Es importante considerar que la aparición de SE como causa principal de salmonelosis humana en muchos países se atribuye a la excepcional capacidad de esta variante sérica para colonizar el tejido ovárico de las gallinas y estar presente en el contenido de los huevos con la cáscara intacta. La mayor parte de las infecciones por SE transmitida por los alimentos está asociada al consumo de huevos crudos y alimentos que contienen huevo crudo, como la masa de galletas, el helado casero, la mayonesa casera, determinadas salsas para ensalada y la salsa holandesa, jugos y licuados con huevo . De hecho, del 77% al 82% de los brotes de SE se han asociado a huevos con cáscara o a alimentos elaborados a base de huevo. Los huevos poco cocidos y los productos que los contienen, como las cremas pasteleras, el pan frito empapado en huevo batido, los huevos fritos con la yema blanda y los huevos escalfados también son importantes fuentes de SE. La ausencia de toxinas termoestables en el arsenal patogénico de *Salmonella* hace que sus principales fuentes de transmisión sean este tipo de alimentos inadecuadamente preparados o la contaminación cruzada que se produce por el contacto de los alimentos durante su proceso de elaboración con otros alimentos o utensilios contaminados con *Salmonella* (contaminación cruzada) ya que esta puede permanecer y multiplicarse en los equipos y en el ambiente en cualquier proceso de manipulación o procesado de alimentos [OMS, 2002].

El control de *Salmonella* en la cadena alimentaria es un asunto complicado debido a las interrelaciones existentes entre la contaminación medioambiental, los animales de abasto y el hombre. La tendencia en infecciones en humanos es creciente y los recientes brotes de origen alimentario originados por SE en huevos

subrayan la necesidad de una redoblada vigilancia en todos los aspectos de la producción de alimentos, que debería reflejarse en la instauración de controles concertados entre el gobierno y la industria. Esto explica la necesidad de un gran celo y cuidado en el diseño de las medidas proyectadas para controlar la diseminación de los microorganismos causantes de las intoxicaciones alimentarias en los diferentes aspectos del control microbiológico de la producción de alimentos, incluyendo un sistema de seguridad denominado Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos conocido como HACCP (por sus sigla en inglés), el cual es un modo de controlar la manufactura y la manipulación de los alimentos, que cubre el diseño del producto, el proceso de diseño y las prácticas de operación. El análisis de riesgo supone la identificación de los factores que pueden tener un efecto dramático en la seguridad del alimento. Una vez que estos factores han sido identificados se pueden introducir varios puntos críticos de control durante el procesamiento para facilitar la monitorización y así prevenir y reducir el riesgo en los consumidores, de tal manera que también pueda reducirse el impacto en salud pública [Parra *et ál.*, 2002].

### **Medidas de control y prevención**

Es importante destacar que mediante la aplicación de medidas preventivas en la crianza de las aves y en el procesamiento y manejo comercial de los productos alimenticios y sus derivados, en conjunto con una educación sanitaria de la población para el manejo correcto de los alimentos en cuanto a su almacenamiento y elaboración, es posible reducir considerablemente el grado de contaminación por *Salmonella*.

Una de estas medidas podría ser la implementación de la vacunación en gallinas cuyos huevos sean comercializados, lo cual disminuiría considerablemente el riesgo de padecer gastroenteritis originada por este microorganismo e incrementaría la calidad de vida de los consumidores con el fin de desarrollar estrategias de prevención que fortalezcan el trabajo en salud pública desde la granja hasta los hogares [Suárez y Mantilla, 2000].

De esta manera, la salmonelosis también puede prevenirse desde el hogar aplicando sencillas pero importantes medidas de control que pueden reducir en un alto grado el riesgo de adquirir la infección, más aún, teniendo en cuenta que los huevos contaminados con *Salmonella* no sufren alteraciones físicas aparentes. Dentro de estas medidas se incluye: no comprar o utilizar huevos sucios o agrietados, conservar los huevos refrigerados (a menos de 10°C), destinar los huevos más frescos, limpios, sin manchas ni defectos, a preparar alimentos cocinados a menores temperaturas, tales como tortillas, huevos fritos, huevos pasados por agua, salsas, natillas, cremas pasteleras, etc., destinar los huevos que tengan la cáscara con algún signo de suciedad, fisuras u otro defecto para

preparaciones que se cocinen a altas temperaturas, tales como huevos cocidos, flanes, bizcochos, etc.; para garantizar la destrucción de los patógenos, lavar los huevos justo antes de utilizarlos y secarlos con papel de cocina limpio, a fin de evitar su contaminación en el momento de romper la cáscara y hacer la cocción de los huevos hasta que alcancen una temperatura interna mínima de 70°C hasta el punto en que tanto la yema como la clara se vuelvan sólidos [Instituto de Estudios del huevo, 2004].

## **Diagnóstico de *Salmonella***

La detección e identificación de los patógenos implicados en las enfermedades transmisibles es un componente fundamental de la vigilancia epidemiológica. Se hace entonces necesario estandarizar técnicas de detección para implementar la vigilancia y el control de estos microorganismos y prevenir las enfermedades que producen.

Sin embargo, es importante destacar que mediante la aplicación de medidas preventivas en la crianza de las aves y en el procesamiento y manejo comercial de los productos alimenticios y sus derivados, en conjunto con una educación sanitaria de la población para el manejo correcto de los alimentos para su almacenamiento y elaboración, es posible reducir considerablemente el grado de contaminación con *Salmonella* [Tauxe 1997]. Estos datos justifican la necesidad de lograr la rápida detección de *Salmonella* y otros contaminantes en alimentos.

La detección de contaminación por *Salmonella* en aves de corral y sus derivados se realiza utilizando métodos convencionales de cultivos microbiológicos, los cuales presentan limitaciones importantes para la detección eficaz de dicha contaminación [St Louis *et ál.*, 1988]. Los métodos clásicos de diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* son laboriosos, requieren tiempo y no todas las cepas aisladas pueden ser identificadas, por lo cual la información que brindan es limitada y dificulta la toma de decisiones. La detección temprana de los microorganismos prevendría la aparición de brotes y permitiría implementar controles previos a la ocurrencia de la enfermedad.

La sensibilidad y especificidad de los métodos de cultivo dependen de la calidad, la toma adecuada de muestras, el almacenamiento y el número de unidades formadoras de colonia presentes en la muestra, además de la habilidad del microbiólogo para detectar su presencia y la necesidad de un laboratorio de microbiología de alimentos para realizar el proceso [Lammerding y Fazil, 2000]. A pesar de estas limitaciones, los métodos microbiológicos son los más utilizados por su tradición, ya que no hay disponibles actualmente métodos alternativos que muestren más sensibilidad y especificidad.

Sin embargo, a través del tiempo se han desarrollado métodos más sensibles y específicos que detectan la infección por *Salmonella* en humanos y que aún no han sido implementados en la industria agropecuaria. Estas alternativas para la detección de contaminación por *Salmonella* en huevos consisten en la utilización de pruebas de diagnóstico rápidas, sensibles y específicas basadas en métodos de detección molecular [Woodward y Kirwan 1996].

La técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Este método, a diferencia de los métodos tradicionales que requieren 6 o 7 días para dar un resultado definitivo, permite obtener los resultados en sólo 1 a 3 días, dependiendo de diversas modificaciones en el protocolo de trabajo, permitiendo la detección e identificación rápida y precisa de *Salmonella* [Myint *et ál.*, 2006].

Actualmente son muy pocos los artículos que han empleado técnicas moleculares en la detección, identificación y/o presencia de *Salmonella* u otros patógenos o microorganismos de alteración en huevos. En estudios de ovoproductos, el empleo de la técnica PFGE ha sido descrita para la identificación de *Listeria monocytogenes* en huevo líquido [Rivoal *et ál.*, 2010]. En otro estudio se detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* mediante el uso de ensayos inmunológicos ligados a enzimas (ELFA) [Uyttendaele *et ál.*, 2009]. El empleo de pruebas serológicas ha sido de los ensayos más recurridos que se realizan en la investigación de *Salmonella*.

Actualmente existen un programa denominado simulación de Monte Carlo como técnica cuantitativa que hace uso de la estadística, mediante modelos matemáticos, y el comportamiento aleatorio de sistemas reales no dinámicos (se tratan de sistemas cuyo estado va cambiando con el paso del tiempo). Esta simulación identifica y analiza aquellas variables cuyo comportamiento aleatorio determina el comportamiento global del sistema, tras repetir  $n$  veces el experimento, dispondremos de  $n$  observaciones sobre el comportamiento del sistema. Este sistema se emplea en modelos de almacenamiento en huevos a diferentes temperaturas, condiciones de humedad y tiempo de almacenamiento, carga microbiana, cargas iniciales del inóculo, carga microbiana final etc., [Botey-Saló *et ál.*, 2012], con el fin de observar los efectos y la persistencia de *Salmonella* sobre la cáscara de los huevos durante el almacenamiento.

También se emplean modelos de análisis cuantitativo de riesgos en ovoproductos para evaluar los riesgos presentes dentro de un modelo de riesgo microbiano, por ejemplo, la pasteurización del huevo líquido [Whiting y Buchanan, 1997], con el fin de estimar el impacto en la seguridad alimentaria, riesgos en la salud y consecuencias económicas asociados con alimentos [Whiting, 1993; Roberts *et ál.*, 1995; Buchanan y Whiting, 1996; Whiting, 1997]. Dentro de estos estudios se ha

analizado el riesgo de salmonelosis en el momento de la puesta hasta la llegada al consumidor en huevos y ovoproductos [Gast y Beard, 1992; Roberts *et ál.*, 1995; Rose *et ál.*, 1996; Latimer *et ál.*, 2002]. Es importante mencionar que estos modelos se basan en los programas HACCP [Buchanan, 1995].

# MICROBIOTA INICIAL

Como se mencionó anteriormente, los huevos se contaminan de dos maneras principales: por contaminación transovárica o por contaminación a través de la cáscara. Los huevos recién puestos se pueden contaminar a través del oviducto, y la presencia de determinadas especies bacterianas puede ser indicadora de una ave infectada. La infección a través de la cáscara supone la contaminación inicial de la superficie del huevo, seguida de la penetración subsiguiente del microorganismo en el albumen o, en algunos casos, directamente en la yema. La superficie del huevo recién formado se contamina con una diversidad de microorganismos entéricos por causa de la anatomía del ave: el tracto intestinal, urinario y reproductor del ave comparten un orificio común (vagina-cloaca). La superficie del huevo también se contamina por microorganismos del ambiente en el que es puesto.

## Microorganismos de Alteración

### Bacterias

La alteración de los huevos está relacionada con la capacidad de los microorganismos para penetrar en el huevo y superar las barreras antimicrobianas. Los microorganismos presentes muy frecuentemente en la superficie de los huevos no son necesariamente los relacionados más frecuentemente con la alteración [Mayes y Takeballi, 1983] (Tabla 18). Mientras que la microflora de la cáscara del huevo varía cualitativa y cuantitativamente en las distintas regiones geográficas y en los distintos tipos de aves (Tabla 19), los microorganismos relacionados con la alteración tienden a ser los mismos. Por lo general, esto se interpreta como indicador de que son los mecanismos de defensa intrínsecos del huevo los que seleccionan los microorganismos que son capaces de crecer en ese medio [Bruce y Drysdale, 1994]. Una causa importante de alteración durante e inmediatamente después de la retirada de los huevos de almacenamiento la constituye *Pseudomonas fluorescens* [Lorenz y Starr, 1952; Ayres, 1960]. Esto refleja el hecho de que *Pseudomonas fluorescens*, que son omnipotentes en la tierra y en el agua, son con frecuencia las primeras en penetrar y crecer porque son móviles, producen un pigmento que compite con la conalbúmina (ver barreras químicas) de la clara por los iones metálicos y son resistentes a otros mecanismos protectores de la clara. Un huevo que presenta fluorescencia intensa en la mayor parte de la clara o en toda su masa cuando se examina con una lámpara que emite luz ultravioleta, siempre contiene una gran cantidad de bacterias. Estos huevos no se descubren fácilmente utilizando una lámpara de luz blanca, y los olores de la descomposición en las primeras fases son ligeros, con frecuencia detectables sólo después de la cocción [Elliott, 1954]. Las

especies de *Pseudomonas* spp. pueden colonizar la cara interna de la membrana interna, permitiendo a veces que los pigmentos fluorescentes difundan hacia la

**Tabla 18.** Microbiota de la superficie de la cáscara del huevo y del interior de los huevos alterados. Nota: el número de signos más indica frecuencia relativa de presentación. Fuente: Mayes y Takebelli, 1983; Ibeh y Izuagbe, 1986, adaptada de Bruce y Drysdale, 1994; De Reu et ál., 2006.

Frecuencia de presentación

Tipo de Microorganismos	Sobre la cáscara	En los huevos podridos
<i>Micrococcus</i>	+++	+
<i>Achromobacter</i>	++	+
<i>Enterobacter</i>	++	-
<i>Alcaligenes</i>	++	+++
<i>Arthrobacter</i>	++	+
<i>Bacillus</i>	++	+
<i>Cytophaga</i>	++	+
<i>Escherichia</i>	++	+++
<i>Flavobacterium</i>	++	+
<i>Pseudomonas</i>	++	+++
<i>Staphylococcus</i>	++	-
<i>Aeromonas</i>	+	++
<i>Proteus</i>	+	+++
<i>Sarcina</i>	+	-
<i>Serratia</i>	+	+
<i>Streptococcus</i>	+	+

**Tabla 19.** Microbiota de los huevos de diferentes aves. Fuente: Bruce y Drysdale, 1994.

Porcentaje de aislamientos

Microorganismo	Pata	Pata	Aves acuáticas	Gallina	Gallina	Pava
<i>Enterobacterias</i>	65.4	40.0	66.0	11.8	31.5	71.4
<i>Staphylococcus</i>	2.5	4	11.4	23.0	9.2	71.4
<i>Micrococcus</i>	1.2	0	21.3	63.8	34.6	0
<i>Streptococcus/Enterococcus</i>	0	0	0	1.2	15.3	8.5
<i>Pseudomonas</i>	16.0	56.0	0	0	2.5	1.5
<i>Acinetobacter</i>	6.2	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	8.6	0	0.9	0	1.2	3.9
<i>Mohos</i>	0	0	0	0	0.2	1.6
<i>Sin identificar</i>	0	0	0	0	5.5	5.4

clara antes de que las bacterias penetren realmente [Elliott, 1954]. Aunque las especies de *Pseudomonas* spp. son capaces de crecer sobre la membrana cuando esta separada de otras partes del huevo y sumergida en solución salina [Elliott y Brant, 1957; Board, 1965], varias veces se ha informado de la actividad antibacteriana relacionada con la membrana. La presencia de lisozima en



ambas membranas [Vadehra *et ál.*, 1972] podría explicar en parte este fenómeno. Típicamente, las *Pseudomonas* que producen pioverdina penetran y crecen en los huevos con cáscara rápidamente que cualquier otro grupo de bacterias. Muchas veces son los únicos microorganismos presentes en los huevos almacenados [Lorenz *et ál.*, 1952].

Además de las *Pseudomonas*, un número limitado de otras bacterias son capaces de comportarse como invasoras de los huevos con cáscara. Los ejemplos incluyen cepas de los géneros *Alcaligenes*, *Proteus*, *Flavobacterium* y *Citrobacter*. Además, otros géneros, como *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Escherichia*, *Flavobacterium* y *Enterobacter* son capaces de crecer en los huevos una vez que las defensas de los huevos han sido vencidas por un invasor primario [Florian y Trussel, 1957; Elliott, 1958; Ayres, 1960]. Presuntivamente, estos invasores secundarios son capaces de utilizar iones metálicos secuestrados por los sideróforos producidos por los invasores primarios.

El carácter de las putrefacciones bacterianas asociadas con los huevos depende de la especie/cepa bacteriana o de la mezcla de especies/cepas presentes (Tabla 20). Por ejemplo, la especie no proteolítica de *Pseudomonas putida* produce fluorescencia en la clara, mientras que la especie productora de lecitinasa *P. fluorescens* rompe la barrera de difusión en la superficie de la yema y confiere color rosado a la clara. Probablemente esto es debido al cromógeno ovotransferrina Fe<sup>3+</sup>. La alteración por *Pseudomonas* esta favorecida en los huevos almacenados en frío [Lorenz y Starr, 1952; Ayres y Taylor, 1956]. Los microorganismos intensamente proteolíticos digieren el albumen, envejeciendo la yema. Las bacterias relacionadas principalmente con la putrefacción negra son *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Aeromonas* y *Proteus* [Stadelman, 1994]. Otros microorganismos no producen cambios macroscópicos pero son capaces de formar poblaciones tan numerosas como las de los microorganismos productores de putrefacción [Board, 1965b]. Estos microorganismos incluyen a *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas fluorescens*. Es posible que estos microorganismos no se descubran en la observación al trasluz o cuando los huevos se rompen, y de este modo contaminan los ovoproductos [Jonhs y Berard, 1945, 1946].

**Tabla 20.** Géneros bacterianos aislados en los diversos tipos de huevos podridos. Fuente: De Alford *et ál.*, 1950; Florian y Trussel, 1957; Mayes y Takeballi, 1983; Gil y Ruiz, 2010.

Tipo de putrefacción en orden decreciente de frecuencia	Géneros bacterianos aislados
Verde Incolora	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>
Negra	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Proteus</i>
	<i>Aeromonas</i>
	<i>Alcaligenes</i> <i>Enterobacter</i>
Rosa	<i>Pseudomonas</i>
Roja	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Serratia</i>

En resumen, las alteraciones o putrefacciones más frecuentes, causadas por bacterias son las siguientes:

- Putrefacción verde: producida por *Pseudomonas fluorescens*, se denomina así porque la yema adquiere un color verdoso, No es frecuente la percepción de olores, pero, si ocurre, se percibe un olor afrutado o dulce.
- Putrefacción incolora: producida por géneros de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y por algunas bacterias coliformes. Estas putrefacciones se detectan fácilmente al trasluz, ya que la yema suele estar afectada y se desmorona. Pueden generar desde un olor casi imperceptible hasta olores desagradables.
- Putrefacción negra: los huevos son totalmente opacos y la yema adquiere un color negro, del huevo se desprende un olor pútrido, siendo evidente la presencia de sulfuro de hidrógeno. Las bacterias que producen gas son *Proteus*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, que se originan al almacenar a temperaturas elevadas del huevo.
- Putrefacción rosa: se suele presentar con menor frecuencia, son producidas por cepas de *Pseudomonas*. En la yema existe un precipitado de color rosáceo y una coloración rosa en la clara.
- Putrefacciones rojas: son las menos frecuentes, son producidas por especies de *Serratia*, desprenden un olor débil no desagradable.

Un estudio reciente [Al-Bahry *et ál.*, 2012] demostraron la penetración de *Pseudomonas aeruginosa*, seguida de *ST*, *S. aureus* y *E. coli*. La característica de estos microorganismos es que tanto *Pseudomonas*, *Salmonella* y *E. coli* son microorganismos móviles, *S. aureus* no. Este microorganismos fue encontrado en el exterior de la cáscara de huevo y se ha encontrado la toxina estafilocócica en ovoproductos [Yang *et ál.*, 2001]. *S. aureus* probablemente se mueve debido a la

difusión de la humedad dentro del huevo [Grijpspeerdt, 2001], provocando su entrada al interior del huevo.

## **Hongos**

A veces se ha observado crecimiento de mohos en los huevos de las parvadas de aves que vagan libres por las granjas pequeñas cuando la recogida se retrasa indebidamente. Los mohos también pueden causar alteración durante el almacenamiento en refrigeración cuando la humedad es excesivamente elevada, favoreciendo el enmohecimiento con manchas puntiformes o motas del tamaño de cabezas de alfiler, debido a la aparición de pequeñas y densas colonias de mohos sobre la cáscara; así *Penicillium* origina manchas amarillas, azules o verdes; *Cladosporium herbarum* verdes o negras, siendo la más frecuente [Board *et ál.*, 1994] y *Sporotrichum* rosas. La fase inicial de la alteración por mohos es la putrefacción fúngica, que se produce una vez que el micelio del moho ha crecido en el interior del huevo después de que las hifas han atravesado los poros o grietas de la cáscara, diseminándose por todo el interior del huevo. Las especies que producen estas alteraciones son *Mucor*, *Thamnidium*, *Botrytis* y *Alternaria*, además de las ya citadas.

Los mohos generalmente se multiplican primeramente en la zona de la cámara de aire, lugar en que el oxígeno facilita el crecimiento de estas formas microbianas. En condiciones de elevada humedad, se pueden observar los mohos creciendo sobre la superficie externa de los huevos. En condiciones de humedad baja o escasa y temperaturas bajas, el crecimiento superficial no resulta favorecido.

Frente a estas contaminaciones por microorganismos de descomposición, tiene mucha más importancia la contaminación del huevo por agentes infecciosos y patógenos para el humano: *Salmonella* procedente de las heces, que como ya se estudio, suele penetrar a través de la cáscara y en ocasiones por vía transovárica; *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*, que podrían causar graves infecciones en ovoproductos contaminados (ver capítulo 6).

## **Efecto del tratamiento sobre los microorganismos**

### **Transporte y almacenaje**

Una vez los huevos han sido recogidos y envasados en cajas o en envases pequeños, a los pocos días se envían al comprador final (comercialización directa), a un centro de envasado o, en aquellos casos en los que esté permitido, a un centro de lavado. En muchos casos, los países han fijado normas reguladoras o legales que se refieren a calidad, peso, envasado, manipulación, etiquetado, transporte y fechado de los huevos con cáscara.

Los huevos se deben almacenar con el polo romo hacia arriba. Esto contribuye a evitar que la yema, que tiene un peso específico menor que la clara, sea impulsada por esta última hacia la membrana interna. Si la yema entra en contacto con la membrana interna, los microorganismos que atraviesan la membrana en este sitio pueden contaminar directamente la yema por eludir las barreras protectoras existentes en la clara. Cuando ocurre esto, la alteración avanza rápidamente [Board, 1964; Brown *et ál.*, 1970].

Las temperaturas de almacenamiento inferiores a 8°C inhiben el crecimiento de las bacterias y retardan la pérdida de la calidad interna. A temperaturas hasta 18°C, las barreras naturales del huevo se deterioran solo lentamente con el tiempo. A medida que disminuye la eficacia de estas barreras. El huevo se vuelve cada vez más sensible a la penetración y al crecimiento bacteriano [Elliot, 1954; Brown *et ál.*, 1970; Humphrey, 1994]. Cuando las temperaturas de almacenamiento sube por encima de 18°C, se acelera la degradación de las barreras antimicrobianas [Humphrey, 1994].

Los huevos almacenados en frío se trasladan a una atmósfera caliente y húmeda, se pueden humedecer por condensación (sudoración). Si los huevos se trasladan de nuevo a la cámara fría mientras están húmedos, las bacterias de la superficie pueden ser aspiradas a través de la cáscara debido a la diferencia de presión que se crea cuando la cámara de aire del huevo se contrae [Forsythe *et ál.*, 1953]. La importancia relativa de esto como un medio de aumentar la penetración bacteriana en el huevo ha sido discutida, ya que algunos investigadores no han observado como aumenta la penetración, excepto después de varios periodos de sudoración debidos a temperaturas de almacenamiento alternantes [Vadehra y Baker, 1973]. La sudoración aumenta aun más la alteración cuando la cáscara esta sucia [Forsythe *et ál.*, 1953]. Esto podría explicar las discrepancias en los resultados indicados. También podría reflejar la sensibilidad de la prueba. Por ejemplo, los huevos provistos de cáscara no mostraron contaminación interna con *Yersinia enterocolitica* inmediatamente después de ser inoculados por inmersión en agua que contenía 10<sup>6</sup> UFC/mL, seguida de la exposición a diferencias de presión o de temperatura [Amin y Draughon, 1990]. Sin embargo, después de 14 días de incubación a 10°C, la población de *Y. enterocolitica* excedió de 10<sup>6</sup> UFC/mL, siendo positivos todos los huevos. El enfriamiento rápido con aire por convección forzada vuelve a los huevos más propensos a la penetración de SE [Fajardo *et ál.*, 1995]. Si bien las cáscaras, tanto las de los huevos enfriados como las de los huevos no enfriados, tenían grietas microscópicas, las de los huevos que habían sido enfriados rápidamente eran más grandes y más numerosas. El uso de gases criogénicos ha sido investigado como método para reducir el daño a las vez que para

intensificar el enfriamiento rápido de los huevos provistos de cáscara [Curtis *et ál.*, 1995].

La penetración aumenta con la duración del contacto con el material contaminado, especialmente durante el almacenamiento en humedades relativas elevadas. Esto es cierto tanto para las bacterias de la alteración como para *Salmonella* [Simmons *et ál.*, 1970]. La humedad relativa durante el almacenamiento debe estar comprendida entre el 70 y 85% [Henderson y Lorenz, 1951]. Por debajo del 70%, existe una pérdida rápida de peso por evaporación que influye de modo desfavorable en la calidad. Por encima de los 85%, aumenta la penetración microbiana y pueden crecer mohos, especialmente en la cámara de aire.

### **Limpieza**

Los distintos países conceden importancia diferente a la limpieza de los huevos con cáscara, lo que refleja la discusión continua sobre su eficiencia. Por ejemplo, la Unión Europea no legisla la limpieza de los huevos, pero se exige en los Estados Unidos y Canadá. Los que exigen que se realice, en parte, es porque se supone que la eliminación de la materia fecal de la superficie del huevo reduce el riesgo de que penetren bacterias patógenas en el huevo. Sin embargo, otros han indicado que, concretamente por lo que se refiere a huevos que han estado almacenados durante periodos prolongados, el lavado de la superficie aumenta los porcentajes de alteración debido a que aumenta la penetración de las bacterias [Sparks, 1944]. Típicamente, los fabricantes de ovoproductos prefieren huevos limpios y con frecuencia estipulan que los huevos provistos de cáscara estén visiblemente limpios, intactos y exentos de deterioro físico.

Los huevos se pueden limpiar o lavar. La limpieza en seco se suele realizar con un cepillo duro, con papel de lija, o con viruta de acero. Los limpiadores mecánicos en seco, con frecuencia son de limpieza fácil y requieren cambios frecuentes de los cepillos. La limpieza en seco también elimina la cutícula de los huevos, haciéndolos más sensibles a la penetración microbiana y a la alteración en caso de que posteriormente se humedezcan [Brown *et ál.*, 1965]. Durante la limpieza en seco, los microorganismos existentes en la superficie de la cáscara pueden ser forzados hacia el interior de los poros de la cáscara de huevo, favoreciendo la penetración. Sin embargo, si los huevos se almacenan bajo control apropiado de la humedad, la limpieza en seco puede ser tan eficaz, por lo menos, como el lavado de los huevos (Tabla 21).

**Tabla 21.** Porcentaje de huevos ligeramente sucios penetrados por bacterias durante el almacenamiento de 9 meses a 1.7-4.4°C y 65-80% de humedad relativa, según el método de limpieza empleado. Fuente: Miller, 1959.

<b>Método de limpieza</b>	<b>Número de huevos examinados</b>	<b>Porcentaje de huevos penetrados</b>
<b>Limpiados en seco con cepillo mecánico</b>	577	3.5
<b>Lavados en detergente, aclarados en agua</b>	276	7.3
<b>Lavados con detergente, sin aclarado</b>	286	7.0
<b>Lavados con detergente-higienizante, aclarado en agua</b>	278	13.3
<b>Lavados con detergente-higienizante, sin aclarado</b>	284	4.2

Los huevos se pueden lavar en un baño de agua o en un baño de agua combinado con limpieza mecánica mediante cepillos o virutas de acero. Sin embargo, las maquinas más modernas para lavar huevos emplean sistemas de lavado por atomización. La típica lavadora continua de huevos consta de tres etapas: 1) una cámara de lavado donde se lavan los huevos con agua caliente y detergente usando chorros de alta presión; 2) una cámara de aclarado que generalmente incluye un agente higienizante; y 3) una cámara de secado [Sparks, 1994]. En América del Norte, la mayoría de los fabricantes lavan los huevos cuando los reciben para evitar la tarea de seleccionarlos [Forsythe, 1970], pero en algunos países sólo se lavan los huevos sucios. Se han realizado muchos intentos para aumentar la calidad de conservación de los huevos mediante lavado perfeccionado y/o desinfección de la cáscara. Se sabe que varios factores relacionados con el lavado de huevos influyen en la penetración microbiana y por tanto en la alteración. Estos factores, que a continuación se relacionan [Stadelman, 1944]:

- El lavado de los huevos en un líquido que éste a una temperatura más baja que los huevos se traduce en que el líquido (líquido más bacterias) es aspirado a través de los poros [Haines, 1938; Haines y Moran, 1940; Brant y Starr, 1962]. La temperatura de la solución debe ser por lo menos 12°C más elevada que la temperatura de los huevos.
- Los huevos visiblemente sucios tienden a tener un porcentaje de alteración alto que los que tienen aspecto de limpios.
- Toda operación que humedezca la cáscara tiende a aumentar la alteración, por ejemplo, la sudoración, la limpieza con paño húmedo. Presuntivamente, el agua penetra en los poros por capilaridad aun en el caso de que no exista diferencia de presión/temperatura.

- El daño a la cutícula se traduce en un aumento de la penetración microbiana. Las investigaciones realizadas han indicado que las lavadoras de huevos provistas de sistemas de atomización continua no dañan la cutícula [Kuhl, 1987].
- El agua de lavado que contiene hierro aumentará el nivel de hierro en el albumen, neutralizando el efecto antimicrobiano de la conalbúmina. El agua de lavado debe contener <1- 2 ppm de Fe (III) mientras que los niveles por encima de 5 ppm aproximadamente han sido relacionados con la alteración acelerada [Garibaldi y Bayne, 1962; Board *et ál.*, 1968] y con el crecimiento de bacterias patógenas [Becirevic *et ál.*, 1988].
- La reducción al mínimo de los niveles de microorganismos en el agua de lavado mediante el uso de agua de alta calidad y desinfectantes o detergentes alcalinos, reduce el impacto microbiológico del lavado.

Las exigencias recomendadas para el lavado comercial de huevos incluyen los puntos siguientes:

**Huevos.** Solo se deben lavar huevos frescos e intactos que hayan sido enfriados a 10- 14°C, con lo cual se puede conseguir fácilmente una diferencia de temperatura adecuada entre el huevo y el agua de lavado. Los huevos sucios y dañados se alteran con una frecuencia y rapidez mayores que los huevos limpios y el lavado puede intensificar la alteración durante el almacenamiento subsiguiente, prescindiendo de si los huevos estaban sucios o no antes del lavado (Tabla 22). El lavado debe tener lugar tan pronto como sea factible después de su recogida; los microorganismos que han tenido tiempo para penetrar hasta la membrana interna no son eliminados ni destruidos fácilmente. Los huevos se deben manejar con cuidado en todo momento para evitar el daño físico y la contaminación.

**Tabla 22.** Influencia del lavado de los huevos en la alteración durante y después del almacenamiento. Fuente: Lorenz y Starr, 1952.

Estado Original	Lavados	Porcentaje de alterados
	Durante el almacenamiento	
Limpios	No	0.6
Sucios	No	12.7
	Después del almacenamiento	
Limpios	Si	5.8
Sucios	Si	19.9

**Máquina de lavado.** Los huevos se deben colocar en la cinta transportadora de tal manera que los chorros del agua de lavado y los cepillos lleguen por completo a todos los huevos. La máquina debe utilizar agua potable, pobre en sales metálicas, con menos de 2 ppm de hierro. Los huevos lavados en agua natural

que contenía 4.8 ppm de hierro presentaron un porcentaje de alteración por *Pseudomonas* del 6.2% después del almacenamiento, mientras que los lavados con agua que contenía 0.2 ppm de hierro solo presentaron un porcentaje de alteración del 0.8% [Garibaldi y Bayne, 1962]. No se ha indicado si el agua dura favorece la alteración. La temperatura de lavado debe ser 40-42°C, lo suficientemente elevada para garantizar el lavado adecuado y para que no exista riesgo de dañar la cutícula. El agua de lavado debe estar limpia, filtrada o purificada, para garantizar que la materia orgánica y la carga microbiana se mantienen a niveles bajos. El detergente alcalino con poca espuma que se utiliza debe ser capaz de elevar el pH del agua de lavado hasta 10-11 y de mejorar la eficacia del agua para eliminar la suciedad.

Se utilizan detergentes alcalinos porque los detergentes ácidos atacan la cáscara. El lavado de huevos experimentalmente con un 1- 3% de ácido acético destruyó muchos microorganismos y limpió la superficie de la cáscara pero redujo el grosor de la cáscara y la calidad del huevo [Heath y Wallace, 1978]. Los compuestos alcalinos simples, como los fosfatos o el metasilicato de sodio son apropiados para esta finalidad lo mismo que las complicadas mezclas patentadas [Swanson, 1959]. Un buen detergente debe de eliminar físicamente hasta el 92% de las bacterias de la superficie de la cáscara [Forsythe *et ál.*, 1953; Bierer *et ál.*, 1961a, b]. La eficacia del lavado para eliminar SE y otros serotipos depende del pH del agua de lavado y de la temperatura [Holley y Proulx, 1986; Catalano y Knabel, 1994a, b]. La supervivencia de patógenos era más probable con la temperatura de lavado baja (32- 35°C) y el pH bajo (9- 10) comparados con la temperatura alta (38- 43°C) y el pH alto (11- 12) [Catalano y Knabel, 1994a, b]. El porcentaje de destrucción de SE en el agua de lavado también fue aumentado por la concentración elevada de detergente y por los sólidos de los huevos. Se observó contaminación cruzada por SE con agua de lavado a pH 9 pero no a pH 11 [Catalano y Knabel, 1994b]. *Yersinia enterocolitica* [Southam *et ál.*, 1987] y *Listeria monocytogenes* [Brackett, 1988; Laird *et ál.*, 1991] persisten en el agua de lavado de los huevos. La inactivación de *L. monocytogenes* y de ST en el agua de lavado de los huevos en función de la temperatura, pH, de la concentración de cloro y del contenido de sólidos de los huevos fue definida mediante una ecuación lineal que se puede utilizar para predecir la supervivencia de patógenos [Leclair *et ál.*, 1994].

En un estudio reciente, se analizaron los contenidos y las superficies de las cáscaras de huevos no lavados. *Salmonella* no fue detectada ni en las superficies ni en los contenidos de los huevos, únicamente *E. coli* fue aislada de la superficie del huevo, de huevos rotos y al parecer no hubo presencia en el contenido de los huevos [Chousalkar *et ál.*, 2010]. Usando la PCR, se detectaron la presencia del gen *STa* (enterotoxina de *E. coli* ETEC), este estudio corrobora la persistencia de



cepas virulentas de *E. coli* en huevos no lavados y rotos, ya que la enterotoxina es estable a tratamientos térmicos como la cocción del huevo, produciendo una intoxicación por su consumo [Harbrecht y Bergdoll, 2006]. Se ha visto que para *E. coli* es difícil que pueda moverse a través de cascara de huevo intactas, sin embargo si ésta se encuentra dañada o rota, *E. coli* es capaz de penetrar y moverse en el interior del huevo [De Reu *et ál.*, 2006]. Se ha observado que *E. coli* tiene factores de patogenicidad una vez dentro del huevo, por ejemplo, aumento de la supervivencia en el suero y resistencia a la fagocitosis [Vidotto *et ál.*, 1991; Waters y Corsa, 1991], además es móvil. En condiciones experimentales, se ha visto que *E. coli* O157:H7 puede colonizar el oviducto [Berry *et ál.*, 1985], sin embargo esto solo ha sido en condiciones de laboratorio, hasta la fecha no se ha encontrado este patógeno en huevos, ovoproductos ni en los tejidos reproductivos de gallinas contaminadas naturalmente.

Se debe aplicar un aclarado final con agua limpia que contenga un higienizante [USDA, 1975a]. Los higienizantes utilizados habitualmente incluyen 100-200 ppm de cloro, compuestos de amonio cuaternario o hipoclorito cálcico, o 12-25 ppm de yodo. Si se utiliza yodo, es necesario un aclarado final en agua potable. El uso de higienizantes destruye muchas de las bacterias que quedan. Además de tratar la superficie del huevo, estos compuestos también higienizan las cintas transportadoras que se ponen de nuevo en circulación. La temperatura del agua del aclarado, 43-45°C, en la superficie del huevo debe ser siempre ligeramente más elevada que la del agua de lavado. Algunos investigadores han demostrado que los yodóforos, los compuestos de amonio cuaternario [Sauter *et ál.*, 1962], y los compuestos de bromo-yodo [Forsythe, 1970], son más eficaces, especialmente si se deja que queden en las cáscaras de los huevos sin un aclarado posterior con agua limpia. Algunos prefieren los detergentes higienizantes porque limpian e higienizan al mismo tiempo. Sin embargo, la materia orgánica del agua de lavado destruirá gran parte de la eficacia del higienizante por lo que, típicamente, es más eficaz una operación de dos fases (lavar- higienizar).

Casi todas las máquinas lavadoras existentes en el comercio reciclan el agua caliente tratada con detergente/higienizante. Ésta atraviesa una serie de filtros que separan la mayor parte de la materia orgánica. El agua rebosa lentamente y su volumen se completa con solución nueva. Después de unas 4 horas, se vacía la máquina y empieza de nuevo el ciclo. Con tal de que la operación de rellenado se realice con un ritmo adecuado y se mantengan los niveles de detergente, la carga microbiológica se puede mantener en un nivel aceptable. En las fábricas de ovoproductos, el agua está siendo cada vez reutilizada a medida que la adquisición y la eliminación de aguas se encarecen. Se debe utilizar procedimientos adecuados de tratamiento para tratar toda el agua reciclada.

## **Post-lavado**

Inmediatamente después del aclarado, los huevos se deben secar rápida y completamente. El secado rápido reduce el riesgo de que las bacterias que quedan en la superficie del huevo sean aspiradas hacia el interior del huevo cuando éste se enfría a temperatura ambiente. La manipulación cuidadosa de los huevos después del lavado es importante para evitar la re-contaminación. Después del secado completo, los huevos se deben mirar al trasluz cuidadosamente utilizando cintas transportadoras y material limpios. Se deben apartar todos los huevos agrietados. Los huevos mirados al trasluz se deben colocar en envases nuevos y después se deben almacenar y distribuir de una manera que garantice que la superficie del huevo permanece seca y no se contamina de nuevo. Se debe evitar la condensación sobre los huevos.

## **Revestimiento de los huevos**

La mayoría de los países no permiten los revestimientos de la cáscara en los huevos frescos producidos a escala comercial. Para proteger a los huevos con cáscara frescos de la pérdida de agua y del aumento asociado del volumen de la cámara de aire durante el almacenamiento en frío, se han utilizado sprays de aceite mineral (aceite de parafina). El aceite no protege a los huevos viejos frente a su elevada sensibilidad a la penetración ni frente al crecimiento de bacterias de la alteración [Elliott, 1954]. Los experimentos han demostrado que los revestimientos de alginatos, el ácido polimetacrílico y ciertos cauchos contribuyen a mantener la calidad del huevo tan eficazmente como el aceite [Rutherford y Murray, 1963]. Se ha informado de que la prolamina de maíz, cloruro de polivinilideno, la emulsión de epoleno y el derivado del azúcar hidrolizado más goma laca retardan mucho la penetración de *Pseudomonas fluorescens* y de ST [Tryhnew et ál., 1973].

El vidrio soluble (silicato sódico) interacciona con el silicato de la cáscara para producir una barrera impenetrable de silicato cálcico que mejora la retención de las calidades funcionales durante el almacenamiento. Se ha utilizado en épocas de escases aguda y cuando no han existido otras posibilidades para el almacenamiento a largo plazo de los huevos.

Un estudio reciente, evaluó al quitosano o quitosán como barrera contra la penetración de *Salmonella* en el huevo [Lelue et ál., 2011]. Este polímero ha sido de interés en estos últimos años debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, no es tóxico y lo más importante, a su actividad antimicrobiana contra hongos, levaduras, bacterias Gram negativas y positivas [Sagoo et ál., 2002; Raafat y Sahl, 2009]. El uso como revestimiento de la cáscara en los huevos frescos con este biopolímero ha sido reportado en varios estudios

por ser efectivo para prevenir la penetración de microorganismos en los huevos frescos, manteniendo así su integridad interna y, alargando su vida de anaquel [Bhale *et ál.*, 2003; Caner, 2005; Caner y Cansiz, 2007; Kim *et ál.*, 2006]. El quitosán ha mostrado tener actividad antimicrobiana como cubierta en huevos contra *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus warneri*, SE, ST, *E. coli* y *Listeria monocytogenes* [Leleu *et ál.*, 2011]. Con esto se ha demostrado que esta cubierta no solo puede proteger al huevo de la penetración de las bacterias, también puede reducir la carga microbiana inicial de la cáscara.

### **Pasteurización (termoestabilización)**

Desde 1867 hasta la actualidad, ha habido varias referencias en la bibliografía científica y de las patentes sobre la eficacia del calor para destruir bacterias de la superficie de la cáscara y de las membranas y de la proximidad de las mismas, el calor crea una capa casi impenetrable de proteína coagulada casi inmediatamente por debajo de las membranas de la cáscara. Esta capa reduce la evaporación en el almacenamiento subsiguiente. Ha habido informes de pérdida de propiedades funcionales resultante de este tratamiento [Goresline *et ál.*, 1950; Knowles, 1956]. El calor se debe aplicar dentro de las 24 horas siguientes a la recogida porque los microorganismos que han penetrado en la clara ya no serán destruidos por el tratamiento térmico mínimo aplicado [Feeney *et ál.*, 1954]. Si bien este tratamiento no ha sido utilizado a escala comercial durante muchos años, los brotes de SE han suscitado un interés renovado en la ideación de técnicas para pasteurizar los huevos con cáscara intacta [Hou *et ál.*, 1966].

Recientemente esta técnica denominada pasteurización con aire caliente, ha sido empleada experimentalmente para descontaminar las superficies de las cáscaras de los huevos en huevos contaminados con SE [Pasquali *et ál.*, 2010]. En dicho estudio, se comprobó que un tratamiento con calor reduce la carga de SE hasta un 1.9 log, el tratamiento fue 2 disparos de 8 segundos a 600°C con intervalos de aire frío de 30 segundos, las muestras fueron examinadas durante 24 días almacenadas a 20°C. En otras investigaciones han reportado la reducción de 5 ciclos logarítmicos para SE [Hou *et ál.*, 1996] con un tratamiento a 55°C durante 180 minutos. Manfreda *et ál.*, (2010) reportaron una reducción en la carga de SE y *Listeria monocytogenes*, mientras que para *E. coli* no hubo resultados estadísticamente significativos en los huevos tratados y no tratados; el seguimiento de esta descontaminación se realizó durante 1 mes, las muestras fueron almacenadas a 20°C. El tratamiento seleccionado fue dos disparos de 8 segundos a 600°C e intervalos de aire frío (20-25°C) por 32 segundos [Manfreda *et ál.*, 2010]. Es importante mencionar que la calidad del huevo no se vio afectada por el tratamiento en todos los estudios mencionados.

## Alternativas para la descontaminación de la superficie

Anteriormente se empleaba el agua caliente a temperaturas de pasteurización para descontaminar la superficie de los huevos, Himathongkham *et ál.*, (1999) emplearon un tratamiento a 100°C durante 3 segundos. Sin embargo, esta técnica mostró micro grietas en las cáscaras [Himathongkham *et ál.*, 1999], con esto se incrementaba el riesgo de penetración de microorganismos patógenos. Tratamientos de 55 a 60°C necesitaban prolongar el tiempo de exposición en los huevos: 25 minutos para reducir la carga a 3 ciclos logarítmicos de SE [Hou *et ál.*, 1996], 50-57 minutos son necesarios para inactivar por completo a SE a 58°C [Schuman *et ál.*, 1997]. Sin embargo, estos tiempos están muy lejos de usarse en la industria, además estos tiempos están asociados a cambios perjudiciales en la calidad del albumen [Schuman *et ál.*, 1997].

Actualmente existen investigaciones en el empleo de conservadores naturales para prevenir el crecimiento de microorganismos en la superficie de las cáscaras de los huevos. Un ejemplo de ello, es el empleo de propoleo, una resina que obtienen las abejas de las yemas de los árboles [Greenaway *et ál.*, 1990; Schmidt, 1997], esta sustancia tiene propiedades antibacteriales, antifúngicas y antivirales [Ghisalberti, 1979; Krell, 1996; Bankova *et ál.*, 2000], de hecho es empelada por las abejas para cubrir por dentro la colmena con una mezcla de cera de abejas durante la construcción para proteger la colonia y las larvas de microorganismos patógenos como *Bacillus subtilis*, *B. alvei*, *Proteus vulgaris* y *P. galangin* [Ghisalberti, 1979]. Además, el propoleo ha demostrado tener efectos antibacterianos contra *Salmonella*, *S. aureus*, *P. vulgaris* y *E. coli* [Powers, 1964]. Debido a que es una sustancia natural y segura para su consumo, el propoleo se ha empleado para proteger productos agrícolas durante el almacenamiento. Copur *et ál.*, (2008) reportaron que el uso de propoleo para recubrir la cáscara de los huevos mejora la calidad interna de los durante su almacenamiento. En otro estudio realizado por Aygun *et ál.*, (2012) utilizando diferentes desinfectantes como alcohol etílico (70%), benzalconio y propoleo en la superficie de los huevos, reportaron que el propoleo presentó una mayor reducción de la carga microbiana en comparación con los demás desinfectantes, pudiéndose emplear como un conservador natural durante el almacenamiento de los huevos para prevenir la penetración y proliferación de microorganismos patógenos y de descomposición, además de que no presenta efectos perjudiciales en los componentes del huevo.

Pocos estudios han evaluado la calidad del huevo después de un tratamiento ultrasónico [Sert *et ál.*, 2011]. Existen estudios que con tratamientos a 35 kHz durante 5, 10 y 15 minutos han demostrado que la calidad del huevo después de un tratamiento ultrasónico no se ve afectada además, por otro lado la calidad microbiológica del huevo mejora, reduciendo la carga inicial en la superficie del huevo [Aygun y Sert, 2012]. Igualmente, Sert *et ál.*, (2011) reportaron que un

tratamiento a 35 kHz durante 15 minutos reduce la cuenta de mesófilos en la yema y clara del huevo. La aplicación de ondas ultrasónicas se ha empleado para desinfectar superficies, inactivando microorganismos y enzimas a través de la ruptura de las células [Floros y Liang, 1994]. Por ejemplo, un tratamiento ultrasónico inactiva a *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugos de manzana [Yuan *et ál.*, 2009]. Por lo que este tratamiento puede ser una alternativa en la eliminación de microorganismos en la superficie y en los componentes del huevo, comprobándose que la calidad de los huevos no se ve afectada en comparación con los tratamientos térmicos.

El uso de ozono como desinfectante ha sido aprobado por la FDA en alimentos [US-FDA, 2006]. Este gas ha demostrado ser un agente antimicrobiano contra un gran número de patógeno en diferentes alimentos como, lechuga, carne de res y huevo [Novak y Yuan, 2004; Selma *et ál.*, 2007; Perry *et ál.*, 2008]. La eficacia contra SE en la superficie de los huevos con ozono ha sido demostrado al igual que la capacidad del ozono para penetrar en el huevo [Rodríguez-Romo y Yousef, 2004; Rodríguez-Romo *et ál.*, 2007]. En un estudio realizado por Perry *et ál.*, (2008) se observó la reducción de SE en huevos inoculados cerca de la membrana vitelina y tratados con calor (57°C durante 21 minutos) seguido de un tratamiento con ozono (140 gramos/m<sup>3</sup> de ozono y 184-198 kPa por 40 minutos). La combinación de estos dos tratamientos redujo hasta 4.2 ciclos logarítmicos de SE; también se reportó que esta combinación es más efectiva en comparación con los dos tratamientos aislados. Este tratamiento contribuye a disminuir la carga microbiana en las cáscaras de huevos y en sus componentes, haciéndolos seguros.

## **Control**

El control de las bacterias en los huevos con cáscara exige un esfuerzo integrado que empieza en la instalación de producción de huevos y termina en el consumidor. Las gallinas ponedoras se deben criar en condiciones que reduzcan al mínimo el estrés y la contaminación ambiental del huevo después de que éste es puesto. Las jaulas, las yacijas y los materiales de los nidales deben estar limpios y se deben de mantener lo más exentos posibles de heces. Los huevos se deben recoger diariamente; lo ideal es recogerlos cada 4 horas. En esta fase y en las fases de multiplicación, transporte y venta, los huevos se deben mantener secos. Todos los huevos se deben almacenar con el polo romo hacia arriba para evitar el desplazamiento de la yema. Las medidas que se pueden llevar a cabo en la producción de huevos fueron revisadas por Humphrey (1994b) y se revisaran en el capítulo 7.

Si bien se sigue discutiendo la necesidad de refrigerar los huevos con cáscara, el enfriamiento rápido a una temperatura inferior a 10°C retardara el crecimiento de muchas bacterias de la alteración y patógenas. El enfriamiento se debe realizar

de modo que reduzca al mínimo el daño a la cutícula y a la cáscara, y solo se debe realizar cuando la superficie esté seca, a fin de evitar la aspiración de bacterias hacia el interior del huevo.

Los huevos se deben mirar al ovoscopio para eliminar como no comestibles los huevos alterados, los que tienen fugas, o los que estén inaceptables por cualquier otra causa. Estas técnicas ayudan a la separación de los huevos con yemas puncionadas y con grietas de la cáscara, y tiene aplicaciones prácticas en el control de calidad (esta parte del proceso se estudia a detalle en el capítulo de ovoproductos).

Si los huevos se lavan, el agua de lavado debe estar a 42°C o a una temperatura más elevada, de modo que esté por lo menos 12°C más caliente que los huevos. El agua debe ser potable y pobre en contenido de hierro. Debe contener un detergente alcalino, por ejemplo metasilicato de sodio o fosfato trisódico, y se debe rellenar continuamente para permitir un rebosamiento. Los huevos limpiados se deben aclarar en un aerosol de agua que contenga un desinfectante apropiado, por ejemplo cloro en la proporción de 100-200ppm, realizándose este aclarado final a una temperatura de 1-2°C más elevada que el agua. Por lo menos una vez al día, la máquina lavadora se debe vaciar, limpiar y rellenar con solución detergente. El lavado se debe realizar de modo que reduzca al mínimo el daño a la cutícula.

Inmediatamente después del lavado, se deben secar las cáscaras, y se deben enfriar de nuevo a 15°C. Los huevos con cáscara no se deben congelar ya que la congelación puede dañar la cáscara. Las operaciones de entrada y salida del almacén se deben realizar de tal manera que se evite la condensación sobre la superficie de la cáscara (sudoración). Todas las superficies de contacto con las cáscaras deben estar limpias y secas. La humedad de las instalaciones del almacén se debe mantener en el intervalo óptimo para asegurarse de que la superficie del huevo permanece seca sin que se acelere la pérdida de humedad del huevo ni la pérdida de calidad concomitante.

# VIRUS

Existen dos enfermedades virales, que si bien no han sido causantes de ETA'S por el consumo de huevo y ovoproductos, pueden provocar rápidas y severas pérdidas económicas a la agroindustria y el comercio. Actualmente se vive un brote de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) en México, lo que ha provocado la muerte de cerca de 4.9 millones de aves, perdidas por 50 millones de dólares, solo por mortandad de aves, una reducción en la postura y cierre de fronteras al huevo de Jalisco en el mercado nacional e internacional, impacto en la inseguridad alimentaria y finalmente el aumento en el precio del huevo y del pollo, respecto al primero el precio subió 133.3% en la ciudad de México al pasar de 15 a 35 pesos por kilo, aunque su precio ha llegado a ser de 40 hasta 55 pesos por kilo.

La enfermedad de Newcastle puede causar hasta el 100% de mortalidad en pollos susceptibles, esta enfermedad vírica es endémica en muchos países, lo que ocasiona graves pérdidas a la avicultura comercial por afectar tanto a las aves reproductoras, como a las progenitoras, pollos de engorda y gallinas de postura. Actualmente este virus no representa un problema a la salud humana ni se transmite a través de los alimentos.

## **Enfermedad de Newcastle**

La enfermedad de Newcastle (ENC) es una enfermedad viral contagiosa y fatal de las aves causada por el serotipo 1 de los paramixovirus aviares que pertenece al género Avulavirus de la subfamilia Paramyxovirinae, familia Paramyxoviridae, la cual puede causar hasta 100% de mortalidad en pollos susceptibles, distribuida mundialmente, ocasiona graves pérdidas a la avicultura comercial por afectar tanto a las aves reproductoras, como a las progenitoras, pollo de engorda y gallinas de postura comercial. Los primeros reportes de esta enfermedad fueron en Newcastle Inglaterra, de donde obtuvo su nombre. La ENC es tan virulenta que muchas aves mueren sin mostrar ningún síntoma clínico. En las parvadas de aves de corral sin vacunar, puede darse una tasa de mortalidad cercana al 100%. La ENC puede infectar y causar la muerte incluso en aves de corral vacunadas. Los animales afectados pueden presentar desde una enfermedad inaparente hasta un cuadro clínico fulminante. Los signos clínicos y las lesiones patológicas por sí solos sugieren la presencia de la enfermedad pero no son patonogmónicos y requieren del aislamiento o la demostración directa de la presencia del virus y posterior caracterización patogénica como diagnóstico confirmativo. En la actualidad, se reconoce que la enfermedad se mantiene controlada, pero de forma enzoótica en esta especie, en muchos de los países afectados [Barbezange y Jestin, 2003].

Desde finales del año 1996 hasta la actualidad se han presentado numerosos brotes de la enfermedad en diversas partes del mundo, que según varios autores [Alexander 2001; Cueto *et ál.*, 2001; Abolnik *et ál.*, 2004; FAO, 2004], constituyen elementos suficientes para que se les considere la cuarta panzootia de Newcastle, la cual afectó además de muchos países, a Australia, país que era libre de la enfermedad desde los años 1930-1932 [Kirkland, 2000; Westbury, 2001]. En el continente americano durante el último lustro se han reportado brotes de la enfermedad en la industria avícola comercial en México, Honduras, Colombia, Venezuela, en varios estados de los Estados Unidos y en Canadá [Senne, 2003; Pedersen *et ál.*, 2004; HandiStatus II, 2004; Toro *et ál.*, 2005].

En los Estados Unidos, una epidemia en el 2002-2003 provocó la muerte de más de 3 millones de aves y causó pérdidas en la industria, estimadas en 5 mil millones. La enfermedad producida por cepas de baja patogenicidad, común en las aves de corral en todo el mundo, puede disminuir la productividad, pero no tienen ningún impacto en el comercio internacional.

En México, la ENC es una de las enfermedades que mayor significancia económica y sanitaria han tenido en la industria avícola mexicana, desde el principio de la década de los 50. Probablemente el agente de la enfermedad fue introducido al país con mucha anterioridad a 1950; sin embargo, como la avicultura en esa época consistía en gallineros de traspatio, o de 50 a 100 aves y rara vez de 500 a 1000, cuando la enfermedad se presentaba en algunos de ellos, las pérdidas que ocasionaba por concepto de alta mortalidad y gran disminución en la postura, por el número reducido de aves, nunca se consideraron pérdidas de gran magnitud; situación que cambió después de 1952-1953, en que la avicultura empezó a realizar como una industria de alta producción de huevo para plato y de pollo rostizado. con establecimientos avícolas de 50, 100, 200 mil aves, muchas para esa época, en que se volvió de necesidad imprescindible proteger a cada parvada de cría y en cada granja, contra la amenaza de la enfermedad de Newcastle, que con su ataque a parvadas susceptibles, podía ocasionar el daño suficiente como para sacar fuera del negocio, a cualquier avicultor afectado. Desde los años 50 a la fecha, esta enfermedad ha sido probablemente una de las más importantes en la industria avícola nacional, tanto en lo económico, como en lo sanitario.

La ENC afecta los sistemas respiratorio, nervioso y digestivo. El período de incubación de la enfermedad oscila entre 2 y 15 días. Un ave infectada puede mostrar los siguientes síntomas (Figuras 39, 40 y 41) [Cuello *et ál.*, 2011]:

- Respiratorios: estornudos, respiración jadeante, secreción nasal, tos.
- Digestivos: diarrea líquida verdosa.



- Nerviosos: depresión, temblores musculares, alas caídas, tuercen la cabeza y el cuello, dan vueltas en círculos, parálisis completa.
- Disminución parcial a total de la producción de huevos.
- Producción de huevos de cáscara delgada.
- Inflamación de los tejidos alrededor de los ojos y en el cuello.
- Muerte súbita.

La tasa de muerte para las parvadas infectadas con ENC aumenta drásticamente [Cuello *et ál.*, 2011].



**Figura 39.** Signos y lesiones del tracto respiratorio por ENC.



**Figura 40.** Signos nerviosos: tortícolis y parálisis por ENC.



**Figura 41.** Caída de la puesta y alteración de la calidad de los huevos por ENC.

La ENC se propaga principalmente a través del contacto directo entre aves sanas y de las secreciones corporales de las aves infectadas. La enfermedad se transmite a través de los excrementos y las secreciones de la nariz, boca y ojos de las aves infectadas. La enfermedad se propaga rápidamente entre las aves mantenidas en confinamiento, como los pollos criados comercialmente. En las secreciones corporales de las aves se encuentran altas concentraciones del virus ENC, por lo tanto, la enfermedad se puede propagar fácilmente mediante medios mecánicos. El material portador de virus se puede recoger en zapatos y ropa y transportar desde una parvada infectada a otra sana. La enfermedad se propaga frecuentemente a través de cuadrillas de vacunación y recorte de pico, acarreadores de estiércol, conductores de camiones para el aprovechamiento de la grasa, personal de entrega de alimento, compradores de aves de corral, personal de servicio de huevos, y propietarios y empleados de las granjas avícolas. El virus que causa la ENC puede sobrevivir varias semanas en un entorno cálido y húmedo sobre plumas de aves, estiércol y otros materiales. Puede sobrevivir durante periodos extremadamente prolongados en material congelado. Sin embargo, el virus se destruye rápidamente por deshidratación y con los rayos ultravioletas de la luz solar. Las aves de contrabando adoptadas como mascotas, especialmente los papagayos amazónicos de América Latina, plantean un gran riesgo de introducción de ENC en las parvadas de aves de corral de los Estados Unidos. Los papagayos amazónicos que son portadores de la enfermedad, pero que no muestran síntomas, son capaces de propagar el virus ENC durante un mínimo de 400 días.

No hay pruebas de que el virus de Newcastle pueda ser transmitido a través del huevo y durante la incubación. Algunas cepas pueden ser transmitidas a través de los huevos a los pollitos incubados; la transmisión asociada con el huevo, de cepas altamente virulentas es posible, pero poco frecuente, ya que el embrión generalmente muere, al menos que la carga viral en el huevo sea baja. Otras

fuentes de virus en los pollitos recién nacidos son las cáscaras de huevo contaminadas con heces y huevos rotos o rajados.

El virus es inactivado a 56°C por 3 horas o 60°C durante 30 minutos, es inactivado a pH ácido, inactivado por formalina y fenol y sobrevive durante largos periodos a temperatura ambiente, especialmente en las heces [FAO,2007].

Su importancia económica radica en ser una de las enfermedades, en su forma patógena, más importante y devastadora que afecta al pollo. La magnitud de este problema a nivel mundial varía debido a la presentación de brotes recurrentes de la ENC caracterizados por alta mortalidad y otros donde solo se observan infecciones respiratorias ligeras o en algunos casos sin evidencias clínicas de enfermedad [Alexander, 2003]. Debido a su importancia en el mercado avícola internacional por los brotes que pueden afectar el comercio, la OIE (World Organization for Animal Health) (1999) cambió la definición de la enfermedad que ahora incluye en su reporte infecciones por virus de moderada y de alta virulencia, mientras que la definición anterior solo incluía las infecciones por cepas altamente patógenas [King, 2004].

Los brotes más virulentos de la enfermedad de Newcastle tienen un enorme impacto en aves de traspatio en los países en desarrollo, donde estas aves constituyen una fuente importante de proteína y esta enfermedad es endémica. En los países desarrollados, donde las formas más virulentas del virus han sido erradicadas, los embargos comerciales y restricciones causan importantes pérdidas económicas, durante un brote.

Las cepas velogénicas (las más virulentas) del virus pueden causar conjuntivitis en el humano, por lo general cuando la persona ha estado expuesta a grandes cantidades del virus. El personal del laboratorio y los que vacunan son afectados con mayor frecuencia. Los que trabajan con aves de corral rara vez son infectados y la manipulación o el consumo de productos de aves de corral no parece ser un riesgo. La conjuntivitis generalmente se mejora rápidamente sin tratamiento, pero el virus se elimina en las descargas oculares por 4 a 7 días. Todo contacto directo o indirecto con las aves debe evitarse durante este tiempo. La enfermedad autolimitante leve parecida a la gripe, con fiebre, dolor de cabeza y malestar también se ha reportado en humanos; en algunos casos, no se sabe si la enfermedad fue causada por el virus o erróneamente diagnosticada por reacciones cruzadas en las pruebas serológicas. Un informe reciente, confirmado por el aislamiento del virus, sugiere que el virus puede causar graves infecciones oportunistas en personas inmuno-suprimidas. Un paciente desarrolló neumonía mortal 18 días después de recibir un trasplante de células madres de sangre periférica. No había antecedentes de contacto con aves de corral, y la cepa

estaba estrechamente relacionada a los virus de la ENC de palomas [Cuello *et ál.*, 2011].

Uno de los objetivos del control es proteger a las aves de la infección con el virus y por otra parte reducir el número de aves susceptibles mediante la aplicación de la vacunación [Alexander, 1997]. Para el control, se tiene en cuenta como factor primordial la diseminación de la enfermedad y en consecuencia, se adoptan disposiciones a nivel nacional e internacional que regulan el comercio de los productos avícolas, así como, de aves vivas. Sin embargo, los factores más importantes en prevenir la introducción de la enfermedad y su diseminación en presencia de un brote, son las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en las explotaciones avícolas [Alexander, 1997].

## **Influenza Aviar**

La influenza aviar (IA) puede definirse como una enfermedad infecciosa de las aves, producida por el virus de la influenza tipo A, de graves consecuencias sanitarias y económicas. Se considera que todas las aves son susceptibles, aunque algunas especies lo son más que otras lo que origina un amplio espectro de síntomas que van desde una variante leve, incluso sin síntomas, como ocurre de ordinario en las aves silvestres, migratorias, los reservorios naturales, que son resistentes, hasta un cuadro altamente contagioso, de elevada mortalidad, que origina epidemias graves en gallinas, pollos, pavos y otras especies.

La infección tiene dos manifestaciones: baja patogenicidad y alta patogenicidad (Figura 42 y 43).

- La influenza aviar de baja patogenicidad (LPAI) se caracteriza por una enfermedad respiratoria leve, depresión y ligera baja en la postura, sin ocasionar muerte de los animales. La mayoría de las cepas víricas de IA corresponden a esta forma. Sin embargo algunas cepas víricas LPAI son capaces de mutar a virus HPAI en condiciones de campo.
- La influenza aviar de alta patogenicidad (HPAI) ocasiona depresión, pérdida del apetito, disminución de la postura; enfermedad respiratoria grave con tos, secreción nasal abundante y dificultad para respirar; puede ir acompañada de signos nerviosos y digestivos, como la diarrea; produce inflamación de la cara, hemorragias en crestas, barbillas y bajo la piel de las patas, y la muerte. En algunos casos se presenta únicamente elevada mortalidad sin signos previos aparentes.



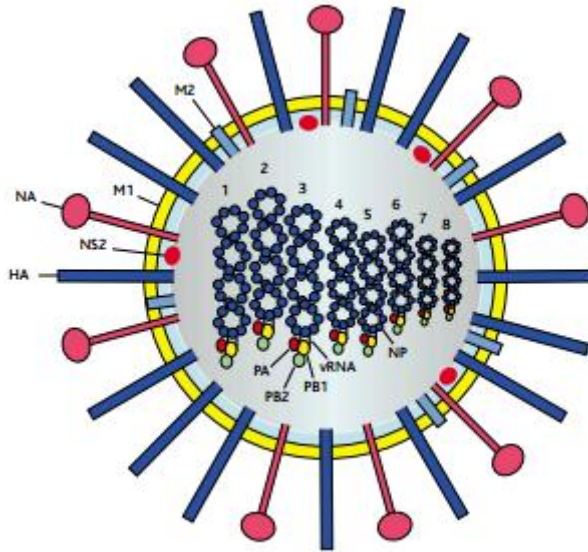
**Figura 42.** Las aves afectadas por HPAI pueden presentar hinchazón de la cabeza y la cara (Imagen de la izquierda). La hemorragia en la piel y las patas es solo uno de los signos que pueden presentar las aves infectadas con el virus que causa la HPAI (Imagen de la derecha).



**Figura 43.** La decoloración del color púrpura de la cresta puede ser un indicador de la HPAI.

Los virus influenza son Orthomyxovirus, un tipo de virus ARN especialmente variables. Afectan al hombre, otros mamíferos como el cerdo, caballo, focas, ballenas y numerosos tipos de aves, tanto domesticas (gallina, pavo, pato) como silvestres, en particular las aves migratorias. Los Orthomyxovirus se integran en la familia Orthomyxoviridae que comprende los géneros Influenzavirus (A, B y C) y Thogotovirus. En los animales solo se encuentran los virus influenza A (Figura 44), mientras que del hombre pueden aislarse los A, B y C.

El virus posee dos proteínas de superficie: hemaglutininas (H) y neuraminidasas (N), y es con base a éstas como se le clasifica. Existen 16 tipos diferentes de H y 9 de N, y los virus entonces reciben la denominación dependiendo de cuál combinación posean: H1N1, H1N2, H1N3 hasta H16N9, dando 144 posibles subtipos.



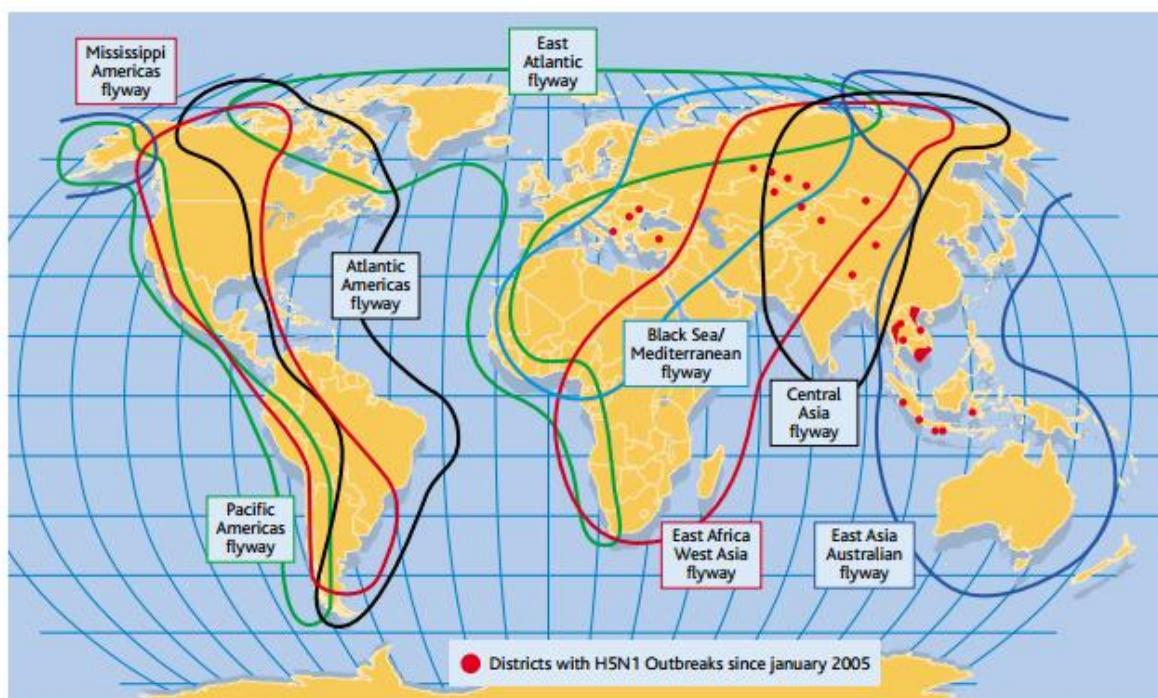
**Figura 44.** Representación esquemática de una partícula del virus de la gripe. Se representa la membrana viral (amarillo) con las glicoproteínas mayoritarias (hemaglutinina-HA y neuraminidasa-NA) y la proteína M2. La capa de proteína M1 se representa en azul claro, con las proteínas NS2 (NEP) asociada. En el interior se representan 8 ribonucleoproteínas con la nucleoproteína (NP) y las subunidades de la polimerasa (PB1, PB2 y PB3).

El virus de la influenza aviar siempre ha existido de manera natural en el mundo, y eventualmente afecta a las aves domésticas. Sin embargo, a partir de 1997 se han presentado brotes de influenza aviar de alta patogenicidad en aves de los países asiáticos, infectando a las aves silvestres y las domésticas y en pocas ocasiones, bajo situaciones muy particulares de convivencia estrecha, ha ocurrido la infección en los humanos.

En 1997, un virus de alta patogenicidad en pollos perteneciente al subtipo H5N1 fue identificado en los mercados de aves vivas de Hong Kong [Subbarao *et ál.*, 1998]. Este virus ocasionó 18 casos de infecciones documentadas en humanos, de los cuales murieron 8 personas. El virus fue eliminado de los mercados de Hong Kong gracias al sacrificio de todas las aves domésticas de esta ciudad. Sin embargo, ahora se sabe que los genes de este virus continuaron circulando en distintas cepas de virus de la gripe en aves silvestres y domésticas. En 2003 y 2004, los virus H5N1 aparecieron de nuevo en granjas de pollos en distintos países asiáticos, entre los cuales se encuentran Corea, China, Japón, Vietnam, Tailandia e Indonesia. Estos nuevos virus H5N1 son descendientes de los aislados en Hong Kong en 1997, aunque su composición genética y su antigenicidad ha sufrido cambios significativos [Li *et ál.*, 2004]. Los virus H5N1 siguen circulando actualmente en aves silvestres y comerciales en distintos países, y se han documentado más de 100 casos de infecciones esporádicas en humanos desde el 2004, que frecuentemente han producido enfermedad grave e incluso la muerte de los pacientes, aunque aún no se sabe con seguridad si existen muchos más casos de infecciones asintomáticas en humanos. A pesar de que se ha



detectado la transmisión ocasional entre humanos, no parece que el virus sea capaz de propagarse eficientemente de humano a humano hasta el momento, un factor necesario para la iniciación de una pandemia. El virus H5N1 continúa propagándose a otros países en especies aviares, bien sea por transporte incontrolado de aves enfermas, o por migración de aves silvestres (Figura 45), y recientemente de julio a octubre del 2005, también ha sido detectado en Rusia, Turquía, Rumanía, Croacia, Ucrania y Grecia.



**Figura 45.** Principales rutas migratorias del mundo y localización geográfica de los brotes registrados del virus H5N1. Fuente: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2006.

El subtipo H5N1 no es el único que ha producido hasta la fecha contagios humanos. En los últimos años se recogen también casos en el hombre por el subtipo H7N7, responsable de un brote importante en Holanda difundido después a Bélgica y Alemania, en el que se contabilizaron 260 afectados con 82 casos confirmados, principalmente de conjuntivitis, y 1 fallecimiento. También, por el subtipo H9N2 (en el que se contabilizan 8 casos de gripe benigna, repartidos entre Hong Kong y China), por el subtipo H7N2 y por el subtipo H7N3. En cualquier caso, el subtipo H5N1 supera a todos los demás en motivo de preocupación, primero por su agresividad y capacidad de difusión entre las aves así como por el número de contagios contabilizados en el hombre. Bien es cierto, sin embargo, que relativamente los casos son muy escasos si se tienen en cuenta las innumerables oportunidades que el virus aviar habrá tenido de facilitar exposiciones al hombre. Al interés derivado de su capacidad patógena y difusión suman, los expertos, el riesgo de que el subtipo resuelva por mutación u otro procedimiento la

incompetencia para su transmisión interhumana (hasta la fecha no demostrada o reducida a grupos familiares sin interés epidemiológico) y que pueda transformarse en un virus pandémico, especialmente si se considera que este subtipo manifiesta una elevada capacidad de mutación con tendencia a incorporar genes de virus que afectan a otras especies animales, lo que no excluye la incorporación de genes de tipos o subtipos humanos.

En 1995 nuestro país padeció un brote de influenza aviar de alta patogenicidad en aves, el cual fue controlado en pocos meses, y al día de hoy hay un nuevo brote del subtipo H7N3 de influenza aviar de alta patogenicidad (HPAI) en México, cuyo origen fue Jalisco.

En aves, los virus de la influenza aviar se excretan a través de las heces, saliva y las secreciones nasales [Acha y Szyfres, 2003; CDC, Swayne, 2008]. Las heces contienen grandes cantidades de virus, y la transmisión por vía fecal-oral es el principal mecanismo de transmisión de los virus LPAI en las poblaciones de aves silvestres [Fouchier y Munster, 2009]. También es posible la transmisión fecal-cloacal [Fouchier y Munster, 2009]. La transmisión fecal se ve favorecida por la persistencia de los virus de la influenza aviar en ambientes acuáticos durante períodos prolongados, particularmente a bajas temperaturas [Myers *et ál.*, 2007; Fouchier y Munster, 2009]. Se cree que la transmisión respiratoria de los virus de LPAI no es importante en la mayoría de las aves silvestres; sin embargo, es posible que tenga un rol importante en algunas especies, particularmente las que viven en la tierra. Algunos aislamientos recientes de los virus del linaje asiático H5N1 (HPAI) han sido encontrados en mayores cantidades en las secreciones respiratorias, que en las heces. Esto sugiere que, al menos en algunas aves silvestres, estas cepas ya no son transmitidas primariamente por la vía fecal-oral.

Una vez que un virus de la influenza aviar ha ingresado a una parvada de aves de corral, este puede diseminarse en un criadero tanto por vía fecal-oral como por aerosoles, debido a la proximidad, con que se encuentran las aves. Los fomites pueden ser importantes en la transmisión y las moscas pueden actuar como vectores mecánicos [WHO, 2006; Swayne, 2008]. Los virus de la influenza aviar también se han hallado en la yema y en la albúmina de los huevos de las gallinas infectadas con virus de HPAI [Swayne, 2008]. Si bien es poco probable que los huevos infectados incuben, los huevos rotos pueden transmitir el virus a otros pollitos dentro de la incubadora. También es probable que los virus de BPAI se excreten en los huevos, pero la evidencia actual sugiere que esto es muy poco frecuente, si es que ocurre realmente [Cappucci *et ál.*, 1985].

En los países en donde la HPAI ha sido erradicado de las aves de corral, la enfermedad puede ser introducida en los criaderos a través de aves acuáticas, playeras ó costeras migratorias, o por aves de corral o fomites infectados. Las aves



migratorias, capaces de volar largas distancias, pueden intercambiar virus con otras poblaciones en los sitios donde realicen escalas o paradas, o en donde pasen el invierno [Fouchier y Munster, 2009]. Las aves silvestres normalmente portan solamente, la forma de baja patogenicidad de los virus de la influenza aviar. Una vez introducidos en las aves de corral, estos virus se recombinan o mutan para producir virus de HPAI. Sin embargo, las cepas del linaje asiático de HPAI H5N1 parecen ocurrir regularmente en las aves silvestres, a pesar de que su importancia en la transmisión de estos virus a las aves de corral es controvertida [WHO, 2006]. Los virus H5N2 de HPAI también han sido detectados recientemente en algunos patos y gansos silvestres asintomáticos de África.

Se admite que el virus puede sobrevivir en los cadáveres y en los tejidos (músculos esqueléticos y otros) de los animales enfermos, pero no se han publicado datos precisos de su duración; en un trabajo que utilizaba cadáveres de aves infectadas para compostaje, la supervivencia del virus de la influenza aviar no pasó de diez días [Senne, 1994]. El riesgo de propagación del virus a partir del comercio y distribución de carne fresca o congelada no ha sido estimado como un hecho probado por las autoridades sanitarias, probablemente y entre otras razones, debido al carácter agudo y explosivo de los brotes en las aves domésticas aunque, en teoría, no podría excluirse; en este sentido durante el pico de la infección, que se produce de 2 a 5 días después del contacto con el virus, los tejidos comestibles de los animales infectados pueden contener grandes cantidades de virus [EFSA, 2006]. En general, los virus de la influenza aviar se mantienen viables a bajas temperaturas.

A pesar de que la mayoría de infecciones por virus H5N1 en humanos han resultado del contacto directo con aves de corral, alguno de sus subproductos, o superficies y objetos contaminados con sus heces, existe la preocupación de que el virus pueda ser transmitido por aguas ya que en las anátidas migratorias la transmisión es fecal-oral. Como ya hemos señalado, pese a que para la mayoría de los subtipos de virus influenza A las aves silvestres son reservorios que no muestran síntomas de la enfermedad y excretan el virus en cantidades muy elevadas, perpetuando así la transmisión a otras aves [CE, 2006a, b, c], en el caso del subtipo H5N1 las infecciones pueden ser letales, especialmente en algunas especies como los gansos.

Se ha comprobado que un pato infectado excreta cantidades de hasta  $10^{10}$  dosis infecciosas por día, y que el virus puede permanecer activo en aguas contaminadas por heces hasta 4 días a una temperatura de 22°C y hasta 30 días a 0°C [OMS, 2006]. Por otro lado, un reciente estudio coordinado por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) sobre el riesgo asociado al baño en aguas de zonas con aves portadoras del virus H5N1

determina que este riesgo es despreciable [ECDC, 2006]. Tampoco se ha asociado riesgo alguno a partir de aguas de abastecimiento humano o avícola. Los virus pueden sobrevivir en las heces durante, al menos, 35 días a baja temperatura (4°C), mientras que a 37°C, según las pruebas de estabilidad en muestras fecales realizadas con los virus H5N1 circulantes en 2004, podrían sobrevivir durante 6 días. Los virus de la gripe aviar también pueden subsistir varias semanas en superficies contaminadas como las de los corrales domésticos o similares [OMS, 2005].

Dadas estas propiedades de supervivencia, los procesos utilizados habitualmente para conservar los alimentos, como la congelación o la refrigeración, no reducen sustancialmente la concentración o viabilidad de estos virus en la carne de pollo contaminada.

En relación con los huevos, aunque una de las primeras manifestaciones de la enfermedad es el cese de la puesta, no puede excluirse que en los primeros días de infección, durante el periodo de incubación, los huevos puedan vehicular virus HPAI, tanto en su interior como en la cáscara. En el caso de la superficie, la presencia del virus puede deberse a la contaminación fecal adquirida durante la puesta, mientras que la contaminación interior procederá de la viremia o de la replicación del virus en el oviducto [EFSA, 2006]. Hay que tener presente, además, que algunas especies como los patos, pueden infectarse sin manifestar síntomas o ser estos muy débiles (puede observarse sinusitis, diarrea y un ligero incremento de la mortalidad en las explotaciones afectadas), lo que también puede ocurrir en el caso de gallinas vacunadas [OMS, 2005].

Las aves silvestres infectadas que no desarrollan síntomas, excretan el virus por las heces hasta un mes después, difundiendo el virus en zonas libres y a otras aves. De entre las domésticas (y se supone también que entre las silvestres que desarrollan la enfermedad), las que sobreviven excretan el virus durante, al menos, 10 días, oralmente y en heces, facilitando igualmente la diseminación a otras aves [OMS, 2004].

La OIE [OIE, 2002] informa de la resistencia a agentes químicos o físicos, aunque en esta referencia no se indica la matriz o el alimento del que se trata.

- Temperatura: inactivación a 56° C/3 horas; 60° C/30 minutos
- pH: inactivado a pH ácido
- Químicos: inactivado por agentes oxidantes, dodecilsulfato sódico, disolventes de lípidos y propiolactona.
- Desinfectantes: Inactivado por formalina y compuestos iodados.
- Supervivencia: continúa viable largos períodos en tejidos, heces y agua.

El virus se inactiva a las temperaturas que se alcanzan con los métodos normales de cocción (al menos 70°C en el centro del producto, esto es, muy caliente, o cuando ya no quede ningún trozo de carne rosada) [OMS, 2005].

El efecto del pH en el virus depende del subtipo, de la cantidad de virus, del medio, del valor de pH y de la duración de la exposición, por lo que no se puede garantizar que el pH gástrico inactive el virus [EFSA, 2006].

Algunos datos indican que el tratamiento con antivirales (oseltamivir) podría reducir la replicación del virus pero hay pocos datos para evaluar su efectividad clínica [OMS, 2006]. Por lo que se refiere al posible riesgo derivado de la vacunación preventiva de aves, no se considera que implique riesgos desde el punto del consumo de alimentos procedentes de ellas [CE, 2006b; FSA, 2006].

El tiempo de supervivencia de los virus en las heces que puedan contaminar superficies como la cáscara del huevo es suficiente para permitir su diseminación durante las operaciones de comercialización y distribución llevadas a cabo dentro del periodo de conservación de los huevos.

No existen pruebas epidemiológicas de que alguno de los casos humanos descritos hasta la fecha haya tenido lugar por ingestión de huevos u ovoproductos. La cocción adecuada inactiva los virus presentes en el interior de un huevo, aunque los protocolos de pasteurización que la industria aplica a los productos de huevo líquido también resultan eficaces. En consecuencia, no deben consumirse crudos o parcialmente cocidos (yema sin cuajar) los huevos procedentes de zonas donde se hayan producido brotes en aves. La pasteurización o la cocción de los huevos también reducirán sustancialmente el riesgo de transmisión de otras infecciones como la salmonelosis. En relación con estos extremos, la Agencia británica de estándares alimentarios opina que no es necesario cocinar los huevos hasta que la yema esté sólida para proteger al consumidor de la gripe aviar [FSA, 2006] y otras opiniones estiman que los virus de gripe aviar HPAI se inactivan con protocolos de pasteurización baja en huevo líquido pero no en claras de huevo deshidratadas [Swayne y Beck, 2004]. También se señala que 1 solo segundo a 70° C inactiva el virus en carne [Swayne, 2006]. En cualquier caso, dado que los resultados podrían depender de la cepa de virus utilizada en el estudio, de la matriz donde se realiza el tratamiento o de la concentración de virus, parece más recomendable para el consumidor atender a las recomendaciones genéricas de organismos como la OMS que recomiendan una cocción total de los alimentos. En el caso de los tratamientos industriales, además de la información facilitada por la OMS, la OIE indica una serie de condiciones estándar aplicadas por la industria que son adecuadas para inactivar el virus en huevo y ovoproductos (OIE, 2006).

Un brote importante de la HPAI sería costoso para la industria de aves de corral, los consumidores y los contribuyentes. La erradicación del brote de la HPAI ocurrido durante 1983 y 1984 en el Noreste de los Estados Unidos se logró mediante el sacrificio de más de 17 millones de aves, con un costo cercano a los 65 millones de dólares. Este brote también provocó el alza del precio minorista de los huevos en más del 30 por ciento. Actualmente en México se vive esta realidad.

Los actuales brotes del subtipo H7N3 de influenza aviar de alta patogenicidad (HPAI) en el estado de Jalisco, México, demuestran el constante riesgo existente por la circulación de virus de la gripe aviar para las industrias avícolas de todo el mundo. En países con industrias avícolas importantes, caracterizados por un alto número de animales viviendo en altas densidades, brotes de HPAI pueden provocar rápidas y severas pérdidas económicas a la agroindustria y el comercio. Los países con infraestructura más débil pueden que no resistan los impactos en los precios de los alimentos y la inseguridad alimentaria resultante, especialmente en los hogares más vulnerables.

Este brote y su rápida propagación a través de una mayor zona de producción que también abastece a los mercados de exportación es un claro recordatorio de la necesidad de los constantes altos niveles de bioseguridad y los desafíos inherentes de esta realidad, especialmente en sistemas mixtos donde las explotaciones de traspatio también están presentes.

El 13 de junio del 2012, tres brotes del subtipo H7N3 fueron reportados en los municipios de Acatic y Tepatitlan, en el estado de Jalisco, en un área de alta densidad de aves de corral. El reporte inicial incluía tres granjas de ponedoras comerciales y el establecimiento de una zona en cuarentena de 40 km. Las aves en las granjas infectadas, entre 32 y 94 semanas de edad, presentaban signos clínicos como: jadeo, depresión, letargo, alas caídas, postración, fiebre y la muerte. Durante los primeros meses del brote, dos granjas más de aves de corral reportaron otro brote fuera de la zona de cuarentena, por lo que la zona inicial de cuarentena fue ampliada a 60 km. Datos epidemiológicos actuales señalan una tasa de incidencia de 24.6%, una tasa de mortalidad de 9.6% y una tasa de letalidad del 39.2% [FAO, 2012].

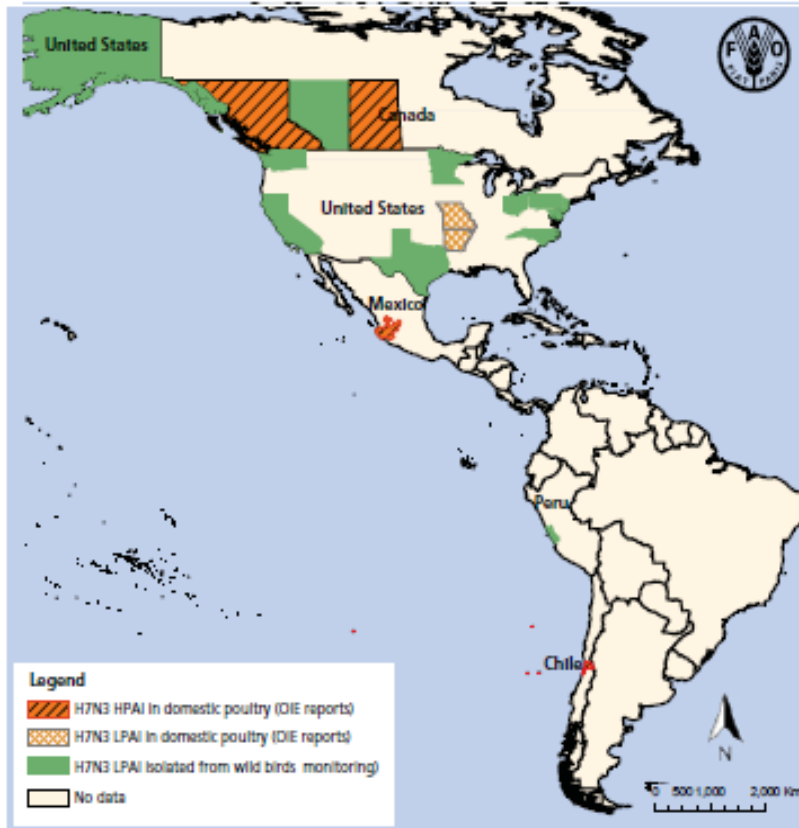
La despoblación de las actividades de las granjas avícolas incluyen alrededor de 4.9 millones de aves que han sido sacrificadas y destruidas, de una población estimada de 9.3 millones en el área de cuarentena. Las medidas de control sobre el movimiento de las aves, sus productos y subproductos están en su lugar, dentro de la zona de cuarentena. Los puntos de vigilancia se han establecido bajo la responsabilidad del personal veterinario del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Como medida de seguridad para reducir el riesgo de propagación en todo el país, el muestreo se lleva a cabo

en los estados vecinos y en las granjas de aves de corral que se consideran en situación de riesgo fuera de la zona de cuarentena.

El virus de la influenza aviar H7N3 se ha reportado en todo el mundo, infectando aves salvajes y aves de corral. El último informe de esta cepa era de un virus de BPAI, aislados de patos domésticos en un mercado de aves en China en el 2011. En los últimos 10 años han ocurrido tres brotes por este subtipo H7N3 HPAI: en Chile en el 2002; en el 2004 en British Columbia, Canadá; y en el 2007 en Saskatchewan, Canadá [FAO, 2012]. Este cepa de alta patogenicidad se originó a partir de precursores de BPAI, que a través de un análisis filogenético, mostraron una estrecha relación con los últimos virus H7 aislados de aves acuáticas de vida libre, estos brotes fueron controlados rápidamente por las medidas sanitarias junto con una intensa vigilancia. Este virus de la influenza esta presente en aves salvajes de todo el mundo, principal y natural reservorio de este virus, como lo demuestra el seguimiento llevado a cabo en América del Norte y América del Sur (Figura 46), así como en Europa y Asia, por lo que la migración de las aves silvestres y el contacto con las aves de corral ha sido el modo más frecuente de introducción y propagación del virus.

El virus H7N3 rara vez se ha reportado que infecten a los humanos: dos casos en Canadá, uno con el BPAI y otro en con el HPAI en el 2004; y un caso en Inglaterra de un brote de BPAI en 2006. En estas infecciones, los casos mostraron síntomas leves que se caracterizaron por conjuntivitis y probablemente una enfermedad respiratoria leve. El uso incompleto o incorrecto del equipo de protección personal se asocia con el riesgo de infección. La información y el cumplimiento estricto con el uso del equipo de protección deben ser reforzados cuando los brotes de IA en las aves han logrado evitar la infección humana.

En las zonas donde hay brotes de gripe aviar, las aves pueden comerse con seguridad, si se cocinan y se manejan adecuadamente durante la preparación. Solo las aves sanas deberán ser sacrificadas para su consumo humano. El virus, si está presente, se inactiva completamente a temperaturas suficientemente altas durante la cocción (70°C en todas las partes del producto, durante 30 minutos o 80°C durante 1 minuto) [FAO, 2012]. Hasta la fecha, no hay información epidemiológica de casos humanos infectados con el virus de IA por consumo de carne de pollo, huevos o cualquier ovoproducto. Hay casos documentados de infecciones de gripe aviar en personas vinculadas con el consumo de productos avícolas crudos (en Asia, por ejemplo, comidas a base de carne de ave cruda o sangre de ave). Cabe señalar que el consumo de productos avícolas crudos se considera un riesgo de alto potencial de infección humana por otros patógenos de mayor importancia para la seguridad alimentaria, incluyendo *Salmonella* y *Campylobacter*.



**Figura 46.** Brotes notificados al OIE de influenza aviar H7N3 en aves de corral y aislados del virus a través del monitoreo de las aves silvestres en América desde el 2002 al 2012. Fuente: FAO, 2012.

Desde 1996 en México se cuenta con una Norma Oficial Mexicana que regula las actividades de la Campaña Nacional contra la Influenza Aviar, entre las que destacan: la vigilancia de la enfermedad en aves comerciales y de traspatio y su diagnóstico mediante pruebas de laboratorio, un programa de constatación de granjas y parvadas libres de la infección, la inspección zoonosanitaria y verificación del cumplimiento de requisitos específicos para la movilización de aves y sus productos en el territorio nacional, y la promoción de la notificación de casos sospechosos.

Además, la SAGARPA realiza cursos de actualización y simulacros de capacitación a médicos veterinarios y estudiantes de las facultades de Medicina Veterinaria y Zootecnia, donde se trata el tema de la influenza aviar. Igualmente, se mantiene una prohibición de la importación de aves y sus productos de los países afectados por ésta y otras enfermedades que signifiquen riesgo a la avicultura nacional.

Los daños por el brote de IA H7N3 en México, se resumen a continuación:

- Desde que se detectó el brote de influenza aviar en los municipios de Tepatitlán y Acatic, Jalisco, y como parte de las acciones que se llevan a cabo para combatir y controlar el virus, de acuerdo con SENASICA, han sido sacrificadas hasta el momento 8 millones de aves de postura.
- A pesar de que hasta el momento el virus se encuentra contenido dentro del cerco sanitario, ha comenzado a registrarse un problema de menor oferta de huevo para plato en el mercado.
- La despoblación en las granjas de la entidad, ha traído como consecuencia una baja en la producción de huevo del orden de 7.9 por ciento, de acuerdo con los datos oficiales disponibles a la fecha.
- La mayoría entran al mercado del Distrito Federal y su área metropolitana.
- Jalisco es el principal estado productor de huevo en el país, con el 55% del total de la producción nacional.
- La industria avícola mexicana, sobre todo la ubicada en Jalisco, ha sido afectada por el virus de influenza aviar. La industria avícola está llevando a cabo todas las acciones a su alcance para operar bajo estrictos estándares sanitarios, mantener su productividad y no trasladar al precio del producto las pérdidas que ha tenido; sin embargo, es irremediable el ajuste en los costos de la cadena productiva.

Respecto al precio del huevo, La Unión Nacional de Avicultores trabaja de manera coordinada con las autoridades del Gobierno Federal, desde que se detectó el brote de la influenza aviar H7N3, con el objetivo de controlar esta situación y disminuir lo más posible los efectos en la economía de las familias mexicanas que incluyen al huevo como parte de su dieta diaria. El Gobierno Federal, a través de PROFECO, ha llevado a cabo solicitudes de información realizadas a participantes de la industria avícola, y en particular de huevo en el país, las cuales buscan detectar anomalías que existan en su venta al público en general. La UNA continuará colaborando con las autoridades para buscar la recuperación del sector avícola en beneficio de la industria avícola y los mexicanos.

El incremento en el precio del kilo de huevo en el 2012, obedece básicamente a dos factores:

- El decremento en la producción de huevo derivada de la despoblación que ha provocado el brote de influenza aviar H7N3 en los municipios de Tepatitlán y Acatic, en la zona de Los Altos en el estado de Jalisco.
- El gran incremento en los precios del maíz y la pasta de soya que utiliza la industria avícola para alimentar a las aves.

Capítulo 5

# Ovoproductos



# OVOPRODUCTOS

Tradicionalmente, las industrias alimentarias que emplean huevos (pastelería, panadería, galletería, pastas alimenticias, salsas, mayonesas) recibían los huevos en cáscara y los empleaban tras un cascado manual en función de sus necesidades: huevo entero para fabricar "genoisés" (tipo de pastel), clara de huevo para las "quenelles" (tipo de croqueta), yema para la mayonesa, etc. (Tabla 23).

**Tabla 23.** Usos de los ovoproductos. Fuente: Instituto de Estudios del Huevo, 2001.

Usos de los Ovoproductos	Tipos de Ovoproductos		
	Entero	Yema	Clara
Confitería	x	x	x
Pastelería	x	x	x
Panadería	x	x	
Productos lácteos	x	x	x
Helados	x	x	x
Bebidas	x	x	
Alimentos infantiles	x	x	
Cremas y sopas	x	x	
Mayonesas y salsas	x	x	
Pastas alimenticias	x	x	
Platos preparados	x	x	x
Charcutería	x	x	x
Alimentos de animales	x	x	
Alimentos para acuicultura	x	x	
Productos cosméticos	x	x	x
Pegamentos			x
Curtidos			x
Industria farmacéutica		x	x

Para las grandes empresas que emplean huevos, se vuelve en seguida imposible cascar cada mañana a mano los huevos necesarios para la fabricación del día. La utilización de ovoproductos se hace inevitable. Permite, además de una buena organización de la producción, un mejor control de la calidad y una gran "practicidad".

Paralelamente al desarrollo económico y al aumento de alimentos preparados, la normativa agroalimentaria evoluciona. La salud del consumidor se convierte en un asunto primordial y las industrias agroalimentarias no pueden permitirse correr el menor riesgo (salmonelosis, por ejemplo). A corto plazo, se hará casi obligatorio no utilizar huevos en cáscara, sino ovoproductos pasteurizados (líquidos, congelados, concentrados, en polvo). Por todas estas razones el mercado de los ovoproductos está en plena expansión.

En Europa los ovoproductos suponen aproximadamente el 30% del consumo total de huevos, siendo los principales países europeos productores de ovoproductos, Francia, Alemania, Bélgica, Holanda e Italia. En Francia más de un 26% de la producción de huevos va destinada a la obtención de ovoproductos, pero esta proporción está en constante evolución. En el ámbito mundial, Estados Unidos encabeza la lista con una cifra próxima al 35%, también está Brasil y China con unas perspectivas de futuro impresionantes.

En México, el consumo de huevo es básicamente en fresco; sin embargo, de acuerdo a sus bondades nutritivas, se ha utilizado principalmente en la industria y es un ingrediente importante para la realización de otros productos, como por ejemplo, en la industria farmacéutica, en las pastelerías, panaderías, en la elaboración de mayonesas y confitería [SIAP]. En el año de 1996, el 4% de la producción de huevo se destinaba a la industria, para 2006, este porcentaje se incremento a 9% [UNA, 2007].

De acuerdo con reportes de la FAO 2008, en México, el 8% de la producción total de huevo se comercializa de forma procesada o industrializada. Se prevé que en años próximos, los huevos procesados se presenten al público en general, y sean una nueva alternativa de consumirlos. De hecho, esta forma de manejarlos ha sido muy aceptada por los japoneses, que llevan aproximadamente 7 años consumiendo huevo industrializado mexicano [SIAP].

Como principales ventajas de los ovoproductos frente al huevo en cáscara [Messens, *et ál.*, 2002], se pueden citar:

- Estabilidad en sus cualidades organolépticas y nutricionales.
- Mayor seguridad bacteriológica por someterse a un proceso de pasteurización.
- Eliminación de los residuos que supondrían las cáscaras.
- Posibilidad de modificación de propiedades funcionales y nutritivas.
- Mayor versatilidad, ya que se puede emplear el derivado apropiado para cada finalidad.
- Manipulación más sencilla y ahorro de tiempo y mano de obra.
- Facilidad en las operaciones de limpieza
- No requieren de un equipamiento especial
- Fácil dosificación y almacenamiento
- Fácil distribución y comercio internacional.

En México, la utilidad del cascarón no ha sido del todo explotada, aunque se considera un área de buena de investigación, debido a su alto contenido de calcio. Aunque este residuo ha sido empleado como material para la

elaboración de compostas debido a su aporte de calcio [SAGARPA/Subsecretaría de Desarrollo Rural/Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural]. Una práctica que se ha empleado en estos últimos años consiste en secar e incorporar las cáscaras como excelente fuente de calcio y proteína para la gallina ponedora [Gil y Ruiz, 2010].

# DEFINICIÓN, TIPOS, CLASIFICACIÓN, APLICACIONES Y COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL

De acuerdo a la FAO los ovoproductos o derivados del huevo son “los productos obtenidos a partir del huevo, de sus diferentes componentes o sus mezclas, una vez quitadas la cáscara y las membranas y que están destinados al consumo humano; podrán estar parcialmente completados por otros productos alimenticios o aditivos; podrán hallarse en estado líquido, concentrado, desecado, cristalizado, congelado, ultracongelado o coagulado.”

El Instituto de Estudios del Huevo, define a los ovoproductos como “los productos transformados resultantes de la transformación de huevos, de diversos componentes o mezclas de huevos, o de la transformación subsiguiente de tales transformados.

Tecnológicamente también se consideran ovoproductos los destinados a distintas aplicaciones industriales no alimentarias y los componentes extraídos de la yema o clara, como la lecitina o la lisozima.

En México, los productos derivados de los huevos se preparan a partir de huevos enteros o de la clara o la yema por separado y se utilizan como productos líquidos, congelados o deshidratados. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996, el huevo, sus productos y derivados por el proceso a que se someten se clasifican en:

- Con cascarón
  - Huevo fresco
  - Huevo refrigerado
  
- Pasteurizados
  - Huevo líquido refrigerado o congelado
  - Yema líquida refrigerada o congelada
  - Clara líquida refrigerada o congelada
  - Huevo deshidratado
  - Yema deshidratada
  - Clara deshidratada
  
- Pasteurizados, envasados asépticamente.

## **Tipos**

Existe una amplia gama de ovoproductos que pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios:

### **Por sus componentes**

- Primarios (Líquidos): Huevo entero, yema, clara, y mezclas diversas.
- Secos: Concentrados (20-25% de humedad) o deshidratados (3-5% de humedad).
- Compuestos: Incorporan otros ingredientes distintos, pero los procedentes del huevo han de suponer un 50% como mínimo. Un ejemplo es la tortilla de patata.

### **Por su forma física y tratamiento**

- Líquidos frescos/refrigerados, pasteurizados o no pasteurizados.
- Líquidos concentrados, pasteurizados o no pasteurizados.
- Congelados (normalmente ultracongelados).
- Desecados o deshidratados, ya sea por calor o liofilización.

### **Por su modo de empleo**

- Ingredientes. Utilizados como materias primas para elaborar otros alimentos o determinados productos industriales.
- Productos de valor añadido. Preparados precocinados en los que el huevo es ingrediente exclusivo o principal.
- Componentes aislados separados por fraccionamiento de la yema o de la clara.

### **Por la duración de su vida comercial**

- Corta: Ovoproductos líquidos pasteurizados convencionalmente (5-12 días, según sea la temperatura de refrigeración).
- Intermedia: Líquidos ultrapasteurizados (4-6 semanas) y concentrados (varios meses, a temperatura ambiente)
- Larga: Ovoproductos desecados y congelados (hasta 1 año). Desecados deshidratados, ya sea por calor o por liofilización

## **Clasificación**

La gama de productos que se pueden obtener es muy amplia y, siguiendo la clasificación que propuso la Comisión Internacional del Huevo (IEC, *International Egg Commission*), los ovoproductos para uso alimentario se pueden agrupar en:

### **A. HUEVO ENTERO**

- A01 Refrigerado.
- A02 Refrigerado con sal.
- A03 Refrigerado con azúcar.
- A04 Refrigerado, larga duración.
- A10 Congelado.
- A11 Congelado con sal.
- A12 Congelado con azúcar.
- A13 Congelado con ácido cítrico.
- A14 Congelado con yema añadida.
- A20 Deshidratado.
- A21 Deshidratado sin glucosa.
- A22 Deshidratado con fluidificante.
- A23 Mezclas de huevo entero deshidratado.

### **B. YEMA**

- B01 Refrigerada.
- B02 Refrigerada con sal.
- B03 Refrigerada con azúcar.
- B04 Refrigerada de larga duración.
- B10 Congelada.
- B11 Congelada con sal.
- B12 Congelada con azúcar.
- B13 Congelada con azúcar invertido.
- B20 Deshidratada.
- B21 Deshidratada con fluidificante.
- B22 Deshidratada sin glucosa (estabilizada).
- B23 Deshidratada con azúcar.
- B24 Mezclas de yema deshidratada.

### **C. ALBUMEN**

- C01 Refrigerado.
- C02 Refrigerado con sal.
- C03 Refrigerado con azúcar.
- C04 Refrigerado de larga duración.
- C10 Congelado.
- C11 Congelado con sal.
- C12 Congelado con azúcar.
- C20 Deshidratado polvo.
- C21 Deshidratado instantáneo.
- C22 Deshidratado en escamas.

#### **D. HUEVOS COCIDOS**

- D01 Refrigerados sin pelar.
- D02 Refrigerados pelados.
- D03 Para ensalada refrigerados y pelados.
- D04 En salmuera refrigerados pelados.
- D05 Troceados y refrigerados.
- D10 Troceados y congelados.
- D11 "Huevo largo" congelado (long egg).
- D20 Huevos escalfados refrigerados.
- D30 "Scottish eggs" refrigerados.

#### **E. HUEVOS REVUELTOS**

- E01 Refrigerados.
- E02 Refrigerados de larga duración.
- E03 Mezcla refrigerada para huevos revueltos.
- E04 Cocidos y refrigerados.
- E10 Congelados.
- E11 Mezcla congelada para huevos revueltos.
- E12 Mezcla congelada para cocción en bolsa.
- E20 Deshidratados.
- E30 Huevos fritos refrigerados.
- E31 Huevos fritos congelados.
- E40 Tortilla refrigerada.
- E41 Tortilla con relleno, refrigerada.
- E50 Tortilla congelada.
- E51 Tortilla con relleno, refrigerada.
- E50 Tortilla con relleno, congelada.
- E60 Mezcla para "quiche" refrigerada.
- E61 "Quiche" refrigerada lista para consumo.
- E62 Mezcla para "quiche" congelada.
- E63 "Quiche" congelada lista para consumo.

#### **H. VARIOS**

- H01 Mezcla refrigerada para "creppes".
- H02 Mezcla refrigerada para "creppes", de larga duración.
- H03 Masas con huevo refrigeradas.
- H04 Masas con huevo congeladas.

La composición y características fisicoquímicas de los ovoproductos son muy distintas según sea su forma física, las técnicas de elaboración empleadas y los aditivos incorporados (como sal y/o azúcar, que se añaden frecuentemente a muchos derivados para preservar sus propiedades funcionales). La elección del

tipo de ovoproducto (pasteurizado, ultrapasteurizado, deshidratado, cocido, compuestos, etc.) se debe realizar con base al uso previsto, el tratamiento posterior, la forma de conservación, la facilidad de manejo, etc.

Existen muchas posibilidades de utilización generalizables a todos los tipos de ovoproductos: líquidos, congelados y desecados. Pero estos últimos son menos adecuados para elaborar postres helados, bebidas o alimentos infantiles, y la clara deshidratada tampoco sirve para fabricar helados.

El huevo entero posee la mayoría de las propiedades de la yema y cierta capacidad espumante, pero lógicamente en menor grado. Su utilización es bastante habitual en la cocina para la elaboración de mayonesas y salsas, flanes, magdalenas, pastas, barquillos, panes especiales, etc.

## **Aplicaciones**

### **Propiedades funcionales**

A la calidad nutrimental del huevo hay que añadirle las propiedades funcionales de sus componentes, por lo que es cada vez más utilizada por la industria alimentaria. Entre ellas cabe destacar la capacidad emulsionante, la formación de espuma y la capacidad coagulante.

Ya es posible separar y purificar ciertos componentes del albumen, como la ovoalbúmina (55% de la proteína de la clara) apreciada como agente emulsionante y espumante. También la lecitina posee una gran capacidad emulsionante [Anton y Gandemer, 1997; Le Denmat, *et ál.*, 1999; Le Denmat *et ál.*, 2000; Badui, 2006; Gil y Ruiz, 2010]. La lisozima (30g/kg albumen), también se emplea como agente emulsionante y espumante [Instituto de Estudios del Huevo, 2001]. La lisozima también se emplea como conservante natural en diversos alimentos por su actividad antimicrobiana bastante específica y es útil en la industria del vino, sidras y en la fabricación de quesos madurados [Codex Alimentarius, 2012].

Todas estas propiedades están relacionadas entre ellas, lo que hace que el huevo sea un ingrediente/aditivo en la industria alimentaria todavía insustituible en muchas ocasiones. En la tabla 1 se recogen diversos ejemplos de utilización y en la tabla 24 se mencionan las múltiples y más importantes propiedades funcionales que poseen la yema y la clara.



**Tabla 24.** Propiedades funcionales de los ovoproductos para la industria alimentaria.

Albumen	Yema
Anticristalizante	Emulsionante
Espumante	Aromatizante
Gelificante	Colorante
Ligante	Gelificante
Coagulante y aglutinante	Ligante
Conservante	Colorante
Propiedades reológicas	Antioxidante

En un futuro próximo pueden aumentar considerablemente la utilización de sustancias extraídas del huevo, cuyas propiedades funcionales son mayores que las de la yema o clara sin fraccionar.

### Usos no alimentarios

Por último, los ovoproductos tiene usos no alimentarios, entre los que cabe citar: elaboración de medio de cultivo y vacunas, proteínas aisladas como agentes antimicrobianos como la lisozima, que se hace ya a nivel industrial desde hace decenas de años, se emplea esencialmente en farmacia en la fabricación de medicamentos para luchar en particular contra las infecciones de garganta [Instituto de Estudios del Huevo, 2001]. Esta es la única proteína del huevo que tiene hoy en día un valor industrial. Es lo mismo que ocurre con la lecitina, extraída desde hace años por sus propiedades emulsionantes y nutricionales.

Tecnólogos, bioquímicos, médicos y nutriólogos se interesan, sin embargo por otras proteínas del huevo. Entre las principales se pueden citar: la ovotransferrina (equivalente a la lactoferrina de la leche) por sus propiedades quelantes del hierro, la ovomucina como fuente de glicopéptidos, la avidina como posible quelante de la biotina, la fosvitina por su riqueza en fósforo y de una forma general, en minerales, las inmunoglobulinas, etc. Tecnología avidina-biotina, empleada en la aplicación de diversos diagnósticos médicos, como inmunoanálisis, histopatologías y pruebas genéticas. Al ovoproducto también se le puede dar un uso cosmético en la fabricación de champús y jabones.

### Composición nutrimental

La gran variedad y forma de presentación de los ovoproductos hace inviable confeccionar una tabla con los contenidos en energía y nutrientes, por lo que se recomienda consultar la base de datos nutricionales *USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 24* (2011).

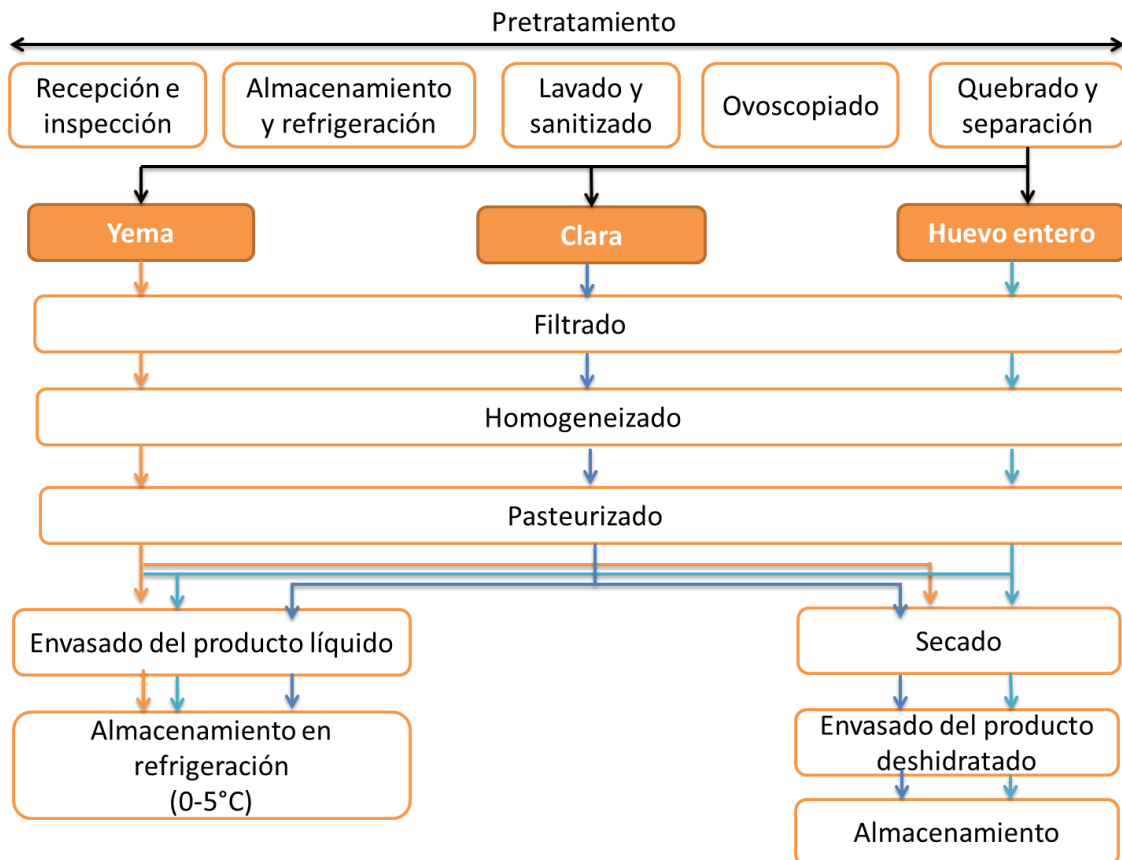
Desde hace varios años podemos encontrar sin embargo huevos de composición modificada esencialmente por la alimentación de la gallina: huevos de bajo colesterol (menos de un 25%), huevos enriquecidos en vitaminas o en ácidos grasos poliinsaturados (DHA y EPA). En lo que respecta a los ovoproductos, es mucho más fácil modificar su composición y hace tiempo que en Estados Unidos se ofrecen al consumidor productos derivados del huevo que sin embargo no son más que sucedáneos y no presentan muchos puntos en común con los huevos con cáscara. Solo las proteínas de la clara están presentes, pero toda la parte lipídica ha sido sustituida por grasas vegetales o emulsionantes. También es posible extraer el colesterol con fluidos supercríticos u otros métodos, lo que ha dado lugar en Estados Unidos a la comercialización de ovoproductos bajos en colesterol.

Debido a su composición, los derivados del huevo son especialmente adecuados para fortificar alimentos de baja calidad proteica.

# ELABORACIÓN DE OVOPRODUCTOS

Las industrias de ovoproductos nacen en demanda de otras industrias cuya materia prima para la elaboración de sus productos es el huevo, el cual tiene una vida útil corta, y puede ser contaminado por microorganismos (*Salmonella* principalmente). Los huevos son importantes por las propiedades nutritivas y funcionales que éstos aportan a los productos a los que se adicionan. Además se suma el aumento de consumo de platos preparados y/o precocinados en los que se incluye el huevo (entero, yema, clara), como ingrediente.

La elaboración de ovoproductos requiere una serie de procesos tecnológicos que se describen a continuación y que van desde los tratamientos de la materia prima (pretratamientos) a la elaboración de los distintos tipos de ovoproductos. La figura 47 muestra de forma esquemática estos procesos.



**Figura 47.** Proceso general de obtención de ovoproductos.

## **Pretratamientos**

La preparación de la materia prima antes de proceder a su transformación es un proceso clave para que la elaboración del ovoproducto se alcance con el máximo de calidad organoléptica, higiénica y nutricional.

### **Recogida, transporte y almacenamiento**

La recogida inmediata tras la puesta y la disminución de la temperatura interna del huevo son factores clave para obtener un buen producto. En algunos países la refrigeración de los huevos desde el momento de la puesta es ya obligatoria, en Estados Unidos, la temperatura máxima en almacenamiento y transporte es de 7.2°C. Incluso, para el huevo de consumo en fresco se está llevando a cabo la refrigeración inmediata mediante baños de CO<sub>2</sub>, pues se ha visto que la refrigeración del producto ya envasado y en los pallets convencionales es deficiente y se prolonga hasta 3 días el tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada. Además, la separación de la yema y la clara es más fácil si su temperatura es más baja.

En caso de que el tiempo de almacenamiento de los huevos se prolongue, se han de tomar una serie de medidas para garantizar la calidad de los mismos, como son:

- Almacenamiento de huevos en refrigeración, para garantizar unas adecuadas condiciones de conservación de los mismos antes de su procesado.
- Control de la humedad relativa de la cámara de refrigeración para evitar la pérdida de humedad de los huevos.

### **Selección**

Consiste en la eliminación de todos aquellos huevos no aptos para su procesado (Figura 2), bien por su extrema suciedad, bien por hallarse rajados o rotos, etc. Los huevos que utilizan las plantas industrializadoras no tienen necesariamente que hallarse clasificados por su peso. De adquirirse sin clasificar resultan más baratos, aunque haya plantas que prefieran que al menos se encuentren dentro de un intervalo determinado de peso para facilitar el trabajo de las máquinas rompedoras. Los huevos con grietas, una vez en la máquina cascadora, no producen una abertura limpia y suelen caer trozos de cáscara en el canal de producto líquido, aumentando mucho la contaminación microbiana y los restos de cascarilla que darán problemas en los filtros, etc.

### Lavado y sanitizado

Es una etapa obligatoria en la obtención de ovoproductos en todos los países (no así para el huevo fresco). Se realiza inmediatamente antes de su utilización en la línea de producción. Consiste en la aplicación de agua a presión sobre los huevos, a una cierta temperatura y con la ayuda de detergentes y desinfectantes. Las máquinas disponen de unos rodillos de diseño especial que favorecen la limpieza por todos los lados. Después del lavado se debe realizar un enjuagado con agua limpia y el secado completo del huevo. El agua es un magnífico medio de contaminación pudiendo favorecer la penetración de microorganismos a través de los poros de la cáscara.

Los requisitos para un lavado correcto son:

- Mantener siempre muy limpia la lavadora y el material complementario, desinfectándose todo al final de cada jornada laboral. El agua de lavado debe cambiarse con frecuencia, se recomienda hacerlo cada 4 horas.
- La temperatura del agua debe ser al menos de 12 a 17°C más alta que la del huevo para que su contenido tienda a expansionarse en vez de contraerse, impidiendo que penetre la suciedad de la cáscara. Una temperatura entre 43° y 49°C es la más correcta. Temperaturas mayores pueden causar grietas y si el período de lavado se prolonga el huevo puede quedar ligeramente cocido, temperaturas superiores a 55ª son muy peligrosas.
- Utilizar un detergente-desinfectante, como los amonios cuaternarios y el hipoclorito.
- Enjuagar los huevos correctamente y, por último, secarlos bien antes de la siguiente operación, no pueden llegar húmedos a la cascadora.



**Figura 48.** Huevos destinados a la elaboración de ovoproductos.

### **Ovoscopiado**

Sistema utilizado para la observación interior del huevo mediante el uso de una fuente de luz. Su finalidad es la de separar todos aquellos huevos de mala calidad, por manchas de sangre de gran tamaño, podridos, envejecidos, agrietados, rotos, etc. Esta selección se hacía antes manualmente. Actualmente varias empresas fabricantes de equipos disponen de máquinas que hacen la selección electrónicamente (Figura 49 y 50).



**Figura 49.** Ovoscopiado y detector automático de huevo sucio y fisurado respectivamente.



**Figura 50.** Ovoscopiado de huevos.

### **Cascado y separación de los componentes**

Hoy en día existen máquinas con capacidad de rotura muy amplia desde 5,000 huevos/hora hasta otras capaces de romper 110,000 huevos/hora, separándose las cáscaras y desviándose yemas y claras por dos circuitos diferentes, o reunir las dos últimas y venderlo como huevo líquido entero. Este proceso se lleva a cabo en sala presurizada, con aire filtrado a temperaturas constante de 18°C.

Es una operación muy delicada que requiere de una supervisión para asegurar una adecuada realización del proceso. Es imprescindible un supervisor en cada máquina para separar cualquier resto de cáscara que haya podido ir a parar a los canales de recogida del líquido.

Hay dos tipos de diseño: uno circular, con 1 ó 2 pisos de cazuelillas en continuo, y otro longitudinal con 12 filas de cazuelillas por línea (Figura 51 y 52).

Los fabricantes de los equipos incorporan un sistema de detección del paso de yema a la corriente de albumen, de manera que si se detecta la presencia de yema se rechaza el contenido de aquella cazuelilla. La razón del interés de minimizar la presencia de yema en albumen se debe a que se ha demostrado que la grasa libre disminuye la capacidad espumante de las proteínas del albumen.

Otra mejora reciente del proceso, consiste en un sistema para la recuperación de los restos de albumen y chalazas que quedan enganchadas a las cáscaras, llegándose a recuperar una cantidad de albumen importante. El sistema consiste en un tubo que corre por debajo de la zona donde se encuentran las cáscaras abiertas y vacías, a través de este tubo se realiza una succión del material que aún quede en el interior del huevo. Además, este proceso proporciona cáscaras más secas.

A partir de este punto, los productos resultantes siguen caminos divergentes, según el destino que se prevea para las yemas y las claras, separadas o mezcladas, con la finalidad de poder ofrecer al fabricante de alimentos un producto que se ajuste a sus necesidades. Por su parte, las cáscaras separadas pueden seguir un proceso de secado con el fin de disminuir la proliferación microbiana y facilitar su eliminación.

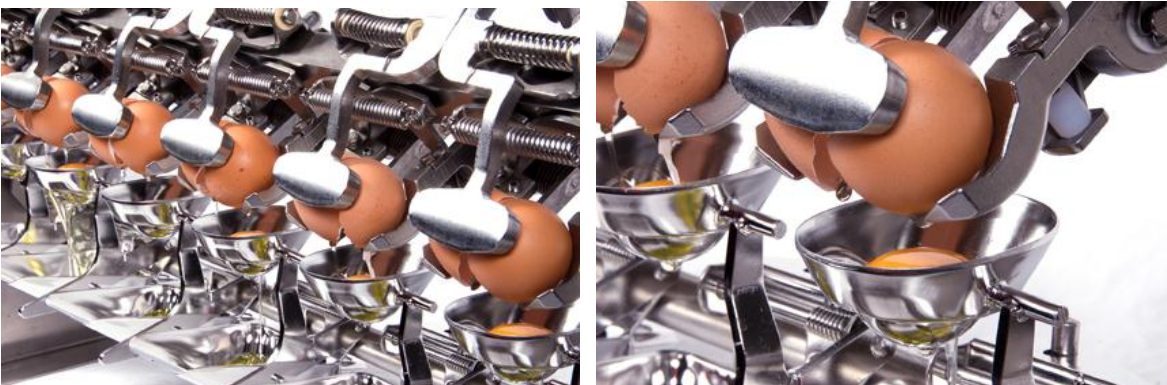
## **Filtrado**

El filtrado de yema, clara o huevo se realiza por un sistema de filtros, cuyo fin es de eliminar partículas de cáscara, membranas y cordones de chalazas remanentes. Esta operación es fundamental para las etapas siguientes: homogeneización, pasteurización y en la estandarización de los productos. Suele ser un punto de aumento de la contaminación microbiana. En la actualidad se dispone de filtros autodeslodantes (los sólidos son expulsados de forma automática durante el servicio) muy eficaces.





**Figura 51.** Cascadoras automáticas.



**Figura 52.** Cascado y separación de sus partes.



## Refrigeración

Del filtrado pasan a enfriadores de placas, donde un intercambio con agua helada permite reducir la temperatura a valores entre 0 y 4°C, para finalmente ser almacenados. La refrigeración (3- 4°C) sólo es necesaria si el producto líquido no pasa inmediatamente al pasteurizador.

## Homogenización

Antes de la pasteurización es necesario realizar una homogenización, ya que la viscosidad es un parámetro importante para el comportamiento del producto en el pasteurizador, a fin de poder aplicar las condiciones de pasteurización más idóneas.

## Eliminación de restos de glucosa

Para evitar el desarrollo de reacciones de pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard) que pueden producirse durante los tratamientos térmicos y el almacenamiento, es preciso eliminar la presencia de glucosa en el huevo. Esta se puede eliminar por varios procedimientos: fermentación microbiana, mediante levaduras o bacterias no proteolíticas, procesos enzimáticos en los que se utilizan dos enzimas glucosa oxidasa y catalasa o bien por ultracentrifugación, que permite eliminar el agua y con ella hasta el 50% de la glucosa. Más adelante se retoma esta parte del proceso como tema a estudiar dentro de la microbiología de los ovoproductos.

**Fermentación bacteriana.** En 24 horas y con diferentes cepas de *Streptococcus* y *Lactobacillus* se consigue eliminar la glucosa del huevo entero. En general, esta técnica da un producto con buenas propiedades funcionales y microbiológicas.

**Fermentación por levaduras.** Se utiliza mucho *Saccharomyces cerevisiae*. Para albumen en 2- 4 horas es eficaz, rápido y barato, pero en huevo entero da gustos anómalos durante la conservación. A pH 6-7 y 30°C. Una vez eliminada la glucosa, se refrigera y centrifuga para eliminar las levaduras y se pasteuriza.

**Enzimática.** Mediante glucosa-oxidasa y catalasa ácido glucónico. El aporte de O<sub>2</sub> se consigue por burbujeo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elimina el 95% de la glucosa en huevo entero. El pH óptimo es 6.

## Pasteurización

La finalidad del tratamiento térmico es la destrucción hasta niveles aceptables de la población microbiana patógena presente en el huevo. Las condiciones

tiempo/temperatura se establecerán en función de las características y producto de que se trate, como puede ser huevo entero, yema, clara. Uno de los principales problemas tecnológicos en la fabricación de ovoproductos consiste en llevar a cabo un tratamiento térmico eficaz al tiempo que se mantiene la integridad de las proteínas del huevo.

La pasteurización es obligatoria en todos los países. Las condiciones de la misma se fijan en la destrucción de distintas cepas de *Salmonella*. Se ha utilizado muy frecuentemente *Salmonella* Senftenberg, una de las más termorresistentes de este género para establecer las combinaciones de temperatura y tiempo. Por ejemplo, en el caso de México y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996, la pasteurización para el huevo líquido entero debe llevarse a cabo a 64,5°C durante 2,5 minutos. En el caso de la clara, mucho más sensible a la acción de la temperatura (no puede sobrepasar los 58°C) a 55°C durante 20 minutos, en cambio la yema, con más sólidos en su composición permite tratamientos más fuertes, 64°C durante 6 minutos.

Con la adición de ciertas sustancias como sal, azúcar, fructosa, jarabe de maíz o miel se puede someter a un mayor tratamiento térmico protegiendo las propiedades funcionales y debe cumplirse con el objetivo de eliminar los microorganismos patógenos. Algunos ejemplos de tratamientos propuestos por la FDA son:

Albumen (sin aditivos) **56,6°C / 3,5 min ó 55°C / 6,2 min**

Huevo entero **60°C / 3,5 min**

Huevo entero con sal (2%) **62,7°C / 3,5 min**

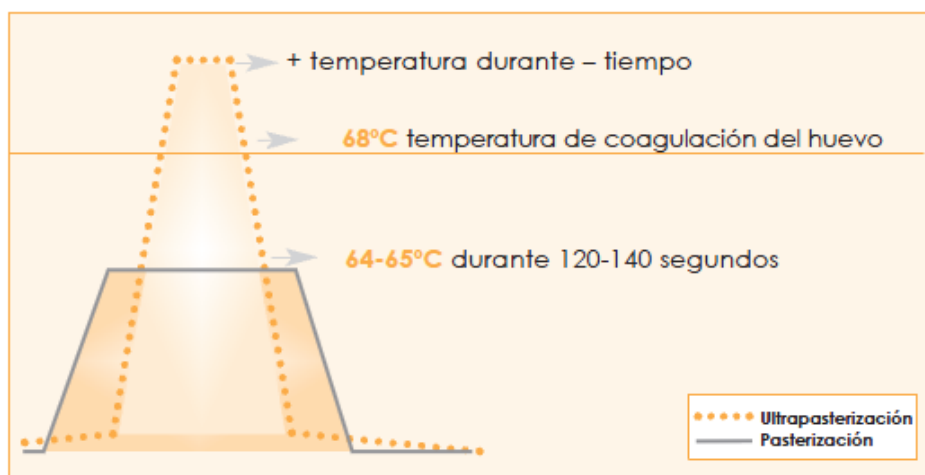
Yema con azúcar (2%) **62,7°C / 3,5 min**

Yema con sal (2-12%) **61,6°C / 6,2 min**

Un factor clave a la hora de la elección del equipo y los tratamientos a aplicar es la búsqueda de aquellas condiciones que aseguren una pasteurización eficaz sin producir la coagulación de las proteínas, acarreando la consiguiente pérdida del producto y los problemas de limpieza colaterales de ahí que algunos fabricantes realizan el mismo proceso a mayor temperatura durante menos tiempo, lo que se denomina ultrapasteurización, empleándose temperaturas de 60- 72°C durante 30- 95 segundos (Figura 53), lo que permite alargar la vida útil del producto a 4-6 semanas.

En Estados Unidos todavía está vigente el manual de pasteurización "Egg products pasteurization manual" de 1969, si bien no tardará mucho en presentarse una nueva edición del mismo que incorporará propuestas de mejora

para la optimización del proceso teniendo en cuenta los cambios que ha sufrido la industria productora de huevos.



**Figura 53.** Esquema de los diferentes tratamientos térmicos en la elaboración de ovoproductos. Fuente: Instituto de Estudios del Huevo.

Los equipos de pasteurización utilizados pueden ser los intercambiadores de placas o tubulares donde se alcanza la temperatura adecuada y seguidamente el producto pasa a los tubos de retención para conseguir el tiempo requerido.

De forma orientativa puede utilizarse la prueba de la alfa-amilasa para verificar que la pasteurización ha sido adecuada. Sin embargo, y en todos los casos el proceso de pasteurización deberá contar con:

- Un control automático de la temperatura.
- Un termómetro registrador.
- Un sistema de seguridad automático que evite un calentamiento insuficiente.

El ovoproducto resultante de estos procesos queda libre de patógenos. Consiguientemente, su uso como ingrediente en la elaboración de distintos alimentos mantendrá unos altos niveles de seguridad y limitará al máximo la aparición de efectos nocivos para la salud.

Después de la pasteurización, todos los productos líquidos deben enfriarse inmediatamente a una temperatura menor a 4°C para su acondicionamiento final.

## **Envasado**

Si el ovoproducto está destinado para su venta en forma líquida, el sistema de envasado es muy importante para evitar su recontaminación. Puede ser en bolsas, envases plásticos o de acero inoxidable, con volúmenes desde 1 litro hasta industriales de 1000 kg. El envasado debe ser aséptico, con lo que la vida útil del producto se alarga mucho. El producto líquido y pasteurizado obtenido puede someterse a otros procesos de transformación para mejorar su conservación: congelación, concentración y deshidratación, principalmente.

## **Congelación**

Es uno de los procesos más utilizados en la conservación de ovoproductos. Se puede congelar huevo entero, yema o clara por separado, mezclas entre ellos y con otros ingredientes. Se realiza habitualmente en cámaras a temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  o en congeladores de placas a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Los ovoproductos congelados se pueden conservar hasta 10- 12 meses, a temperaturas entre  $-15$  y  $-18^{\circ}\text{C}$  [SAGARPA], a estas temperaturas no puede existir ningún crecimiento microbiano. La duración del almacenamiento de los ovoproductos congelados puede prolongarse durante un año o más, aunque se tienda a reducirla debido al elevado coste que supone. Con ciertas preparaciones se aconseja que tenga lugar, como mínimo, durante 5 a 8 semanas con objeto de conseguir una "maduración" del producto y un aumento de su viscosidad.

Las propiedades funcionales de la clara de huevo no sufren cambios importantes, siempre que el proceso de congelación se realice rápidamente, de manera que se formen cristales de agua de pequeño tamaño. La congelación de las yemas por separado provoca aumento de la viscosidad y disminución de la solubilidad del producto descongelado, así como un ligero descenso de su capacidad emulsionante, aunque sin pérdida de valor nutritivo. En el huevo entero se observa también incremento de la viscosidad, aunque de menor importancia que en las yemas, y leve pérdida de la capacidad espumante, por insolubilización o desnaturalización de las proteínas. La utilización de sal o sacarosa produce un descenso del punto de congelación. La descongelación debe hacerse en dos fases, una primera hasta alcanzar  $0^{\circ}\text{C}$  y otra más rápida a baño María a  $40-45$ . La albúmina congelada puede presentar problemas de separación de dos fases en la descongelación por coagulación de algunas fracciones proteicas.

## **Concentración**

La eliminación de agua facilita el transporte, almacenamiento y posterior tratamiento de los ovoproductos líquidos. Consiste en la eliminación de agua, mediante evaporación al vacío, consiguiéndose un extracto seco del 40% para el huevo entero y un 20% para el albumen, pero las propiedades funcionales pueden verse mermadas fácilmente por la desnaturalización de las proteínas. Más recientemente han aparecido concentrados mediante membranas: ultrafiltración a través de membranas minerales u orgánicas (donde se elimina agua y componentes de bajo peso molecular), y la ósmosis inversa (donde se elimina agua mediante presiones elevadas). El primer sistema es el más utilizado. Al producto concentrado se le adiciona sal o azúcar, con lo que el producto se puede conservar a temperatura ambiente durante varios meses.

## **Deshidratación/Secado**

Es el sistema más antiguo y que más se ha utilizado en los últimos años (pues no necesita condiciones especiales de almacenamiento), ocupa el primer puesto en volumen de producto fabricado en todo el mundo. Este procedimiento confiere una serie de ventajas a los ovoproductos, ya que se pueden almacenar a temperatura ambiente sin riesgo de desarrollo microbiano, más cómodos y menos costosos de transportar, son productos homogéneos y fáciles de utilizar y permite una formulación más precisa de los productos a los que se incorpora.

Se utilizan torres de atomización horizontales, en las cuales la masa a tratar es sometida a la acción de una fuerte corriente de aire filtrado y a una temperatura de entrada de unos 160°C para la albúmina y de unos 180-200°C para la yema. También se puede realizar en bandejas o en cilindros giratorios. Del secado se obtiene un producto que debe ser envasado inmediatamente al vacío para evitar que, por su higroscopicidad, vuelva a cargarse parcialmente de humedad. El ambiente del local del envasado debe ser rigurosamente controlado con una sobrepresión interior para evitar la entrada de microorganismos. En algunos países, una vez el producto ya envasado se somete a una pasteurización a baja temperatura (60- 65°C) por tiempo prolongado 10-15 días.

Los ovoproductos deshidratados se pueden conservar al menos 1 año, aunque pueden producirse cambios en el aroma de las yemas por oxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos. Si el tratamiento térmico no es demasiado elevado y el almacenamiento se produce a temperaturas no muy altas (alrededor de 20°C), no se produce pérdida de propiedades funcionales. En general, la capacidad emulsionante y gelificante y la viscosidad de las claras se mantienen bastante bien. En cambio puede producirse aumento de viscosidad en las yemas y huevos enteros, disminuyendo su capacidad emulsionante.

## Envasado y Embalaje

Los materiales utilizados para el envasado y embalaje no deben ser una fuente de contaminación. El local destinado al almacenamiento de los envases, al igual que el local destinado a la elaboración de los ovoproductos, debe estar limpio y en buen estado de mantenimiento, de modo que los envases no estén expuestos a ningún riesgo de contaminación.

El envasado de los ovoproductos se efectúa en condiciones de higiene satisfactorias, con el fin de garantizar que los ovoproductos no estén contaminados. Los envases deben cumplir todas las normas de higiene y en particular:

- No alterar las propiedades físicas, químicas y organolépticas de los ovoproductos.
- No transmitir a los ovoproductos sustancias nocivas para la salud humana.
- Ser suficientemente resistentes para proteger los ovoproductos de forma eficaz durante su almacenamiento y transporte.

Los envases y embalajes que vuelvan a utilizarse deberán ser fáciles de limpiar y, en caso necesario, de desinfectar antes de volver a utilizarlos.

## Almacenamiento

El almacenamiento de los ovoproductos deberá realizarse de manera higiénica manteniendo la cadena de frío durante su almacenamiento y distribución. Se considerarán las siguientes temperaturas para su almacenamiento, acorde a la Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996:

- Productos congelados: -5°C
- Productos refrigerados: 4°C
- Productos deshidratados: temperatura ambiente

## Aditivos

En la elaboración de ovoproductos se pueden utilizar distintos aditivos alimentarios para garantizar la adecuada conservación de los mismos, así como de sus propiedades. En la tabla 25 y acorde a la legislación vigente en materia de aditivos, se hace referencia a los que se pueden utilizar, así como su cantidad máxima permitida.

**Tabla 25.** Aditivos para alimentos permitidos para los productos y derivados del huevo. Donde: \*: Aplicable solo a los deshidratados.

<b>Aditivo</b>	<b>Límite máximo</b>
<b>Reguladores de pH</b>	
<b>Ácido acético y su sal de sodio</b>	BPF
<b>Ácido cítrico y sus sales de sodio o potasio</b>	BPF
<b>Ácido láctico y sus sales de sodio o calcio</b>	BPF
<b>Ácido tartárico y sus sales de sodio o potasio</b>	BPF
<b>Conservadores</b>	
<b>Ácido benzoico y sus sales de sodio, potasio o calcio</b>	0.1% solo en yema y huevo líquido
<b>Antiaglomerantes</b>	
<b>Silicoaluminato de sodio*</b>	2%
<b>Bióxido de silicio*</b>	1%
<b>Estabilizantes</b>	
<b>Fosfato monopotásico</b>	0.5% en peso de los productos congelados
<b>Fosfato monosódico</b>	0.5% en peso de los productos congelados
<b>Espesantes</b>	
<b>Agar-agar</b>	BFP
<b>Carragenatos</b>	BFP
<b>Goma guar</b>	BFP
<b>Emulsificantes</b>	
<b>Lecitina</b>	
<b>Mono y diglicéridos de los ácidos grasos no polimerizados de cadena lineal, saturado e insaturado, presente en aceites y grasas alimenticias</b>	1000 mg/kg
<b>Mono y diglicéridos de los ácidos grasos antes citados, esterificados con los ácidos acético, acetiltartárico, cítrico, láctico y tartárico</b>	1000 mg/kg
<b>Esteres de ácidos grasos con poliglicerol</b>	3000 mg/kg
<b>Estearil-2-lactilato de sodio o calcio</b>	500 mg/kg para clara líquida y congelada, 5000 mg/kg para clara en polvo
<b>Enzimas</b>	
<b>Derivadas de las fuentes establecidas en el Reglamento</b>	
<b>Glucosa oxidasa</b>	BFP
<b>Catalasa</b>	BFP
<b>Colorantes naturales</b>	
<b>Xantófilas</b>	BFP
<b>Carotenos</b>	BFP
<b>Aditivos para la pasteurización</b>	
<b>Peróxido de hidrogeno</b>	BFP
<b>Recubrimiento para huevo con cascara</b>	
<b>Aceite vegetal o mineral (parafina) grado alimentario</b>	0.1%

## Especificaciones legales de los ovoproductos en seguridad alimentaria y calidad

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996, los ovoproductos deben cumplir con las siguientes especificaciones sanitarias:

**Tabla 26.** Especificaciones físicas y químicas de los huevos y ovoproductos. Donde: \*: A excepción de aquellos procedimientos de pasteurización que utilicen agentes sensibilizadores (peróxido de hidrogeno) o que por su combinación de tiempo y temperatura no inactive la alfa-amilasa, pero cumpla con las especificaciones microbiológicas.

Productos y derivados	Especificación /Límite Máximo			
	Humedad	Materia extraña	a-amilasa	pH
Huevo fresco, huevo refrigerado	---	Exento	---	6.8
Huevo líquido refrigerado o congelado	---	Exento	Negativo*	---
Huevo, yema y clara congelados	---	Exento	Negativo*	---
Huevo, yema y clara deshidratados	8%	Exento	Negativo*	---
Huevo, yema y clara pasteurizados y envasados asépticamente	---	Exento	Negativo*	---

**Tabla 27.** Especificaciones para metales pesados y metaloides huevos y ovoproductos.

Metal pesado y metaloide	Límite máximo mg/kg
Pb	0.1
Hg	0.03
Cd	0.05



**Tabla 28.** Especificaciones microbiológicas de los huevos y ovoproductos.

Productos y derivados	Especificación /Límite Máximo			
	Mesófilos aerobios UFC/g	<i>Salmonella</i> en 25 g	Coliformes totales UFC/g	<i>S. aureus</i> UFC/g
Huevo fresco, huevo refrigerado	100,000	Ausencia	50	<100
Huevo líquido refrigerado o congelado	15,000	Ausencia	10	<100
Huevo, yema y clara congelados	15,000	Ausencia	10	<100
Huevo, yema y clara deshidratados	25,000	Ausencia	10	<100
Huevo, yema y clara pasteurizados y envasados asépticamente	1,000	Ausencia	10	<100

**Tabla 29.** Especificaciones para residuos de antibióticos en huevos y ovoproductos.

Residuo	Límite máximo
Bacitracina	4,8 U.I. /g (mg de bacitracina 42 U.I.)
Clorotetraciclina	0,05 mg/kg
Dihidroestreptomicina	0,05 mg/kg
Eritromicina	0,03 mg/kg
Flubenzazole	0,4 mg/kg
Neomicina	0,2 mg/kg
Novobiocina	0,1 mg/kg
Nistatina	4,3 mg/kg
Oleandomicina	0,1 mg/kg
Oxitetraciclina	0,2 mg/kg
Penicilinas	0,018 mg/kg
Polimixina B	5 U.I./g (1 mg de polimixina B = 10000 U.I.)
Estreptomicina	0,5 mg/kg
Tetraciclina	0,3 mg/kg

Capítulo 6

# **Microbiología de los Ovoproductos**

# CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LOS OVOPRODUCTOS

## Huevos líquidos

Los huevos con cáscara preparados para el consumo humano se pueden separar de sus cáscaras para producir productos líquidos, concentrados, desecados, cristalizados, congelados, coagulados o de colesterol reducido. Estos productos han sido obtenidos a partir de huevos de gallina, de patas, de pavas, de pintadas o de codornices, pero no a partir de una mezcla de huevos de diferentes especies. El huevo líquido se puede homogenizar como huevo entero o se puede separar en clara y yema. Todos los ovoproductos se deben pasteurizar, se deben refrigerar, se deben introducir en contenedores o tanques, y se deben enviar refrigerados o congelados.

## Efectos del tratamiento sobre los microorganismos

### Cascado, separado de sus componentes y homogenizado

La microbiota inicial del huevo líquido consta de una mezcla variada de bacterias Gram positivas y Gram negativas que provienen:

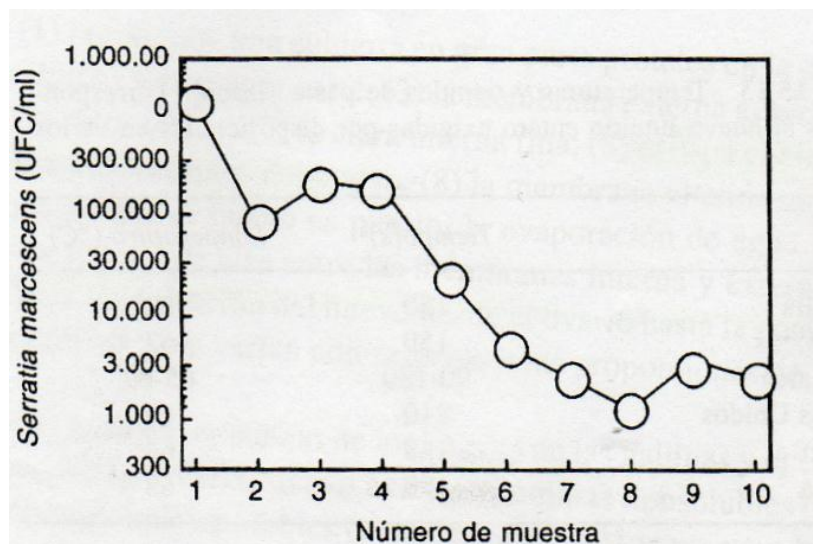
- De la cáscara, que con frecuencia está contaminada con materia fecal y con otro tipo de materia.
- De otro contenido de huevos contaminados.
- Del material y superficies utilizadas en el tratamiento (como equipo, utensilios para romper los huevos, tuberías, bombas, filtros, batidoras, y tanques de recepción).
- De los manipuladores de alimentos.

A no ser que se diseñe cuidadosamente, el material utilizado continuamente durante periodos prolongados puede ser difícil de limpiar y en él puede haber bolsas de líquido y películas semiestancadas donde se pueden acumular y multiplicar las bacterias. Por ejemplo, Kuda *et ál.*, (2011) estudiaron la importancia de un apropiado lavado y sanitizado en las superficies y utensilios que contienen restos, ya sea de yema, clara, o ambas, durante la producción de los ovoproductos. La relevancia de este estudio, es debido a que estos microorganismos, además de ser patógenos, se adhieren y forman biopelículas [McNeill y Hamilton, 2004; Kubota *et ál.*, 2009] causando la transmisión del patógeno al alimento [Giauris y Nychas, 2006; Simoes *et ál.*, 2010]. Existen reporte de biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa* [Parsek y Tolker-Nielsen,

2008], *Listeria monocytogenes* [Takahashi et ál., 2010], ST [Zaklkbany et ál., 2010] y *S. aureus* [Kwon et ál., 2008], que han mostrado gran resistencia contra los desinfectantes. En dicho estudio la adición de cloruro de benzalconio e hidrocioruro de alquildiaminoetilglicina presenta un efecto bactericida sobre dichos microorganismos, en ausencia de los componentes del huevo. Sin embargo este efecto desaparece en presencia de yema y huevo entero. Este efecto de protección de los componentes del huevo desaparece con un correcto y adecuado lavado con agua.

A no ser que los huevos ya estén limpios, se deben limpiar inmediatamente antes de la operación de cascado. Esta operación se debe realizar en una habitación independiente para evitar la contaminación cruzada. No es necesario secarlos después del lavado mientras escurran lo suficiente para que el agua de las manos no vaya a parar directamente al ovoproducto líquido. El lavado de los huevos sucios antes de romperlos puede reducir los recuentos de mesófilos aerobios del huevo líquido en varios órdenes de magnitud [Penniston y Hedrick, 1947].

Un solo huevo alterado puede contaminar el material que se utiliza para romper los huevos y añadir millones de bacterias al líquido. La observación de los huevos al trasluz (ovoscopiado) antes de la operación de rotura puede descubrir los huevos alterados, pero algunos tipos de alteraciones son muy difíciles de descubrir. Por ejemplo, las putrefacciones fluorescentes por *Pseudomonas* spp., son difíciles de ver utilizando una lámpara de observación de luz blanca. Los olores de poca intensidad también son engañosos [Johns y Berard, 1945; Elliott, 1954; Mercuri et ál., 1957]. De modo parecido, el grupo de *Acinetobacter-Moraxella* puede producir putrefacciones incoloras que pueden pasar al huevo líquido sin ser descubiertas. En las máquinas automáticas para romper huevos, el examen de las putrefacciones es aún más difícil. El uso eficaz de estas máquinas depende de un aporte uniforme de huevos secos, limpios y no alterados [Forsythe, 1970]. El uso de huevos agrietados aumenta el porcentaje de contaminación por *Salmonella* y microorganismos de alteración en las mezclas de huevos [Baker, 1974]. El uso de huevos de desecho de las incubadoras no está permitido en algunos países (UE, Estados Unidos, Canadá). Un huevo alterado puede contaminar el material que se emplea para romper los huevos y el subsiguiente ovoproducto líquido (Figura 54).



**Figura 54.** Contaminación del huevo líquido por la maquina rompedora de huevos infectada con *Serratia marcescens* [Kraft, 1967b]. Cada muestra representa el contenido de 102 huevos. Las muestras 1-4 eran de huevos infectados con *Serratia marcescens*. Las muestras 5-10 eran de huevos no infectados rotos en la misma máquina después de las muestras 1-4 sin haberla limpiado.

La homogenización de los huevos líquidos generalmente se consigue en un tanque mezclador grande denominado batidora o en sistemas de homogeneizadores continuos. Aquí, cada uno de los huevos, la clara o las yemas se mezclan completamente. Durante esta operación, la contaminación microbiana se distribuye uniformemente por todo el lote. Después, las mezclas de huevos se deben tratar inmediatamente. Si esto no es posible, el producto se debe introducir en almacenaje a temperaturas no más de 4°C.

### Pasteurización

*Salmonella* es el patógeno objetivo para el cual fueron diseñados los tratamientos de pasteurización de los huevos. Afortunadamente, el grupo de *Salmonella* no es especialmente termorresistente. Sin embargo, en los ovoproductos, rodeadas de proteínas y grasas, su termorresistencia aumenta. Los tiempos y las temperaturas que destruyen a este patógeno coinciden o están próximos a las temperaturas que afectan de modo perjudicial a las propiedades físicas y funcionales de los ovoproductos. El albumen es el componente del huevo más sensible; es desnaturalizado en unos pocos minutos a 60°C o por encima de esta temperatura. A esta temperatura, el huevo entero homogeneizado y la yema son razonablemente estables.

Las temperaturas de pasteurización recomendadas para los huevos líquidos que no se les añadieron aditivos alimentarios varían de 55.6 a 69°C, y los tiempos de exposición varían de 10 a 15 minutos. Las temperaturas más bajas y los tiempos

más cortos aumentan el riesgo de supervivencia de *Salmonella*, mientras que las temperaturas más altas y los tiempos más prolongados aumentan el daño a las propiedades funcionales del huevo [Forsythe, 1970]. Las temperaturas y los tiempos de pasteurización mínimos exigidos por los distintos países varían considerablemente [Cunningham, 1990]. Es por ello que la FDA ha propuesto ejemplos de tratamientos para la pasteurización del huevo con o sin aditivos (ver pasteurización).

La termorresistencia de *Salmonella*, que incluye a SE, en los ovoproductos, depende de las características físicas y químicas de cada producto. Además, la termorresistencia varía en las distintas especies y cepas de *Salmonella*. Examinando 17 cepas de SE, Shah *et ál.*, (1991) indicaron que en el huevo entero los valores  $D_{57.2^{\circ}\text{C}}$  y  $D_{60^{\circ}\text{C}}$  variaban de 1.21-2.81 minutos y de 0.20-0.52 minutos, respectivamente. En las cepas procedentes de brotes de gastroenteritis relacionados con el consumo de huevos, la resistencia no estaba aumentada. Sin embargo Humphrey *et ál.*, (1993, 1995) indicaron que en los aislamientos del fago tipo 4, los cultivos de fase estacionaria de los aislamientos clínicos tenían una resistencia al calor, al ácido y al peróxido de hidrógeno considerablemente mayor que la correspondiente a los aislamientos procedentes de las gallinas o de los huevos. Las células de la fase estacionaria eran aproximadamente 10 veces más termorresistentes que las células de la fase logarítmica. Garibaldi *et ál.*, (1969) indicaron que el valor  $D_{60^{\circ}\text{C}}$  correspondiente a ST en el huevo entero líquido y en la yema era 0.27 y 0.40 minutos, respectivamente. En los aislamientos y en los tipos fágicos de SE existen diferencias. Palumbo *et ál.*, (1995) averiguaron que el valor  $D_{60^{\circ}\text{C}}$  correspondiente a cuatro cepas de SE en la yema de huevo variaba de 0.55- 0.75 minutos, con valores Z que variaban de 4.6-6.6°C. Cepas aisladas de S. Senftenberg y de ST tenían valores  $D_{60^{\circ}\text{C}}$  de 0.73 y 0.67 respectivamente, con valores Z de 4.1 y 3.2°C. SE PT4 era algo más termorresistente que algunos aislamientos de *Salmonella* relacionados con las aves de corral, pero no hasta un grado tal que impactara en la eficacia de la pasteurización [Humphrey *et ál.*, 1990]. La termorresistencia y la acidotolerancia de SE se puede aumentar exponiendo previamente las células a temperaturas elevadas (37- 48°C) [Shah *et ál.*, 1991; Humphrey *et ál.*, 1993]. Garibaldi *et ál.*, (1969) indicaron que en la clara de huevo líquida, ST tenía valores  $D_{54.8^{\circ}\text{C}}$  y  $D_{56.7^{\circ}\text{C}}$  de 0.64 y 0.25 minutos, respectivamente. Palumbo *et ál.*, (1995, 1996) encontraron una concordancia razonable entre los valores de la termorresistencia en las investigaciones con tubos cerrados herméticamente y en las investigaciones con pasteurizadores de placa.

Una cepa atípica que no es destruida por las costumbres actuales de pasteurización es S. Senftenberg 775W. Aislada originariamente en huevos en 1946, esta cepa tiene una termorresistencia que es 10-20 veces mayor que la de

otras cepas de *Salmonella* [Osborne *et ál.*, 1954]. En una investigación con albumen a pH 9.1, *S. Senftenberg* 775W tuvo un valor  $D_{57.8^{\circ}\text{C}}$  de 2.1-2.4 minutos, mientras que el correspondiente a ST fue 0.125 minutos [Corry y Barnes, 1968]. Entre cientos de aislamientos examinados durante un periodo de más de 30 años, nadie ha vuelto a aislar esta cepa ni ha encontrado otra cepa con termorresistencia equiparable. Por esta razón, los tiempos y las temperaturas de pasteurización han sido diseñados para destruir las cepas típicas menos resistentes. A finales de la década de los 50 se tomó la decisión de que no se debe sacrificar la calidad del producto pasteurizado, frente a una cepa que se encuentra pocas veces [Ng, 1996; Lineweaver *et ál.*, 1967].

En años recientes han surgido cepas de *Salmonella* resistentes a una amplia gama de antibióticos, tal es el caso de ST DT104. Este microorganismo ha incrementado el número de salmonelosis a nivel mundial en los últimos años [Helms *et ál.*, 2005; Varma *et ál.*, 2005; McQuestin *et ál.*, 2010]. Varios autores han reportado que la presencia de este microorganismo posiblemente pueda deberse a que las temperaturas de pasteurización no han sido suficientes para reducir la carga del patógeno a niveles seguros [Kim *et ál.*, 1989; Saeed y Koons, 1993; Gast y Holt, 2000; McQuestin *et ál.*, 2010].

En un estudio realizado por McQuestin *et ál.*, (2010) reportaron las cinéticas de crecimiento e inactivación de ST DT104 en distintas temperaturas de almacenamiento para cuatro distintos ovoproductos: huevo entero, albumen, yema con azúcar al 10% y yema con sal al 10%. Los resultados mostraron una lenta inactivación de ST DT104 en los cuatro productos a 4°C logrando una reducción menor a 0.6 ciclos logarítmicos. La contaminación en productos refrigerados y congelados posiblemente se deba a una contaminación post-pasteurización, como lo indica McQuestin *et ál.*, (2010). Los ovoproductos almacenados a 10, 15, 20 y 25°C (temperaturas por encima de las recomendadas) incrementaron en 5 ciclos logarítmicos el crecimiento de este microorganismo en huevo entero, albumen y yema con azúcar. Otros autores han reportado el crecimiento en 2-5 ciclos logarítmicos de otros serotipos de *Salmonella* a temperaturas de 10 y 15°C respectivamente [Bradshaw *et ál.*, 1990; Clay y Board, 1991]. Este mismo incremento se observó a temperaturas de 30, 37 y 42°C en huevo entero y yema con azúcar.

Hogue *et ál.*, (1997); Poppe *et ál.*, (2002); Therlfall, (2002); McQuestin *et ál.*, (2010), han mostrado que el número de aislados de ST DT104 en las aves ha ido en aumento y actualmente las aves de corral son el mayor reservorio, por lo tanto, también la contaminación de ovoproductos líquidos se ha incrementado en las diferentes etapas de la producción.

El grado de protección deparado por la pasteurización está relacionado con el número de *Salmonella* presentes inicialmente. Casi todas las recomendaciones para la pasteurización de huevos reducen niveles de *Salmonella* en 1,000 a 10,000 veces (Tabla 30). Puesto que el nivel de *Salmonella* en el huevo líquido no pasteurizado suele ser muy bajo, los tiempos y las temperaturas de pasteurización recomendados deben conceder un margen de seguridad adecuado, reduciendo el nivel a menos de 1 UFC en 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> gramos de producto. Un tratamiento de este tipo eliminaría prácticamente a *Salmonella*, aun en el caso de que el nivel inicial fuese 10<sup>2</sup> UFC/g. Normalmente, la contaminación inicial es mucho más baja. Considerando que un solo huevo contaminado sería mezclado con una gran cantidad de huevos exentos de *Salmonella*, es improbable que con una operación de tratamiento higiénico se encontrase un lote de mezcla de huevos con niveles altos de *Salmonella*. Sin embargo, esto pone de relieve la importancia de usar huevos frescos con una incidencia y con un predominio de *Salmonella* que sea lo más bajo posible.

**Tabla 30.** Reducción del número de algunos grupos microbianos y *Salmonella* durante la pasteurización de la clara de huevo líquida.

°C	Esquema de pasteurización		log <sub>10</sub> reducción de recuentos bacterianos			Referencia
	Tiempo de sostenimiento (min)	pH	Recuento aerobio en placa	<i>Salmonella</i>	Coliformes	
57.2	1	9	4	-	>3	Ayres y Slosberg, 1949
57.2	10	9	5	-	>3	Ayres y Slosberg, 1949
60	"relámpago"	9	2	-	>3	Ayres y Slosberg, 1949
55.6	4	-	2.6	>4	-	Kline et ál., 1966
56.7	2	-	2.6	>4	-	Kline et ál., 1966
57.2	2.5	9.2	2	-	>5.4	Barnes y Corry, 1969
		9.3	2.7	-	>5.9	

En los huevos líquidos, la pasteurización reduce el recuento de mesófilos aerobios en 100 a 1,000 veces, generalmente hasta 100 UFC/g (Tablas 30 y 31). Los microorganismos sobrevivientes son en su mayor parte *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y unos pocos bacilos Gram negativos [Shafi et ál., 1970]. Payne et ál., (1979) averiguaron que los microorganismos más importantes después del calentamiento a 65°C durante 3 minutos eran *Microbacterium*



*lacticum* y *Bacillus* spp. Ninguno de los aislamientos fue capaz de crecer a 5°C, pero varios fueron capaces de crecer con rapidez relativa a 10 y a 15°C.

**Tabla 31.** Reducción del número de algunos grupos microbianos y *Salmonella* durante la pasteurización del huevo entero líquido.

Esquema de pasteurización		log <sub>10</sub> reducción de recuentos bacterianos			
°C	Tiempo de sostenimiento (min)	Recuento aerobio en placa	<i>Salmonella</i>	Coliformes	Referencia
60	10	-	4.3	-	Gibbons et ál., 1946
60	20	-	5.6	-	Gibbons et ál., 1946
60	25	-	>7.3	-	Gibbons et ál., 1946
60	30	2	-	-	Gibbons et ál., 1946
62.8	"relámpago"	0.6-1.3	+	>4.8	Goresline et ál., 1951
63.9	2.5	1.3-3.3	-	>4	Murdock et ál., 1960
64.4	3	3.5	-	-	Mulder y Van der Hulst, 1973
65.2	9	2.2-2.3	-	>2	Murdock et ál., 1960
66.1-62.8	2.5	>5.1	>6	>3	Heller et ál., 1962
67-68	1.75	1.7-2.8	-	>2	Murdock et ál., 1960

Las características de la termorresistencia de *L. monocytogenes* (Tabla 32) indican que la actual exigencia mínima de pasteurización de los Estados Unidos (60°C durante 3.5 minutos) conseguiría una reducción de 2.1-2.7 ciclos logarítmicos del patógeno en el huevo entero líquido [Foegeding y Leasor, 1990]. Por lo que se refiere a la actual exigencia mínima de la pasteurización de la yema líquida, se observó una estimación parecida (reducción de 2.5 ciclos logarítmicos) [Palumbo et ál., 1995]. El grado de inactivación de *L. innocua* fue menos de 10 veces en 3.5 minutos cuando la clara de huevo fue calentada a 56.6 y 57.7°C utilizando tanto tubos cerrados herméticamente como un pasteurizador de placa [Palumbo et ál., 1996]. Se ha llegado a la conclusión de que las exigencias actuales de la pasteurización mínima serían suficientes para controlar a *L. monocytogenes* en los ovoproductos de vida comercial larga solamente si los niveles iniciales del patógeno eran bajos [Foegeding y Leasor, 1990; Foegeding y Stanley, 1990; Palumbo et ál., 1995, 1996]. Moore y Madden, (1993) consideraron que los usos

actuales de la pasteurización eran adecuados con base a la ausencia de *Listeria* spp. en 500 muestras diarias del producto pasteurizado.

**Tabla 32.** Características de la termorresistencia de *Listeria monocytogenes* en los ovoproductos líquidos.

Producto	Valor D°C (min)	Valor Z (°C)	Sistemas/cepas	Referencia
<b>Huevo entero</b>	D <sub>51</sub> 14.3-22.6 D <sub>55.5</sub> 5.3-8 D <sub>60</sub> 1.3-1.7 D <sub>66</sub> 0.06-0.20	5.9-7.2	Tubo capilar cerrado, una cepa	Foegeding y Leasor, 1990
<b>Yema de huevo</b>	D <sub>61.1</sub> 0.7-2.3 D <sub>63.3</sub> 0.35-1.28 D <sub>64.4</sub> 0.19-0.82	5.1-11.5	Tubos cerrados, cinco cepas diferentes de <i>L. monocytogenes</i> y una de <i>L. innocua</i>	Palumbo et ál., 1995
<b>Clara de huevo</b>	D <sub>55.5</sub> 13 D <sub>56.6</sub> 12 D <sub>57.7</sub> 8.3	11.3	Tubos cerrados, mezcla de cinco cepas de <i>L. monocytogenes</i> y una de <i>L. innocua</i>	Palumbo et ál., 1996

Los sistemas de pasteurización continua calientan el huevo líquido a la temperatura objetivo y después lo mantienen a esta temperatura durante un tiempo determinado mediante el uso de tubos de calentamiento de longitudes apropiadas. Estos pasteurizadores necesitan sistemas de control adecuados que sean capaces de garantizar una velocidad constante del flujo. Esto incluye el aparato automático para la regulación y registro de la temperatura, dispositivos de control automático para evitar el calentamiento insuficiente, y un sistema de seguridad (que incluye dispositivos de registro apropiados) que desvía el producto calentado insuficientemente e impide que este se mezcle con el producto que se ha calentado completamente.

La adición de humectantes que disminuyen la actividad del agua de los ovoproductos líquidos aumenta la termorresistencia de *Salmonella* y de otros patógenos. Por ejemplo, Palumbo et ál., (1995) averiguaron que los valores D<sub>63.3°C</sub> correspondientes a *Salmonella* en yema de huevo, en yema de huevo con sacarosa al 10%, y en yema de huevo con NaCl al 10%, fueron 0.21, 0.72 y 11.50 minutos, respectivamente. Las actividades del agua (Aw) de estos productos fueron 0.989, 0.978 y 0.965. Cuando en estos productos se determinó la inactivación de *L. monocytogenes*, los valores D<sub>63.3°C</sub> correspondientes a la yema de huevo y a la yema de huevo con sacarosa al 10% fueron 0.81 y 1.05 minutos, mientras que este mismo valor correspondiente a la yema de huevo con NaCl al

10% fue de 10.5 minutos después de un primer periodo de latencia de 14.8 minutos durante el cual no hubo disminución en los niveles de patógenos.

Si se destinan las yemas de huevos saladas a la producción de aderezo para ensaladas de acidez elevada, o de mayonesa de acidez elevada, no es necesaria la pasteurización. Sin embargo, se necesita mayor cuidado para evitar la contaminación después de la elaboración. Las yemas de huevo se pueden pasteurizar primero y después se puede añadir la sal con precauciones para evitar la contaminación. Para rebajar el pH hasta 4.6, se puede añadir ácido acético u otros ácidos, después de lo cual *Salmonella* muere más rápidamente. Es posible que SE sea más ácidotolerante que ST [Humphrey *et ál.*, 1993]. Las yemas de huevos saladas y acidificadas se pueden pasteurizar en 1 minuto a 60°C [Garibaldi, 1968].

Muchas veces, las temperaturas del pasteurizador hacen que el material de huevo se coagule en las superficies salientes de las placas de calentamiento [Ling y Lund, 1978], lo que influye desfavorablemente tanto en la calidad funcional del producto como en la eficacia de la inactivación microbiana. Por esta razón, la investigación se ha centrado en métodos para:

- Restablecer la calidad dañada añadiendo compuestos químicos como auxiliares del batido en el punto de uso;
- Aumentar la sensibilidad de *Salmonella* al calor añadiendo compuestos químicos o modificando el pH;
- Evitar los efectos perjudiciales sobre la calidad añadiendo compuestos químicos antes de la pasteurización.

La clara es el componente del huevo más termosensible. El calentamiento de la yema de huevo inalterada a 62°C durante 3.5 minutos altera un 3-5% de la ovomucina, un 90-100% de la lisozima y más del 50% de la conalbúmina [Lineweaver *et ál.*, 1967]. El tratamiento térmico mínimo de los Estados Unidos de 56.7°C durante 3.5 minutos aumenta notablemente el tiempo del batido para preparar merengue. Incluso un tratamiento térmico mínimo de 3 minutos a 54.4°C duplicó el tiempo del batido, pero auxiliares del batido como el citrato de triacetilo o la triacetina restablecieron esta función casi a la normalidad [Kline *et ál.*, 1965]. En este intervalo de temperaturas, una elevación de 2°C de la temperatura aumenta el daño 2.5-3 veces, mientras que el porcentaje de destrucción de *Salmonella* solo aumenta 2 veces. La cinética de la pérdida de calidad frente a la destrucción de *Salmonella* junto con la formación de material coagulado en las placas del pasteurizador a temperaturas más elevadas, hace improbable que la clara de huevo inalterada fuera pasteurizada a temperaturas superiores a 60°C [Kline *et ál.*, 1965; Lineweaver *et ál.*, 1967]. Las autoridades del

Reino Unido han recomendado 57°C durante un tiempo de 2.5 a 3 minutos [Corry y Barnes, 1968; Hobbs y Gilbert, 1978].

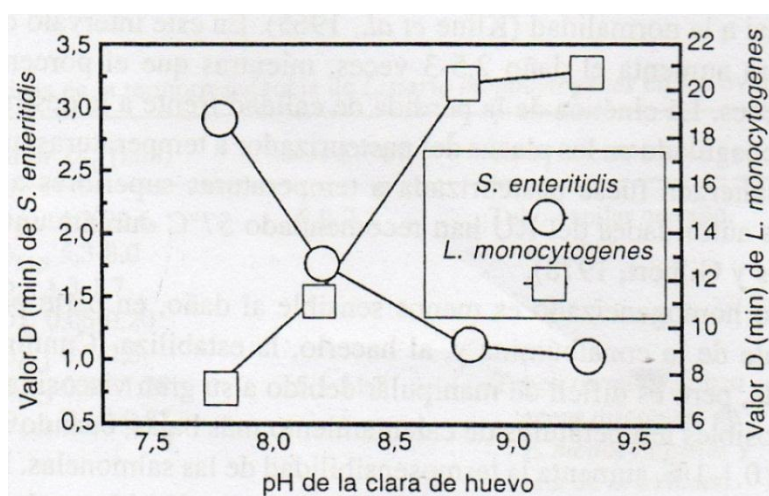
El huevo entero inalterado homogenizado es menos sensible al daño, en parte porque el hierro de la yema satisface la capacidad quelante de la conalbúmina y, al hacerlo, la estabiliza [Cunningham, 1966]. La yema de huevo es relativamente estable, pero es difícil de manipular debido a su gran viscosidad.

Con el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son posibles temperaturas de calentamiento más bajas; cuando se añade a los huevos en un nivel de aproximadamente un 0.1-1%, aumentan la termosensibilidad de *Salmonella*. Por ejemplo, Palumbo *et ál.*, (1966) indicaron que el valor D<sub>56.6°C</sub> correspondiente a la clara de huevo líquida era 1.44 minutos, mientras que el valor D<sub>53.2°C</sub> correspondiente a la clara de huevo líquida tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.875% era 1.54 minutos. Un tratamiento de catalasa después de la pasteurización desdobra el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Lloyd y Harriman, 1957; Rogers *et ál.*, 1966]. Palumbo *et ál.*, (1966) no descubrieron que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentaba la destrucción de *L. monocytogenes* de la clara en el huevo líquido. El "electrocalentamiento" ha sido utilizado a escala comercial como método alternativo del calentamiento de los ovoproductos líquidos [Reznik y Knipper, 1994].

Un factor que influye en la termorresistencia de las bacterias es el pH de calentamiento. Típicamente, las bacterias son resistentes cerca de su pH óptimo de crecimiento y se vuelven cada vez menos resistentes a medida que este pH se desvía de ese óptimo. Según se ha mencionado anteriormente, un huevo de gallina recién puesto tiene un pH comprendido en la escala 7.8- 8.2. A medida que el huevo envejece, el pH se eleva hasta 9.1-9.6. Se ha indicado que ajustando el pH de la clara de huevo desde su nivel normal próximo a 9 a un valor comprendido en la escala 6.5- 6.7, aumenta al mismo tiempo la estabilidad de la clara de huevo y de *Salmonella* al calor, pero la estabilidad de *Salmonella* aumenta menos que la de la clara de huevo [Lineweaver *et ál.*, 1967]. A valores de pH por debajo de 7, *Salmonella* se vuelve más sensible al calentamiento, especialmente con la presencia de ácidos orgánicos. El calor necesario para destruir a *Salmonella* en los huevos se puede reducir considerablemente ajustando el pH a 5.5 o a 6 con los ácidos cítrico, láctico, fórmico o propiónico [Lategan y Vaughn, 1964]. Cuando el pH de la clara de huevo esta en 9 o por encima de este valor, *Salmonella* no crece, pero si este pH se ajusta a 6.8 crece bien [Banwart y Ayres, 1957]. Se debe tener cuidado en asegurarse de que la clara de huevo pasteurizada y acidificada no se vuelva a contaminar con *Salmonella* y después se someta a una temperatura incorrecta.

A medida que se producen más huevos expresamente para la elaboración de ovoproductos líquidos, un porcentaje cada vez mayor de huevos está entrando en el local de rotura antes de que el pH de la clara haya tenido la oportunidad de alcanzar un pH de 9.1-9.6. Cotterill (1968) descubrió que la temperatura necesaria para conseguir una reducción del 99.99% (4D) de *S. Oranienburg* en la clara de huevo en un tiempo determinado, aumentaba desde 55°C a pH 9.4 hasta 58.6°C a pH 8.5. Garibaldi *et ál.*, (1969) averiguaron que el valor D correspondiente a ST en la clara a pH 7 era 4.6 veces mayor que a pH 9. Palumbo *et ál.*, (1966) indicaron que la reducción hasta 7.8 del pH de clara triplica, aproximadamente, la termorresistencia de SE (Figura 55). Curiosamente, en *L. monocytogenes* se observó la relación contraria, que Palumbo *et ál.*, (1966) atribuyeron al efecto del pH sobre la inactivación de la lisozima.

La modificación del pH de la clara para aumentar la destrucción térmica de las bacterias tiene efectos perjudiciales sobre las proteínas de la clara de huevo, principalmente sobre la conalbúmina. El ajuste del pH a 7 con ácido láctico aumenta la estabilidad de la conalbúmina, de la lisozima y del ovomucoide [Cunningham y Lineweaver, 1965]. La adición de una sal metálica satisface la actividad de quelación de la conalbúmina y la vuelve relativamente estable al calor. Funcionarán el  $Fe^{3+}$  o  $Al^{3+}$ , pero debido a que el  $Fe^{3+}$  vuelve al albumen de color rosado, el metal de elección es el  $Al^{3+}$  en forma de sulfato aluminico [Cunningham, 1966]. Con el ajuste del pH a 7 y la adición de  $Al^{3+}$ , la clara se puede pasteurizar a 60-62°C durante un tiempo de 3.5 a 4 minutos. La cantidad total de proteínas alterada es <1%; sin embargo, el tiempo del batido todavía está aumentado y la clara necesita la adición de un auxiliar del batido [Lineweaver *et ál.*, 1967]. En algunos países, el sulfato aluminico no está permitido como aditivo alimentario (Tabla 25).



**Figura 55.** Efecto del pH sobre el valor  $D_{56.6^{\circ}C}$  correspondiente a SE y *L. monocytogenes* en clara de huevo líquida calentada [Palumbo *et ál.*, 1996].

Han sido recomendados otros compuestos que estabilizan la conalbúmina o que disminuyen la resistencia de *Salmonella*. La adición de polifosfato sódico al 0.5-0.75% a la clara permite la destrucción eficaz de *Salmonella* a 52.2-55°C durante 3.5 minutos sin dañar las propiedades funcionales [Chang et ál., 1970; Kohl, 1971]. El ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA) en un nivel de 7 mg/mL de clara de huevo destruyó  $10^6$  de *Salmonella* en menos de 24 horas a 28°C, y 70 mg de polifosfato sódico por mL de clara de huevo destruyó  $10^6$  de *Salmonella* en 60 horas a 28°C. Cuando el pH de la clara de huevo se ajustó a 5.3 y se añadió EDTA a razón de 7 mg/mL, la termorresistencia de *Salmonella* disminuyó 100 veces. Estos secuestrantes convierten al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{Mg}^{2+}$  en no disponibles para los microorganismos; en tal caso, los microorganismos se vuelven sensibles al ataque de la lisozima [Garibaldi et ál., 1969].

### **Tecnologías no térmicas: Alternativas a la pasteurización**

#### **a) Campo eléctrico pulsado o Campo eléctrico de alta intensidad**

El uso de huevo entero líquido como sustituto del huevo con cáscara, requiere de un proceso térmico por el cual se inactivan microorganismos patógenos. El huevo entero líquido es pasteurizado a 60°C por 3.5 minutos, para el caso de los Estados Unidos, o 64°C durante 2.5 minutos en el Reino Unido [Monfort et ál., 2012] y para el caso de México debe llevarse a cabo a 64,5°C durante 2,5 minutos. Como se ha venido mencionando, la pasteurización tiene efectos indeseables en la calidad funcional del producto, altas temperaturas (60-68°C) reducen la capacidad de espuma del huevo líquido entero [Cunningham, 1995] o temperaturas de 70-73°C producen la coagulación del huevo líquido [Hamid-Samimi et ál., 1984; Herald y Smith, 1989]. Para conservar las propiedades físicas y funcionales del huevo líquido, se han ido desarrollando alternativas que no requieren de un proceso térmico, tal es el caso del campo eléctrico pulsado (PEF por sus siglas en inglés) [Ponce et ál., 1999; Mañas et ál., 2000; Amiali et ál., 2007; Geveke, 2008; De Souza y Fernández, 2011].

PEF es una tecnología que inactiva microorganismos y algunas enzimas, conservando la calidad organoléptica, funcional y nutricional del huevo líquido [Calderón- Miranda et ál., 1999]. La PEF es una alternativa a los procesos térmicos, ya que esta metodología consiste en la aplicación de un campo eléctrico pulsado de alta intensidad (10- 50 kV/cm) y de corta duración a los alimentos colocados entre dos electrodos a temperaturas bajas, en comparación a las empleadas por la pasteurización [Barbosa-Cánovas et ál., 2001]. El campo eléctrico da lugar a un daño estructural irreversible en la membrana del microorganismo seguido de su inactivación [Qin et ál., 1995, 1996].

Esta tecnología ha demostrado ser efectiva en la inactivación de microorganismos como *Salmonella* y sus distintos serotipos, *E. coli*, *Bacillus cereus*,

*S. aureus*, *Pseudomona fluorescens*, *L. innocua* en huevo entero líquido [Calderón-Miranda *et ál.*, 1999; Góngora-Nieto *et ál.*, 2003; Hermawan *et ál.*, 2004; Bazhal *et ál.*, 2006; Huang *et ál.*, 2006; Jin *et ál.*, 2009; Pina-Perez *et ál.*, 2009; Monfort *et ál.*, 2010a, b].

Jeantet *et ál.*, (1999) evaluaron la inactivación de SE en la clara de huevo, logrando la reducción de 3.5 ciclos logarítmicos del microorganismo después de un tratamiento con PEF con una intensidad de 23 kV/cm. Ohshima *et ál.*, (1997) estudiaron la inactivación de ST bajo condiciones de temperatura controlada (50°C) con y sin la aplicación de un campo eléctrico pulsado (32 kV/cm), obteniendo una relación de células sobrevivientes de  $10^{-4}$  y  $10^{-1}$  respectivamente.

Martin-Belloso *et ál.*, (1997) lograron la reducción de 6 ciclos logarítmicos para *E. coli* (ATCC 11229) inoculada en huevo entero líquido con un tratamiento de 26 kV/cm por 400  $\mu$ s. Ma *et ál.*, (1997) inocularon *E. coli* (ATCC 11775) en huevo entero líquido obteniendo una reducción de 6 ciclos logarítmicos con un total de 20 pulsaciones de 2.5  $\mu$ s con una intensidad de 36 kV/cm.

Góngora *et ál.*, (2001) estudiaron la inactivación de tres cepas diferentes de *Pseudomonas* (ATCC 17400, ATCC 13252, WSU-07) suspendidas en huevo líquido. Los resultados mostraron una reducción de 0.95 ciclos logarítmicos para *P. fluorescens* WSU-07 cuando es sometida a un tratamiento de 48 kV/cm por 230  $\mu$ s; mientras que para la cepa ATCC 17400 obtuvieron una reducción de 3.5 ciclos logarítmicos. La tercera cepa, ATCC 13252 mostró una resistencia intermedia, en comparación con las cepas anteriores, al obtener una reducción mayor a 2 ciclos logarítmicos. Sin embargo estos resultados comparados con otros estudios mostraron que la inactivación de ciertas cepas de *Pseudomonas* se debe a los diferentes sistemas PEF, el número de pulsaciones, las diferentes formas de pulsaciones etc., aun así los resultados de dicho estudio ofrecen una buena perspectiva para la técnica de PEF en *Pseudomonas*.

También se ha estudiado la influencia de diferentes medios en el que el microorganismo es suspendido. Con un tratamiento a 180  $\mu$ s y una intensidad de 28 kV/cm, Sensoy *et ál.*, (1997) lograron la reducción de 4 ciclos logarítmicos de *Salmonella* Dublin (ATCC 15480) inoculado en una solución de KCl con una conductividad eléctrica de 0.47 S/m; y la reducción de 5 ciclos logarítmicos se obtuvo, para el mismo microorganismo, cuando se suspendió en una solución de KCl con conductividad eléctrica de 0.9669 S/m en huevo entero líquido. Alvarez *et ál.*, (2000) reportaron la inactivación de *S. Senftenberg* suspendido en un buffer de citrato-fosfato (McIlvaine) con un tratamiento de 22 kV/cm durante 600  $\mu$ s. Ho *et ál.*, (1995) estudiaron la reducción microbiana de *P. fluorescens* seguido de un tratamiento de PEF en cinco medios diferentes (agua destilada, peptona, azúcar,

goma xantana y NaCl), cada una con una diferente conductividad eléctrica y propiedades reológicas distintas.

También existen casos en donde, la PEF no llega a reducir los ciclos logarítmicos recomendados por organismos internacionales. Un ejemplo de ello lo es *Salmonella* y *Listeria*. Tratamientos de PEF a temperaturas menores de 35°C están lejos de reducir los 5 ciclos logarítmicos para *Salmonella* recomendados por la USDA (USDA, 1969) siendo insuficientes para garantizar la ausencia de *Salmonella* en 25 gramos o mL de huevo entero líquido, como lo indica la regulación Europea [Monfort *et ál.*, 2012].

Para incrementar la letalidad de la PEF en huevos y ovoproductos, esta tecnología se ha combinado con otros obstáculos para las bacterias, como es la adición de antimicrobianos, el aumento de la temperatura o la sucesiva aplicación de PEF seguido de un tratamiento térmico [Hermawan *et ál.*, 2004; Bazhal *et ál.*, 2006; Huang *et ál.*, 2006; Amiali *et ál.*, 2007; Jin *et ál.*, 2009]. En el mejor de los escenarios, la reducción de 3 a 5 ciclos logarítmicos para SE y ST en huevo entero líquido y yema de huevo se ha logrado con tratamientos de PEF combinados con temperatura o mediante la aplicación de PEF seguido de un tratamiento térmico [Hermawan *et ál.*, 2004; Amiali *et ál.*, 2007; Jin *et ál.*, 2009].

Actualmente, Monfort *et ál.*, (2011) han propuesto una metodología de PEF seguido de un tratamiento térmico con la adición de EDTA disódica o trietil citrato. A través de este proceso, la reducción de 8 ciclos logarítmicos se ha alcanzado para SE en huevo entero líquido con un 2% de trietil citrato, después de una aplicación de PEF a 25 kV/cm y 200 kJ/kg seguido de un tratamiento térmico a 55°C durante 2 minutos, con un mínimo impacto en el contenido proteico. Un estudio reciente de Monfort *et ál.*, (2012), mostró la reducción de 5 ciclos logarítmicos de serotipos de *Salmonella* como, SE, ST, S. Senftenberg, S. Typhi, S. Dublin, S. Virchow en huevo entero líquido usando trietil citrato, diferentes tratamiento térmicos y un solo tratamiento de PEF. También en este estudio se cuantificó el impacto de proteínas solubles en el huevo entero líquido (Tabla 33).

El EDTA se usa como un conservador o como un inhibidor de la decoloración del producto [Helander *et ál.*, 1997]. Concentraciones arriba de 0.54 mM son permitidas en los ovoproductos que han sufrido un tratamiento térmico y concentraciones por arriba de 20 mM han sido propuestas para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas en diferentes productos, incluido el huevo [Anónimo, 2006]. El trietil citrato es un aditivo permitido en huevo deshidratado y reconocido como aditivo GRAS (FDA, 2012), empleado para mejorar las propiedades de batido del huevo [Cho *et ál.*, 2009].



**Tabla 33.** Contenido de proteína soluble en el huevo entero líquido sometido a un tratamiento térmico o PEF seguido de un tratamiento térmico con trietil citrato (TC) al 2%. Fuente: Monfort *et ál.*, 2012.

Tratamiento térmico	Contenido de proteína soluble (%)
Sin tratamiento	100
TC PEF 52°C/ 3.5 minutos	98.2 ± 2.2
TC PEF 55°C/ 2 minutos	98.7 ± 2.8
TC PEF 60°C/ 1 minuto	95.0 ± 1.7
60°C/ 3.5 minutos	98.4 ± 0.2
64°C/ 2.5 minutos	90.6 ± 3.3

Se mencionó que la técnica de PEF ha sido combinada con antimicrobianos, tal es el caso de la nisina. PFE estresa a la célula microbiana haciéndola más sensible a la nisina [Kalchayanand *et ál.*, 1994]. Esta metodología se ha empleado en *Listeria innocua*. [Caldero- Miranda *et ál.*, 1999]. Por ejemplo, Calderón- Miranda *et ál.*, (1999) suspendieron a *L. innocua* en huevo entero líquido sometiendo al microorganismo a dos diferentes tratamientos, PEF y PEF con nisina. La mayor inactivación alcanzada solo con el primer tratamiento fue de 3.5 ciclos logarítmicos, mientras que, para el segundo tratamiento, la reducción fue de 5.5 ciclos logarítmicos con 100 UI de nisina/mL.

### b) Irradiación

Técnicamente, es factible controlar a *Salmonella* utilizando radiación ionizante [Comer *et ál.*, 1963; Schaffner *et ál.*, 1989; Slater y Sanderson, 1989; Kijowski *et ál.*, 1994]. Una dosis de 3.0 kGy es suficiente para eliminar a *Salmonella* y las enterobacterias de la clara de huevo, de la yema y del huevo entero líquidos con o sin adición de un 50% de azúcar o de un 11% de sal. Parece ser que SE es algo más resistente a la radiación que ST [Thayer *et ál.*, 1990]. Se ha demostrado que la asociación de la irradiación y el tratamiento térmico reduce las exigencias de ambos tratamientos para eliminar a SE en el huevo entero líquido [Schaffner *et ál.*, 1989]. Un inconveniente que presenta este tratamiento es la formación de H<sub>2</sub>S durante la exposición del ovoproducto líquido, además de las fuertes oposiciones que se tienen hacia los alimentos irradiados [Bruhn, 2005].

### c) Microfiltración tangencial o de flujo cruzado

Otro proceso que ha presentado alto potencial y que ha sido reportado como un método efectivo en la eliminación de microorganismos y otros contaminantes. Esta tecnología se ha empleado en leche [Eckner y Zottaola, 1991], sin embargo, los pocos estudios llevados a cabo en el huevo líquido han dado buenos resultados [Ferreira *et ál.*, 1999; Mukhopadhyay *et ál.*, 2010]. La microfiltración de flujo cruzado se basa en el bombeado continuo del líquido a altas velocidades a través de una membrana presurizada en donde la dirección del flujo es

tangencial a la superficie de la membrana [McGregor, 1985; Cheryan, 1998] evitando la acumulación de partículas en la superficie de la membrana. Este proceso de separación ha demostrado la eliminación de compuestos celulares y contaminantes a partir de un fluido en donde las proteínas, el agua y otros solutos de menor tamaño pasan a través de la membrana. Estudios realizados por Ferreira *et ál.*, (1999) reportaron una reducción de 1-2 ciclos logarítmicos en la carga microbiana de la clara de huevo. Mukhopadhyay *et ál.*, (2009) observaron la completa eliminación de la carga microbiana en la clara de huevo líquida. En otro estudio, realizado por el mismo autor, se reportó la reducción de 8 ciclos logarítmicos de SE en la clara de huevo líquida no pasteurizada a un pH de 8 y 9 a 40°C. Este proceso no alteró la capacidad de espuma del ovoproducto líquido. Posteriormente se realizó un análisis microbiológico a dicho producto almacenado a 4°C durante 21 días, observándose la ausencia de microorganismos y la estabilidad del producto.

#### **d) Otros tratamientos**

Para superar las limitaciones de la pasteurización, se han investigado varias tecnologías no térmicas con la finalidad de obtener alimentos seguros y que conserven sus cualidades nutrimentales y organolépticas, permitiendo alargar la vida útil de los ovoproductos. Dentro de estas tecnologías alternativas se encuentran la ultrasonificación [Wrigley y Llorca, 1992; Herrero y Romero de Avila, 2006], la radiación con luz UV [Unluturk *et ál.*, 2008] y la aplicación de altas presiones hidrostáticas [Lee *et ál.*, 1999, 2001, 2003; Andrassy *et ál.*, 2006]. Sin embargo, estas nuevas tecnologías de conservación aun se encuentran en investigación, ya que se han conocido algunos efectos de las dichos tratamientos [Herrero y Romero de Avila, 2006], por ejemplo, se ha visto que el presurizado de la clara de huevo líquida causa la desnaturalización y coagulación de las proteínas [Andrassy *et ál.*, 2006]. A pesar de los grandes esfuerzos que se les ha dado a estos tratamientos, ninguno ha resultado tecnológicamente atractivo para ser comercializado para los ovoproductos líquidos [Mukhopadhyay *et ál.*, 2010].

#### **Envasado y enfriamiento**

Una vez que un ovoproducto ha sido pasteurizado, se debe manipular con cuidado para evitar la re-contaminación con huevo no pasteurizado, por material no higiénico, por envases, por polvo o por fuentes humanas o animales. También se debe enfriar rápidamente, preferentemente utilizando un intercambiador de calor o, si no, se introduce en latas y se enfría en 1.5 horas a 7°C o menos para evitar el crecimiento de cualquier microorganismo superviviente. La temperatura del ovoproducto debe recorrer rápidamente la escala de temperaturas que mantiene el crecimiento microbiano rápido (de 50°C a 7°C).

Si se envían yemas de huevo no pasteurizadas con adición de un 10% de sal y se utilizan inmediatamente podrían contener *Salmonella* en el momento de utilizarlas. La adición de esta cantidad de sal (esto es, 20.3 gramos de sal en 100 gramos de fase acuosa) disminuye la actividad de agua de la yema de huevo hasta 0.90 aproximadamente. En este  $A_w$  *Salmonella* no crecerá, prescindiendo de la temperatura, y se extinguirá en cuestión de semanas [Banwart, 1964; Cotterill y Glauert, 1972; Ijichi *et ál.*, 1973]. Sería de esperar que los estafilococos crecieran aerobiamente si el producto fue almacenado sin refrigeración.

### **Congelación y descongelación**

Los contenedores de huevos líquidos para congelar se deben colocar en un congelador a una temperatura comprendida entre -23 y -40°C inmediatamente después de la refrigeración y se deben apilar de tal manera que se congelen pronto. Para el almacenamiento prolongado las temperaturas deben ser de -18°C o menos: algunos microorganismos son capaces de crecer lentamente a temperatura de -10°C o por encima de ésta [Michener y Elliott, 1964].

La congelación y el almacenaje congelado reducen el número de microorganismos pero por lo general no hasta el punto de la extinción de una cepa dada, concretamente no en la matriz proteica protectora del huevo. Si bien la congelación y el almacenaje congelado reducen a *Salmonella*, no se puede confiar en que eliminen el patógeno. En huevo entero líquido congelado (-18°C), los niveles de *L. monocytogenes* permanecieron invariables durante 6 meses de almacenaje [Brackett y Beauchat, 1991]. En la tabla 34 se representa un ejemplo de los efectos de la congelación en el huevo entero pasteurizado y no pasteurizado.

La descongelación incorrecta puede conducir a aumentos inaceptables en el contenido microbiano [Forsythe, 1970]. Por ejemplo, cuando una lata de huevo líquido se deja que se descongele completamente en una habitación templada, la temperatura de la parte exterior habrá permanecido durante varias horas en la escala de temperaturas que mantiene el crecimiento bacteriano. Los productos congelados se deben descongelar en condiciones que permitan que la temperatura del material descongelado se eleve más de 4°C solo durante tiempos cortos. Algunos fabricantes descongelan en un frigorífico a 4°C aproximadamente; otros sumergen las latas en agua fría; otros tienen instalados aplastadores para romper la masa parcialmente congelada; todavía otros separan mediante centrifuga o de cualquier otro modo el material de huevo líquido a medida que se descongela [Lawler, 1965].

**Tabla 34.** Efecto de la congelación sobre la microbiota del huevo entero líquido pasteurizado y no pasteurizado. Fuente: Wrinkle *et ál.*, 1950.

Bacterias	No pasteurizado (porcentaje de aislamientos)		Pasteurizado (porcentaje de aislamientos)	
	Antes de la congelación	Después de la congelación	Antes de la congelación	Después de la congelación
<i>Acinetobacter-</i>				
<i>Moraxella</i>	0	2	-	-
<i>Enterobacter</i>	3	0	-	-
<i>Alcaligenes</i>	25	20	4	8
<i>Bacillus</i>	7	2	83	84
<i>Chromobacterium</i>	2	2	-	-
<i>Cocos</i>				
<i>Gram positivos</i>	5	4	3	0
<i>Escherichia</i>	6	7	3	0
<i>Flavobacterium</i>	29	27	4	0
<i>Proteus</i>	16	18	4	8
<i>Pseudomonas</i>	7	16	-	-
<i>Salmonella</i>	2	0	-	-
<i>Streptothrix</i>	0	2	-	-

#### Tratamiento especial con alcohol

Cuando se utilizan para la producción de licores que contienen huevo, los ovoproductos reciben un tratamiento de intensidad menor que la del tratamiento recomendado. El efecto conservante del alcohol destruye a *Salmonella* en 6 días de almacenaje cuando el contenido de alcohol es el 13% y superior [Bolder, *et ál.*, 1987; Warburton *et ál.*, 1993].

#### Microorganismos de descomposición y alteración del huevo líquido

Los microorganismos contaminantes en el momento de la rotura del huevo son principalmente los existentes en la cáscara (Tabla 18) y en el interior de algún que otro huevo alterado. Si no se pasteurizan inmediatamente, los huevos rotos se deben refrigerar enseguida a 7°C o menos, especialmente si se utilizaron huevos agrietados o sucios [Brown *et ál.*, 1966].

Después de que los huevos están pasteurizados, de nuevo se deben enfriar inmediatamente. Aunque los microorganismos que alteran o descomponen los huevos en refrigeración han sido destruidos en su mayor parte [Speck y Tarver, 1967], un retraso en el enfriamiento permitirá que las bacterias mesófilas crezcan y que las pocas psicrótrofas presentes se desarrollen rápidamente. En una investigación, los huevos enteros no pasteurizados mantenidos a 4°C durante 8- 10 días tuvieron niveles bacterianos de  $3 \times 10^6$  UFC/g [Steele *et ál.*, 1967]. Los huevos pasteurizados, congelados inmediatamente y almacenados a 4°C durante 45



La tabla 35 registra los cambios producidos por diferentes géneros cuando crecen en cultivo puro en huevo entero líquido. Sería de esperar que la mayoría de los géneros no sobrevivieran a la pasteurización, y su presencia sería indicadora de re-contaminación después de la pasteurización. Los olores de la alteración son mucho más intensos en la yema o en el huevo entero que en la clara. En la clara, algunas cepas no produjeron olor pútrido o H<sub>2</sub>S [Imai, 1976].

**Tabla 35.** Cambios producidos por diferentes géneros de bacterias aisladas originariamente en huevo líquido y después inoculadas en cultivo en huevo estéril. Fuente: Wrinkle *et ál.*, 1950.

Bacterias	Número de cepas inoculadas	Cambios producidos
<b>Acinetobacter- Moraxella</b>	1	Sin cambio en 72 h.
<b>Enterobacter</b>	4	Ligero olor ácido después de 72 h.
<b>Alcaligenes</b>	17	12 olor a enmohecido en 60 h. 1 olor a enmohecido en 48 h. 4 sin cambio detectable.
<b>Bacillus</b>	8	6 coagulación en 18 h. 1 olor muy agrio en 24 h. 1 sin cambio detectable.
<b>Chromobacterium</b>	2	Sin cambio en 72 h.
<b>Escherichia</b>	15	4 ligero olor ácido en 60 h. 8 olor agrio después de 60 h. 3 sin cambio detectable.
<b>Flavobacterium</b>	11	2 coagulación en 120 h. 1 olor fecal después de 60 h. 4 olor ligero en 120 h. 4 sin cambio en 72 h.
<b>Proteus</b>	10	3 olor de agriado plano en 60 h. 2 coagulación en 18 h. 4 olor muy agrio en 60 h. 1 sin cambio detectable.
<b>Pseudomonas</b>	7	3 olor muy agrio en 60 h. 2 gas en 60 h. 1 olor agrio en 60 h. 1 sin cambio detectable.
<b>Cocos Gram positivos</b>	7	2 produjeron gas en 18 h. 1 sin cambio detectable.

Casi todos los microorganismos de la alteración redujeron ligeramente el pH de la clara y produjeron una pequeña cantidad de trimetilamina. Por otra parte, la yema desarrollo olores a pescado, a enmohecido y amoniacal, con niveles elevados de H<sub>2</sub>S y de trimetilamina y un elevado nivel total de bases volátiles.

## Microorganismos patógenos

SE y ST son los patógenos más importantes existentes en el huevo líquido, se trataron con detalle en el capítulo 4 y en los párrafos anteriores.

*Staphylococcus aureus* crece bien en huevo entero líquido mantenido a temperatura por encima de 15.6°C. Los estafilococos son un peligro potencial en las yemas de huevo saladas porque son capaces de crecer en Aw reducida (0.90) del producto y por ser microorganismos halotolerantes. Si resisten la pasteurización o son reintroducidos después de la pasteurización, deben crecer hasta niveles de 10<sup>5</sup> UFC/mL o más antes de que se forme la toxina. Esto exigiría un grave uso incorrecto de la temperatura que supone el almacenamiento del ovoproducto durante varios días a temperaturas ambientales [Ijichi et ál., 1973]. También exigiría la presencia de oxígeno suficiente ya que la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas no sería de esperar en esta Aw en condiciones de anaerobiosis.

Si bien hasta ahora los ovoproductos líquidos no han sido relacionados con casos de listeriosis humana, la presencia de *L. monocytogenes* en huevos tratados [Leasor y Foegeding, 1989; Nitcheva et ál., 1990; Moore y Madden, 1993; Rivoal et ál., 2010] se ha convertido en una preocupación importante, especialmente en productos con vida de anaquel refrigerada larga. En los Estados Unidos, un examen de huevos crudos rotos a escala comercial procedentes de 11 establecimientos descubrió *Listeria monocytogenes* en el 36% de las muestras [Leasor y Foegeding, 1989]. *L. innocua* se encontró en 15 muestras positivas, mientras que *L. monocytogenes* estuvo presente en solo dos (5%) de las muestras. Sin embargo, muchas veces es difícil aislar bajos niveles de *L. monocytogenes* cuando coexiste con *L. innocua* [Cornu et ál., 2002]. De hecho, estudios han mostrado que *L. innocua* crece más rápido que *L. monocytogenes* en diferentes medios [Curiale y Lewus, 1994; MacDonald y Sutherland, 1994]. En otro examen, se aisló *Listeria* en el 72% de los filtros en la línea del tratamiento de huevo crudo recién mezclado, aislándose *L. innocua* en el 62% y *L. monocytogenes* en el 38% [Moore y Madden, 1993]. Otro estudio reciente, examinó la presencia de *Listeria* de los filtros, de las 173 muestras analizadas el 72% (125 muestras) dieron positivo a *Listeria spp.*, de las cuales 78 por *L. innocua* (45%) y 47 por *L. monocytogenes* (27%) [Rivoal et ál., 2010]. Un estudio japonés, reportó la presencia de *L. monocytogenes* en ovoproductos donde la contaminación fue más baja que en los anteriores estudios, de un total de 803 muestras solo 4 (0.5%) dieron positivas a *L. monocytogenes* [Ohkochi et ál., 2009].

Se ha observado que *Listeria monocytogenes* crecía en el huevo entero líquido crudo pasteurizado y en la yema de huevo a temperaturas que varían desde 5°C hasta 30°C, pero era inactivado en albumen líquido no pasteurizado a pH 7.0- 8.9, presuntivamente debido a la actividad de la lisozima [Khan *et ál.*, 1975; Foegeding y Leasor, 1990; Sionkowski y Shelef, 1990]. En las diferentes cepas de *L. monocytogenes* en huevo entero líquido, los tiempos de generación variaron de 24- 51 horas a 4°C y de 8- 31 horas a 10°C [Foegeding y Leasor, 1990]. El patógeno sobrevivió durante periodos prolongados en huevo entero líquido almacenado a 0°C [Brackett y Beuchat, 1991].

En la mayoría de los casos donde se ha detectado la presencia de especies de *Listeria*, ha sido debido, a huevos en donde la cáscara ha sido contaminada con la bacteria por el ambiente en el que se encuentran las gallinas durante la oviposición [Rioval *et ál.*, 2010]. Esto es porque *L. monocytogenes* esta frecuentemente presente en las granjas de aves de corral (Chemaly *et ál.*, 2008 reportaron un 32%) y también se ha reportado la presencia en las manadas de gallinas ponedoras (Chemaly *et ál.*, 2008 reportaron un 15%). La bacteria, que es ubicua y también ampliamente extendida en las instalaciones de la industria de alimentos, puede ser encontrada en las plantas quebradoras de huevo: se ha asilado al microorganismo del agua empleada para el lavado de los huevos [Laird *et ál.*, 1991; Jones *et ál.*, 2006] y en los filtros (línea de huevo crudo recién mezclado) antes de la pasteurización [Moore y Madden, 1993]. Recientemente, en un estudio por Jones y Musgrove (2008) mostraron que la presencia de *Listeria* spp. en los cargadores de vacío: 86 (72%) de las 120 muestras dieron positivo a *Listeria*, de las cuales el 98.8% pertenece a especies no patógenas de *L. innocua* y solo el 1.2% a *L. monocytogenes*.

La influencia de la temperatura en los distintos ovoproductos en el crecimiento de *Listeria* ha sido motivo de análisis. Notermans *et ál.*, (1991) estudiaron la sobrevivencia de especies de *Listeria* en los ovoproductos líquidos como clara, yema, huevo entero y huevo entero con 25% de azúcar en condiciones distintas de temperatura. En dicho estudio se observó que a temperaturas de 4°C *Listeria* es capaz de sobrevivir en todos los ovoproductos; a esta temperatura las defensas químicas del huevo no parecen tener actividad. Experimentos realizados por Galyean *et ál.*, (1972) mostraron que el mezclar la yema de huevo con la clara neutraliza las propiedades antimicrobianas del huevo, esto explicaría la sobrevivencia de *Listeria* en el huevo entero líquido [Notermans *et ál.*, 1991]. Sin embargo a temperaturas de 20-22°C, en el huevo entero con azúcar, se observó una rápida disminución en los números de *Listeria*. Esto puede deberse a que el azúcar posiblemente activa las defensas químicas del huevo, aunque dicho mecanismo aun no está del todo comprobado.



Sin embargo, se ha dicho que los niveles de contaminación de los ovoproductos por *L. monocytogenes* debe ser baja, particularmente en productos pasteurizados [Rivoal *et ál.*, 2010]. Pero debe tenerse cuidado durante los tratamientos térmicos, debido a la termorresistencia de *L. monocytogenes* que es mayor que la de *Salmonella* spp. [Foegeding y Leasor, 1990; Foegeding y Stanley, 1990; Abdel Kareem y Mattar, 2001; Doyle *et ál.*, 2001]. Dado el número muy pequeño de *Listeria* spp. (cerca de 1.01 log/mL) encontrado por Moore y Madden (1993), la pasteurización debe destruir todas las bacterias en el huevo entero. Sin embargo, debe tenerse gran cuidado en los huevos y mezclas crudas que son más altamente contaminados, especialmente si son añadidas azúcar y sal [McKenna, 1991; Notermans *et ál.*, 1991; Bartlett y Hawke, 1995; Palumbo *et ál.*, 1995; Augustin, 1996; Abdel Kareem y Mattar, 2001]. Además, los procedimientos de higiene y desinfección en la producción de huevos, deben ser extremadamente rigurosos y deben de verificarse constantemente [Moore y Madden, 1993].

Tanto las esporas como las células vegetativas del grupo de *Bacillus cereus*, frecuentemente se han encontrado en la materia prima debido a su amplia distribución en la naturaleza [Anónimo, 2005]. Este grupo microbiano es capaz de producir una toxina (síndrome emético) dentro del alimento como en el interior del intestino humano ocasionando vomito y diarrea, respectivamente [Granum, 1994; Agata *et ál.*, 1995]. Además este microorganismo es responsable del deterioro de ciertos grupos de alimentos, incluso a temperaturas de refrigeración, debido a la actividad de varias de sus enzimas [Anderson *et ál.*, 1995]. Por otra parte, las esporas de este grupo, se adhieren fuertemente a superficies de las tuberías y a equipos de acero inoxidable empleados en la industria de alimentos, en donde germinarán y se multiplicarán [Anderson *et ál.*, 1995; Peng *et ál.*, 2001; Ruy y Beuchat, 2005; Tauveron *et ál.*, 2006].

En la literatura, pocos han sido los estudios que han centrado su relevancia en *B. cereus*, dentro de la industria del huevo [Baron *et ál.*, 2007; Pina- Pérez *et ál.*, 2009]. Después de la pasteurización, el huevo líquido es almacenado a temperaturas de refrigeración, es en éste momento del proceso en donde las bacterias psicrótrofas (*B. cereus*), que sobrevivieron al tratamiento térmico, en específico las esporas, germinan dando lugar a la célula vegetativa bacteriana que puede crecer en dichas condiciones. Jan, *et ál.*, (2011), estudiaron la actividad citotóxica y la adhesión a superficies de acero inoxidable de *B. cereus* y *B. weihenstephanensis*, aislados de las cáscaras de huevos y del huevo líquido pasteurizado. Los resultados obtenidos indican que ninguna de las especies de *Bacillus* mostró actividad citotóxica. En cuanto a la adhesión a superficies, todos los aislados presentaron capacidad para adherirse, lo que puede dar lugar a la formación de biopelículas en los equipos [Peng *et ál.*, 2001; Ruy y Beuchat, 2005].

Otro estudio ha aislado a *B. cereus*, tanto de la cáscara del huevo como del huevo líquido pasteurizado [Wood y Waites, 1988]. Lo anterior supone la presencia del microorganismo en los tanques de mezcla, tanques de almacenamiento y en las materias primas debido a la contaminación de la cáscara. Después de la pasteurización, *B. cereus* ha sido aislado con frecuencia en los ovoproductos líquidos, debido a que la contaminación inicial esta en forma de células vegetativas [Wood y Waites, 1988]. En dicho estudio las esporas producidas sobrevivieron tratamientos térmicos de 80°C durante 60 minutos. Estos resultados indican que se debe tener más precaución en la eliminación de huevos agrietados o rotos junto con la verificación y el aumento en la limpieza y desinfección de los tanques de mezcla y transporte se reducirían los niveles de contaminación por *B. cereus*. También mencionan que parte de la contaminación se encuentra en las estaciones de puesta de huevos, en donde es recogido el huevo después de la oviposición, por lo que la limpieza e higiene de este lugar también disminuirán la contaminación inicial de las cáscaras de huevo.

Payne *et ál.*, (1979) analizaron el huevo líquido pasteurizado, hecho a partir de una mezcla de huevos rotos, agrietados, sucios y de calidad inferior, encontrando cocos termodúricos y especies de *Bacillus*, especialmente de *B. cereus* que soportaron temperaturas de 65°C por 3 minutos.

Después de los ataques bioterroristas del 2001 suscitados en los Estados Unidos, existen posibilidades de que los terroristas utilicen la cadena de suministro de alimentos como vehículo para el bioterrorismo [Sung *et ál.*, 2011]. La contaminación de los alimentos por patógenos atípicos, podría resultar en un brote inusual que dificultaría su identificación en las primeras etapas. *Bacillus anthracis* no es un patógeno que produzca ETA'S, pero podría ser utilizado deliberadamente por terroristas en los alimentos [Khan *et ál.*, 2009; Sung *et ál.*, 2011], resultando en formas cutáneas y gastrointestinales de ántrax [Khan *et ál.*, 2009]. Este microorganismo ya ha sido utilizado en ataques terroristas [Pile *et ál.*, 1998; Brachman y Brachman, 2002; Cummings y Relman, 2002; Cupp *et ál.*, 2004]. Estudiar la supervivencia de *B. anthracis* en diferentes matrices de alimentos, sería de gran utilidad para el desarrollo de estrategias para la preparación y respuesta ante una emergencia terrorista.

Existen estudios sobre la viabilidad de la cepa Sterne de *B. anthracis* en huevo líquido y el efecto de la lisozima sobre este microorganismo en huevo líquido [Khan *et ál.*, 2009; Sung *et ál.*, 2011]. Para el primer estudio se analizaron las cinéticas de inactivación en huevo entero líquido, clara de huevo líquida, yema de huevo con azúcar, y yema de huevo con sal, a bajas (-20, 0, 5°C), moderadas (15, 20, 25, 30, 35 y 40°C) y altas (45, 50, 55 y 60°C) temperaturas de almacenamiento. Se observó que la reducción de la viabilidad de las esporas es

de 60- 100%, 60- 100%, 0- 30% y 50- 100% en temperaturas de 0 y 5°C para los tratamientos de clara de huevo líquido, yema con azúcar, yema con sal y huevo entero líquido respectivamente, en un intervalo de 2 a 3 semanas de almacenamiento. No se observó una caída en la viabilidad de esporas a -20°C en yema con azúcar, y clara líquida; en yema con sal la reducción fue de 20% y en huevo entero líquido fue de 50%. A temperaturas altas de almacenamiento en huevo líquido, clara de huevo líquido y yema con sal se produjo un 20- 50% de reducción dentro de 1 a 4 horas, sin embargo la reducción en la yema con azúcar fue de un 100% en 0.75 horas. A medida que la temperatura se elevaba de 15- 40°C la duración de la fase lag de crecimiento disminuyó, la máxima densidad microbiana alcanzada fue de 0.27- 2.2x10<sup>9</sup> UFC/mL en yema con azúcar y huevo entero líquido, respectivamente. La inactivación total de las esporas en la clara líquida se produjo de 1 a 6 horas. Esta viabilidad e inactivación de las esporas de *B. anthracis* en los ovoproductos será útil en el desarrollo de modelos para la evaluación de riesgos en la seguridad alimentaria.

Se ha observado también el efecto de la lisozima sobre *B. anthracis* y *B. cereus* en la clara de huevo líquida, los resultados indican una reducción mayor cuando se adiciona lisozima (2 mg/mL) en los tratamientos de pasteurización de la clara de huevo líquida, en comparación de un tratamiento sin lisozima. Además esta inactivación depende del pH del ovoproducto, observándose una reducción en el crecimiento de estos microorganismos cuando el pH esta dentro del rango 6- 8.5 [Sung et ál., 2011].

Parece que los ovoproductos líquidos tienen escaso potencial para convertirse en origen de *Escherichia coli* enterohemorrágica, ya que su predominio en los huevos se muestra bajo y las temperaturas actuales de pasteurización son suficientes para inactivar al microorganismo [Erickson et ál., 1995].

## **Medidas de control**

Para evitar la contaminación bacteriana masiva del huevo líquido, los huevos para romper se deben lavar, se deben mirar al trasluz para eliminar putrefacciones, y se deben examinar por lo que se refiere a olor y aspecto en el momento de romperlos. El material que contacta con los huevo contaminados al romperlos se debe lavar e higienizar antes de volver a utilizarlo [Forsythe, 1970]. Idealmente, se debe diseñar material automático de modo que se limpie e higienice de forma continua. Todo el material que contacte con el producto, como tuberías, agitadores, tanques, se debe limpiar e higienizar de forma escrupulosamente al menos diariamente. El material se debe diseñar e instalar para la limpieza fácil, tal como describen las normas sanitarias correspondientes.

Para retardar el crecimiento microbiano, inmediatamente después de la rotura de los huevos y después de la pasteurización, los ovoproductos se deben enfriar a 7°C o a una temperatura por debajo de esta. Si el producto se tiene que congelar, las latas de huevos se deben poner inmediatamente en el congelador a temperatura desde -23 hasta -40°C y se debe conservar a -18°C o menos.

Los pasteurizadores deben tener las siguientes características [Murdock *et ál.*, 1960; Linewear *et ál.*, 1969; Kauffman, 1969; Forsythe, 1970]:

- Control automático del flujo, que incluya válvulas de desvío del flujo para desviar el huevo calentado insuficientemente;
- Control automático de la temperatura;
- Presión más elevada en el lado pasteurizado que en el no pasteurizado para evitar que la mezcla cruda se mezcle por fuga con el material pasteurizado;
- Termómetros registradores en la entrada y salida del pasteurizador y del enfriador;
- Dispositivos para detectar fugas.

## **Huevos deshidratados**

### **Efectos del tratamiento sobre los microorganismos**

Para la deshidratación de los ovoproductos líquidos generalmente se utilizan tres métodos:

- Desecación por aerosol en la que se atomiza el líquido que sale a chorros a través de una boquilla;
- Desecación sobre una superficie calentada;
- Desecación por liofilización.

El agua se puede separar por ultrafiltración o por ósmosis inversa antes de la desecación final.

La microbiología de los tres métodos es esencialmente la misma. La desecación destruye muchas de las bacterias presentes inicialmente en el huevo. Sin embargo, una vez el huevo está seco, la población microbiana se estabiliza y las posteriores disminuciones solo se producen lentamente en el almacenaje prolongado, también a temperaturas ambientales. Solo rara vez hay una extinción completa de las cepas sobrevivientes. Los microorganismos predominantes en el producto desecado son enterococos y bacilos esporógenos

aerobios, los representantes más resistentes de la microflora inicial. Durante la desecación, el número de *Salmonella* se puede reducir del orden de 4 ciclos logarítmicos [Gibbons y Moore, 1944]. El albumen fermentado o el huevo entero sometido a temperaturas incorrectas pueden tener elevada carga bacteriana inicial, por lo que es probable la supervivencia de algunas bacterias [Gibbons *et ál.*, 1944; Ayres y Slosberg, 1949]. Las cepas de *Salmonella* son el principal problema microbiano en los huevos desecados, y el problema se agrava más si crecen durante la eliminación de la glucosa.

### **Eliminación de la glucosa (fermentación)**

Las claras desecadas normalmente contienen más o menos un 0.6% de carbohidratos libres, principalmente en forma de glucosa. En el almacenaje, especialmente a temperaturas por encima de 15°C, el grupo aldehído de la glucosa se combina con el grupo amino de las proteínas, reduciendo su solubilidad, produciendo olores desagradables y formando compuestos insolubles de color pardo (productos de la reacción de Maillard). La eliminación de la glucosa de la clara de huevo líquida antes de la desecación evita estas reacciones. La eliminación de la glucosa también mejora en menor grado la estabilidad del huevo entero y de la yema de huevo desecados [Stewart y Kline, 1941; Paul *et ál.*, 1957; Forsythe, 1970; Kilara y Shahini, 1973].

El primer método usado para eliminar la glucosa consistía simplemente en dejar que la microflora natural del huevo creciera a temperaturas de 21-29°C durante 2 a 7 días. La duración del tiempo se calculaba mediante observaciones del burbujeo, de la consistencia y de la claridad de las muestras. Se desechaban las espumas y los sedimentos y se añadía amoníaco para aclarar el líquido. Las reacciones no se controlaban bien, y con frecuencia producían olores desagradables y proteólisis. Este procedimiento permitía el crecimiento de enterococos, de *Enterobacter aerogenes* y de otras bacterias. Además, podía crecer *Salmonella*, que representaba un peligro para la salud [Ayres, 1958].

Algunos fabricantes añaden cultivos bacterianos iniciadores para fermentar las claras de huevo rápidamente. Se eleva la temperatura a 35°C de modo que la glucosa es eliminada en 12 a 24 horas. Los enterococos resultan favorecidos; *Enterobacter* y los microorganismos lácticos son menos competitivos en el pH natural de la clara de huevo (>9). Sin embargo, los tres microorganismos son empleados por fabricantes diferentes. Los enterococos no producen proteólisis u olores desagradables pero acidifican la clara hasta un pH 6 aproximadamente. Este método de fermentación puede permitir el crecimiento rápido de *Salmonella* después de que el pH desciende debajo de 8.

Generalmente, ha sido recomendado por los investigadores que los fabricantes empleen cultivos iniciadores puros masivos. El primer paso consiste en reducir el pH del huevo desde su valor normal de 9 a 7-7.5 con un ácido orgánico. Después se añade el cultivo iniciador, y se deja que el carbohidrato libre fermenta durante 12-24 horas a 30-33°C. Se ha pretendido que los cultivos bacterianos son mejores porque el producto acabado tiene una elevada calidad de batido, y su solubilidad y su olor son buenos [Forsythe, 1970]. Sin embargo, otros prefieren tratamientos alternativos con levaduras o con enzimas (Tabla 36). Ha sido investigado el tratamiento con glucosa oxidasa como método posible para inactivar SE y otras bacterias en el huevo entero líquido [Dobbenie *et ál.*, 1995].

En algunos procedimientos de fermentación registrados en la tabla 14, las especies de *Salmonella* son capaces de crecer si la escala de pH de la clara de huevo se reduce a 6- 8, pero no si el pH se mantiene en un valor mayor a 9 [Banwart y Ayres, 1957]. Después de la fermentación, la pasteurización es esencial para destruir a *Salmonella* (Ayres y Stewart, 1947; Kline y Sonoda, 1951) a fin de que, si existe alguna, no sea transmitida al producto desecado.

#### **Destrucción de *Salmonella* mediante almacenaje caliente**

A pesar de los procedimientos bastantes eficaces para pasteurizar los huevos líquidos antes de la desecación, alguna que otra vez aparece *Salmonella* en el producto final desecado y envasado. Esto puede ser debido a pasteurización insuficiente, a niveles iniciales excesivos o a contaminación post-pasteurización. Una vez que el producto ha sido desecado todavía pueden ser destruidos microorganismos mediante almacenaje caliente (tratamiento de cámara caliente).

Los microorganismos son sensibles cuando están húmedos; su termorresistencia aumenta a medida que el medio se seca. Mientras que, típicamente, los tiempos de pasteurización están comprendidos en el intervalo de 2 a 5 minutos, los correspondientes a los ovoproductos desecados son varios días. En la tabla 42 se registran los tiempos y las temperaturas correspondientes a la "pasteurización" de la clara de huevo desecada. Estas exposiciones no tienen influencia grave alguna sobre las cualidades funcionales.

En algunos procedimientos de fermentación registrados en la tabla 36, las especies de *Salmonella* son capaces de crecer si la escala de pH de la clara de huevo se reduce a 6-8, pero no si el pH se mantiene en un valor mayor a 9 [Banwart y Ayres, 1957]. Después de la fermentación, la pasteurización es esencial para destruir a *Salmonella* (Ayres y Stewart, 1947; Kline y Sonoda, 1951) a fin de que, si existe alguna, no sea transmitida al producto desecado.

**Tabla 36.** Métodos comerciales y experimentales para la eliminación de la glucosa en los huevos líquidos.

Microorganismo o enzima	Comentario	Referencia
<b>Microbiota</b>	<i>Enterobacter</i> , enterococos y otras bacterias	Ayres, 1958
<b>Coliformes</b>	Primeros estudios de cultivo puro	Stuart y Goresline, 1942a, b
<b><i>Saccharomyces apiculatis</i></b>	El 1% del inóculo confirió sabor a fermento	Hawthorne y Brooks, 1944
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	El olor a fermento en los inóculos grandes se puede eliminar mediante un 0.1% de extracto de levadura que estimula la actividad de los inóculos pequeños. Se centrifuga para eliminar la levadura	Ayres y Stewart, 1947; Hawthorne, 1950; Kline y Sonoda, 1951; Carlin y Ayres, 1953; Ayres, 1958
<b><i>Streptococcus lactis</i> y <i>E. faecalis</i></b>	Células en reposo, 37°C durante 3 horas, extracto de levadura al 0.1% inhibe la producción de ácido	Kaplan <i>et ál.</i> , 1950; Ayres, 1958; Galuzzo <i>et ál.</i> , 1994
<b>Glucosa oxidasa y catalasa</b>	Glucosa oxidada a ácido glucónico, la catalasa destruye el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> que se forma	Baldwin <i>et ál.</i> , 1953; Carlin y Ayres, 1953; Scott, 1953; Paul <i>et ál.</i> , 1957; Ayres, 1958
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	La producción de acetilmetilcarbinol se puede reducir al mínimo usando inóculos pequeños con 0.1% de extracto de levadura para estimulación	Ayres, 1958
<b>Extractos de levadura</b>	Eliminan azúcares en 4-5 horas a 5°C	Niewiarowicz <i>et ál.</i> , 1967
<b><i>E. coli</i></b>	Manifiesta antagonismo por <i>Salmonella</i>	Flippin y Mickelson, 1960; Mickelson y Flippin, 1960
<b><i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus fermenti</i> <i>Lactobacillus plantarum</i></b>	Temperatura óptima de 25°C, lactobacilos eliminados por ajuste del pH antes del tratamiento en la cámara caliente	Mulder y Bolder, 1988

### **Destrucción de *Salmonella* mediante almacenaje caliente**

A pesar de los procedimientos bastantes eficaces para pasteurizar los huevos líquidos antes de la desecación, alguna que otra vez aparece *Salmonella* en el producto final desecado y envasado. Esto puede ser debido a pasteurización insuficiente, a niveles iniciales excesivos o a contaminación post-pasteurización. Una vez que el producto ha sido desecado todavía pueden ser destruidos microorganismos mediante almacenaje caliente (tratamiento de cámara caliente).

Los microorganismos son sensibles cuando están húmedos; su termorresistencia aumenta a medida que el medio se seca. Mientras que, típicamente, los tiempos de pasteurización están comprendidos en el intervalo de 2 a 5 minutos, los correspondientes a los ovoproductos desecados son varios días. En la tabla 37 se registran los tiempos y las temperaturas correspondientes a la “pasteurización” de la clara de huevo desecada. Estas exposiciones no tienen influencia grave alguna sobre las cualidades funcionales.

**Tabla 37.** Tiempos y temperaturas de almacenamiento en cámara caliente para destruir a *Salmonella* spp. en el albumen del huevo desecado.

Pre-tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	Referencia
<b>Fermentado, desecado en bandejas</b>	48.9	20	Ayres y Slosberg, 1949
	54.4	8	
	57.2	4	
<b>3% de humedad</b>	50	9	Banwart y Ayres, 1956
<b>6% de humedad</b>	50	6	Banwart y Ayres, 1956
<b>Desecado por atomización</b>	54.4	7	USDA, 1975b
<b>Desecado en bandejas</b>	51.7	5	USDA, 1975b
<b>Ajustado a pH 9.8 con amoníaco, desecado en bandejas</b>	49	14	Northolt <i>et ál.</i> , 1978
<b>Tratado con ácido cítrico</b>	55	14	Northolt <i>et ál.</i> , 1978
<b>Desecado por atomización</b>	49	14	Northolt <i>et ál.</i> , 1978

La ventaja del almacenamiento caliente sobre la pasteurización húmeda normal es que existe poca posibilidad de re-contaminación mientras los envases permanecen cerrados durante y después del periodo de tratamiento. El efecto bactericida del tratamiento de cámara caliente depende del contenido de humedad, de la temperatura, y del carácter de los tratamientos térmicos que proceden al tratamiento térmico (por ejemplo, método de fermentación, uso de amoníaco o de ácido cítrico, método de desecación) [Banwart y Ayres, 1956; Northolt *et ál.*, 1978]. Comoquiera que el tiempo necesario para la inactivación de todos los microorganismos depende del número de éstos presentes al principio, posiblemente se podría aplicar un tratamiento más corto a los materiales con niveles bajos de contaminación.

### Irradiación

Los investigadores han demostrado que *Salmonella* también se puede inactivar por irradiación en los huevos en polvo [Matic *et ál.*, 1990; Narvaiz *et ál.*, 1992]. La resistencia a la irradiación de una mezcla de SE y ST y *S. Lille* fue 0.8 kGy: una reducción de  $10^3$  necesitó 2.4 kGy. Se consiguió un grado de inactivación



parecido tratando el huevo en polvo con 1 kGy y reteniendo después el producto durante 3 semanas.

### **Microorganismos de descomposición y alteración del huevo deshidratado**

Potencialmente, los microorganismos podrían permanecer vivos indefinidamente en el producto desecado. Sin embargo, con el tiempo la mayoría de las bacterias mueren lentamente dependiendo de factores diversos tales como la especie, la temperatura, el pH, la actividad de agua y la atmósfera. Después de la reconstitución con agua o después del humedecimiento fortuito durante el almacenaje, las bacterias sobrevivientes se activarán y alterarán el producto.

### **Microorganismos patógenos**

El huevo desecado contaminado con *Salmonella* ha ocasionado numerosos brotes por ingestión directa, y otros brotes por medio de otros alimentos contaminados de modo cruzado en la cocina por el huevo desecado. Antes de 1965, los huevos desecados estaban contaminados con frecuencia. Por ejemplo, en un examen realizado en los Estados Unidos en 1943, se aisló *Salmonella* en 1,810 (35%) de 5,198 muestras de huevo entero desecado [Solowey *et ál.*, 1947]. Muchas de estas cepas aisladas eran las mismas que las que se encontraron muy frecuentemente en la enfermedad humana. En el Reino Unido, más o menos en la misma época, se aislaron en el 10%, aproximadamente, de 7,584 muestras de huevo desecado importado [Haines *et ál.*, 1947]. En Canadá, los productos de panadería que contienen huevo fueron relacionados con varios casos de salmonelosis [Butler y Josephson, 1962; Thatcher y Montford, 1962; Skoll y Dillenburg, 1963]. En un brote, *Salmonella* se diseminó por toda una panadería; en las instalaciones se prepararon productos contaminados por el huevo desecado contaminado, e infectaron a los manipuladores de alimentos quienes se convirtieron en excretores asintomáticos. A principios de la década de los años 60, fueron positivas a *Salmonella* 65 (54.6%) de un total de 119 muestras de mezclas de pastel canadiense que contenían huevo desecado [Skoll y Dillengurg, 1963]. Más recientemente, el huevo en polvo producido por Yugoslavia se aislaron niveles bajos (0.1- 0.01 UFC/g) de SE, ST y *S. Lille* [Matic *et ál.*, 1990].

Desde entonces, la pasteurización, seca o húmeda, ha pasado a ser uso general. Además, los gobiernos nacionales han fijado y puesto en vigor normas que exigen la pasteurización. En la actualidad, la incidencia de *Salmonella* en los ovoproductos secos se encuentra, típicamente, en un nivel bajo, pero no determinado en su mayor parte.

Esencialmente, *Listeria monocytogenes* es capaz de sobrevivir durante tiempos prolongados en el polvo de huevo entero y en la yema de huevo desecados y pulverizados almacenados a temperaturas de refrigeración, pero disminuye con el tiempo cuando se almacena a 20°C [Brackett y Beuchat, 1991].

## **Medidas de control**

Los procedimientos descritos para los huevos líquidos también son aplicables a los huevos desecados. Además, el desecador debe estar construido de materiales impermeables sin hendiduras, grietas ni bolsas sin salida donde el producto puede permanecer húmedo y caliente. Los huevos desecados, en común con otros alimentos desecados, se deben proteger contra el goteo por condensación en el producto desecado. Con frecuencia, las tapaderas de los tanques, las caperuzas de los desecadores y las cubiertas de las cintas transportadoras están más frías que el flujo de huevo desecado, de modo que se forma condensación en sus caras inferiores. El polvo del producto aporta nutrientes, de modo que las bacterias, incluida *Salmonella*, son capaces de crecer en las gotitas. Cuando las gotitas o los agregados de huevo húmedo caen en la masa principal pueden aportar zonas de contaminación rara y localizada. La mejor forma de controlar el problema es evitar la condensación. Una solución es el calentamiento de las superficies del material donde se produce la condensación.

La limpieza con agua de una zona usada para un producto desecado puede introducir peligros adicionales. En cambio, se pueden utilizar un limpiador de vacío, cepillos secos, seguidos de paños de alcohol etílico al 95% como desinfectante. Si parece aconsejable usar agua, el material se debe secar completamente y rápidamente antes de volver a utilizarlo.

## **Otros ovoproductos**

Existe una gran cantidad de productos elaborados que contienen huevo. Aquellos que no están cocidos, como el pastel de merengue, el ponche de huevo, o las mezclas dietéticas secas, siguen siendo peligros potenciales por *Salmonella* que podría haber sobrevivido o serían reintroducidas después de la pasteurización. Alimentos cocidos como las natillas, los pasteles de crema y el pastel de ángel podrían ser contaminados de modo cruzado en la zona de preparación por un ingrediente de huevo contaminado, especialmente por un ovoproducto desecado [Williams y Hobbs, 1975]. Sin embargo, los productos cocidos al horno que alcanzan 71°C o más están exentos de *Salmonella* [Beloian y Schlosser, 1963]. Otro ejemplo de alimento cocido que se le asocia a brotes por *Salmonella* son los omelettes [Perales y Audicana, 1989].

*Salmonella* y los estafilococos de los huevos morirán en unos pocos días en el aderezo ácido de las ensaladas (pH 3.3 aproximadamente) o en la mayonesa, pero ha habido brotes de salmonelosis relacionados con mayonesa. Los factores limitantes del crecimiento en la mayonesa son el  $A_w$  bajo (0.93) que no mantiene el crecimiento de *Salmonella*, y un pH bajo (4 aproximadamente) que no mantiene el crecimiento de *S. aureus* [Wethington y Fabian, 1950; Smittle, 1977].

En España, la causa más frecuente de las ETA'S es por el consumo de mayonesa artesanal hecha con huevos frescos, siendo SE el agente etiológico en la mayoría de los brotes [Pérez *et ál.*, 1986]. Los huevos y sus derivados son el 90% de los vehículos de los brotes producidos por *Salmonella* en la década de los ochenta [Anon, 1987]. Esta incidencia ha disminuido gracias a la pasteurización de los ovoproductos.

En un estudio llevado a cabo en ensaladas con mayonesa, se encontró que de las 1187 muestras, el 80 (6.7%) dieron positivo a *Listeria monocytogenes* [Uyttendaele *et ál.*, 2009], sin embargo no excedieron los niveles de seguridad permitidos por la Comunidad Europea de 100 UFC/g [EC, 2005]. En este mismo estudio se realizaron ajustes en los parámetros fisicoquímicos del alimento como el pH,  $A_w$  y temperatura de almacenamiento y se concluyó que bajo las condiciones de pH (5-5.5) y de  $A_w$  (0.96-0.98) del alimento no hay crecimiento del patógeno en un tiempo de 35-42 días almacenado a 4-7°C. También se observó el efecto negativo de los ácidos orgánicos como el ácido acético (predominante en la mayonesa) sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. Éste ácido tiene un efecto inhibitorio fuerte cuando se añade a bajos niveles (0.2%) [Vermeulen *et ál.*, 2007].

Capítulo 7

# Calidad del Huevo

# CLASIFICACIÓN DE LOS HUEVOS

Con base a la norma NMX-FF-079-1991, "Productos avícolas. Huevo fresco de gallina. Especificaciones", el huevo para plato se debe clasificar en los siguientes grados de calidad:

- México extra
- México 1
- México 2
- Fuera de clasificación

Los atributos de calidad que deben cumplir los huevos de dichas categorías se recogen en la tabla 38, las especificaciones para cada parámetro se mencionan a continuación.

## Especificaciones

### Huevo fresco

Se considera como huevo fresco aquel cuyas características sensoriales, así como sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas se mantienen en un nivel óptimo de calidad comestible y que no han sido sometidos a ningún proceso de conservación y cuya edad desde el momento de la postura no pase de 15 días quedando incluidos en esta clasificación el producto almacenado en cámaras frigoríficas entre los 0°C y 2°C, con una humedad relativa entre 73% y 80%, por periodos no mayores a 10 días. En caso de que el huevo se ha sometido a cualquier proceso de conservación diferente a los señalados, pudiendo ser de orden físico o químico, el tiempo de almacenaje de este tipo de producto no excederá los seis meses.

Si rompemos un huevo sobre una superficie plana, si es fresco la clara estará concentrada alrededor de la yema que será alta y convexa. Cuanto más se desparrame la clara menos fresco es el huevo. Lo mismo sucederá cuanto más se desplace la yema del centro (Figura 60).

### Cascarón normal

Es aquel que guarda una proporción entre el diámetro ecuatorial y el diámetro máximo polar de 3 a 4 y no presenta ondulaciones ni depósitos excesivos de sales de calcio. Sin grietas o rajaduras apreciables a simple vista.

**Tabla 38.** Características cualitativas de los huevos de las diferentes categorías.

Parámetros	México extra	México 1	México 2	Fuera de Clasificación
<b>Cáscara y cutícula</b>	De forma normal, limpias e intactas	De forma prácticamente normal, limpio e intacto	Puede presentar anomalías en su conformación, pero intacto y limpio	Con grietas y sucio
<b>Cámara de aire</b>	De altura fija o con movimiento, profundidad no superior a 3.2 mm y exenta de burbujas	De altura fija con movimientos ondulatorios limitados, profundidad no superior a 5 mm y exenta de burbujas	Con movimientos ondulatorios limitados, libre de burbujas y con una profundidad no mayor a 5 mm	Espumosa y con profundidad mayor a 5 mm
<b>Clara</b>	Transparente, firme y traslúcida, exenta de cuerpos extraños	Transparente, firme y traslúcida, exenta de cuerpos extraños	Débil y acuosa, podrá presentar puntos de sangre o "carne"	Con cuerpos extraños o manchas, turbia
<b>Yema</b>	Visible al trasluz solo como una sombra, sin contorno claramente discernible, que se mueva solo levemente al girar el huevo y al volver a colocarlo en una posición central, sin sangre evidente	Forma redonda, prácticamente libre de defectos y ubicada céntricamente.	Oscura, ligeramente aplanada o alargada, desplazada fuera de la posición céntrica	Oscura, no céntrica, de conformación anormal
<b>Disco germinal</b>	Desarrollo imperceptible	Desarrollo imperceptible	Ligeramente visible, pero sin sangre	Desarrollado
<b>Materia extraña</b>	No permitido	No permitido	No permitido	No permitido
<b>Olor extraño</b>	No permitido	No permitido	No permitido	No permitido

### Cascarón anormal

Su forma no se aproxima a la proporción antes descrita o bien, presenta ondulaciones, anillos o depósitos excesivos de sales de calcio en forma de puntos o bordes; puede carecer de resistencia.

### **Cascarón quebrado**

Con grietas y/o rajaduras apreciables a simple vista, pero con las membranas del cascarón intactas y sin goteo del contenido; si hay pérdida de sustancias, se clasificará como huevo perdido o dañado, no apto para consumo humano directo.

### **Cascarón limpio**

Sin lavar, que este exento de material externo y de manchas o decoloraciones que alteren la apariencia de limpieza general del huevo.

### **Cascarón ligeramente sucio**

Sin lavar, que presente manchas o suciedad (sangre, tierra, huevo o estiércol), cuyo conjunto no exceda al 10% de la superficie. No se considera apto para consumo humano directo.

### **Cascarón sucio**

Sin lavar, que presente manchas o suciedad (sangre, tierra, huevo o estiércol), cuyo conjunto sea mayor al 10% de la superficie, pero menor al 25% de la misma. Se cataloga como huevo dañado o perdido, no apto para consumo humano.

### **Cámara de aire fija**

Se localiza en el polo ancho u obtuso y no presenta movimiento al rotar el huevo frente al ovoscopio.

### **Cámara de aire ligeramente móvil**

Presenta movimientos ondulatorios dentro del mismo polo obtuso del huevo, al rotarlo frente al ovoscopio.

### **Cámara de aire libre**

Cuando presenta movimientos hacia posiciones diferentes a la normal, principalmente hacia el punto superior del huevo cuando se rota lentamente frente al ovoscopio.

### **Cámara de aire espumosa**

Una cámara de aire rota se refleja en la formación de burbujas de aire separadas, normalmente flotan debajo de la cámara de aire, aunque pueden desplazarse a otras áreas del huevo cuando se gira lentamente frente al ovoscopio.

### **Clara limpia**

Cuando esta libre de coloración o cualquier elemento ajeno flotando en ella. Las chalazas prominentes (dos) no deben ser confundidas con cuerpos extraños como partículas de sangre o "carnosidades".

### **Clara opaca ensangrentada**

Es aquella que presenta derrames de sangre a lo largo de su estructura, dando lugar a opacidades. Un huevo con clara ensangrentada debe clasificarse como dañado o perdido, no apto para el consumo humano directo.

### **Clara con puntos de sangre o “carne”**

Se determinan como elementos ajenos a la clara cuando su tamaño es de 3.1 mm de diámetro; si su tamaño es mayor o se presentan difundidos, el huevo debe ser clasificado como dañado o perdido, no apto para consumo humano directo.

### **Yema libre de defectos**

Su forma es casi esférica, de contorno ligeramente definido, de ubicación central y firmemente sostenida por las chalazas. Al rotar el huevo en el ovoscopio, da la apariencia de mezclarse con la clara que la rodea. Su movilidad es mínima. No debe presentar manchas o elementos extraños.

### **Yema ligeramente defectuosa**

Su forma es casi esférica, de contorno bien definido pero no claramente establecida cuando se observa el huevo al ovoscopio. Su ubicación es central y presenta movimientos ligeros, sin llegar al desplazamiento. No debe presentar manchas o elementos extraños.

### **Yema defectuosa**

Su forma tiende a ser alargada más que esférica, pero sin llegar a ser predominantemente plana. Su contorno es definido y no ha perdido su ubicación central. No debe presentar manchas o elementos extraños.

### **Yemas anormales**

En cuanto a su forma, se encuentran aquellas alargadas o prácticamente planas, así como las rotas o estalladas. Respecto a su movilidad se consideran aquellas con desplazamiento evidente. Por otra parte se consideran anormales las yemas que presentan anillos de sangre y disco germinativo desarrollado.

### **Germen o disco germinativo imperceptible**

Cuando no se distingue a la ovoscopía.

### **Germen ligeramente visible**

Aquel que aparece como un punto brillante o luminoso sobre la yema a la ovoscopía.

### **Germen desarrollado**

Cuando se observa como una área oscura y bien visible sobre la yema.



### Huevo dañado o perdido

La presencia de cualquiera de los defectos enunciados a continuación, confieren al producto la clasificación de huevo dañado o perdido, no apto para el consumo humano directo:

- Cascarán con quebraduras o rupturas que involucran a las membranas, hasta el punto en que el contenido del huevo se vacía, libera o queda expuesto al medio ambiente.
- Cuando se encuentre suciedad (rastros de sangre y excremento) y otros materiales adheridos al cascarón.
- Huevo con cámara de aire cuya profundidad exceda 10 mm y/o sea espumosa.
- Cuando la yema presente desarrollo del disco germinativo, así como anillos y puntos de sangre.
- Evidencia de manchas de sangre o partículas en la clara, cuya sombra al ovoscopio sea mayor a 3.1mm o cuando se aprecie la presencia de un sin número de manchas y cuyo conjunto sea mayor a la medida antes consignada.
- Pérdida de propiedades organolépticas: En este apartado se consideraran: podredumbres negras; yemas, claras o mezclas podridas; huevos agrios o con claras verdes; huevos con moho; huevos con yemas perforadas y huevos conteniendo embriones (mas allá del estado de anillos de sangre).
- Huevos contaminados: Cuando ocurran alteraciones, ya sea de orden químico o bien de carácter microbiológico que atenten contra la salud o bien, que han sido contaminados por humos, químicos u otros materiales externos, los cuales han afectado seriamente la apariencia, carácter o sabor del producto.

A su vez los huevos se clasifican en función del peso, aunque no se requiere esta clasificación para los huevos entregados a la industria alimentaria y no alimentaria. La clasificación según su peso se muestra en la tabla 39:

**Tabla 39.** Clasificación de los huevos según su peso.

Tamaño	Peso neto mínimo por unidad (g)	Peso neto mínimo por docena (g)	Peso neto mínimo 360 piezas (Kg)
1	64	768	23
2	60- 63.9	720	21.6
3	55- 59.9	660	19.8
4	50- 54.9	600	18
5	45- 49.9	540	16.2
6	Menos de 45	No hay peso neto mínimo	

Los tamaños admisibles para la categoría México extra son del 1 al 5. La presentación de este grado será únicamente en caja o envase cerrado, nuevos, limpios y de materiales y especificaciones aprobadas por la Secretaria de Salud. Los huevos de esta calidad deben ser homogéneos en peso sin que baje el peso neto mínimo por caja o envase. Su tamaño debe ser señalado en la caja y /o envase, en forma visible

Los tamaños admisibles para el grado México 1 son del 1 al 6, debiendo señalarse el tamaño en la caja.

Los tamaños admisibles para el grado México 2 son del 1 al 6, debiendo señalarse el mismo en la caja.

Los huevos de categoría México extra no podrán lavarse o limpiarse antes ni después de su clasificación, en caso de ser autorizados, los huevos lavados podrán solo comercializarse en los estados o países que hayan concebido esa autorización, por ejemplo España no admite esta práctica.

Con el fin de evitar que un huevo refrigerado y expuesto a temperatura ambiente sufra fenómenos de condensación, propiciando el crecimiento de bacterias en la cáscara los huevos de la categoría México extra, no deberán ser sometidos a ningún tratamiento de conservación ni refrigeración en cámaras <5°C. No obstante, sí esta permitido mantenerlos a menos de esa temperatura en el transporte, cuando este dure menos de 24 horas, o en el minorista durante un máximo de 72 horas. Los huevos de las demás categorías solo pueden ir a industrias de ovoproductos si son aptos para su consumo humano y a las de "tratamientos de subproductos" si son aptos para consumo humano.

En cuanto al envase y embalaje, la norma considera lo siguiente:

- Los conos o charolas podrán ser de pulpa moldeada, cartón, polietileno o cualquier otro material autorizado por la Secretaria de Salud.
- El envasado deberá realizarse siempre en charolas nuevas, debiendo tener estas tal construcción que cada una de las celdillas pueda contener a un huevo de cualquiera de los 3 principales grados de tamaño (1, 2 y 3).
- El envase estará limpio y libre de manchas de grasa, suciedad, polvo, marcas ajenas al envase, hoyos o zonas rajadas. No deberá presentar evidencias de maltrato y de laminación; asimismo deberá ser impermeable y no presentara defectos que alteren la apariencia de sanidad y eficiencia.
- De utilizarse envase y embalajes cerrados, estos presentaran un sellado que se inutilizara al abrirse.

- Para empaques de cartón con capacidad para treinta huevos se recomienda una cubierta con película de contracción que permita un ajuste estrecho, facilitando a la vez un etiquetado adecuado y al cliente examinar el producto sin abrir el empaque, evitando el contacto directo.
- El embalaje se fabricará con materiales autorizados pudiendo ser recuperable o no. En el segundo caso se autoriza el rehúso por una sola ocasión; su capacidad será para 360 huevos.
- Deberá presentarse limpio, seco y exento de materiales no propios del embalaje que puedan transmitir olores y/o sabores ajenos al producto.
- El embalaje no podrá contener nunca materiales de relleno.
- El embalaje deberá cerrarse con grapas o cinta engomada, evitándose esta última, en caso que el producto se destine a refrigeración.



**Figura 56.** Envasado y almacenamiento de huevos.

### **Etiquetado**

Los envases deberán presentar la siguiente información mínima en un lugar fácilmente visible, con tipografía clara y ostensible. En la figura 57 se indica de manera esquemática los datos que deben identificarse en los huevos frescos que se venden envasados o a granel.

- Número de licencia o autorización de la Secretaría de Salud al centro de clasificación.
- Marca registrada del producto.

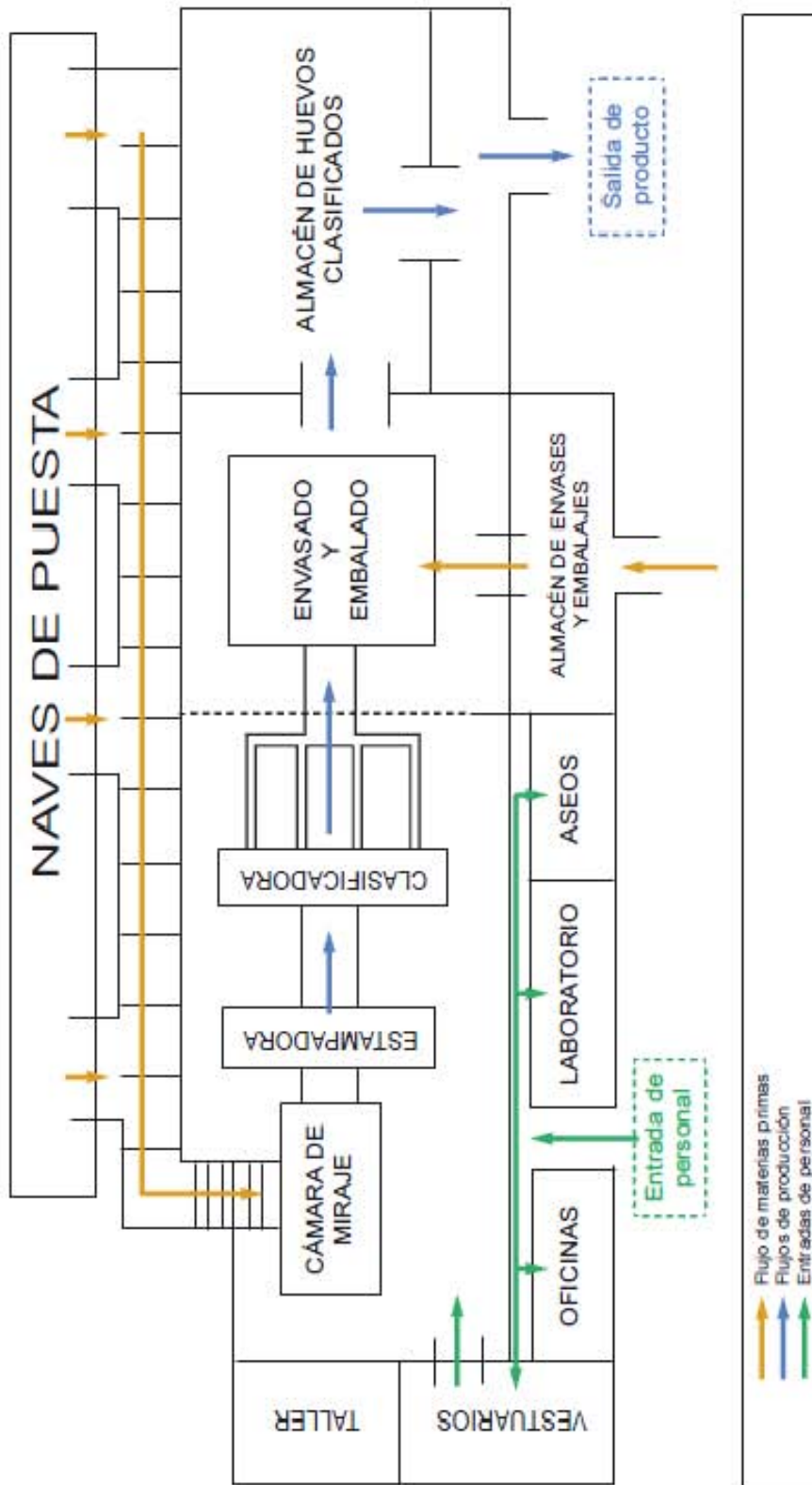
- Grados de calidad y tamaño del producto.
- Fecha de colecta del producto
- Una indicación que recomiende a los consumidores que conserven los huevos en refrigeración.

El embalaje por su parte deberá presentar la siguiente información:

- Denominación de la naturaleza del producto.
- Grado de calidad.
- Número de huevos.
- Leyenda "Peso neto" seguida del dato cuantitativo expresado en kilogramos, mediante la abreviatura kg escrita con minúscula sin pluralizar y sin punto abreviatorio.
- Leyenda "Producido en México".
- Marca registrada o razón social y domicilio del productor.
- Fecha de empaqueo colocada sobre la banda de papel engomado, así como de caducidad.



**Figura 57.** Información de la etiqueta de huevos frescos envasados. Esta etiqueta es un ejemplo de la información presentada en huevos españoles de acuerdo a su reglamentación.



**Figura 58.** Croquis de un centro de clasificación y envasado de huevos. Fuente: Cabellos et ál., 2006.

# CALIDAD DEL HUEVO

## Huevo entero

### Índice morfológico

Los huevos de gallina doméstica exhiben una forma elíptica típica. Su forma es de especial interés para facilitar el envasado y transporte de los huevos. Los huevos muy largos están especialmente expuestos a daños mecánicos, mientras que los huevos esferoidales y muy gruesos ofrecen dificultad para ser introducidos en los envases preformados.

La forma del huevo se expresa calculando el índice morfológico:

$$\text{Índice morfológicos} = (\text{anchura}/\text{longitud}) \times 100$$

Los huevos de gallina miden por término medio 4.2 cm de ancho y 5.7 cm de longitud por lo que le corresponde un índice morfológico de 74.

### Técnica de ovoscopia

La ovoscopia es un método que se basa en la traslucidez de la cáscara y en las diferencias de transmisión lumínica que presentan las estructuras internas del huevo, modificadas más o menos según las alteraciones. El huevo debe colocarse ante el foco luminoso en posición vertical. El interior del huevo queda completamente iluminado y la cáscara muestra su estructura porosa, estando influenciada la observación por el color de la cáscara. El huevo fresco aparece en el ovoscopio de color amarillo rosado claro.

### Observaciones

**Cáscara:** En la cáscara se pueden apreciar las grietas o fisuras, manchas y los defectos de calcificación como los depósitos de cal y las calcificaciones defectuosas. Las manchas de sangre internas aparecen como sombras de colores oscuros o rojizos. En los huevos con la yema adherida a la cáscara, la yema aparece inmóvil dando una sombra más oscura en la zona de contacto.

**Cámara de aire:** En el ángulo obtuso se puede apreciar la cámara de aire del huevo, y su altura nos indica la edad del huevo. En el huevo fresco (recién puesto) la cámara de aire presenta una altura de 3 mm, pero aumenta conforme pasa el tiempo desde la puesta. En huevos de 1 a 4 semanas la cámara de aire presenta una altura comprendida entre 4 y 6 mm, en huevos de 6 semanas a 4 meses la cámara de aire supone 1/6 del huevo y su altura está comprendida entre 11 y 18 mm y para los huevos de más de cuatro meses la cámara de aire ocupa un tercio del huevo.

**Yema y clara:** Fijándose más detenidamente, en la posición que corresponde a la yema distinguimos una sombra rosa en posición central y no móvil. Cuando los huevos son fecundados y están entre el día 1° y 4° de incubación se puede observar la formación de vasos sanguíneos alrededor del disco germinativo, a partir del 5° día de incubación se empieza a apreciar el embrión. A veces en el interior del huevo aparecen manchas oscuras pegadas en el interior de la cáscara o en la clara y yema, que se corresponden con infestaciones por hongos y putrefacciones microbianas. Conforme envejece el huevo se produce la licuefacción del saco albuminoso y de las chalazas, mejora la transmisión de la luz y facilita la movilidad de la yema, y la sombra de ésta aparece con más intensidad, pierde esfericidad, se ensancha y la clara puede tomar color amarillo claro. Sin embargo cuando el huevo es viejo sobre la yema actúan diversas enzimas lipolíticas y glucolíticas y sobre la clara actúa la tripsina degradando la mucina lo que origina una pérdida de consistencia de la clara densa. Un huevo conservado durante 4 0 6 meses aumenta el tamaño de la cámara, la clara aparece turbia y la yema oscura.

#### **Técnica de la luz ultravioleta**

La cutícula es una membrana externa compuesta por dos capas de fibras de glicoproteínas que se encuentra sólidamente adherida a la cáscara y que actúa taponando los poros de la cáscara, impidiendo la entrada de gases y microorganismos al interior del huevo. La cutícula se encuentra compuesta por la proteína denominada porfirina u ovoporfirina que se caracteriza por presentar fluorescencia bajo la luz UV dando un color que varía desde violeta intenso a rojizo dependiendo del color de la cáscara. El tiempo, la luz, el calor y el lavado destruyen la ovoporfirina por lo que la intensidad de color ante la luz UV disminuye, pasando a violeta claro o azul pálido, llegando incluso a desaparecer, observando el huevo blanquecino sin fluorescencia (Figura 59).



**Figura 59.** Técnica de la luz ultravioleta. A la izquierda se observa la presencia de las ovoporfirinas dando un color violeta, a la derecha se observa un huevo sin fluorescencia, es decir un huevo con pérdida de ovoporfirina.



### Prueba de la frescura

Una vez abierto el huevo fresco sobre una superficie plana, la yema adopta una forma esferoidal, distinguiéndose muy bien en la clara la fracción densa, que queda a mayor altura que la clara fluida. El olor del huevo fresco es suave y "soso", y debe estar exento de olores desagradables y extraños. Se percibe el típico "olor a viejo" como consecuencia de los procesos enzimáticos que sufre el huevo. Incluso puede presentar olores desagradables como húmedo, mohoso, pútrido, etc. Si el huevo no es fresco y se mantiene íntegra la membrana de la yema, ésta se extiende sobre la superficie en capa de escasa altura perdiendo la forma esferoidal y presentando una forma aplastada. Además la membrana de la yema puede tener finas arrugas y la separación de la clara y la yema resulta imposible, o bien se logra tan sólo parcialmente y con dificultad. La clara presenta escasa altura como consecuencia de la fluidificación de la clara densa, su color es más amarillo pudiendo aparecer enturbada o teñida de rojo amarillento.

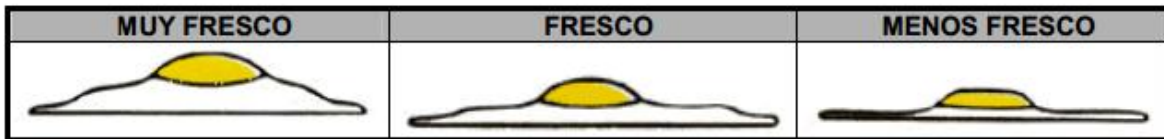


Figura 60. Prueba de la frescura.

Otra prueba para determinar la frescura es poniendo a flotar un huevo en soluciones salinas con diferentes concentraciones de NaCl (Figura 61). Si todos se hunden, se debe ir aumentando la concentración de la solución (agregando sal) hasta que alguno de ellos comience a flotar: éste será el menos fresco. Si todos flotan, se deberá diluir la solución (agregar agua) hasta lograr que uno de ellos se hunda, éste será el más fresco.



Figura 61. Prueba de la flotabilidad para determinar la frescura del huevo.

### Cáscara

#### Espesor de la cáscara

Los huevos con cáscara delgada y muy porosa están sujetos a una evaporación más intensa, pierden peso con mayor rapidez, y en consecuencia son



de calidad más baja que los que poseen la cáscara gruesa y poco porosa. Este carácter determina la resistencia del huevo a la rotura. La cáscara se hace más frágil después de determinados procesos de almacenamiento y conservación como es el baño en agua de cal, que hace que la cáscara se vuelva quebradiza, rompiéndose cuando el huevo se somete a la cocción. Durante el almacenamiento la cáscara se seca ya que la sustancia viscosa de los poros se evapora y como consecuencia los canalículos que atraviesan la cáscara se agrandan. Esta medición se realiza con micrómetro o pico de rey. Huevos de menos de 0.35 mm son poco apropiados para la comercialización por su fragilidad.

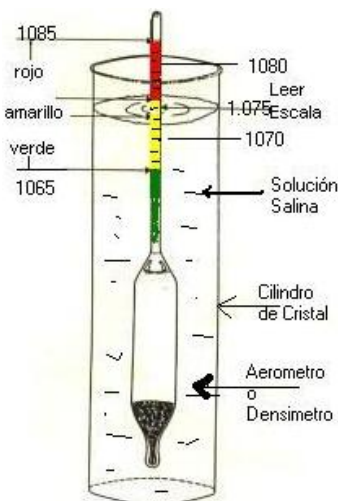
### **Peso específico**

El peso específico refleja la cantidad real que representa la cáscara en comparación con la cantidad de albúmina, yema, y membranas. Las medidas de los pesos específicos tienden a disminuir en los huevos puestos por gallinas con más de cuarenta cinco semanas de edad. Mientras que es de esperar que el peso específico disminuirá según avanza la edad del lote reproductor, a veces el uso de este procedimiento nos permitirá saber cuando el peso específico está cayendo más rápido de lo normal. Permittiéndonos de esta manera poder determinar la calidad de la cáscara de los lotes reproductores que a cualquier edad estén teniendo algún problema y también para evaluar la eficacia de un tratamiento usado para mejorar la calidad de la cáscara.

El peso específico de un objeto es igual al peso de su volumen con relación al peso de un mismo volumen de agua, cuando ambos están a la misma temperatura. El peso específico de un huevo es igual a la densidad del huevo relacionada al agua. Un huevo tiene cuatro partes básicas: la yema, la albúmina, membranas de la cascara, y la cáscara. El peso específico de todas las cuatro partes del huevo son diferentes (la cáscara, 2.325; la yema, 1.032; la albúmina, 1.038; las membranas de cáscara, 1.075). Como el peso específico de la cáscara es dos veces más alto que el de las otras partes del huevo, el porcentaje de huevo que es cáscara tiene una influencia importante sobre el peso específico del huevo entero.

Según aumenta la cantidad de cáscara el peso específico del huevo aumenta, y los cambios correspondientes en las proporciones de yema, albúmina, y la membrana de la cascara son de poca consecuencia. Por lo tanto. El peso específico de los huevos, es un buen indicador del porcentaje de cáscara y esta es la razón por la cual se usa el peso específico para determinar la calidad de la cascara.

Para realizar la determinación del peso específico, se sumerge el huevo en una serie de soluciones salinas cada vez más concentradas hasta que el huevo flote sobre la superficie de una de las soluciones. El peso específico está altamente relacionado con la incidencia de huevos rotos o agrietados en las granjas. La incidencia de roturas estará más alta de lo normal cuando el peso específico promedio de los huevos de un lote reproductor sea menor de 1.080. Es más adecuado usar dos o tres soluciones de sal en la determinación del peso específico de los huevos de un lote.



**Figura 62.** Equipo requerido para realizar la determinación del peso específico.

## Albumen

### Determinación del pH

Los procesos de envejecimiento que se producen en el huevo y se inician tras la puesta dan lugar a la liberación de anhídrido carbónico desde el interior del huevo, tendiendo a equilibrar su concentración con la tensión parcial de este gas en el aire circundante, con el consiguiente aumento del pH. Así el huevo tiene un valor de pH de 7.6 si está recién puesto y se eleva a 8.5 después de 24 horas a 20°C, alcanzando valores de 9 a 9.4 tras unos días de almacenamiento. Tales modificaciones se aceleran notablemente al aumentar la temperatura ambiente. La alcalinización del huevo supone un envejecimiento del mismo, aunque este fenómeno también puede ser debido a la conservación del huevo en agua de cal.



**Figura 63.** Determinación del pH en el albumen.

Para la medida de la calidad del albumen se propuso utilizar el pH, variación de éste está relacionada con la calidad del albumen después de un periodo de almacenamiento [Hunton 1985, Sauveur 1988] pero las diferencias en el pH no están asociadas a la calidad del huevo fresco [Skala y Swanson 1962]. La evolución de la materia seca [Cunningham 1960, Fletcher 1983] o la composición química [Sauveur 1988] son inconsistentes por la baja correlación entre cualquiera de los elementos medibles y otros parámetros relacionados con la calidad.

### **Unidades Haugh**

De todas las técnicas de medida de la calidad interior del huevo abierto, las Unidades Haugh (U.H.) representan una unidad de medida objetiva y precisa, y su valor para cada huevo está en función del peso total del huevo y de la altura de la clara densa. Este método fue propuesto en 1937 por Raymond Haugh y es utilizado en los Estados Unidos como método de referencia, aunque no se utiliza de modo rutinario. Se trata del logaritmo de la altura del albumen denso corregido con respecto a un peso de huevo de 2 onzas (56,7 gramos.) a temperatura superior o igual a 12°C. Las U.H. vienen dadas para cada huevo, por la siguiente expresión matemática, donde H es la altura de la clara densa en mm y P el peso del huevo en gramos:

$$UH = 100 \text{ Log } (H - 1,7 P^{2,37} + 7,57)$$

Hay que tener en cuenta al realizar la medición el tiempo, ya que las U.H. declinan linealmente con el logaritmo del tiempo transcurrido después de abrir el huevo. También se ven afectadas por la temperatura ya que la temperatura interna de los huevos en el momento de realizar la medición debe estar comprendida entre 7° y 15° C. Cada 10° C más de temperatura supone 1.15 U.H. menos.

El peso del huevo tiene muy poca influencia sobre la altura del albumen, luego se presenta como innecesaria la corrección del peso en la fórmula. Según Silversides (1993) el alto coeficiente de correlación entre la altura del albumen y las U.H. y

por otro lado el bajo coeficiente entre el peso del huevo y las U.H., sugieren que la medida de la altura como índice de calidad del albumen es tan buena como la Unidad Haugh.

Para hacer la medición se precisa un trípode con micrómetro especial para medir el albumen del huevo, una vez cascado el huevo se coloca el trípode de tal manera que las patas estén situadas en un diámetro de la yema. Se mide la altura en una zona plana del albumen denso que dista unos 7 mm de la yema, no midiendo sobre las chalazas, como se esquematiza en la figura 64. La escala varía entre 20 y 110, aunque los valores más frecuentes están entre 45 y 95.

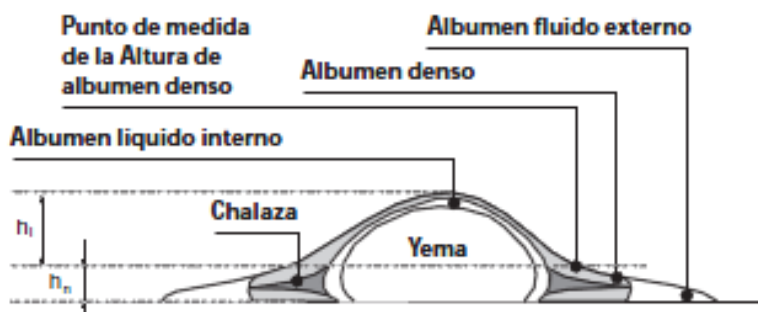


Figura 64. Parámetros en la medición de las U.H.

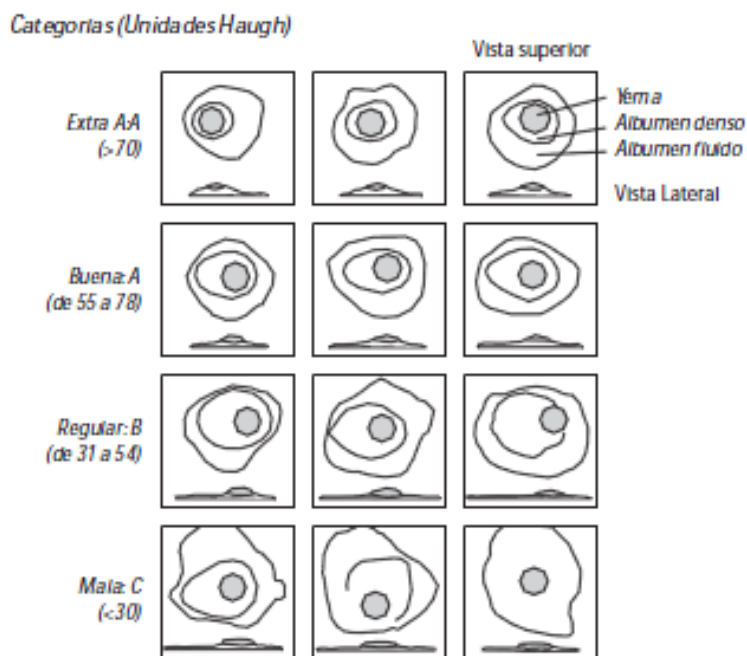


Figura 65. Esquematización de las U.H. con la frescura del huevo.

La única escala de medición de frescura que utiliza las Unidades Haugh es la del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) que es (Figura 65):

UH	>79	78-55	54-31	<30
<b>Categoría</b>	AA extra	A frescos	B baja calidad	C desechables

### **Factores que afectan el albumen de los huevos antes de la puesta**

#### **Edad de la gallina**

Las U.H. del albumen disminuyen con la edad de las gallinas [Jeffrey 1941], aunque esta disminución es independiente de la época del año [Cunningham 1960] (Figura 66).

#### **Estirpe**

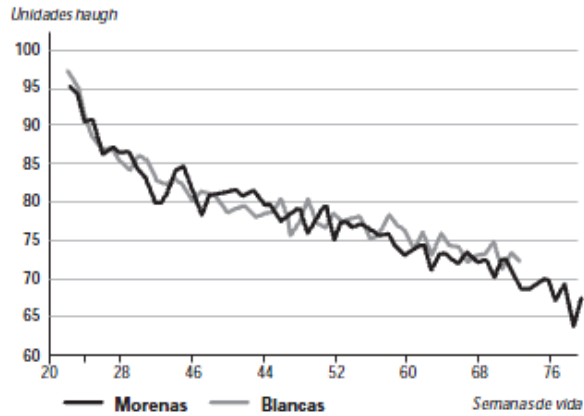
Está demostrada la diferencia entre distintas estirpes, aunque es en general pequeña. Esta diferencia es por diferente presión de selección genética

#### **Muda forzada**

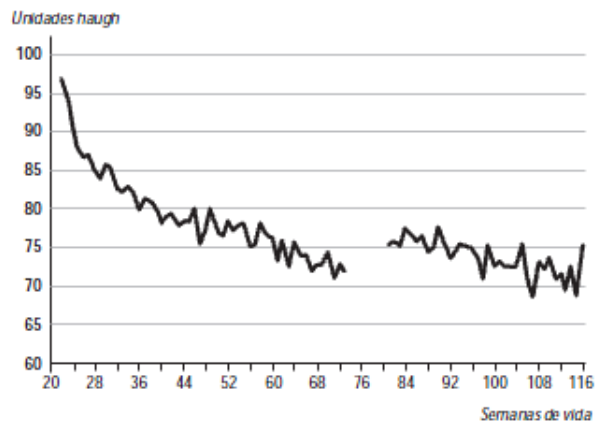
Es conocido por todos la mejora de la calidad del albumen después de realizar una muda forzada. Esta es debido a la reabsorción y posterior regeneración del mágnum con lo que este tejido nuevo se comporta más eficientemente que el viejo a la hora de fabricar el albumen (Figura 67).

#### **Programa de luz**

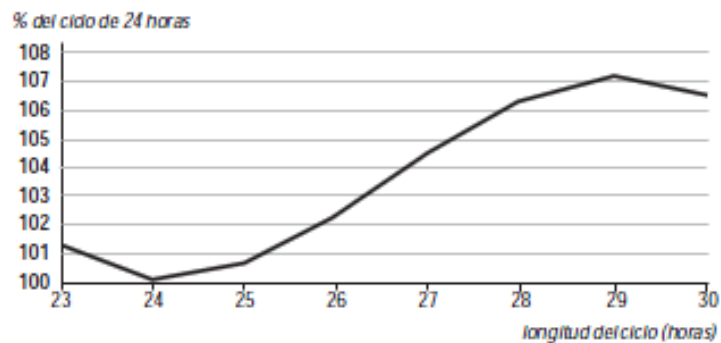
M.M. Shanawany (WPSA. Symposium on Egg Quality 1989) encontró una relación positiva entre el aumento del peso del huevo y el ciclo *ahemeral* de luz, por otro lado obtuvo un decrecimiento de la altura del albumen al aumentar la longitud de los ciclos, de donde deducimos la disminución de las U.H. al aumentar los ciclos. Este efecto de disminución por efecto de ciclos *ahemerales* también ha sido constatado por Sauveur y Picard (1987) (Figura 68, 69 y 70).



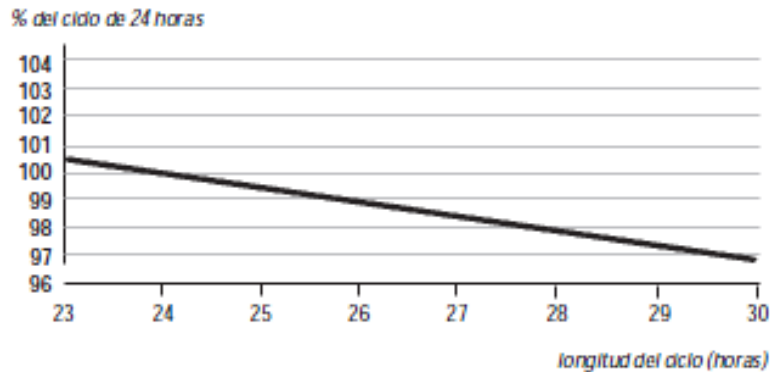
**Figura 66.** Edad de la gallina, U.H. de aves nacidas en 1992. Departamento de Producción Hibramer, S.A.



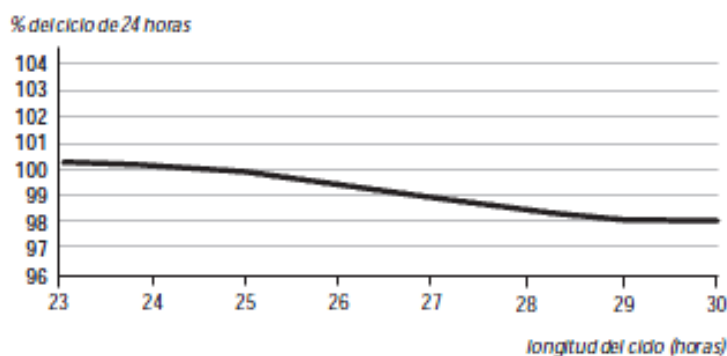
**Figura 67.** Muda forzada. U.H. de aves nacidas en 1992. Departamento de Producción Hibramer, S.A.



**Figura 68.** Variación del peso del albumen según Shanaway, 1989.



**Figura 69.** Variación de la altura del albumen según Shanaway, 1989.



**Figura 70.** Variación de las U.H. según Shanaway, 1989.

### Instalaciones

Belyavin (1988) evaluando la diferencia de calidad entre huevos producidos en baterías, aviario, suelo o parque al aire libre, observó mejor calidad en los huevos de batería, aunque cabe pensar que este efecto sea realmente debido a frecuencia de recogida, a problemas sanitarios o de amoníaco, más que al sistema en si.

### Enfermedades

Para una buena ampliación de este apartado, debe consultarse la revisión realizada por Spackman (1987). A modo de resumen:

- Bronquitis Infecciosa: los virus causantes de esta enfermedad destruyen las células del mágnium, afectando por consiguiente muy fuertemente a la calidad del albumen y de la cáscara. El problema es en general bastante permanente por lo que se aconseja un correcto programa de vacunación para preservarnos de esta enfermedad.
- Enfermedad de Newcastle

## Alimentación

### Nivel proteína

En aves Leghorn alimentadas con raciones decrecientes en proteína (15,6%, 14,8%, y 14,0%) se observa un aumento en las Unidades Haugh, según Cava y Hamilton (1982). Al Bustany y Elwinger (1987) observan una mejora muy significativa de las U.H. al pasar los niveles de Lisina de 0.46 a 0.87% en la dieta.

### Fuente proteica

Determinadas fuentes de proteína para alimentación de gallinas ponedoras presentan efectos sobre las U.H. del huevo:

Las harinas de habas, según Mateos y Puchal, (1981):

	U.H
<b>Control</b>	84.8
<b>55% de harina de habas</b>	94.3

Según Bougon (1974) la incorporación de grano de habas produce un incremento en las U.H aunque supone un decremento en la masa de huevo:

	Variación U.H
<b>Control</b>	-
<b>12.5% de habas</b>	1.7%
<b>25% de habas</b>	3.9%

Mueller (1956) observa que raciones con harina de carne, avena y cebada daban huevos con U.H. más elevadas que raciones de maíz-soja. Sauveur (1979) también observa un efecto positivo de la harina de carne. Hoy este producto esta prohibida su utilización en la Unión Europea.

	U.H
<b>Control</b>	78.8
<b>5% de harina de carne</b>	82

La semilla entera de girasol presenta unos efectos negativos sobre los U.H. observados por Karanjeewa y Tham (1987-1989).

% de semilla entera de girasol	%Puesta	Peso huevo	U.H.	Consumo
<b>0</b>	75.9	59.8	73.1	112.3
<b>1</b>	73.5	60.9	70	111.7
<b>2</b>	72.6	61.6	68.5	110.8
<b>4</b>	72.3	62.2	65.9	110.2

Sauveur (1988) describe efectos negativos de la colza rica en glucosinolatos sobre las U.H.



### **Subproductos de destilería**

Usando en las dietas de ponedoras subproductos de la fermentación de granos (DDGS) a niveles del 10%, se obtienen resultados muy dispares sobre las U.H. Sauveur (1990) dice que en 2 de cada 3 casos se obtienen mejores en las U.H. del orden de 5-10 puntos. Igualmente Santomá (1994) y Benabdeljelil (1990) describen diversos ensayos con resultados varios, pero sin obtenerse consecuencias concretas.

### **Magnesio**

Monsey (1977), variando el contenido de magnesio de una dieta de 0.4 a 0.93%, obtenía una mejora en las U.H. Benabdeljelil y Jensen (1989), añadiendo a la dieta 1.1% de magnesio en forma de carbonato de magnesio, a una dieta de maíz-soja, no encontraron mejoras en la U.H. Sauveur (1971 y 1973) indica que un aumento del magnesio origina una más lenta caída de las U.H. después de la puesta. Robinson (1975) indica que suplementaciones en la dieta de 0.4 a 0.8% de magnesio favorece la estabilidad del albumen durante el almacenaje. Robinson y Monsey (1972) proponen que el  $Mg^{2+}$  pueda ser un inhibidor de la enzima responsable de la degradación de la ovomucina. El mecanismo es aún desconocido.

### **Vanadio**

Berg *et ál.*, (1963) fueron los primeros en describir los efectos negativos del vanadio sobre el albumen del huevo, cantidades del orden de 10 ppm de vanadio originan descensos de las U.H. Sell (1984) no obtiene efectos sobre la producción de huevos, peso del huevo e índice de conversión, al añadir 10 ppm de vanadio a la ración. El modo de actuación propuesto por Eyd y Moran (1984) es la inhibición de las contracciones del mágnam durante la formación del huevo. Se observa una reducción en el peso del mágnam en aves alimentadas con 30 ppm de vanadio. Las contaminaciones con vanadio se han detectado en algunas fuentes de fosfato bicálcico.

Sell (1986) observa que una ración con 5% de harina de semilla de algodón contrarrestaba ciertos efectos del vanadio. Jensen y Maurice (1980) observan que un 10% de DDGS contrarresta efectos de 20 ppm de vanadio sobre las U.H. Hafez y Kratzer (1976) observaron que el cromo producía un efecto de contrarrestación de la toxicidad del vanadio en pollitas. Jensen y Maurice (1980) observan la contrarrestación de los efectos del vanadio en las U.H., mientras que Ousterhout y Berg (1981) no observan ninguna contrarrestación. Recientes ensayos de Benabdeljelil y Jensen (1990) confirman los efectos negativos del vanadio y no resuelve la incógnita del cromo, teniendo en cuenta las dietas utilizadas (Tabla 25). Blalock y Hill (1987) especulan sobre la interacción de los niveles de hierro en

la dieta y la toxicidad del vanadio, argumentando la hipótesis de la dependencia del transporte del vanadio y del hierro.

**Tabla 40.** Efectos del vanadio y cromo en las U.H.

Vanadio (ppm)	Cromo (ppm)	Masa del huevo (gramos)	Resistencia a la rotura (Kg)	U.H.
0	0	53.07	2.67	78
10	0	51.60	2.62	72
10	10	48.38	2.70	72
10	50	49.56	2.80	70
30	0	48.19	2.61	70
30	30	49.20	2.60	69
30	150	49.20	2.58	68
100	0	37.76	2.63	66

### **Cloruro de amonio**

Hall y Helbacka (1959) estudiaron el efecto del cloruro amónico sobre las U.H., observándose unos efectos positivos, pero al mismo tiempo se observaban unos efectos negativos sobre la cáscara del huevo. Actúa sobre el pH del albumen aumentándolo, así como aumentando el contenido en calcio y magnesio del albumen [Sauveur, 1970]. Esta mejoría en las U.H. se sigue observando después de 14 días de almacenaje. [Sauveur, 1976].

### **Ácido ascórbico**

Numerosos estudios hacen referencia al beneficioso efecto del ácido ascórbico en resultados productivos y calidad del huevo durante períodos de estrés o de carencias. Benabdeljelil y Jensen (1990) indican que 100 ppm de ácido ascórbico es suficiente para contrarrestar los efectos negativos del vanadio (Tabla 26). El mecanismo por el cual el ácido ascórbico reduce la toxicidad del vanadio no está claro, aunque Berg y Lawrence (1971) deducen que el ácido ascórbico reduce la deposición de vanadio en los huesos de pollos.

**Tabla 41.** Efectos del ácido ascórbico sobre el vanadio y en las U.H.

Vanadio (ppm)	Ácido ascórbico (ppm)	Masa del huevo (gramos)	Resistencia a la rotura (Kg)	U.H.
0	0	54.56	2.89	77
0	100	55.49	2.91	79
0	1000	51.46	2.90	80
0	5000	51	2.98	79
10	0	50.02	2.68	71
10	100	51.24	2.66	75
10	1000	52.29	2.88	77
10	5000	55.04	2.85	81

## Factores que afectan el albumen de los huevos después de la puesta

### Transformaciones en el interior del huevo

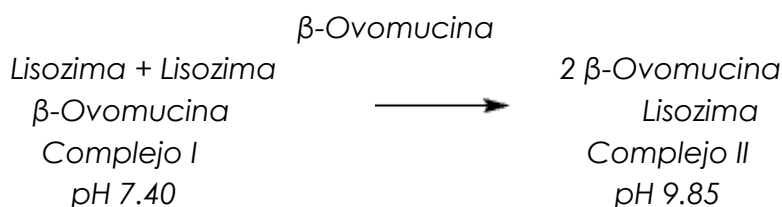
Durante el almacenaje, en los huevos se producen dos fenómenos que le hacen perder calidad: pérdida de vapor de agua y de anhídrido carbónico. La pérdida de agua origina disminución de peso y aumento de la cámara de aire. La transferencia de vapor de agua del interior al exterior del huevo depende del gradiente de presión de vapor de agua y de la superficie de transferencia, la cutícula y la porosidad. La pérdida de anhídrido carbónico que hay disuelto en el albumen, origina una alcalinización de éste. Próximo a la puesta el pH del albumen es alrededor de 7.4-7.9 llegando con el paso del tiempo hasta valores de 9.2-9.7. Así pues, el pH del albumen depende del equilibrio entre el CO<sub>2</sub>, el ion bicarbonato y el ion carbonato del albumen.

La variación del pH está asociada a una fluidificación de la clara del huevo. El mecanismo de esta fluidificación no está perfectamente dilucidado, existen tres teorías:

- Despolarización de la  $\beta$ -ovomucina por efecto del ion hidroxilo (OH<sup>-</sup>) a medida que aumenta el pH.
- Hidrólisis enzimática.
- Modificación de las interacciones electrostáticas entre la  $\beta$ -ovomucina y la lisozima.

La ovomucina es una glicoproteína de carácter ácido formada por dos unidades,  $\gamma$  y  $\beta$ . La  $\beta$ -ovomucina es especialmente rica en glúcidos y en ácidos siálicos capaces de establecer relaciones electrostáticas con otras moléculas cargadas positivamente. La ovomucina es capaz de formar un gel y se encuentra 10 veces más en el albumen denso que en el fluido. La lisozima por el contrario es una proteína con carácter básico.

Kato y Nakamura (1970) observaron que el contenido en carbohidratos del complejo ovomucina disminuía con el tiempo de almacenaje. Powrie (1977) indica que la actividad de la lisozima baja un 20-25% durante el almacenaje de huevos a 2°C durante 45 días. Estos datos ratifican la teoría expuesta por Cotterill (1955), Brooks (1961) y Kato (1970), en la que:



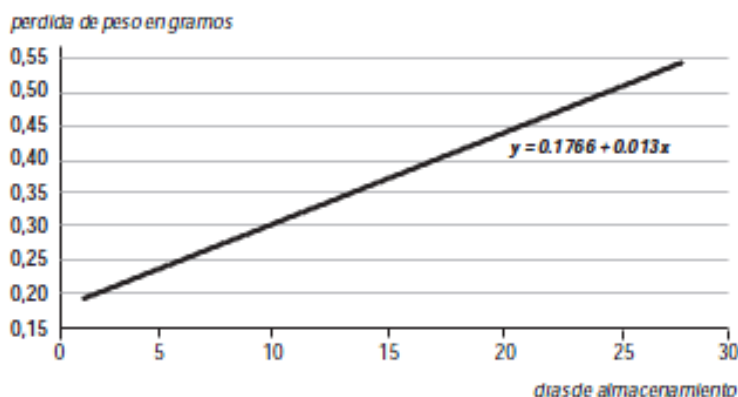
El gel lisozima-ovomucina del complejo I, al aumentar el pH en presencia de lisozima, reaccionan formando un nuevo complejo II que carece de capacidad formadora de gel.

### **Influencia del binomio temperatura-humedad ambiente**

Como ya hemos indicado la pérdida vapor de agua del huevo depende del gradiente de presión de vapor entre el interior y el exterior del huevo, por lo tanto, la pérdida de vapor de agua depende de la humedad y temperatura exterior. La humedad no deberíamos subirla de 80%, pues podríamos tener problemas de proliferación de hongos y otros microorganismos. En cuanto a temperatura y para no producir congelación en el huevo debemos ir a temperaturas del orden de 1°C.

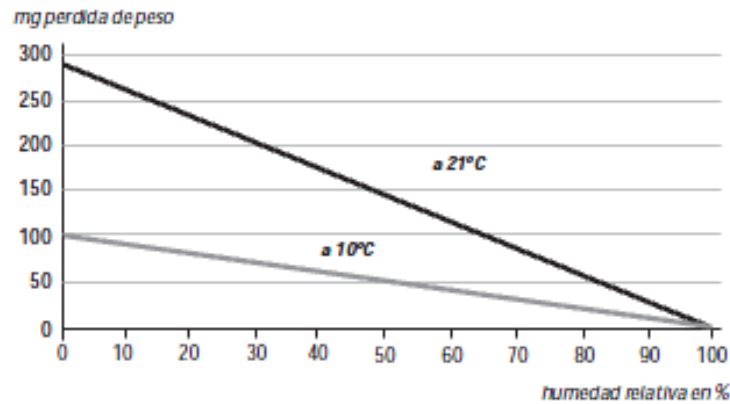
En estas condiciones, según J. Protais (1989) a 1°C y 90% de humedad relativa (RH), la pérdida de peso (Y) es una función lineal del tiempo (X) de almacenamiento, según la ecuación:

$$Y = 0,013 X + 0,1766$$

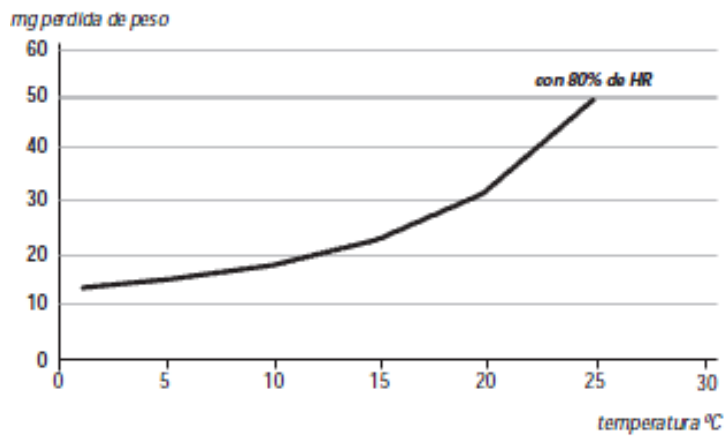


**Figura 71.** Pérdida de peso en almacenaje. Temperatura 1°C y 90% de humedad relativa.

Para otras humedades y temperaturas se obtienen los siguientes gráficos:



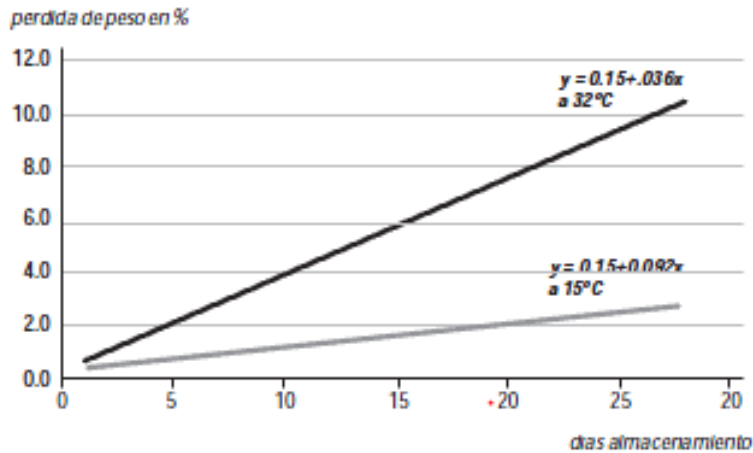
**Figura 72.** Pérdida de peso en función del medio ambiente (%HR). Según Romanoff (1949) y Saveur (1988).



**Figura 73.** Pérdida de peso en función del medio ambiente (temperatura °C). Según Romanoff (1949) y Saveur (1988).

Según Bornstein-Lipstein (1958), la pérdida de peso (Y) en relación a los días (X) de almacenamiento, es:

- A 32°C  $Y = 0,150 + 0,368 x$
- A 15°C  $Y = 0,150 + 0,0923 x$

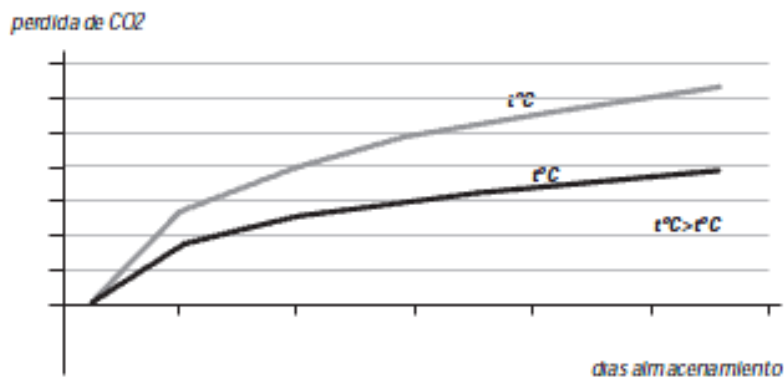


**Figura 74.** Pérdida de peso en función de la temperatura. Según Bornstein –Lipstein (1958).

Según Sauveur (1988) la pérdida de CO<sub>2</sub> a la atmósfera por parte del huevo se realiza según la ecuación

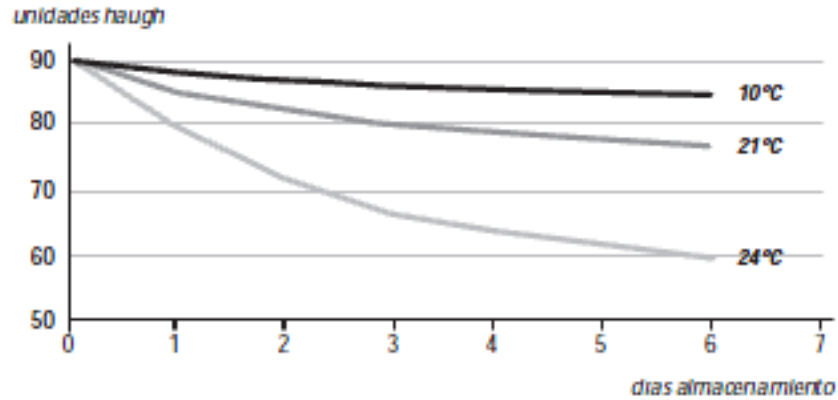
$$CO_2 = atb$$

Siendo  $t$  el tiempo,  $a$  una constante y  $b$  un parámetro que depende de la temperatura, luego al aumentar la temperatura aumentará la pérdida de anhídrido carbónico.

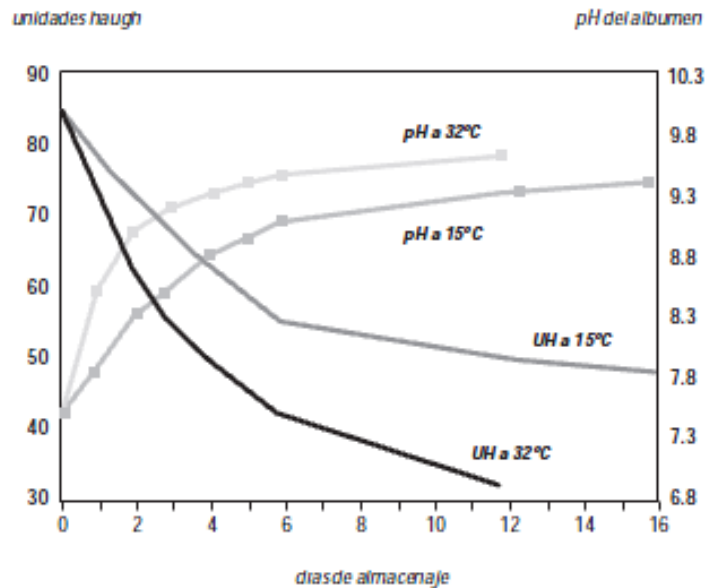


**Figura 75.** Pérdidas de CO<sub>2</sub> con el tiempo. Según Saveur (1988).

Como la pérdida de CO<sub>2</sub> está íntimamente relacionada con las U.H., vemos que las pérdidas de U.H. de los huevos almacenados disminuyen al disminuir la temperatura (Figuras 76 y 77).



**Figura 76.** Influencia de la temperatura en almacenaje. Según Coutts y Wilson (1986).



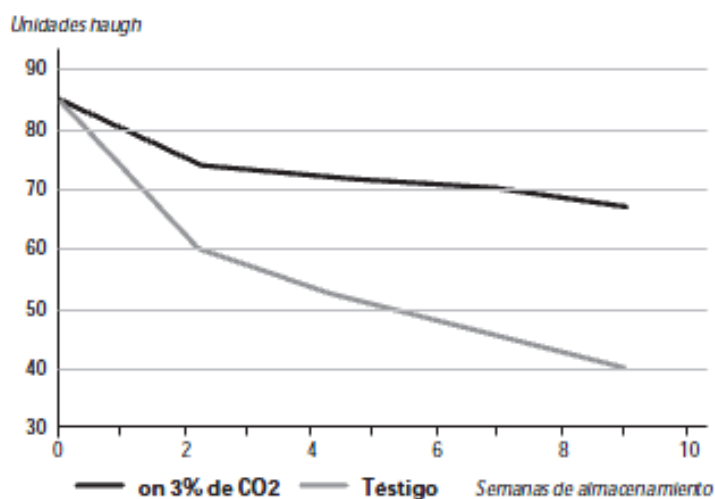
**Figura 77.** U.H. en función del pH del albumen según Bornstein y Lipstein (1962).

### Influencia de una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>

El huevo pierde CO<sub>2</sub> en función de un gradiente de tensión de vapor, luego si aumentamos la concentración en CO<sub>2</sub> de la atmósfera que rodea al huevo, aumentamos la tensión de vapor del CO<sub>2</sub> y por lo tanto reduciremos la difusión de este gas de dentro hacia fuera del huevo. Según W.D. Powrie (1977), la modificación de la atmósfera en CO<sub>2</sub> afecta al equilibrio iónico bicarbonato-carbonato y CO<sub>2</sub>, con lo que se modifica el pH (Tabla 42) y por consiguiente las U.H. (Figura 78).

**Tabla 42.** Reducción del pH debido a la modificación de la atmosfera en CO<sub>2</sub>.

% CO <sub>2</sub>	pH del albumen	Bicarbonato (gramos/litro iones)	Carbonato (gramos/litro iones)
<b>0.03 (aire)</b>	9.61	0.0205	0.0104
<b>1</b>	8.43	0.0448	0.0015
<b>2</b>	7.99	0.0490	0.0006
<b>5</b>	7.78	0.0505	0.0004
<b>10</b>	7.50	0.0528	0.0002



**Figura 78.** Almacenaje en atmósfera rica en CO<sub>2</sub> a temperatura de 20°C, según Sauveur (1967).

### Influencia del aceitado

El aceitado de huevos consiste en hacer pasar los huevos por una atmósfera saturada de un aceite de una densidad muy baja, se impregna la superficie del huevo taponando los poros. Según Stadelman (1977), las pérdidas de peso con o sin aceitado para huevos tratados inmediatamente después de la puesta:

**Tabla 43.** Pérdidas de peso en huevos aceitados y sin aceite.

Edad del huevo (días)	Pérdidas de peso en gramos			
	10°C y alta humedad relativa		24°C y baja humedad relativa	
	Aceitado	No aceitado	Aceitado	No aceitado
1	0.107	0.172	0.197	0.328
3	0.212	0.374	0.411	0.795
5	0.309	0.575	0.604	1.256

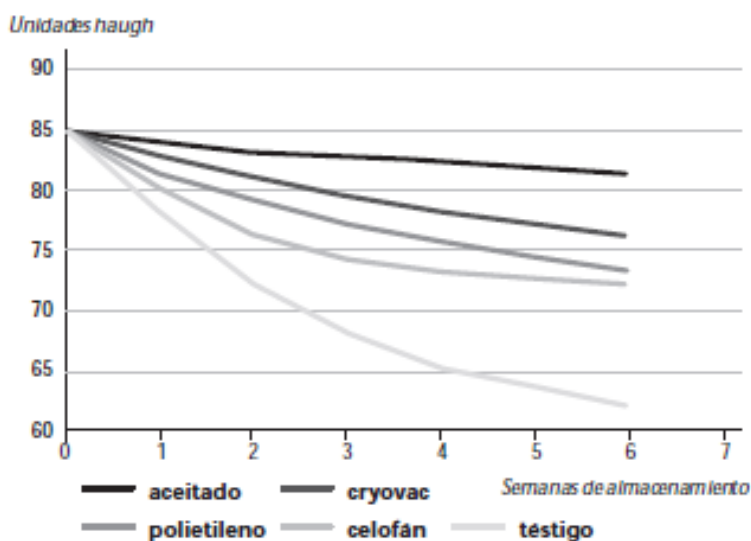


**Tabla 44.** Influencia del aceitado en las U.H.

		U.H. de los huevos				
		Días de almacenamiento				
Tratamiento		1	3	9	27	81
<b>Aceitado</b>		91	92	91	91	81
<b>No aceitado</b>		92	90	89	83	78
<b>Aceitado</b>		91	91	87	82	66
<b>No aceitado</b>		90	84	72	58	43

### Influencia de un empaquetado hermético

Siguiendo la misma línea si empaquetamos los huevos en envases impermeables al CO<sub>2</sub> y al vapor de agua, se acabará creando en el interior una atmósfera con elevadas presiones de vapor de agua y de CO<sub>2</sub> y por lo tanto se podrá controlar las pérdidas como ya hemos visto. Para este empaquetado hermético se debe usar un film de plástico que sean lo más impermeable posible al CO<sub>2</sub>, tal es el caso del Cryovac, polietileno y/o celofanes.



**Figura 79.** Almacenamiento con envases herméticos. Temperatura 10°C, según Davis (1961).

El problema que se nos presenta es que tendremos complicaciones con el vapor de agua y la condensación sobre la superficie del envase. La única posibilidad de eliminar este inconveniente es tener algo en el interior que absorba esta humedad generada.

### Influencia de la posición en el almacenaje

Se trata de un ensayo sobre posición de los huevos en el cartón. Se almacenaron los huevos durante 3 semanas a 10°C, obteniéndose [Cardett, 1979]:

**Tabla 45.** Influencia de la posición en el almacenaje.

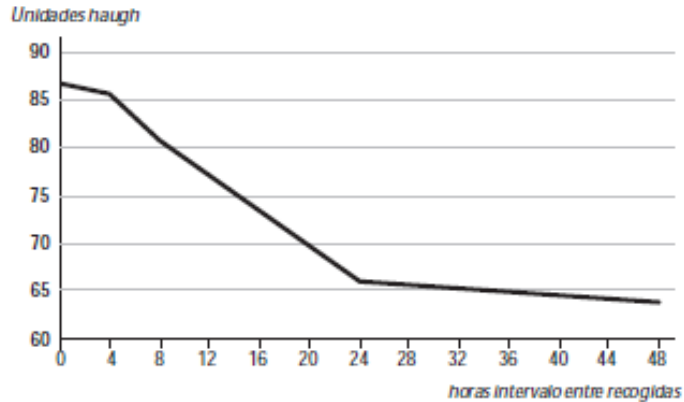
Posición	U.H.
Horizontal	70.5
Vertical	73.8
Polo grueso arriba	73.4
Polo grueso abajo	73.4

### Influencia del intervalo de recolección

Los datos que se presentan nos muestran la interacción entre intervalo entre recogidas (número de recogidas al día), días de almacenaje y temperatura, según datos aportados por MacIndoe (1981):

**Tabla 46.** Influencia del intervalo de recolección en las U.H.

Intervalo entre recogidas (horas)	U.H.	
	15°C	30°C
3 días de almacenamiento		
4	73.9	58.7
8	73.6	56.5
29	61.3	52.2
48	59.3	54.7
14 días de almacenamiento		
4	60.4	24.9
8	58.5	24.9
29	54.1	25.7
48	55	25.6
21 días de almacenamiento		
4	55.7	24.1
8	53.9	20.6
29	47.3	25.9
48	52.3	26.4



**Figura 80.** Intervalo entre dos recogidas de huevos. Temperatura 35°C, según MacIndos (1981).

## Yema

La calidad de la yema se entiende desde dos posiciones: el color y las características físicas de ésta.

### Color de la yema

Es un atributo de calidad. El color de la yema es debido en un 70% a las xantofilas y en un 2% a los carotenos, el resto corresponde a otros pigmentos. Los carotenos y vitamina A que aparecen en algunos piensos en gran cantidad dan una yema pálida, mientras que las xantofilas dan yemas muy subidas de color. Las yemas pálidas por llevar gran cantidad de carotenos y vitamina A son de gran importancia bromatológica pues son más nutritivas que las de color subido. Las yemas pálidas suelen aparecer en los huevos procedentes de la avicultura industrial. El color de la yema se compara con un patrón de color denominado el abanico de

Roche. La comparación de la escala de color con la yema debe hacerse a una luz constante, siempre la misma, y no modificando tampoco el ángulo de incidencia de la iluminación, pues modifica el color que percibimos. El muestreo debe ser suficientemente amplio para cubrir la variabilidad propia del método. En la actualidad existen aparatos que por espectrofotometría nos dan igualmente una escala de color.

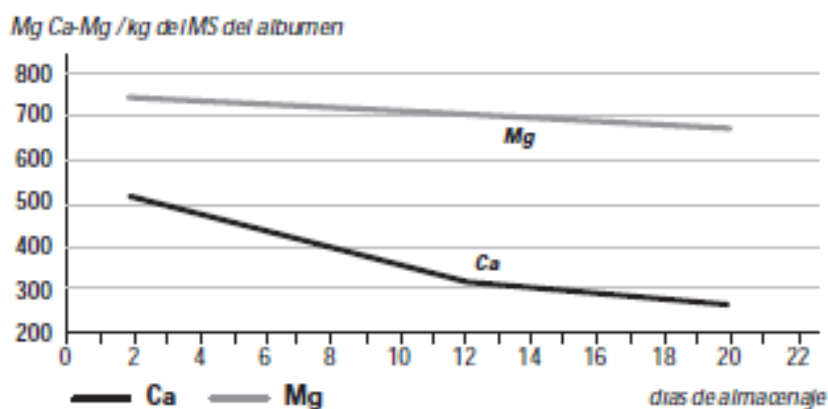
### Índice de la yema

El índice de yema es un parámetro que informa sobre la forma ideal de la yema y su relación con la frescura y calidad del huevo. Cuanto mayor sea el valor de este índice, mayor es la frescura del huevo, ya que la yema se presenta más compacta. El índice de la yema se calcula o se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de yema} = \text{altura} / \text{diámetro} = 0.40 \text{ a } 0.42$$

### Influencia del almacenamiento en la calidad de la yema

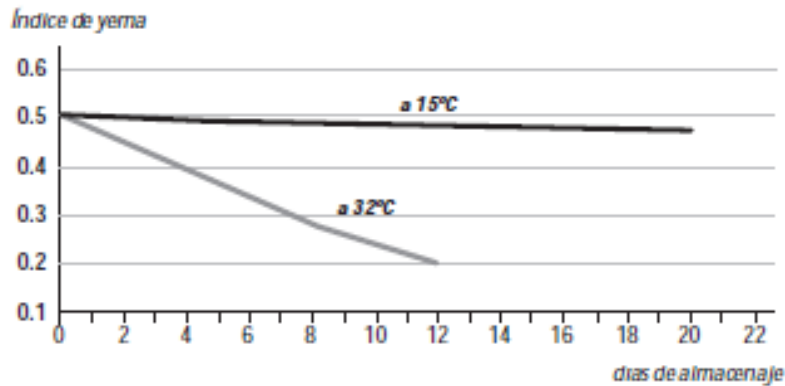
Después de la puesta existe un fuerte gradiente de presión osmótica del albumen hacia la yema, con lo que se establece un constante paso de agua en esa dirección. Cuando aumenta el pH del albumen durante el almacenaje de los huevos, las propiedades físicas de la capa externa de la membrana vitelina se modifican, aumentando la permeabilidad. Con esta alteración de la permeabilidad aumenta el intercambio habiéndose comprobado un paso de calcio y magnesio a la yema y un paso de hierro y aminoácidos libres hacia el albumen. Con la pérdida de magnesio por parte del albumen, se agudiza la transferencia de ovomucina gel a ovomucina soluble, con lo que el pH aumenta y provoca a su vez mayor permeabilidad de la membrana vitelina.



**Figura 81.** Evolución de cationes en el albumen, según Sauveur (1971).

Estos fenómenos de difusión a través de la membrana vitelina dan lugar a:

- Un aplastamiento de la yema.
- Una mayor fragilidad de la membrana vitelina.
- Aparición de manchas en la superficie de la yema, llamado "moteado".
- Disminución de la viscosidad de la yema de una forma muy importante.
- Todos estos fenómenos pueden ser paliados reduciendo el aumento progresivo del pH del albumen.



**Figura 82** . Índice de yema en función de la temperatura, según Bronstein [Rehovot, 1958].

Después de la puesta, el índice de yema es algo más alto para aves jóvenes que para aves viejas y no tiene ninguna relación con el peso del huevo.

## Otros factores de calidad

### Manchas en el interior del huevo

Nos referimos a las denominadas "manchas de sangre" y "manchas de carne", que ninguna de las dos tienen nada que ver con desarrollos embrionarios.

#### Origen de las "manchas de sangre"

Estas manchas son más frecuentes en la superficie de la yema y su origen son pequeñas hemorragias acaecidas en la ovulación. Su tamaño es muy variado. La alcalinización del albumen, puede afectar a estas manchas cambiándoles la tonalidad hacia colores más pardos.

#### Origen de las "manchas de carne"

Estas manchas suelen encontrarse fundamentalmente asociadas a las chalazas o en el albumen denso, su tamaño varía entre 0.5 y 3 mm de diámetro aproximadamente. Su procedencia, o bien es por mancha de sangre oxidada, o por descamación de tejido glandular de los ovarios o del epitelio del oviducto, siendo este último origen el más frecuente. En 1998 Solomon indica la posibilidad de que sean partículas de calcio que suben por el oviducto.

#### Factores que afectan a estas manchas

Todos los autores que han estudiado el tema, coinciden en la importancia del origen genético. Las gallinas White Leghorn, prácticamente no poseen manchas, mientras que las de cáscara marrón poseen manchas entre el 5 y 40% de los huevos, dependiendo de estirpes. La frecuencia aumenta con la edad y con el estrés, bien de tipo ambiental (cambios bruscos de temperatura o de

iluminación), de tipo alimenticio (aumentos drásticos de niveles de proteínas) o de tipo toxicológico (insecticidas u otros productos químicos).

**Tabla 47.** Porcentaje de manchas de sangre o de carne a las 70 semanas de vida.

Estirpe de color	Manchas en clara		Manchas en yema	
	Pequeñas	Grandes	Pequeñas	Grandes
Hy-Line	13.3	11.7	3.3	1.7
Isa	16.7	10	1.7	8.3
Hisex	23.3	15	1.7	8.3

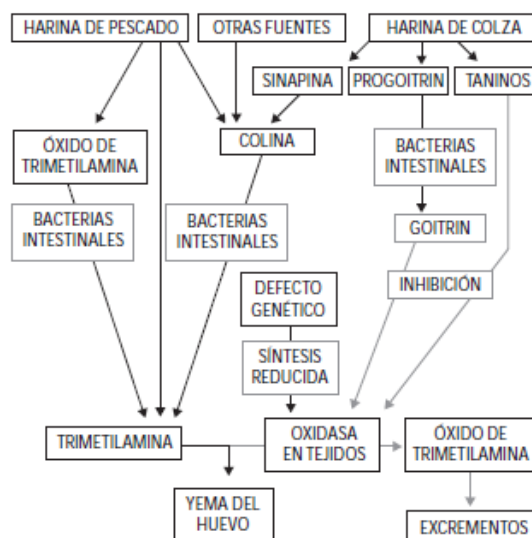
## Características organolépticas

### Insecticidas

Utilizados contra parásitos de las aves, sobre todo los órganoclorados, tipo HCH o lindano.

### Alimentación

En este sentido constituyen un cierto problema la utilización o dosis importantes de harina de pescado y/o ciertas harinas de colza. Este problema es causado por la trimetilamina (TMA), sustancia que da sabor a pescado. Esta TMA, una vez oxidada en el hígado, se transforma en óxido de TMA que no da olor. Sin embargo, gran parte de las aves de huevo de color y muy pocas blancas, no poseen la enzima que permite esta oxidación. El esquema metabólico indicado por Buxade (1987), esquematiza lo anteriormente dicho (Figura 83).



**Figura 83.** Esquema metabólico de algunas fuentes de alimentación como factores de calidad organolépticos.

Luego podemos decir que incorporaciones de harina de pescado superior a un 5% y de aceites de pescado superiores a un 3%, pueden causar problemas de sabor, así como harinas de colza en dosis del orden del 10%.

# DESARROLLO DE UN PLAN HACCP

El Análisis de Riesgos, Identificación y Control de Puntos Críticos (HACCP por sus siglas en inglés) es un método de control de calidad que hace énfasis en:

- La identificación de aquellas operaciones en el proceso del alimento en las cuales exista la posibilidad de que surjan desviaciones que puedan afectar negativamente la seguridad en la producción de alimentos, y
- El desarrollo de acciones específicas que prevengan las posibles desviaciones antes de que sucedan.

El Análisis de Riesgos, Identificación y Control de Puntos Críticos es un método sistemático, racional y continuo de previsión y organización, con miras a lograr la seguridad de los alimentos, mejorar su calidad y disminuir las pérdidas ocasionadas por su alteración.

Este método puede ser aplicable a todas las operaciones del proceso de un alimento, desde la producción de la materia prima, la elaboración del alimento, su distribución y la manipulación por el usuario final.

Un peligro se define como aquella característica que puede hacer que un alimento, en este caso los huevos u ovoproductos no sean seguros para su consumo, al causar un daño, lesión o enfermedad al consumidor. Según el origen de los peligros, éstos se clasifican en microbiológicos, químicos y físicos.

- Peligros microbiológicos: aquellos microorganismos que pueden existir y desarrollarse en los productos alimentarios.
- Peligros químicos: por la presencia de residuos de medicamentos, migración de sustancias de los envases, tintas, disolventes y residuos de los productos de limpieza y desinfección, etc.
- Peligros físicos: son cuerpos extraños al alimento que pueden causar algún daño al consumidor, como trozos de plástico, metal, etc.

Un Punto Crítico de Control (PCC) es una fase, etapa o proceso donde se puede aplicar una medida de control y así prevenir, eliminar o reducir un peligro hasta un nivel aceptable. Para su identificación se usan los árboles de decisión aplicados a las diferentes etapas del proceso.

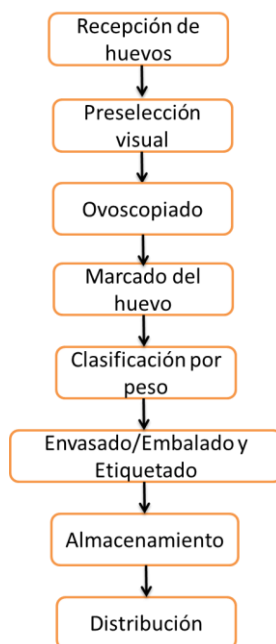
Un Punto de Control (PC) es la etapa en la que se aplicarán las medidas preventivas para la adecuada consecución del control crítico posterior.



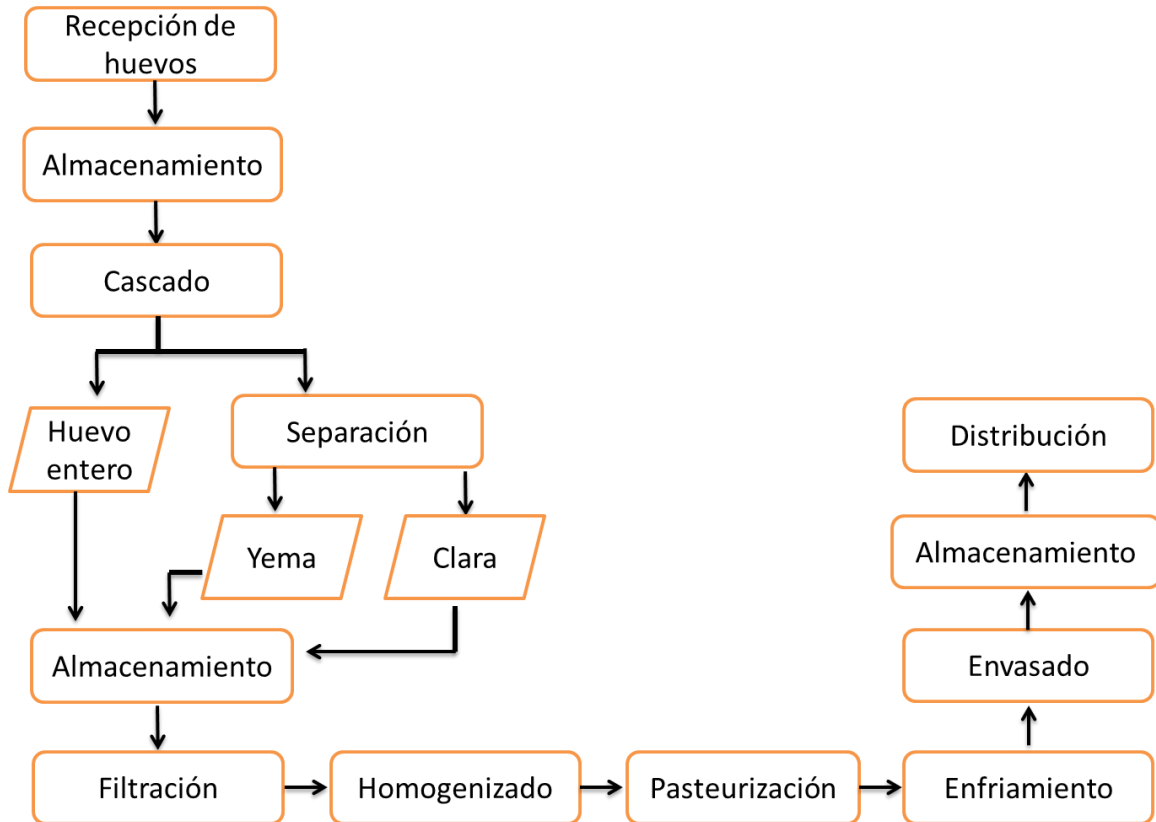
En esta última parte, se analizarán todas las fases de un proceso de forma esquemática en diagramas de flujo. Serán lo más completos posible, sin olvidar fases que pudieran resultar de interés. Una vez tengamos el diagrama de flujo, se procederá a estudiar etapa por etapa los posibles peligros existentes, y mediante los árboles de decisión, se identificarán los PCC existentes, además se realizaran las tablas de gestión (documentos estructurados en los que se analiza de forma sistemática cada una de las fases del diagrama de flujo en las que se han identificado peligros y se considera necesario el control de la misma).

## Diagramas de Flujo

Los diagramas de flujo que se desarrollan en las figuras 84 y 85, son considerados genéricos a los procesos de clasificación de huevos y a industrias de fabricación de huevo, clara y yema líquida pasteurizadas. En todos los casos deberán considerarse las especificidades de cada industria en el desarrollo de los diagramas de flujo en el estudio y diseño del plan HACCP.



**Figura 84.** Diagrama de flujo de un centro de clasificación y embalaje de huevos. Fuente: Cabellos *et ál.*, 2006.

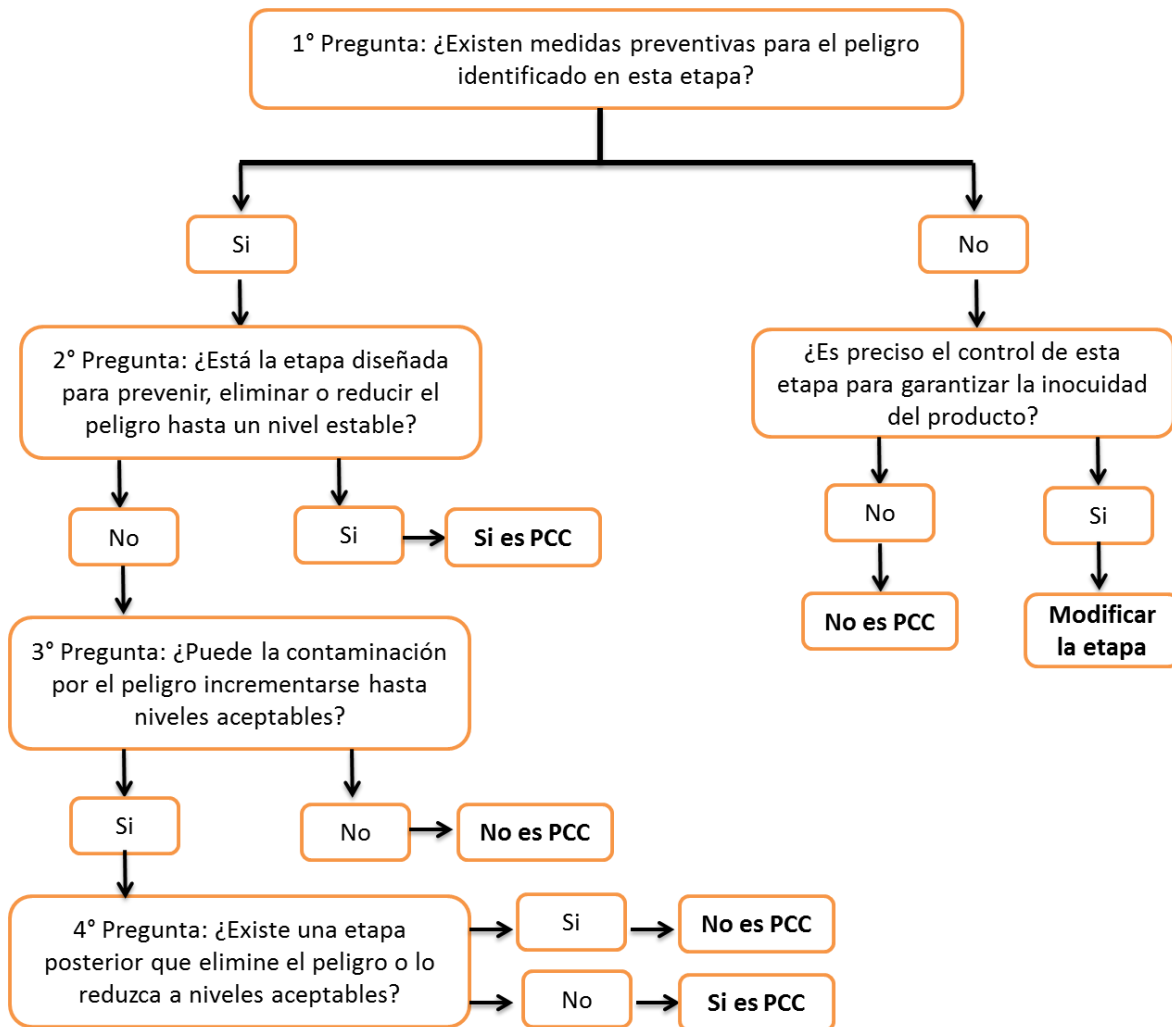


**Figura 85.** Diagrama de flujo de la fabricación de ovoproductos líquidos pasteurizados. Fuente: Cabellos *et ál.*, 2006.

### Identificación de peligros y PCC

Para identificar si un determinado proceso o etapa es un Punto de Control Crítico (PCC), emplearemos el siguiente árbol de decisiones en cada fase del diagrama de flujo para cada uno de los peligros identificados, respondiendo de forma secuencial a las preguntas que se refieren a los peligros (físicos, químicos y biológicos) y medidas preventivas de cada una de las etapas del diagrama de flujo.

De acuerdo a las respuestas que se obtengan en el siguiente árbol, se identificarán los PCC de cada una de las etapas:



La secuencia de respuestas para cada uno de los diagramas antes descritos que nos dirán si una etapa es PCC son:

1° Pregunta	2° Pregunta	3° Pregunta	4° Pregunta	PCC
Si	Si	-	-	Si
Si	No	Si	No	Si

Mediante la aplicación del árbol de decisiones a cada uno de los peligros identificados en cada una de las etapas de los diagramas de flujo de los centros de clasificación de huevos e industria de ovoproductos descritos, se obtendrían los PCC descritos en las tablas 48 y 49, siempre de forma general, ya que el estudio de Peligros y Puntos de Control Crítico han de ser específicos para cada centro de clasificación de huevos a estudiar e industria de ovoproductos en particular.

**Tabla 48.** Peligros y PCC identificados en el proceso de clasificación y embalaje de huevos.

Etapa	Peligro	P1	P2	P3	P4	PPC
<b>Recepción de huevos</b>	Microbiológicos: presencia de microorganismos en el interior del huevo y en la superficie.	Considerados en requisitos previos (homologación de proveedores)*				
	Químicos: residuos veterinarios	Considerados en requisitos previos (homologación de proveedores)*				
<b>Preselección visual</b>	Microbiológicos: presencia de huevos rotos, sucios o fisurados.	Si	No	Si	Si	No
<b>Ovoscopiado</b>	Microbiológicos: presencia de huevos sucios, rotos o fisurados.	Si	Si	-	-	Si
<b>Marcado del huevo</b>	Químicos: contaminantes de la tinta al huevo	Considerados en requisitos previos (homologación de proveedores)*				
	Químicos: residuos de productos de limpieza y desinfección.	Considerada en requisitos previos (limpieza y desinfección)**				
<b>Clasificación por peso</b>	Microbiológicos: contaminación superficial del huevo por incorrecta limpieza y desinfección de equipos y superficies.	Considerada en requisitos previos (limpieza y desinfección)**				
	Químicos: migración de sustancias de los envases al huevo.	Considerada en requisitos previos (limpieza y desinfección)** (homologación de proveedores)*				
<b>Envasado y etiquetado</b>	Microbiológicos: desarrollo de patógenos en superficie por inadecuada limpieza de la maquinaria	Considerada en requisitos previos (limpieza y desinfección)** (homologación de proveedores)*				
	Microbiológicos: desarrollo de microorganismos patógenos por inadecuadas condiciones de almacenamiento.	Si	Si	-	-	Si
<b>Almacén</b>	Microbiológicos: desarrollo de microorganismos patógenos por inadecuadas condiciones de almacenamiento.	Si	Si	-	-	Si
<b>Distribución y venta</b>	Microbiológicos: desarrollo de patógenos por inadecuadas condiciones de transporte.	Si	Si	-	-	Si

**Tabla 49.** Peligros y PCC identificados en el proceso de fabricación de huevo, clara o yema líquida pasteurizada.

Etapa	Peligro	P1	P2	P3	P4	PPC
<b>Recepción de huevos</b>	Microbiológicos: presencia de microorganismos en el interior del huevo y en la superficie.	Considerados en requisitos previos (homologación de proveedores)*				
	Químicos: residuos veterinarios					
<b>Cascado</b>	Microbiológicos: debida a contaminación externa	Si	No	Si	Si	No
<b>Separación</b>	Microbiológicos: contaminación por ambiente, equipos y superficies	Considerada en requisitos previos (limpieza y desinfección)*				
<b>Almacenamiento</b>	Microbiológicos: desarrollo microbiano por inadecuadas condiciones de almacenamiento	Si	No	Si	Si	No
<b>Filtración</b>	Físicos: presencia de restos de cáscaras, etc.	Si	Si	-	-	Si
<b>Pasteurización</b>	Microbiológicos: supervivencia de microorganismos patógenos hasta nivel inaceptable.	Si	Si	-	-	Si
<b>Enfriado</b>	Microbiológicos: desarrollo de patógenos por no enfriar adecuadamente los productos.	Si	Si	-	-	Si
<b>Envasado</b>	Microbiológicos: desarrollo patógenos por inadecuada condiciones envasado.	Si	No	Si	No	Si
	Químicos: migración compuestos del envase al alimento	Considerada en requisitos previos (homologación de proveedores)**				

<b>Almacenamiento</b>	Microbiológicos: desarrollo por inadecuadas condiciones de almacenamiento	Si	Si	-	-	No
<b>Distribución y venta</b>	Microbiológicos: desarrollo de patógenos por inadecuadas condiciones de transporte.	Si	Si	-	-	Si

(\*) Los peligros químicos y microbiológicos identificados en la etapa de recepción de huevos se monitorizan en el requisito previo de homologación de proveedores incluso aunque la producción de huevos proceda de granjas anexas al propio centro de clasificación. Las medidas de control para asegurar la ausencia de contaminantes químicos de contaminación microbiológica de huevos a la entrada del centro de clasificación se considera crítica, por lo que el plan de homologación deberá garantizar la seguridad del producto en esta etapa. Igualmente el control de la aptitud sanitaria de las tintas empleadas en el estampado de los huevos así como los materiales de embalado son evaluados en el plan de homologación de proveedores de forma que no aporten ninguna ulterior contaminación a los huevos. Estos planes deberán realizarse como un requisito previo al sistema HACCP.

(\*\*) Los residuos de los productos de limpieza y desinfección empleados así como la eficacia de estas operaciones se protocolizan y monitoriza en el plan de limpieza y desinfección. Esto protocolos se realizan en los requisitos previos al sistema HACCP.

## **Consideraciones sanitarias a los procesos productivos de centros de clasificación y embalaje de huevos e industrias de ovoproductos**

### **Centros de clasificación y embalaje de huevos**

#### **Recepción de materias auxiliares, huevos propios y externos.**

En dicho punto deberán describirse las especificaciones de las materias primas (huevos) y productos auxiliares, donde los controles en la recepción son visuales, documentales y analíticos. Durante el proceso de clasificación y embalaje se eliminarán o reducirán los peligros microbiológicos y físicos, procedentes principalmente de los huevos rotos, sucios y fisurados.

### **Clasificación de huevos**

Esta serie de etapas comprende la clasificación visual o automática de los huevos, separando los sucios, rotos y fisurados. También el estampado del código del huevo y la clasificación por peso de los mismos. Aquí los peligros principales son microbiológicos, por una deficiente limpieza de las cintas transportadoras y ganchos en los que se van desplazando los huevos, que podrían contaminar las cáscaras de los huevos con microorganismos patógenos. También residuos químicos de los productos de limpieza y desinfección aplicados. En el plan de limpieza y desinfección se controlarán los peligros existentes en este punto. El proceso de ovoscopiado debe asegurar que se retiran todos aquellos huevos que no pueden ser considerados de categoría "México extra", siendo esta etapa crítica.

### **Envasado y embalado**

El envasado protege a los huevos de las posibles contaminaciones externas y daños que estos pudieran sufrir en las manipulaciones posteriores. Solamente se emplearán materiales de envasado aptos para su uso en industria alimentaria o los que permita la norma y en perfecto estado de limpieza, debiendo cuidar su ubicación y manipulación dentro de la industria.

### **Almacenamiento**

Durante el almacenamiento los huevos no podrán ser sometidos a ningún tratamiento de conservación, ni refrigerados en locales cuyas temperaturas sean inferiores a 5°C. Los huevos pueden ser almacenados sin clasificar hasta un máximo de 3 días laborables, o bien una semana si se conservan a una temperatura inferior a 18°C y superior a 5°C. Tanto los envases de huevos como las cajas, han de venir etiquetados con la fecha de consumo preferente, que será de 28 días a partir del día de puesta de los huevos.

### **Distribución y venta**

Los huevos deberán transportarse en vehículos cerrados que los preserven de posibles golpes, así como de la luz y de temperaturas extremas. Han de ser transportados a una temperatura preferentemente constante, que garantice la óptima conservación de la calidad.

### **Industrias de ovoproductos (fabricación de huevo, clara y yema líquida pasteurizada).**

### **Recepción de materias auxiliares, huevos propios y externos**

Es conveniente controlar en el plan de proveedores, las condiciones en que se realiza la recepción de los huevos y las características sanitarias de los mismos, al objeto de diseñar el tratamiento térmico de manera eficiente y que se alcancen

las tasas de destrucción microbiana que deriven en un producto sanitariamente seguro. En el apartado de proveedores, se deberán describir las especificaciones de las materias primas (huevos) y productos auxiliares, donde los controles en la recepción son visuales, documentales y analíticos.

### **Cascado de huevos**

Se realizará de forma higiénica evitando el contacto de la cáscara con la clara y yema del huevo. El cascado de huevos se realizará en zonas diferentes a las del tratamiento térmico, a no ser que este se lleve a cabo en un sistema cerrado (ver figura 52).

### **Almacenamiento**

Es poco habitual almacenar el huevo, clara o yema líquida tras su cascado, dado que se incrementará el desarrollo microbiano y hará menos eficaz el tratamiento térmico. En caso de proceder a almacenar huevo cascado, deberá mantenerse a una temperatura en todo momento inferior a 4°C y nunca durante un tiempo superior a 48 horas.

### **Filtración**

El objetivo es eliminar los posibles restos que pudieran acompañar al huevo, clara o yema líquida según el caso, al tiempo que eliminar las chalazas del huevo. Esta etapa es fundamental para la eliminación completa de peligros físicos en producto el final.

### **Pasteurización**

Etapa tecnológica crucial para la eliminación de la flora patógena del huevo (especialmente *Salmonella*). La relación tiempo/temperatura debe establecerse acorde a las características del producto. Igualmente influye si se trata de un proceso de pasteurización del huevo entero, de la clara o de la yema solamente. El problema de aplicar temperaturas excesivamente altas deriva en que a pesar de obtener mayor seguridad del producto, se ven afectadas las proteínas, siendo estas desnaturalizadas, al tiempo que se pierden algunas de las cualidades sensoriales, reológicas, etc., de los productos. Por tanto, deberá alcanzarse una situación de compromiso entre la aplicación de parámetros tiempo/temperatura que resulten eficaces respecto a la seguridad microbiológica del producto al tiempo que se afecten lo menos posible sus características.

### **Enfriado, almacenamiento y distribución**

Las etapas posteriores de almacenamiento y distribución se han considerado críticas pues el mantenimiento de las temperaturas de frío en los productos según sean ultracongelados, congelados o refrigerados influyen de manera decisiva en su conservación, durabilidad, y por tanto seguridad sanitaria. La aplicación de frío



en todas las etapas posteriores al tratamiento térmico son determinantes para evitar el desarrollo microbiano del producto. Los productos finales se mantendrán durante su almacenamiento y transporte y entrega a una temperatura inferior a 4°C para ovoproductos refrigerados.

## Desarrollo de tablas de gestión y monitorización de PCC

Las tablas de gestión son documentos estructurados que sirven como apoyo para desarrollar de forma metódica la gestión de los PCC. Estas tablas nos sirven para darnos una visión global de los peligros que se han identificado en cada una de las etapas y de las medidas preventivas aplicadas, así como la monitorización de las mismas.

Una secuencia de apartados de una tabla de gestión puede ser la que se detalla a continuación:

Fase y N°	Peligro	Medida preventiva	PCC	Limite critico	Vigilancia	Frecuencia	Medida correctora	Registro

- Fase y número: en este apartado se ubicará cada una de las fases del diagrama de flujo.
- Peligro: se indicarán que tipo de peligros afectan a la fase en cuestión, ya sean físicos, químicos o microbiológicos, omitiendo esta fase si se determina que no hay ningún peligro que le afecte o éste no es relevante.
- Medidas preventivas: estando encaminadas para evitar los peligros que se hayan marcado para cada fase.
- Punto de control crítico (PCC): se indica si alguno de los peligros identificados en la etapa es de control crítico o no.
- Límites Críticos: se deberá indicar un parámetro que cuantifique de manera efectiva que se está implantando una medida preventiva adecuada.
- Vigilancia: es la comprobación de que los puntos de control crítico están dentro de los límites críticos establecidos, indicándose los métodos que se usarán para realizar la monitorización del control. Estas medidas pueden ser parámetros fisicoquímicos, como temperatura, pH, humedad, etc., inspecciones sensoriales (visuales, olfativas etc.); o estudios microbiológicos.
- Frecuencia: es la periodicidad con la que se hace la vigilancia de un determinado parámetro, que ha de ser la adecuada para cada caso, sin sobrecargar los controles pero haciendo que éstos resulten efectivos.

- Medidas correctoras: si hay unas desviaciones de los niveles objetivos o límites críticos marcados, o sea cuando un PCC no está bajo control; para tener un sistema completo, siendo necesario incidir en las medidas preventivas.
- Registro: nos permite un estudio de forma adecuada del origen de las posibles deficiencias y corregirlas de manera idónea, además de acreditar de forma documentada los controles y las medidas aplicadas.

**Tabla 50.** Tabla de gestión: Centro de clasificación y embalaje de huevos.

**Tabla 51.** Tabla de gestión en la fabricación de huevos, clara y yema líquida pasteurizada.

**Tabla 52.** Tabla de gestión en la fabricación de huevos, clara y yema líquida pasteurizada.

### **Registro de vigilancia y monitorización**

Los documentos que a continuación se muestran son ejemplos orientativos, debiendo ser modificados para ajustarlos a las características de la industria, a los controles que se deban incluir o las circunstancias de cada empresa. Algunos de los registros podrán variar su periodicidad, especialmente aquellos que una vez estandarizado el proceso no precisen de un seguimiento exhaustivo.

Las fichas y documentos de registro más importantes que se pueden generar en un programa HACCP son:

- Ficha de control huevos granjas externas (centros clasificación huevos).
- Ficha de control de producción de huevos de granja (centros clasificación huevos).
- Ficha de control de limpieza y desinfección.
- Ficha de control de higiene y buenas prácticas de fabricación (centros clasificación huevos).
- Ficha control temperaturas.
- Ficha control transportes.
- Plan de control de desinsectación-desratización.
- Ficha de control de las instalaciones.
- Parte de incidencias.
- Ficha de control de cloro.

Tabla 50. Tabla de gestión: Centro de clasificación y embalaje de huevos.

Fase	Peligro	Medidas preventivas	PCC	Límite crítico	Vigilancia	Frecuencia	Medidas correctoras	Registro
Ovoscopiado	Microbiológicos: presencia de huevos sucios, rotos o fisurados.	Retirada de huevos rotos, sucios o fisurados	Si	Ausencia de huevos rotos, sucios o fisurados, manchas con sangre en el interior	Control visual y/o automático	Cuando se clasifique	Separara huevos sucios, rotos fisurados	Parte de producción
Almacenamiento y distribución	Microbiológicos: desarrollo de microorganismos patógenos por inadecuadas condiciones de almacenamiento	Mantener los huevos identificados a temperatura > 5 y < 18°C	Si	Temperatura entre 5°C y 18°C	Control de temperaturas en cámara y en vehículos de transporte	Diaria y a cada transporte y vehículo	Modificar condiciones de almacenamiento y/o transporte	Registro control de temperaturas en cámaras y en transportes

Tabla 51. Tabla de gestión en la fabricación de huevos, clara y yema líquida pasteurizada.

Fase	Peligro	Medidas preventivas	PCC	Límite crítico	Vigilancia	Frecuencia	Medidas correctoras	Registro
Filtración	Fiscos; presencia de restos de cáscaras, etc.	Mantenimiento del frío	Si	Ausencia de restos de cáscaras y chalazas	Control visual	Cada uso	Volver a filtrar, sustitución del filtro	Parte de producción
Pasteurización	Microbiológicos; supervivencia de microorganismos patógeno hasta niveles inaceptables	Adecuada relación tiempo/temperatura durante le proceso	Si	Ausencia de la flora patógena presente en el huevo	Control tiempo/ temperatura	Continua	Volver a tratar térmicamente	Registro gráfico
Enfriado	Microbiológicos; desarrollo de patógenos en superficie por inadecuada limpieza de la maquinaria	Enfriar en el menor tiempo posible desde el tratamiento térmico	Si	Enfriar a 4°C inmediato ante después del tratamiento térmico	Control de tiempo y temperatura del enfriado final	Continua	Verificar parámetros microbiológicos del producto; volver a tratar térmicamente	Registro gráfico

Tabla 52. Tabla de gestión en la fabricación de huevos, clara y yema líquida pasteurizada.

Fase	Peligro	Medidas preventivas	PCC	Límite crítico	Vigilancia	Frecuencia	Medidas correctoras	Registro
Envasado	Microbiológicos: contaminación por suciedad en envases	Establecer adecuada condiciones higiénicas según tipo de envasado	Si	Cumplir normas de higiene según tipo de envase. T (°C) según el producto	Control de parámetros envasados establecidos	Cada envasado	Verificar estado sanitario del producto/ reprocesar o desechar producto	Registro control de envasado
Almacenamiento	Microbiológicos: Desarrollo por inadecuadas condiciones de almacenamiento	Mantener los productos en adecuadas condiciones de temperatura e higiene	Si	Temperatura refrigerados <4°C congelados < -12°C ultracongelados < -18°C	Control de temperatura de la cámara	Diana	Modificar temperatura, reparación de la cámara	Ficha de control de temperatura de cámaras
Distribución y venta	Microbiológicos: desarrollo de patógenos por inadecuadas condiciones de transporte	Mantener higiene de vehículos y temperaturas adecuadas durante el transporte	si	Temperatura refrigerados <4°C congelados < -12°C ultracongelados < -18°C	Control de temperatura	Cada transporte	Modificaciones de las condiciones de transporte	Ficha de control de transporte

Para el caso de una industria de ovoproductos además de la documentación en registro gráfico de los equipos de tratamiento térmico y equipos de frío se generan documentos de seguimientos de partidas y PCC. A modo de ejemplo se adjunta un registro de control de producción en una de estas industrias. Se generan documentos de registro tanto del control de los requisitos previos como de controles de proceso y siempre incluyendo aquellos puntos de control crítico que se hayan definido en la industria. El objetivo de los registros es doble, por un lado documentar el control sobre aquellos puntos que se consideren críticos, y por otro lado lograr la trazabilidad de los productos fabricados. En cada registro figurará la persona responsable del mismo, pudiendo ser la misma persona la encargada de varios documentos de registro.

**Tabla 53.** Ficha control en la producción de huevos de naves granjas.

Fecha puesta	Nave	Cantidad de huevos (clasificación por su peso)				Industriales (México 1)	Medidas correctoras	Firma
		1	2	3	4			

**Tabla 54.** Ficha control limpieza y desinfección.

Responsable del control:							Mes y año:		
Superficie	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cintas desde granja									
Ovoscopio									
Detector de fisuras									
Cintas transportadoras									
Clasificadora									
Rodillos									
Suelos									
Techos									
Paredes									
Almacén auxiliares									
Almacén huevos									
Medidas correctoras: (Indicar fecha y superficie)									

**Tabla 55.** Ficha de control de higiene y buenas practicas de fabricación.

Practica a controlar	Correcto		Medida correctora
	Si	No	
Los huevos se clasifican de forma diaria, salvo días no laborables que se realiza al día siguiente			
Almacén a T <18°C y ventilado para mantener una temperatura constante.			
No se manipulan los huevos con las manos.			
Mantener limpio el detector de fisuras y ovoscopio.			
Mantener los materiales de embalaje sobre palets para que no estén en contacto con el suelo.			
Mantener envases de tinta y disolvente de estampadora cerrados e identificados.			
No mantener huevos en cajas, embalajes o contenedores sin identificar.			

Los huevos fisurados, rotos o sucios se retirarán de las zonas de selección y embalado de forma diaria con la gallinaza.			
Condiciones de almacén estables, sin cambios bruscos de temperatura.			
Los manipuladores deberán llevar ropa limpia y de uso exclusivo			
<b>Observaciones:</b>			

**Tabla 56.** Ficha de control de temperaturas.

Responsable de control:			
Fecha	Temperatura	Acciones correctoras	Firma
<b>Observaciones:</b>			

**Tabla 57.** Ficha control transportes.

Responsable de control:			Id. Vehículo:	
Fecha	Temperatura último destino	Condiciones de transporte	Acciones correctoras	Firma
<b>Observaciones:</b>				



**Tabla 58.** Parte de incidencias.

Responsable de control:		
Fecha	Incidencia	Corrección

### **Verificación del sistema**

La verificación de un sistema HACCP consiste en comprobar que éste se ajuste a la realidad de la industria, mantiene bajo control todos los PCC identificados y garantiza la producción de alimentos seguros, evitando el consumo de aquellos que no lo sean.

En primer lugar se procede a validar el programa HACCP que se ha desarrollado. Para este fin se procede a revisar documentalmente que todos los peligros identificados han sido considerados y que no hemos olvidado ninguno. Es importante supervisar las zonas de producción y comprobar "*in situ*" que todas las medidas preventivas han sido implantadas, así como los equipos de vigilancia de los PCC.

La verificación del sistema se puede realizar de diferentes formas y a distintos niveles. Se pueden emplear metodologías de auditorías, pudiendo distinguir entre auditorías de sistemas, conformidad o de investigación según se desee obtener información sobre las debilidades del sistema, la conformidad con los PCC y especificaciones establecidas o sobre un punto o proceso concreto respectivamente.

Dentro de los medios que se pueden utilizar para verificar el buen funcionamiento y diseño del sistema HACCP se encuentra:

- Revisión de los registros de vigilancia.
- Revisión de las desviaciones acaecidas sobre los límites diseñados en el sistema, lo que nos debe inducir a replantearnos el estudio de peligros y estudio de PCC en una o más etapas.
- Revisión de la eficacia de las acciones correctoras establecidas a partir del análisis tras la aplicación de las mismas.
- Comprobaciones analíticas de productos intermedios y de productos finales.
- Procedimientos de auditoría.

Una vez realizado el protocolo de verificación y llevadas a cabo las posibles modificaciones del sistema es preciso volver a validar el mismo tanto documentalmente como en la práctica. Obviamente el procedimiento de verificación a desarrollar por cada empresa se diseñará acorde a sus procesos tecnológicos y características propias en función de la complejidad de la misma, de los productos que elabore y sus sistemas operativos.

El sistema HACCP será preciso actualizarlo debido esencialmente a la detección de nuevos peligros que podrán venir de la aplicación de nuevas tecnologías en la industria, la fabricación de nuevos productos, uso de nuevas materias primas, nuevas normativas legales o datos científicos contrastados. Es preciso considerar estas variantes como fuente de nuevos peligros que habrán de ser tenidos en cuenta, estudiados y monitorizados si fuese el caso.

Tanto los procesos de verificación total o parcial del sistema HACCP, como las modificaciones y/o actualizaciones llevadas a cabo, se registrarán documentalmente.

# CONSEJOS EN EL MANEJO DE HUEVOS POR LOS CONSUMIDORES

Las conclusiones de diversas investigaciones científicas desarrolladas en la última década han determinado que el huevo es un alimento completo y saludable, que contiene proteínas de alto valor biológico, predominan los ácidos grasos insaturados sobre los saturados, y rico también en vitaminas y minerales.

Aunque desde un punto de vista sanitario, un huevo es seguro si procede de animales sanos, está limpio, y ha sido recogido y clasificado en condiciones higiénicas, éste se puede contaminar por unas malas prácticas de almacenamiento, conservación y manipulación. Si los huevos los tenemos almacenados durante demasiado tiempo, se dan dos procesos de deterioro de su calidad que nos indican el estado de frescura en el que se encuentra:

- Pérdida de anhídrido carbónico, por lo que la yema se descentra y la clara pierde consistencia.
- Salida de agua en forma de vapor a través de los poros de la cáscara, por lo que el huevo disminuirá de peso y la cámara de aire será mayor.

## **Manejo del huevo antes de consumirlo**

### **Almacenaje**

Los huevos se han de almacenar en un recinto habilitado para tal efecto, que este limpio, seco, a una temperatura constante y sin olores extraños. Una vez los huevos están envasados, han de quedar protegidos de posibles golpes, cambios bruscos de temperatura y luz directa.

### **Transporte**

Los huevos se han de transportar hasta su lugar de venta en un vehículo equipado de tal forma, que se soporten cambios térmicos, han de estar limpios y en el momento de la descarga hay que cuidar la manipulación de los mismos.

### **Compra**

Es muy importante que nos fijemos en la información que aparece en el envase de los huevos, así como de su fecha de consumo preferente, ya que una vez adquiridos los huevos, el comprador se hace responsable de la adecuada manipulación de los mismos. Nos hemos de fijar que los huevos proceden de un centro de clasificación autorizado, con su número de registro general sanitario y dirección. Además se ha de observar que los huevos estén limpios y sin fisuras.

Una vez comprados los huevos es importante tener en cuenta los siguientes consejos:

- En caso de lavar los huevos, solamente hacerlo en el momento de su utilización. El lavado de los huevos antes de su almacenamiento puede producir la contaminación del mismo, ya que la cáscara es porosa, permitiendo de esta manera que pueda haber un intercambio gaseoso a su través. Estos poros no son de pequeño diámetro, más bien al contrario, lo que permite perfectamente el paso de microorganismos. Por ello, existe una estructura de tipo proteico denominada cutícula, que recubre la totalidad de la superficie externa de la cáscara. Esta cutícula posee un aspecto similar al de una esponja, lo que facilita el paso de aire pero impide la entrada de microorganismos. Mientras la cutícula permanezca intacta, los microorganismos no podrán acceder al interior del huevo, por lo que todas aquellas medidas que la mantengan intacta garantizarán la seguridad del producto. Es por ello que el lavado, la abrasión, los golpes, la desecación y el envejecimiento, entre otros factores, pueden ocasionar la pérdida de la capa protectora.
- Mantener los huevos en refrigeración, debido a que un salto de bajas a altas temperaturas, puede producir una condensación de agua en la superficie de la cáscara, pudiendo desarrollarse microorganismos en ella y entrar a través de los poros.
- Evitar contaminaciones cruzadas del huevo al entrar en contacto con productos frescos (carnes, pescados, ajos, cebollas...), que podrían aportar al huevo olores extraños y contaminación microbiológica. Además es importante que nuestro refrigerador se encuentre en unas adecuadas condiciones de limpieza, ya que en caso de contaminación ambiental, esta se propagará a todos los alimentos.
- Vigilancia de las fechas de consumo preferente de los huevos que tenemos en el frigorífico, para una adecuada rotación de existencias.

### **Manejo de huevo en cocina**

Es importante el lavado de las manos antes y después de manejar los huevos en la cocina, ya que así se eliminan los microorganismos que pueden ser una fuente de contaminación de los alimentos frescos. A continuación se detallan una serie de consejos útiles para un buen manejo del huevo en las cocinas domésticas:

- Verificar la fecha de consumo preferente de los huevos que viene en el envase.
- No dejar los huevos ni los alimentos que contengan huevo más de dos horas a temperatura ambiente para evitar condensaciones de agua en la cáscara y la contaminación por microorganismos.

- Se pueden lavar los huevos con agua tibia en el momento antes de su utilización.
- Coger del frigorífico solamente los huevos estrictamente necesarios para el plato que vayamos a preparar, y guardar lo antes posible los huevos que no se vayan a utilizar.
- Si los huevos tienen la cáscara algo sucia, fisurada o están cercanos a la fecha de consumo preferente, es mejor destinarlos para el cocinado de alimentos a altas temperaturas. Para huevos frescos y sin defectos, se pueden destinar al cocinado a menor temperatura.
- Todos los utensilios utilizados en la manipulación de los huevos, han de estar limpios antes y después del uso, y no han de utilizarse en la manipulación de los alimentos una vez cocinados, además no han de estar deteriorados.
- Cascar el huevo en una superficie distinta al utensilio destinado al batido del mismo, así como evitar que contengan otros alimentos.
- Los alimentos preparados con huevo, se han de mantener en refrigeración, separados de los alimentos crudos para evitar el desarrollo microbiano y posibles contaminaciones cruzadas.
- En restauración colectiva sólo está permitido el uso de huevo fresco, si durante la elaboración de los distintos platos se garantiza que se van a alcanzar 75°C en el interior del alimento. En caso contrario se emplearán ovoproductos. Además los productos elaborados con huevo fresco, se han de consumir en las 24 horas posteriores al proceso de elaboración, conservando a una temperatura de 8°C máximo. Para platos con una duración mayor de 24 horas, se deben conservar a una temperatura inferior a 4°C. También se puede conservar en caliente a una temperatura que sea superior a 65°C.

En definitiva, la responsabilidad de poner productos alimenticios sanos e inocuos es de las industrias, pero como vemos en todos los alimentos y particularmente los huevos frescos, todos los consumidores debemos aplicar unas prácticas de higiene correctas que eviten la contaminación de alimentos seguros en nuestros hogares.

Capítulo 8

# **Conclusiones y Sugerencias**

## CONCLUSIONES

- Los aspectos que repercuten de manera directa en la producción y calidad del huevo son: su composición, el valor nutricional, la formación en el oviducto, los cambios que puede sufrir durante el almacenamiento y que influyen en su calidad nutritiva y comercial, las posibles contaminaciones microbiológicas, así como los derivados que comercialmente se pueden obtener de él (ovoproductos). Es por lo anterior que cada uno de estos puntos fueron materia de interés en el presente trabajo.
- A diferencia de los mamíferos, el pollo no se desarrolla en el ambiente seguro de la matriz, por lo tanto, no es de sorprenderse que el huevo presente mecanismos de protección, como las barreras físicas y químicas.
- Se ha reconocido la contaminación por *Salmonella*, especialmente por los serotipos Enteritidis y Typhimurium; siendo las principales vías de contaminación la transovárica y transcascárida.
- Los mecanismos por los cuales SE contamina los huevos de gallina con mucho más éxito que cualquier otro serotipo y microorganismo, siendo las principales características que hacen único a este serotipo sus capacidades para evadir los ataques de las moléculas antimicrobianas durante y después de la formación del huevo y sobrevivir a las condiciones del oviducto migrando hacia el interior del huevo. Al parecer, lo anterior requiere de una combinación de genes que mejoran la protección del microorganismo y de mecanismos de reparación exitosos, por mencionar solo algunos factores que promueven la supervivencia de este serotipo.
- Además de *Salmonella*, se han encontrado en huevos y ovoproductos representantes de los siguientes géneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, *Listeria* y *Bacillus*. Entre los mohos los géneros, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Sporotrichum*, *Botrytis* y *Thamnidium* se han encontrado con cierto grado de constancia. Además se mencionaron los dos principales virus patógenos (Newcastle y el virus de la Influenza aviar) que, a pesar de no representar un riesgo por el consumo de huevos, sí presentan un impacto económico en su producción.

- Los sistemas de autocontrol basados en el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP) han demostrado ser el modelo más eficaz desarrollado en este momento para garantizar la inocuidad de los alimentos. En este trabajo se realizó un ejemplo de un manual que ayudaría como guía al empresario y/o fabricante a diseñar su propio sistema e implementarlo correctamente para los centros de clasificación de huevos y/o industria de fabricación de ovoproductos, constituyendo la manera más positiva de influir eficazmente en la seguridad alimentaria. De esta forma, además, se da cumplimiento a lo establecido en las normas y que refuerza en la necesidad de implantar estos sistemas de autocontrol basados en la metodología del HACCP.

## SUGERENCIAS

- Aunque es posible infectar el huevo con diferentes microorganismos en las condiciones de un laboratorio, de manera natural solo se ha reconocido al género *Salmonella* como microorganismo capaz de sobrevivir y crecer en el interior de los huevos. Lo anterior da pie a nuevas líneas de investigación en las cuales, se infecten con otros géneros de bacterias y especies microbianas que representen un peligro a la salud pública para observar la capacidad de éstas a permanecer y desarrollarse en el interior y exterior del huevo.  
Es importante estudiar aquellos microorganismos que con frecuencia son encontrados en este tipo de productos y que las condiciones sean lo más cercanas a las naturales, con el fin de observar dicho efecto y a la par, que sea representativo.
- Someter a tratamientos térmicos (cocción y horneado), aquellos huevos que se presenten sucios, manchados con excremento o sangre, rotos, agrietados etc. Ya que, el principal riesgo está en aquellos alimentos que no reciben un tratamiento térmico y cuyo ingrediente es el huevo o el consumo de huevo crudo o semicocido, ejemplo de ello lo representa la mayonesa, aderezos, algunos licuados, helados, entre otros alimentos.
- Finalmente se recomienda para la industria avícola nacional, la elaboración de un manual HACCP cuyo objetivo principal es facilitar el conocimiento de las mejores prácticas de higiene a desarrollar de forma específica en estas industrias. Haciendo énfasis en aquellas operaciones que representen un peligro (agentes biológicos, químicos o físicos) para aplicarles un control, previniendo o eliminando dicha contaminación



relacionada con la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable.

Entre los principales puntos críticos se mencionan, la recepción de los huevos, preselección visual, ovoscopiado, cascado, almacenamiento, pasteurización, enfriado y envasado, de la misma manera es importante verificar el buen funcionamiento, diseño y cumplimiento del sistema HACCP.

A nivel minorista, se recomienda el almacenamiento de los huevos en refrigeración, evitando el desarrollo microbiano; así como prohibir la venta aquellos huevos que presenten la cáscara dañada o manchada, con el fin de asegurar la salud pública.

Capítulo 9

# Bibliografía

# BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, F.B. & Chahine, J.M. Transferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin. *European Journal of Biochemistry* 263, 912–920 (1999).
- Abdel Mageed, A.M., Isobe, N. & Yoshimura, Y. Expression of avian beta-defensins in the oviduct and effects of lipopolysaccharide on their expression in the vagina of hens. *Poultry Science* 87, 979–984 (2008).
- Abdel Kareem, H. & Mattar, Z. Heat resistance and growth of *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* in whole liquid egg. *Acta Microbiologica Polonica* 50, 27–35 (2001).
- Abigail, A.S., Whitt, D.D., 1994. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. ASM Press, Washington, DC, pp. 343.
- Abolnik, C., Ilorner, R.F., Bisschop, S.P.R., Parker, M.E., Romito, M. & Viljoen, G.J. A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggest epidemiological origins in the Far East. *Archives of Virology* 49, 603-619 (2004).
- Acha PN, Szyfres B (Pan American Health Organization 309). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. Volume 2. Chlamydiosis, rickettsioses and viroses. 3rd ed. Washington DC: PAHO; 2003. Scientific and Technical Publication No. 580. Influenza; pp. 155-72.
- ACMSF (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food) (1993) *Salmonella in eggs*. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Acuff, G.R.C., Vanderzant, C., Gardner, F.A. & Golan, F.A. Examination of turkey eggs, poults and brooder house facilities for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Food Protection* 45, 1279-81 (1982).
- ADA. (2003). The position of The American Dietetic Association on Functional Foods. Recuperado el 2 de junio de 2012 de [http://www.eatright.org/cps/rde/xchg/ada/hs.xsl/nutrition\\_350\\_ENU\\_HTML.htm](http://www.eatright.org/cps/rde/xchg/ada/hs.xsl/nutrition_350_ENU_HTML.htm)
- ACMSF. (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food) (1993). *Report on Salmonella in eggs*. London. Recuperado el 2 de junio de 2012 de <http://acmsf.food.gov.uk/acmsfreps/acmsfreports>
- AFSSA (2009). Opinion of the French food safety agency concerning two draft amendments to orders for controlling salmonellae in the *Gallus gallus* species. Request no. 2009-SA-0182.
- Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y. & Mori, M. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology* 141, 983-988 (1995).

- Al-Bahry, S.N., Mahmoud, I.Y., Al-Musharafi, S.K. & Al-Ali, M.A. Penetration of spoilage and food poisoning bacteria into fresh chicken egg: A public health concern. *Global Journal of Bio-Science & Biotechnology* 1, 33-39 (2012).
- Alamprese, C., Casiraghi, E. and Rossi, M. Foaming, gelling and rheological properties of egg albumen as affected by the housing system and the age of laying hens. *International Journal of Food Science & Technology* 47(7), 1411-1420 (2012).
- Alderton, G., Chen, J.K. & Ito, K.A. Effect of lysozyme on the recovery of heated *Clostridium botulinum* spores. *Applied Microbiology* 27, 613-615 (1974).
- Alexander D.J. (1997). Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry, Tenth Edition, Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M. (Eds.), Iowa State University Press, Iowa, USA, pp. 541–570.
- Alexander, D.J. Newcastle disease. *British Poultry Science* 42, 5-22 (2001).
- Alexander, D.J. (2003) Newcastle Disease. Diseases of Poultry. 11th edition, (Eds.), Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., Mc Dougald, L. R. y Swayne, D.E. Ames, Iowa: Iowa State Press, pp. 64-87.
- Alford, L.R., Holmes, N.E., Scott, W.J. & Vickery, J.R. Studies in the preservation of shell eggs. I. The nature of wastage in Australian export eggs. *Australian Journal of Applied Science* 1, 208-214 (1950).
- Allen-Vercoe, E. & Woodward, M.J. Colonization of the chicken caecum by afimbriate and aflagellate derivatives of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Veterinary Microbiology* 69, 265-275 (1999).
- Allen-Vercoe, E., Sayers, A.R. & Woodward, M.J. Virulence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. *Epidemiology and Infection* 122, 395-402 (1999).
- Alvarez, I., Raso, J., Palop, A., & Sala, F. J. Influence of different factors on the inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology* 55, 143–146 (2000).
- American Heart Association. AHA dietary guidelines. Revision 2000: A statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American Heart Association. *Circulation* 102, 2296–2311 (2000).
- Amiali, M., Ngadi, M.O., Smith, J.P., Raghavan, G.S.V. Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering* 79, 689-694 (2007).
- Amin, M.K. & Draughon, F.A. Infections of shell eggs with *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Food Protection* 53, 826-830 (1990).
- Anderson, A., Rönener, U., Granum, P.E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* 28, 145-155 (1995).

- Andrassy, E., Farkas, J., Seregely, Z., Dalmadi, I., Tuboly, E., Lebovics, V. Changes of hen eggs and their components caused by nonthermal pasteurizing treatments. II. Some non-microbiological effects of gamma irradiation or hydrostatic pressure processing on liquid egg white and egg yolk. *Acta Alimentaria* 35(3), 305–318 (2006).
- Angulo, F.J., Johnson, K.R., Tauxe, R.V. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microbial Drug Resistance* 6, 77-83 (2000).
- Anon. Toxi-infecciones alimentarias en la Comunidad Autónoma Vasca: 1984-1986. *Boletín Microbiológico Semanal* 87/37, 1, 7, 8 (1987).
- Anonymous. Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. *EFSA Journal* 175, 1-48 (2005).
- Anonymous. (2006). Food and drugs, chap. 1. Part 172-food additives permitted for direct addition to food for human consumption. In: Subpart B-food Preservatives. Disodium EDTA. Code of Federal Regulations. Title 21, vol. 3. U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Washington, DC. Section In.120.
- Anonymus. (2008). *Salmonella* in humans (excluding *S. Typhi* and *S. Paratyphi*). Faecal and lower gastrointestinal isolates reported to the Health Protection Agency Centre for Infections England and Wales, 1981-2008. Recuperado el 2 de julio de 2012 de [http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb\\_C/1195733760280?p=1191942172078](http://www.hpa.org.uk/webw/HPAweb&HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733760280?p=1191942172078)
- Anton, M. Structure and functional properties of hen egg yolk constituents. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry*, 2, 839–864 (1998).
- Anton, M., & Gandemer, G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma from egg yolk. *Journal of Food Science*, 62, 484–487 (1997).
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrodo, M., Beaumal, V., David-Briand, E. and Rabesona, H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry* 83, 175–183 (2003).
- Arias, J. L., Fernandez, M.S., Dennis, J. E. and Caplan, A. I.: Collagens of the chicken eggshell membranes. *Connective Tissue Research* 26, 37-45 (1991).
- Augustin, J.C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to physical exposure. *Pathologie Biologie* (Paris) 44(9), 790–807 (1996).
- Ayerza, R. and Coates, W. Dietary levels of chia: Influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry Science* 79, 724-739 (2000).
- Aygun, A. & Sert, D. Effects of ultrasonic treatment on eggshell microbial activity, hatchability, tibia mineral content, and chick performance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Poultry Science* 91, 732-738 (2012).

- Aygun, A., Sert, D. & Copur, G. Effects of propolis on eggshell microbial activity, hatchability, and chick performance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) eggs. *Poultry Science* 91, 1018-1025 (2012).
- Ayres, J.C. Methods for depleting glucose from egg albumen before drying. *Food Technology* 12, 186-9 (1958).
- Ayres, J.C. The relationship of organism of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry, and eggs. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 471-486 (1960).
- Ayres, J.C. & Slosberg, H.M. Destruction of *Salmonella* in egg albumen. *Food Technology* 3, 180-3 (1949).
- Ayres, J.C. & Stewart, G.F. Removal of sugar from raw egg white by yeast before drying. *Food Technology* 1, 519-26 (1947).
- Ayres, J.C. & Taylor, B. Effect of temperature on microbial proliferation in shell eggs. *Applied Microbiology* 4, 355-359 (1956).
- Badui, S. (2006). Química de los alimentos. Cuarta edición. México: PEARSON EDUCACIÓN, pp. 188, 210-213.
- Bailey, J., Stern, N., Fedorka-Cray, P., Craven, S., Cox, N., Cosby, D., et al. Sources and movement of *Salmonella* through integrated poultry operations: A multistate epidemiological investigation. *Journal of Food Protection*, 64, 1690–1697 (2001).
- Baker, R. & Balch, A. A study of the organic material of hen's egg shell. *Biochemical Journal* 82, 352-361 (1962).
- Baker, R.C. Microbiology of eggs. *Journal of Milk and Food Technology* 37, 265-8 (1974).
- Baker, R.C. Survival of *Salmonella enteritidis* on and in shelled eggs, liquid eggs and cooked egg products. *Dairy, Food Environment San.* 10, 273-5 (1990).
- Baker, R. C., & Bruce, C. 1994. Effects of processing on the microbiology of eggs. In R. G. Board, & R. Fuller (Eds.), *Microbiology of the avian egg*. London: Chapman and Hall.
- Baker, R. C., Goff, J. P., & Mulnix, E. J. Salmonellae recovery following oral and intravenous inoculation of laying hens. *Poultry Science*, 59(5), 1067–1072 (1980).
- Balch, A. and Cooke, A. A study of the composition of hen's eggshell membranes. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 10, 13-25 (1970).
- Baldwin, R.R., Campbell, H.A., Thiessen, R., Jr & Lorant, G.J. The use of glucose oxidase in the processing of foods with special emphasis on the desugaring of egg white. *Food Technology* 7, 275-82 (1953).
- Ball, H.R., Jr, Hamid-Samimi, M., Foegeding, P.M. & Swartzel, K.R. Functionally and microbial stability of ultrapasteurized, aseptically packaged refrigerated whole egg. *Journal of Science* 52, 1212-18 (1987).

- Ballesteros, M.N., Cabrera, R.M., Saucedo, M.S., Fernandez, M.L. Dietary cholesterol does not increase biomarkers for chronic disease in a pediatric population from northern Mexico. *American Journal of Clinical Nutrition* 80, 855–61 (2004).
- Bankova, V.S., Castro, S.L. & Marcucci, M.C. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15 (2000).
- Banwart, G.J. Effect of sodium chloride and storage temperature on the growth of *Salmonella oranienburg* in egg yolk. *Poultry Science* 43, 973-6 (1964).
- Banwart, G.J. & Ayres, J.C. The effect of high temperature storage on the content of *Salmonella* and on the functional properties of dried egg white. *Food Technology* 10, 68-73 (1956).
- Banwart, G.J. & Ayres, J.C. The effect of pH on the growth of *Salmonella* and functional properties of liquid egg white. *Food Technology* 11, 244-6 (1957).
- Barbezange, C. & Jestin, Véronique. Monitoring of pigeon paramyxovirus type-1 in organs of pigeons naturally infected with *Salmonella typhimurium*. *Avian Pathology* 32(3), 277-283 (2003).
- Barbosa-Cánovas, G.V., Pierson, M.D., Zhang, Q.H., Schaffner, D.W. Pulsed electric fields. *Journal of Food Science* 65, 65-79 (2001).
- Barnes, E.M. & Corry, J.E.L. Microbial flora of raw and pasteurized egg albumen. *Journal of Applied Bacteriology* 31, 97-107 (1969).
- Barnhart, H. M., Dreesen, D. W., Bastien, R., & Pancorbo, O. C. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. *Journal of Food Protection* 54(7), 488–491 (1991).
- Baron, F., M. Gautier, and G. Brule. Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg white. *Journal of Food Protection* 60(11), 1318-1323 (1997).
- Baron, F., Cochet, M.F., Grosset, N., Madec, M.N., Briandet, R., Dessaigne, S., Chevalier, S., Gautier, M., Jan, S. Isolation and characterization of a psychrotolerant toxin producer, *Bacillus weihenstephanensis*, in liquid egg products. *Journal of Food Protection* 70, 2782-2791 (2007).
- Baron, F., M. Gautier, & G. Brule. Factors involved in the inhibition of growth of *Salmonella enteritidis* in liquid egg white. *Journal of Food Protection* 60(11), 1318-1323 (1997).
- Bartlett, F.M., Hawke, A.E. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A and HAL957E1 in various liquid egg products. *Journal of Food Protection* 58(11), 1211–1214 (1995).
- Barragan, J.I. *Manchas de Carne*. Trouw 1991.
- Barroeta, A. (2002). Formación del huevo. En: Consejo asesor del Instituto de Estudios del Huevo. (Eds.), *Lecciones sobre el huevo*. Madrid: Instituto de Estudios del Huevo, pp. 45-54.

- Barroeta, A. El huevo y sus componentes como alimento funcional. Barcelona. Recuperado el 2 de junio de 2012 de [http://www.institutohuevo.com/images/archivos/ana\\_barroeta.\\_el\\_huevo\\_alimento\\_funcional08\\_13135328.pdf](http://www.institutohuevo.com/images/archivos/ana_barroeta._el_huevo_alimento_funcional08_13135328.pdf)
- Barron, J. Fat soluble anti-oxidant vitamins A, E and carotenoids. *CPD Clinical Biochemistry* 3(3), 82-6 (2001).
- Barrow, P.A. & Lovell, M.A. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Avian Pathology* 20, 335-348 (1991).
- Baskerville, A., Humphrey, T.J., Fitzgeorge, R.B., Cook, R.W., Chart, H., Rowe, B. & Whitehead, A. Airborne infection of laying hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Veterinary Record* 130, 395-398 (1992).
- Baumgartner, S., Brown, D.J., Salevsky, E. and Leach, R. M., Jr. Copper deficiency in the laying hen. *Journal of Nutrition* 108, 804-811 (1978).
- Baucells MD, Crespo N, Barroeta AC, López-Ferrer S, Grashorn MA. Incorporation of Different Polyunsaturated Fatty Acids into Eggs. *Poult Science* 78, 51-59 (2000).
- Bazhal, M.I., Ngadi, M.O., Raghavan, G.S.V., Smith, J.P. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in liquid whole egg using combined pulsed electric field and thermal treatments. *LWT- Food Science and Technology* 39, 419-425 (2006).
- Becirevic, M., Popovic, M. & Becirevic, N. Influence of iron and water on the growth of *S. typhimurium* and enteropathogenic *E. coli* in eggs and albumen. *Vet. Yugoslav.*, 37, 41-49 (1988).
- Belitz, H.D., Grosch, W. and Scheebell, P. Food Chemistry. 4<sup>o</sup> ed. Heidelberg, Springer, 2009.
- Bellairs, R., Harkness, M. & Harkness, R.D. The vitelline membrane of the hen's egg: a chemical and electron microscopical study. *Journal of Ultrastructure Research* 8, 339-359 (1963).
- Beloian, A. & Schlosser, G.C. Adequacy of cook procedures for the destruction of salmonellae. *American Journal of Public Health* 53, 782-91 (1963).
- Benabdelgelil, K, Nutritional factors Affecting albumen quality. *Zootecnia Int.* 1990.
- Benabdelgelil, K, Jensen S. Effectiveness of Ascorbic Acid and chromium in counteracting the negative effects of dietary vanadium on interior egg Quality. *Poultry Science* (1990).
- Bengtsson, G., Marklund, S.E. and Olivecrona, T. Protein components of very low density lipoproteins from hen's egg yolk. *European Journal of Biochemistry* 79(1), 211-223 (1977).
- Berrang, M.E. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. *Journal of Applied Poultry Research* 8, 499-504 (1999).



- Berry, J.T., Doyle, M.P., Schoeni, J.L. Colonization of chicken caeca by *E. coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 310–315 (1985).
- Betancourt, L., Díaz, G. y D. Ph. Enriquecimiento de huevos con ácidos grasos omega-3 mediante la suplementación con semilla de lino (*Linum usitatissimum*) en la dieta. *Revista MVZ Córdoba* 14(1), 1602-1610 (2009).
- Beveridge, T., Arntfield, S., Ko, S. & Chung, J.K.L. Firmness of heat induced albumen coagulum. *Poultry Science*, 59, 1229– 1236 (1980).
- Beynen, A.C. Fatty acid composition of eggs produced by hens fed diets containing groundnut, soya bean or linseed. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 52(1), 3-10 (2004).
- Bhale, S., No, H.K., Prinyawiwatkul, W., Farr, A.J., Nadarajah, K. & Meyers, S.P. Chitosan coating improves shelf life of eggs. *Journal of Food Science* 68(7), 2378-2383 (2003).
- Bichler L.A., Kabambi, V., Nagaraja, D.V.M. & Halvorson, D.A. *Salmonella enteritidis* in eggs, cloacal swab specimens, and internal organs of experimentally infected white leghorn chickens. *American Journal of Veterinary Research* 57, 489–495 (1996).
- Bierer, B.W., Barnett, B.D. & Valentine, H.D. Experimentally killing *Salmonella typhimurium* on egg shells by washing. *Poultry Science* 40, 1009-1014 (1961b).
- Bierer, B.W., Valentine, H.D., Barnett, B.D. & Rhodes, W.H. Germicidal efficiency of egg washing compounds on eggs artificially contaminated with *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science* 40, 148-152 (1961a).
- Binkin, N., Scuderi, G., Novaco, F. et al. Egg-related *Salmonella enteritidis*, Italy, 1991. *Epidemiology & Infection* 110 (2), 227-37 (1993).
- Boar, P.A., Hendon, L.P. & Board, R.G. The influence of iron on the course of bacterial infection of the hen's egg. *British Poultry Science* 9, 211-215 (1968).
- Board, R.G. The growth of gram-negative bacteria in the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology* 27, 350-364 (1964).
- Board, R.G. Bacterial growth on and penetration of the shell membranes of the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology* 28, 197-205 (1965a).
- Board, R.G. The properties and classification on the predominant bacteria in rotten eggs. *Journal of Applied Bacteriology* 28, 437-453 (1965b).
- Board, R.G. Review: the course of microbial infection of the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology* 29, 319–341 (1966).
- Board, R.G. The microbiology of the hen's egg. *Advances in Applied Microbiology* 11, 245-281 (1969).

- Board, R.G. and Halls, N.A. The cuticle: a barrier to liquid and particle uptake by the shell of the hens' egg. *British Poultry Science* 14, 69-97 (1973).
- Board, R.G., Clay, C., Lock, J. & Dolman, J. (1994). The egg: a compartmentalized aseptically packaged food, in *Microbiology of the Avian Egg*. R.G. Board and R. Fuller (Eds.), Chapman & Hall, London, pp. 43-61.
- Bohez, L., Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Dewulf, J., Haesebrouck, F. & Van Immerseel, F. The *Salmonella* Pathogenicity Island 2 regulator SsrA promotes reproductive tract but not intestinal colonization in chickens. *Veterinary Microbiology* 126, 216–224 (2008).
- Botey-Saló, P., Anyogu, A., Varnam, A. H. & Sutherland, J. P. Survival of inoculated *Salmonella* on the shell of hens' eggs and its potential significance. *Food Control* 28, 463–469 (2012).
- Brachman, P.S., Brachman, P.S. Bioterrorism: an update with a focus on anthrax. *American Journal of Epidemiology* 155, 981-987 (2002).
- Brackett, R.E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technology* 42, 162-164 (1988).
- Brackett, R.E. & Beuchat, L.R. Survival of *Listeria monocytogenes* in whole egg and egg yolk powders and in liquid whole egg. *Food Microbiology* 8, 33-7 (1991).
- Braden, C. R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: A national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 43(4), 512–517 (2006).
- Bradshaw, J.G., Shah, D.B., Forney, E., Madden, J.M. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. *Journal of Food Protection* 53, 1033-1036 (1990).
- Brant, A.W & Starr, P.B. Some physical factors related to egg spoilage. *Poultry Science* 41, 1468-1473 (1962).
- Braun, P. & Fehlhaber, K. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. *International Journal of Food Microbiology* 25, 95–99 (1995).
- Brooks, J. Mechanism of the multiplication of *Pseudomonas* in the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 499-503 (1960).
- Brooks J. and D.I. Taylor. (1955). Eggs and egg products. Spec. Rep. Food Invest. Bd. No 60 H.M.S.O., London
- Brown, W.E., Baker, R.C. & Naylor, H.B. The role of the inner shell membrane in bacterial penetration of chicken eggs. *Poultry Science* 44, 1323-7 (1965).
- Brown, W.E., Baker, R.C. & Naylor, H.B. The microbiology of cracked eggs. *Poultry Science* 45, 284-7 (1966).

- Brown, W.E., Baker, R.C. & Naylor, H.B. The effect of egg position in storage on susceptibility to bacterial spoilage. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 3, 29-32 (1970).
- Bruce, J. & Drysdale, E.M. (1994). Trans-shell transmission, in *Microbiology of the Avian Egg* (Eds.), R.G. Board and R. Fuller. London: Chapman & Hall, pp. 63-91.
- Bruce, J. & Johnson, A.L. The bacterial flora of unhatched eggs. *British Poultry Science* 19, 681-9 (1978).
- Bruhn, C.M. Explaining the concept of health risk versus hazards to consumers. *Food Control* 16 (6), 487-490 (2005).
- Bolder, N.M., Van der Hulst, M.C. & Mulder R.W.A.W. Survival of spoilage and potentially pathogenic microorganism in egg nog. *Lebensmittel Wissenschaft Technology* 20, 151-4 (1987).
- Botey-Saló, P., Anyogu, A., Varnam, A.H., Sutherland, J.P., Survival of inoculated *Salmonella* on the shell of hens' eggs and its potential significance. *Food Control* 463-469(2012),
- Bourre, J.M. and Galea, F. An important source of omega-3 fatty acids, vitamins D and E, carotenoids, iodine and selenium: a new natural multi-enriched egg. *Journal of Nutrition Health and Aging* 10(5), 371-376 (2006).
- Bourret, R.B., Hess, J.F., Borkovich, K.A., Pakula, A.A. & Simon, M.I. Protein phosphorylation in chemotaxis and twocomponent regulatory systems of bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 264, 7085-7088 (1989).
- Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckaert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imbereschts, H. et al. Complete nucleotide sequence of a 43 kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 104 and its identification in phage type DT 120 and serovar Agona. *Journal of Bacteriology* 5725-5732 (2002).
- Buchanan, R.L. The role of microbiological criteria and risk assessment in HACCP. *Food Microbiology* 12, 421-424 (1995).
- Buchanan, R.L. & Whiting, R.C. Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection* 58, 1-7 (1996).
- Burley, R. W., & Cook, W. H. Isolation and composition of avian egg yolk granules and their constituents [alpha] and [beta]-lipovitellins. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* 39, 1295-1307 (1961).
- Burley, R.W. and Valdehra, D.V. Chromatographic separation of the soluble proteins of hen's egg yolk: an analytical and preparative study. *Analytical Biochemistry* 94(1), 53-59 (1979).
- Burley, R. W., & Valdehra, D. V. (1989). *The vitelline membrane. The avian egg: Chemistry and biology*. New York: John Wiley and Sons, pp. 147-169.

- Butler, R.W. and Josephson, H.E. Egg-containing cake-mixes as a source of *Salmonella*. *Canadian Journal of Public Health* 53, 478-82 (1962).
- Buxadé, C. (1994). Fisiología de la producción del huevo. En: C. Buxadé. (Ed.), Zootecnia. Bases de producción animal. Tomo I. Estructura, etnología, anatomía y fisiología. Madrid: Mundi- Prensa, pp. 319-328.
- Cabellos, P., Lizcano, L., García, M. et al. Manual de Aplicación del Sistema APPCC en Centros de Clasificación de Huevos e Industrias de Ovoproductos de Castilla-La Mancha. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y CECAM. Recuperado el 3 de junio de 2012 de <http://pagina.jccm.es/sanidad/salud/agroalimentaria/manhue.pdf>
- Cabrera, M.C., Saadoun, A., Grompone, A., Pagano, T., Salhi, M., Olivero, R. and Del Puerto, M. Enriching the egg yolk in n-3 fatty acids by feeding hens with diets containing horse fat produced in Uruguay. *Food Chemistry* 98, 767-773 (2006).
- Cachaldora, P., García-Rebollar, P., Alvarez, C., Méndez, J. & De Blas, J. C. Double enrichment of chicken eggs with conjugated linoleic acid and n-3 fatty acids through dietary fat supplementation. *Animal Feed Science and Technology* 144, 315-326 (2008).
- Caffer, M.J. and Eiguer, T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 21, 15-19 (1994).
- Calderon-Miranda, M.L., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. Inactivation of *Listeria innocua* in liquid whole egg by pulsed electric fields and nisin. *International Journal of Food Microbiology* 51, 7-17 (1999).
- Cantor, A. & McFarlane, V.H. *Salmonella* organism on and in chicken eggs. *Poultry Science* 27, 350-5 (1948).
- Cappucci, D.T., Johnson, D.C., Brugh, M., Smith, T.M., Jackson, C.F., Pearson, J.E., Senne, D.A. Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak. *Avian Diseases* 29, 1195-1200 (1985).
- Carbajal, M.A. (2005). Hábitos de consumo de carne de pollo y huevos. Calidad nutricional y relación con la salud. XLII Symposium de Avicultura Científica. Cáceres, España.
- Cardetti, M.M. Efecto de la posición de almacenamiento del huevo sobre su calidad. *Poultry Science* 1979.
- Carlander, D., Kollberg, H., Wejaker, P. & Larsson, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunology Research* 21, 1-6 (2000).
- Carlin, A.F. & Ayres, J.C. Effect of the removal of glucose by enzyme treatment on the whipping properties of dried albumen. *Food Technology* 7, 268-70 (1953).

- Carner, C. The effect of edible eggshell coatings on egg quality and consumer perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (11), 1897-1902 (2005).
- Carner, C. & Cansiz, O. Effectiveness of chitosan-based coating in improving shelf life of eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (2) 227-232 (2007).
- Carraminana, J. J., Humbert, F., Ermel, G., & Colin, P. Molecular epidemiological investigation of *Salmonella typhimurium* strains related to an egg-borne outbreak. *Research in Microbiology* 148(7), 633–636 (1997).
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45(2), 545–556 (2012).
- Carter, T.A., Gentry, R.F. & Bressler, G.O. Bacterial contamination of hatching eggs and chicks produced by broiler systems. *Poultry Science* 52, 2226-36 (1973).
- Cason, J. A., Bailey, J. S., & Cox, N. A. Location of *Salmonella typhimurium* during incubation and hatching of inoculated eggs. *Poultry Science* 72(11), 2064–2068 (1993).
- Cason, J. A., Cox, N. A., & Bailey, J. S. Transmission of *Salmonella typhimurium* during hatching of broiler chicks. *Avian Diseases* 38(3), 583–588 (1994).
- Castello, J. (1989). El aparato genito-urinario. En: J. Castello. (Ed.), *Biología de la gallina*. Madrid: Real Escuela de Avicultura, pp. 117-124.
- Castellani, O., David-Briand, E., Guerin-Dubiarç, C. and Anton, M. Effect of aggregation and sodium salt on emulsifying properties of egg yolk phosvitin. *Food Hydrocolloids* 19(4), 769-776 (2005).
- Caston, L. and Leeson, S. Dietary flaxseed and egg composition. *Poultry Science* 69, 1617-1620 (1990).
- Caston, L., Squire, E. J., & Leeson, S. Hen performance, egg quality, and sensory evaluation of eggs from SCWL hens fed dietary flax. *Canadian Journal of Animal Science*, 74, 347–353 (1994).
- Castro-González, M.I. Ácidos grasos omega 3: Beneficios y Fuentes. *Interciencia* 27(3), 128-136 (2002).
- Catalano, C.R. & Knabel, S.J. Incidence of *Salmonella* in Pennsylvania egg processing plants and destruction by high pH. *Journal of Food Protection* 57, 587-591 (1994a).
- Catalano, C.R. & Knabel, S.J. Destruction of *Salmonella enteritidis* by high pH and rapid chilling during simulated commercial egg processing. *Journal of Food Protection* 57, 592-595 (1994b).
- Causeret, D., Matringe, E., & Lorient, D. Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules. *Journal of Food Science*, 56, 1532–1536 (1991).

- Center for Disease Control and Prevention, 1990a. Salmonella Surveillance. Annual Summary 1988. CDC, Atlanta, GA.
- Center for Disease Control and Prevention, 1990b. Update: *Salmonella enteritidis* infections and shell eggs—United States. MMWR 39, 909–912.
- CDC (Centers for Disease Control). Outbreak of *Salmonella enteritidis* infections associated with consumption of raw shell eggs, 1991. MMWR 41, 369-372 (1992).
- CDC. Outbreaks of *Salmonella* serotype Enteritidis infection associated with consumption of raw shell eggs United States. 1994-1995. MMWR 1996;(45):737-742.
- CDC (Centers for Disease Control). 2006. Annual listing of foodborne disease outbreaks. Recuperado el 3 de junio de 2012 de [http://www.cdc.gov/outbreaknet/surveillance\\_data.html](http://www.cdc.gov/outbreaknet/surveillance_data.html).
- CDC (Centers for Disease Control). 2010. Investigation Update: Multistate outbreak of human *Salmonella enteritidis* infections associated with shell eggs. Recuperado el 3 de junio de 2012 de <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/>
- CDC (Centers for Disease Control). Avian Influenza. Recuperado el 1 de agosto de 2012 de <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/>
- CDC (Centers for Disease Control). H1N1 Flu (Swine Flu). Recuperado el 1 de agosto de 2012 de <http://www.cdc.gov/h1n1flu/>
- CDC (Centers for Disease Control). Seasonal influenza (flu). Recuperado el 1 de agosto de 2012 de <http://www.cdc.gov/flu/>
- CE (2006a). Comisión Europea. Gripe aviar. Vivir con el virus Influenza. Comisión Europea. I+DTinfo. Revista de la Investigación Europea. Nº 47. Enero de 2006. Recuperado el 3 de agosto de 2012 de [http://europa.eu.int/comm/research/rtdinfo/47/article\\_3429\\_es.html](http://europa.eu.int/comm/research/rtdinfo/47/article_3429_es.html)
- CE (2006b). Comisión Europea. Vaccinating poultry and other birds against Avian Influenza. MEMO/06/92 Brussels, 22 February 2006 Questions and Answers. Recuperado el 3 de agosto de 2012 de <http://europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/92&format=HTML&aged=0&langua-ge=EN&guiLanguage=en>
- CE (2006c). Questions and Answers: Measures in event of avian influenza in poultry in the EU. MEMO/06/79. Brussels, 16 February 2006. Recuperado el 3 de agosto de 2012 de <http://europa.eu.int/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/06/79>
- Secretaría de Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Boletín Epidemiológico. Recuperado el 3 de junio de 2012 de [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd\\_boletin.html](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html)
- CDC (2010). Investigation update: multistate outbreak of human *Salmonella Enteritidis* infections associated with shell eggs. Available at. <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/> Accessed 18 January 2011

- CDC (Centers for Disease Control). Avian flu [Website online]. CDC. Recuperado el 3 de agosto de 2012 de <http://www.cdc.gov/flu/avian/index.htm>.
- Chacana, P.A., Terzolo, H.R. Protection Conferred by a Live *Salmonella* Enteritidis Vaccine against Fowl Typhoid in Laying Hens. *Avian Diseases* 50, 280-283 (2006).
- Chang, P.K., Powrie, W.D. & Fennema, O. Sodium hexametaphosphate effect on the foam performance of heat treated and yolk contaminated albumen. *Food Technology* 24, 63-7 (1970).
- Chang, Y.I. & Chen, T.C. Functional and gel characteristics of liquid whole egg as affected by pH alteration. *Journal of Food Engineering*, 45, 237-241 (2000).
- Chapman, P.A., Rhodes, P. & Rylands, W. *Salmonella* typhimurium phage type 141 infections in Sheffield during 1984 and 1985: Association with hens' eggs. *Epidemiology & Infection* 101, 75-82 (1988).
- Chart H. & B. Rowe. Iron restriction and the growth of *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiology & Infection* 110, 41-47 (1993).
- Chemaly, M., Huneau-Salaun, A., Labbe, A., Houdayer, C., Petetin, I., & Fravallo, P. Isolation of *Salmonella enterica* in laying-hen flocks and assessment of eggshell contamination in France. *Journal of Food Protection* 72(10), 2071-2077 (2009).
- Chemaly, M., Toquin, M.T., LeNôtre, Y., Fravallo, P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry production in France. *Journal of Food Protection* 71 (10), 1996-2000 (2008).
- Chen, J., Clarke, R.C. & Griffiths, M.W. Use of luminescent strains of *Salmonella* Enteritidis to monitor contamination and survival in eggs. *Journal of Food Protection* 59, 915-921 (1996).
- Chen, Y., Miyata, S., Makino, S. & Moriyama, R. Molecular characterization of a germination-specific muramidase from *Clostridium perfringens* S40 spores and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology* 179, 3181-3187 (1997).
- Chernoff, R. Protein and older adults. *Journal of the American College of Nutrition* 23, 627S-630S (2004).
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA.
- Chiou, V. (2003). Isolation of IgY ( $\Delta$ Fc) Antibodies. US Patent 6608172.
- Cho, S., Jang, J.W., Jung, S.H., Lee, B.R., Oh, E., Lee, K.H. Precursor effects of citric acid and citrates on ZnO Crystal formation. *Langmuir* 25(6), 3825-3831 (2009).
- Chousalkar, K. K., Flynn, P., Sutherland, M., Roberts, J. R., & Cheetham, B. F. Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial egg shells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *International Journal of Food Microbiology* 142(1-2), 207-213 (2010).

- Chung, H.K., Rasmussen, H.M., Johnson, E.J. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *Journal of Nutrition* 134(8), 1887-1893 (2004).
- Clark, R. M., Herron, K. L., Waters, D., Fernandez, M. L. & Al, C. E. T. Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions. Hypo- and Hyperresponse to Egg Cholesterol Predicts Plasma Lutein and b-Carotene Concentrations in Men and Women. *Journal of Nutrition* 136, 601-607 (2006).
- Clavijo, R.I., Loui, C., Andersen, G.L., Riley, L.W. & Lu, S. Identification of genes associated with survival of *Salmonella entericaserovar* Enteritidis in chicken egg albumen. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1055-1064 (2006).
- Clay, C.E., Board, R.G. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens shell eggs. *Epidemiology & Infection* 106, 271-281 (1991).
- Codony, R. (2002). Composición y valor nutritivo del huevo. En: Lecciones sobre el huevo, Ed, Instituto de Estudios del Huevo. Madrid, España.
- Secretaría de Salud. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Seguridad en alimentos como mecanismo esencial del blindaje sanitario. Recuperado el 3 de junio de 2012 de [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/SINAVE/RNS2011/1\\_290811\\_SeguridadAlimentosCOFEPRIS.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/SINAVE/RNS2011/1_290811_SeguridadAlimentosCOFEPRIS.pdf)
- Cogan, T.A., Domingue, G., Lappin-Scott, H.M., Benson, C.E., Woodward, M.J. & Humphrey, T.J. Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. *International Journal of Food Microbiology* 40, 131-141 (2001).
- Cogan, T. A., & Humphrey, T. J. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. *Journal of Applied Microbiology*, 94(Suppl), 114S-119S (2003).
- Cogan, T.A., Jorgensen, F., Lappin-Scott, H.M., Benson, C.E., Woodward, M.J. & Humphrey, T.J. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiology* 150, 1063-1071 (2004).
- Cole, H. (1973). Puesta de huevos. En: H. Cole. (Ed.), Producción animal. Madrid: Acribia, pp. 427-442.
- Coleman. Oral administration of chicken yolk immunoglobulins to lower somatic cell count in the milk of lactating ruminants. US Patent 5585098 (1996).
- Collinson, S.K., Emody, L., Muller, K.H., Trust, T.J. & Kay, W.W. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Bacteriology* 173, 4773-4781 (1991).
- Comer, A.G., Anderson, G.W. & Garrard. Gamma irradiation of *Salmonella* species in frozen whole egg. *Canadian Journal of Microbiology* 9, 321 (1963).



- Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2006). La Gripe Aviara ¿Una nueva amenaza pandémica? Recuperado el 2 de agosto de 2012 de [http://www.csic.es/web/guest/buscar?p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_lifecycle=1&contentviewerservice\\_WAR\\_alfresco\\_packportlet\\_struts\\_action=%2Fcontentviewer%2Fview&p\\_p\\_id=contentviewerservice\\_WAR\\_alfresco\\_packportlet&contentviewerservice\\_WAR\\_alfresco\\_packportlet\\_nodeRef=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2Febcc3391-3f88-4595-bb87-f426cb1fcf2b&p\\_p\\_mode=view&contentType=article](http://www.csic.es/web/guest/buscar?p_p_state=maximized&p_p_lifecycle=1&contentviewerservice_WAR_alfresco_packportlet_struts_action=%2Fcontentviewer%2Fview&p_p_id=contentviewerservice_WAR_alfresco_packportlet&contentviewerservice_WAR_alfresco_packportlet_nodeRef=workspace%3A%2F%2FSpacesStore%2Febcc3391-3f88-4595-bb87-f426cb1fcf2b&p_p_mode=view&contentType=article)
- Copur, G., Camci, O., Sahinler, N. & Gul, A. The effect of propolis eggshell coatings on interior egg quality. *Arch. Geflugelkd* 72, 35-40 (2008).
- Cornu, M., Kalmokoff, M., Flandrois, J.P. Modeling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology* 73, 261–274 (2002).
- Corry, J.E.L. & Barnes, E.M. The heat resistance of salmonellae in egg albumen. *British Poultry Science* 9, 253-60 (1968).
- Cotterill, O.J. & Glauert, J. Destruction of *Salmonella oranienburg* in egg yolk containing various concentrations of salt at low temperatures. *Poultry Science* 51, 1060-1 (1972).
- Cotterill, O.J. Equivalent pasteurization temperatures to kill salmonellae in liquid egg products at various pH levels. *Poultry Science* 47, 354-65 (1968).
- Cotterill, O.J., Glauert, J., Steinhoff, S.E. & Baldwin, R.E. Hot-pack pasteurization of salted egg products. *Poultry Science* 53, 636-45 (1974).
- Coutts, J., Wilson G. Egg Quality. A Practical Approach. Roche 1990.
- Cox, N. A., Davis, B. H., Watts, A. B., & Colmer, A. R. *Salmonella* in the laying hen. 1. *Salmonella* recovery from viscera, feces and eggs following oral inoculation. *Poultry Science* 52(2), 661–666 (1973).
- Creger, C. R., Phillips, H. and Scott, J. Formation of an eggshell. *Poultry Science* 55, 1717-1723 (1976).
- Cuello, S., Vega, A. & Noda, Julia. Actualización sobre la enfermedad de Newcastle. *Revista ekletronica de Veterinaria* 12(6), 1695-7504 (2011).
- Cueto, S., Medina, S., Quintana, J.A. & Tamayo, M. 2001. Newcastle disease in México. 50th Western Poultry Disease Conference, EU.
- Cuguennec T., F. Nau, D. Molle, Y. Le Graet, & G. Brule. Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme. *Food Chemistry* 68, 29-35 (2000).
- Cummings, C.A., Relman, D.A., 2002. Microbial forensics- "cross-examining pathogens". *Science* 296, 1976-79.
- Cunningham, F.E. (1990). Egg production pasteurization. In W.J. Stadelman and O.J. Cotterill (Eds.), *Egg Science and Technology*, 3rd edn. Bringhamton, NY: Haworth Press.

- Cunningham, F.E., 1995. Egg product pasteurization. In: Stadelman, W.J., Cotterill, O. (Eds.), *Egg Science and Technology*, 4th ed, Haworth Press, p. 290.
- Cunningham, F.E. 1966. Process for pasteurizing liquid egg white. In *The Destruction of Salmonellae*, ARS 74-37, USDA Agric. Res. Serv., Albany, CA, pp. 61-5.
- Cunningham, F.E. & Lineweaver, H. Stabilization of egg-white proteins to pasteurizing temperatures above 60°C. *Food Technology* 19, 136-41 (1965).
- Cupp, O.S., Walker, D.E., Hillison, J. Agroterrorism in the US: key security challenge for the 21<sup>st</sup> century. *Biosecurity and Bioterrorism* 2, 97-105 (2004).
- Curiale, M.S., Lewus, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection* 57, 1048-1051 (1994).
- Curran-Celentano, J.M., Wenzel, A., Nicolosi, R.J., Handelman, G.J. Evaluating the influence of egg consumption as a source of macular carotenoids and the impact on serum cholesterol risk ratios. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44:E-abstract: 403 (2003).
- Curtis, P.A., Anderson, K.E. & Jones, F.T. Cryogenics gas for rapid cooling of shell eggs before packaging. *Journal of Food Protection* 58, 389-394 (1995).
- Dalton, C. B., Gregory, J., Kirk, M. D., Stafford, R. J., Givney, R., Kraa, E., et al. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. *Communicable Diseases Intelligence* 28, 211-224 (2004).
- Davalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-Gonzalez, D. & Hidalgo-Alvarez, R.A. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 11, 657-673 (2000).
- Davies, R.H. & Wray, C. Observations on disinfection regimens used on *Salmonella enteritidis* infected poultry units. *Poultry Science* 74, 638-47 (1995).
- Dawson, P.S. Control of *Salmonella* in poultry in Great Britain. *International Journal of Food Microbiology* 15, 215-17 (1992).
- Dawoud, T. M., Hererra, P., Hanning, I., Kwon, Y. M., & Ricke, S. C. In vitro invasion of laying hen ovarian follicles by *Salmonella* Enteritidis strains. *Poultry Science* 90, 1134-1137 (2011).
- De Buck, J., Van Immerseel, F., Meulemans, G., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates to chicken isthmal glandular secretions. *Veterinary Microbiology* 93, 223-233 (2003).
- De Buck, J., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poultry Science* 83, 352-358 (2004a).

- De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. Effect of type-1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteremia and reproductive tract infection in laying hens. *Avian Pathology* 33, 314–320 (2004b).
- De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology* 97, 233–245 (2004c).
- De Jong, B., Ekdahl, K. 2006. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. *BMC Public Health*, pp. 6
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, A., Uyttendaele, M., Debevere, J., & Herman, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology* 112, 253–260 (2006).
- De Souza, P.M., Fernández, A. Effects of UV-C on physicochemical quality attributes and *Salmonella* Enteritidis inactivation in liquid egg products. *Food Control* 22, 1385-1392 (2011).
- De Swaaf ME, Rijk TC, Meer P, Eggink G, Sijtsma L. Analysis of docosahexaenoic acid biosynthesis in *Cryptocodinium cohnii* by C-13 labelling and desaturase inhibitor experiments. *Journal of Biotechnology* 103(1), 21–29 (2003).
- De Swaaf, M.E., Rijk, T.C., Eggink, G. and Sijtsma, L. Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. *Progress in Industrial Microbiology* 35, 185-192 (2007).
- Defra. 2007. UK national control programme for *Salmonella* in layers (*Gallus gallus*)
- Delmas, G., Gallay, A., Espié, E., Haeghebaert, S., Pihier, N., Weill, F.X., De Valk, H., Vaillant, V., Désenclos, J.C., Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 51-52, 418-422 (2006).
- Delpech, P. Criterios que deben tenerse en cuenta para mejorar la calidad de los huevos. *L'Aviculteur* 1980.
- Desert, C., Guérin-Dubiard, C., Nau, F., Jan, G., Val, F. & Mallard, J. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4553-4561 (2001).
- Desmidt, M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., De Groot, P.A., Verlinden, M., Wijffels, R., Hinton, M., Bale, J.A. & Allen, V.M. Detection of antibodies to *Salmonella* Enteritidis in sera and yolks from experimentally and naturally infected chickens. *Veterinary Record* 138, 223–226 (1996).
- Dobbenie, D., Uyttendaele, M. & Debevere, J. Antibacterial activity of the glucose oxidase/glucose system in liquid whole egg. *Journal of Food Protection* 58, 273-9 (1995).

- Doran, J.L., Collinson, S.K., Burian, J., Sarlos, G., Todd, E.C., Munro, C.K., Kay, C.M., Banser, P.A., Peterkin, P.I. & Kay, W.W. DNABased diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2263–2273 (1993).
- Doyle, M.E., Mazzotta, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W., Scott, V.N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 64 (3), 410–429 (2001).
- Doyel, M.P. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 533-6 (1984).
- Dreesen, D.W., Barnhart, H.M., Burke, J.L., Chen, T. & Johnson, D.C. Frequency of *Salmonella enteritidis* and other salmonellae in the ceca of spent hens at time of slaughter. *Avian Diseases* 36, 247-250 (1992).
- Duchet, S.M., Mompert, F., Berthelot, F., Beaumont, C., Lechopier, P., Pardon, P. Differences in frequency, level and duration of cecal carriage between four outbreed chicken lines infected orally with *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases* 41, 559-567 (1997).
- Duguid, J.P. & North, R.A.E. Egg and *Salmonella* food-poisoning: an evaluation. *Journal of Medical Microbiology* 34, 65-72 (1991).
- Dwyer, J.H., Paul-Labrador, M.J., Fan, J., Shircore, A.M., Merz, C.N., Dwyer, K.M. Progression of carotid intima-media thickness and plasma antioxidants: the Los Angeles Atherosclerosis Study. *Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology* 24(2), 313-9 (2004).
- Dyer-Hurdon, J. N., & Nnanna, I. A. Cholesterol content and functionality of plasma and granules fractionated from egg yolk. *Journal of Food Science*, 58, 1277–1281 (1993).
- Ebel, E.D., David, M.J. & Mason, J. Occurrence of *Salmonella enteritidis* in the U.S. commercial egg industry: report of a national spent hen survey. *Avian Diseases* 36, 646-54 (1992).
- EC (2005). European Commission Regulations (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for food-stuffs.
- ECDC (2006). H5N1 "bird flu" should not stop people bathing in EU water this summer. June 2006; <http://www.ecdc.eu.int/EFSA> (2005). EFSA press release. 26th October 2005.
- Eckhardt, E.R.M., Wang, D. Q., Donovan, J. M. & Carey, M. C. Dietary sphingomyelin suppresses intestinal cholesterol absorption by decreasing thermodynamic activity of cholesterol monomers. *Gastroenterology* 122, 948–956 (2002).
- Eckner, K.F., Zottola, E.A. Potential for low temperature pasteurization of dairy fluids using membrane processing. *Journal of Food Protection* 54, 793–797 (1991).
- Economista, El. México, primer productor de huevo en el mundo. Recuperado el 2 de junio de 2012 de <http://eleconomista.com.mx/negocios/2009/10/05/mexico-primer-consumidor-huevo-mundo>

- Edel, W. Salmonella enteritidis eradication programme in poultry breeder flocks in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 171-8 (1994).
- EFSA. Opinion of the scientific panel on biological hazards on the request from the commission related to the microbiological risks on washing of table eggs. *EFSA Journal* 269, 1–39 (2005).
- EFSA. Scientific report of the Scientific Panel on Biological Hazards on “ Food as a possible source of infection with highly pathogenic avian influenza viruses for humans and other mammals”, *The EFSA Journal* 74, 1-29 (2006).
- EFSA. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *EFSA Journal* 130, 34–117 (2007a).
- EFSA. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*. *EFSA Journal* 97, 1–84 (2007b).
- EFSA. Scientific opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. *EFSA Journal* 8(4), 1546 (2010a).
- EFSA. Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 8(1), 1–368 (2010b).
- EFSA. EU summary report of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2010. *EFSA Journal* 10(3), 2597 (2012).
- Elkin, R.G. (2007) Reduction of shell egg cholesterol content. II. Review of approaches utilizing non- nutritive dietary factors or pharmacological agents and an examination of emerging strategies. *World's Poultry Science Journal* 63: In press.
- Elliot, L.E. and Brant, A.W. Effects of saline and egg shell membrane on bacterial growth. *Food Research* 22, 241-250 (1957).
- Elliott, R.P. Spoilage of shell eggs by pseudomonas. *Applied Microbiology* 2, 158-64 (1954).
- Elliott, R.P. Determination of pyoverdine, the fluorescent pigment of pseudomonas in frozen whole egg. *Applied Microbiology* 6, 247-251 (1958).
- Elliott, R.P., Straka, R.P. & Garibaldi, J.A. Polyphosphate inhibition of growth of pseudomonads from poultry meat. *Applied Microbiology* 12, 517-22 (1964).
- Elsbach, P. & Weiss, J. Role of bactericidal/permeability- increasing protein in host defence. *Current Opinion in Immunology* 10, 45–49 (1998).
- Erickson, J.P., Stamer, J.W., Hayes, M., McKenna, D. N. & VanAlstine, L.A. An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior of low pH dressing. *Journal of Food Protection* 58, 1059-64 (1995).

- Etches, R. J. The ovulatory cycle of the hen. *Critical Reviews in Poultry Biology* 2, 293–318 (1990).
- Evans, J., Davidson, J. A., Bauer, D. H. & Bandener, S. L. Distribution of proteins in fresh and stored shell eggs. *Poultry Science* 37, 81 (1958).
- Evans, W. J. Protein nutrition, exercise and aging. *Journal of the American College of Nutrition* 23, 601S–609S (2004).
- Fajardo, T.A., Anantheswaran, R.C., Puri, V.M. & Knabel, S.J. Penetration of *Salmonella enteritidis* into eggs subjected to rapid cooling. *Journal of Food Protection* 58, 473–477 (1995).
- Fantasia, M. & Filetici, E. *Salmonella enteritidis* in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 21, 7–13 (1994).
- Farewell, A., Kvint, K., Nystrom, T., *uspB*, a new *sigmaS*-regulated gene in *Escherichia coli* which is required for stationary-phase resistance to ethanol. *Journal of Bacteriology* 180, 6140–6147 (1998).
- Fearnley, E., Raupach, J., Lagala, F., & Cameron, S. *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. *International Journal of Food Microbiology* 146(3), 219–27 (2011).
- Feeney, R.E., MacDonnell, L.R. & Lorenz, F.W. High temperatures treatment of shell eggs. *Food Technology* 8, 242–245 (1954).
- Feeny, R.E. & D.A. Nagy. The antibacterial activity of the egg white protein conalbumin. *Journal of Bacteriology* 64, 629–643 (1952).
- Ferreira, M., Fernanda, A.R., Jost, O., Jost, R. Application of microfiltration to egg white depleted in ovomucin. *International Journal of Food Science & Technology* 34 (1), 27–32 (1999).
- Fichtali, J., Charter, E.A., Lo, K.V. and Nakai, S. Purification of antibodies from industrially separated egg yolk. *Journal of Food Science* 58(6), 1282–1290 (1993).
- Finch, M.J. & Blake, P.A. Food-borne outbreaks of campylobacteriosis: the U.S. experience, 1980–1982. *American Journal of Epidemiology* 122, 262–8 (1985).
- Fischer, L.M., Scarce, J.A., Mar, M.H., Blanchard, R.T., Macintosh, B.A., Busby, M.G., Zeisel, S.H. Ad libitum choline intake in healthy individuals meets or exceeds the proposed adequate intake level. *Journal of Nutrition* 135(4), 826–829 (2005).
- Flippin, R.S. & Mickelson, M.N. Use of salmonellae antagonists in fermenting egg white. I. Microbial antagonists of salmonellae. *Applied Microbiology* 8, 366–70 (1960).
- Florian, M.L.E. & Trussell, P.C. Bacterial spoilage of shell eggs IV. Identification of spoilage organism. *Food Technology* 11, 56–60 (1957).

- Floros, J.D. & Liang, H. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology* 48, 79-84 (1994).
- Foegeding, P.M. & Leasor, S.B. Heat resistance and growth of *Listeria monocytogenes* in liquid whole egg. *Journal of Food Protection* 53, 9-14 (1990).
- Foegeding, P.M. & Stanley, N.W. Growth and inactivation of microorganism isolated from ultrapasteurized egg. *Journal of Food Science* 52, 1219-23, 1227 (1987).
- Foegeding, P.M. & Stanley, N.W. *Listeria monocytogenes* F5069 thermal death times in liquid whole egg. *Journal of Food Protection* 53, 6-8 (1990).
- Foley, S. L., & Lynne, A. M. Food animal-associated Salmonella challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science* 86(14 Suppl), 173–187 (2008).
- FAO/WHO, 2002. Risk Assessment of Salmonella in Eggs and Broiler Chickens: Interpretive Summary. WHO Library, Geneva, Switzerland.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2004). A technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effects on village chickens. FAO, 2004.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Discussion paper on risk management strategies for Salmonella spp in poultry; 2003 Jan 27-Febr 1; Orlando (Florida) USA. Orlando (Florida) USA: Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Hygiene. Third-fifteenth Session. 2003:11.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Highly Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3). A significant threat to poultry production not to be underestimated. EMPRES WATCH, Vol. 26-August 2012. Rome
- Forsythe, R.H. Egg processing technology-Progress and sanitation programs. *Journal of Milk and Food Technology* 33, 64-73 (1970).
- Forsythe, R.H., Ayres, J.C. & Radlo, J.L. Factors affecting the microbiological populations of shell eggs. *Food Technology* 7, 49-56 (1953).
- Fouchier RA, Munster VJ. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Rev Sci Tech.*, 28(1), 49-58 (2009).
- Fromm, D. Permeability of the hen's egg shell. *Poultry Science* 42, 1271 (1963).
- FSA. (2006). Bird flu update. Friday 24 February 2006. The Food Standards Agency considers that avian flu does not pose a food safety risk for UK consumers. Questions and answers. [http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2005/dev/avianflu#h\\_4](http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2005/dev/avianflu#h_4)
- Fuentes, P. (2002). Calidad interna del huevo y su conservación. En: Consejo asesor del Instituto de Estudios del Huevo. (Eds.), Lecciones sobre el huevo. Madrid: Instituto de Estudios del Huevo, pp. 57-71.

- Fullerton, K. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual report of the OzFoodNet Network, 2007. *Communicable Diseases Intelligence* 32(4), 400–424 (2008).
- Gallardo, J.L. Situación actual y perspectiva de la producción de huevo para plato en México 2003. México. Recuperado del 2 de junio de 2012 de <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg>.
- Galobart J., Barroeta A. C., Cortinas L, Baucells M. D., y Codony R. Accumulation of  $\alpha$ -Tocopherol in Eggs Enriched with  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 Polyunsaturated Fatty Acids. *Poultry Science* 81, 1873–1876 (2002).
- Galuzzo, S.J., Cotterill, O.J. & Marshall, R.T. Fermentation of whole egg by heterofermentative streptococci. *Poultry Science* 53, 1575-84 (1994).
- Gálvez, J.F. y Fernández, J. (1971). La alimentación de la gallina ponedora, 2ª parte. Cátedra de Alimentación Animal. Madrid: ETSIA.
- Galyean, R.D., Cotterill, O.J. & Cunningham, F.E. Yolk inhibition of lysozyme activity in egg white. *Poultry Science* 51, 1346-53 (1972).
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews* 33(4), 718–738 (2009).
- Gantois, I., Ducatelle, R., Timbermont, L., Boyen, F., Bohez, L., Haesebrouck, F. & Van Immerseel, F. Oral immunization of laying hens with live vaccine strains of TAD *Salmonella* vacE and TAD *Salmonella* vacT reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* 24, 6250–6255 (2006).
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F. & Van Immerseel, F. The *Salmonella* Enteritidis lipopolysaccharide biosynthesis gene rfbH is required for survival in egg albumen. *Zoonoses Public Health*, DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01195.x (2008a).
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F. & Van Immerseel, F. *Salmonella* Enteritidis genes induced during oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6616–6622 (2008b).
- Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathology*, 37(4), 399–406 (2008c).
- Garibaldi, J.A. and Bayne, H.G. The effect of iron on the *Pseudomonas* spoilage of farm washed eggs. *Poultry Science*, 41, 850-853 (1962).
- Garibaldi, J.A. and Stokes, J.L. Protective role of shell membranes in bacterial spoilage of egg. *Food Research* 23, 282-90 (1958).
- Garibaldi, J.A. Factors in egg white which control growth of bacteria. *Food Research* 25, 337-44 (1960).



- Garibaldi, J.A. Acetic acid as a means of lowering the heat resistance of *Salmonella* in yolk products. *Food Technology* 22, 1031-3 (1968).
- Garibaldi, J.A., Ijichi, K. and Bayne, H.G. Effect of pH and chelating agents on the heat resistance and viability of *Salmonella typhimurium* Tm-1 and *Salmonella senftenberg* 775W in egg white. *Applied Microbiology* 17, 491-6 (1969a).
- Garibaldi J.A., Straka, R.P. and Ijichi, K. Heat resistance of *Salmonella* in various egg products. *Applied Microbiology* 17, 491-6 (1969b).
- Garibaldi, J.A. Role of microbial iron transport compounds in the bacterial spoilage of eggs. *Applied Microbiology*, 20, 558-560 (1970).
- Gast, R.K. Understanding *Salmonella enteritidis* in laying chickens: the contributions of experimental infections. *International Journal of Food Microbiology* 21, 107-16 (1994).
- Gast, R. K. & Beard, C. W. Production of *Salmonella* Enteritidis-contaminated eggs by experimentally infected hens. *Avian Diseases* 34, 438-446 (1990).
- Gast, R.K. & Beard, C.W. Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. *Journal of Food Protection* 55, 152-156 (1992).
- Gast, R.K., Holt, P.S. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poultry Science* 79, 559-563 (2000).
- Gast, R.K., Guard-Petter, J. & Holt, P.S. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Diseases* 46, 629-635 (2002).
- Gast, R.K., Guard-Petter, J. & Holt, P.S. Effect of prior serial in vivo passage on the frequency of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs from experimentally infected laying hens. *Avian Diseases* 47, 633-639 (2003).
- Gast, R.K, Guard-Bouldin, J. & Holt, P.S. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases* 48, 863-869 (2004).
- Gast, R.K. & Holt, P.S. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Diseases*, 44, 706-710 (2000a).
- Gast, R.K. & Holt, P.S. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poultry Science* 79, 559-563 (2000b).
- Gast, R.K., and P.S. Holt. Multiplication in egg yolk and survival in egg albumen of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains of phage types 4,8,13a, and 14b. *Journal of Food Protection*, 64(6), 865-868 (2001).

- Gast, R.K., Guard-Bouldin, J. & Holt, P.S. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens infected with strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg. *Avian Diseases* 49, 382–386 (2005a).
- Gast, R.K., Holt, P.S. and Murase, T. Penetration of *Salmonella* enteritidis and *Salmonella* heidelberg into egg yolks in an in vitro contamination model. *Poultry Science* 84, 621-625 (2005b).
- Gast, R. K., Guraya, R., Guard-Bouldin, J., Holt, P. S., & Moore, R. W. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* enteritidis or *Salmonella* heidelberg. *Avian Diseases*, 51(1), 40–44 (2007).
- Gast, R.K., Guraya, R., Guard-Bouldin, J. & Holt, P.S. Multiplication of *Salmonella* Enteritidis on the yolk membrane and penetration to the yolk contents at 30 degrees C in an in vitro contamination model (2008).
- Gautron, J., Hincke, M.T., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J. M., Boldicke, T. & Nys, Y. Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. *Connective Tissue Research* 42, 255–267 (2001).
- Geveke, D.J. UV inactivation of *E. coli* in liquid egg white. *Food and Bioprocess Technology* 1, 201-206 (2008).
- Ghisalberti, E.L. Propolis: A review. *Bee World*, 60, 59-84 (1979).
- Giaouris, E.D., Nychas, G.J.E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology* 23, 747-752 (2006).
- Gibbons, N.E., Fulton, C.O. and Reid, M. Dried whole egg powder. XXI. Pasteurization of liquid egg and its effect on quality of the powder. *Canadian Journal of Research, Sect. F* 24, 327-37 (1946).
- Gibbons, N.E. and Moore, R.L. Dried whole egg powder. XII. The effect of drying, storage, and cooking on the *Salmonella* content. *Canadian Journal for Research, Sect. F*, 22, 58-63 (1944).
- Gibbons, N.E., Moore, R.L. and Fulton, C.O. Dried whole egg powder XV. The growth of *Salmonella* and other organism in liquid and reconstituted egg. *Canadian Journal for Research, Sect F*, 22, 169-73 (1944).
- Giessen, A.W., Ament, A.J.H.A. and Notermans, S.H.W. Interventions strategies for *Salmonella* enteritidis in poultry flocks: a basis approach. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 145-54 (1994).
- Gil, A. y Ruiz, M. D., 2010. Huevos y ovoproductos. En: M.D. Ruiz. (Ed.), Tratado de Nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Tomo II. Madrid: Medica Panamericana, pp. 77-96.

- Gillespie, J.M. and Scott, W.J. Studies in the preservation of shell eggs. IV. Experiments in the mode of infection by bacteria. *Australian Journal of Applied Science* 1, 514-530 (1950).
- Glosnicka, R. and Kunikowska, D. The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. *International Journal of Food Microbiology*. 21, 21-30 (1994).
- Granum, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. Society for Applied Bacteriology Symp. Ser. 23, 61S-66S (1994).
- Greenway, W., Scaysbrook, T. and Whatley, F.R. The composition and plant origins of propolis. A report of work at Oxford. *Bee World* 71, 107-118 (1990).
- Greig, J. D., & Ravel, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 77-87 (2009).
- Griffin, H.D., Perry, M.M. & Gilbert, A.B. 1984. Yolk formation. Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl (Freeman BM, ed), Academic Press, London, pp. 345-378.
- Grijspeerdt, K. Modeling the penetration and growth of bacteria in eggs. *Food Control*. 12, 7-11 (2001).
- Grundy, S.M. & Denke, M.A. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 31, 1149-1172 (1990).
- Góngora-Nieto, M., Pedrow, P. D., Swanson, B. G. and Barbosa-Cánovas G.V. Energy analysis of liquid whole egg pasteurized by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering* 57, 209-16 (2003).
- Gongora-Nieto, M. M., Seignour, L., Riquet, P., Davidson, P. M., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. 2001. Nonthermal inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in liquid whole egg. In G. V. Barbosa-Canovas & H. Zhang (Eds.), *Pulsed electric fields in food processing: fundamental aspects and applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing (Chapter 13), pp. 193-210.
- González Mateos, G. Factores que influyen sobre la calidad externa e interna del huevo. Cyanamid Ibérica 1981.
- González Mateos, G. El albumen del huevo. Factores que influyen sobre la calidad y consistencia. Veterinaria en Praxis 1988.
- Goresline, H.E., Hayes, K.M., Moser, R.E., Howe, M.E. and Drewniak, E.E. Pasteurization of liquid egg under commercial conditions to eliminate *Salmonella*. US Department of Agriculture Circular No. 897 (1951).
- Goresline, H.E., Moser, R.E. and Hayes, K.M. A pilot scale study of shell egg thermostabilization. *Food Technology*, 4, 426-430 (1950).
- Greengard, O., Sentenac, A., & Mendelsohn, N. Phosvitin, the iron carrier of egg yolk. *Biochimica et Biophysica Acta*, 90, 406-407 (1964).

- Guan, J., Grenier, C. & Brooks, B.W. In vitro study of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium definitive type 104: survival in egg albumen and penetration through the vitelline membrane. *Poultry Science* 85, 1678–1681 (2006).
- Guard-Petter, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environmental Microbiology* 3, 421–430 (2001).
- Guard-Petter, J., Henzler, D.J., Rahman, M.M. & Carlson, R.W. On-farm monitoring of mouse-invasive *Salmonella* enterica serovar Enteritidis and a model for its association with the production of contaminated eggs. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1588–1593 (1997).
- Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Mollé, D., Désert, C., Croguennec, T. & Nau, F. Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3901–3910 (2006).
- Gürtler, M. & Fehlhaber, K. Growth of *Salmonella* Enteritidis in yolk from eggs laid by immunized hens. *International Journal of Food Microbiology* 90, 107–113 (2004).
- Gustavsson, N., Diez, A. and Nystrom, T. The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Molecular Microbiology*, 43, 107-117 (2002).
- Guthrie, R.K., 1992. *Salmonella*. CRC Press, Boca Raton, p. 37.
- Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., González-Andrade, M.C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública de México*, 42(6), 490-495 (2000).
- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M., Vaillant, V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull. Epidémiol. Hebdo* 23, 105-109 (2002).
- Haines, R.B. Observations on the bacterial flora of the hen's egg, with a description of new species of *Proteus* and *Pseudomonas* causing rots in eggs. *Journal of Hygiene*, 38, 338-355 (1938).
- Haines, R.B. 1939. Microbiology in the preservation of the hen's egg. G.B. Dep. Sci. Ind. Res. Food Invest. Board, Spec. Rep. 47.
- Haines, R.B. and Moran, T. Porosity of, and bacterial invasion through, the shell of the hen's egg. *Journal of Hygiene*, 40, 453-461 (1940).
- Haines, R.B., Elliott, E.M.L. and Tomlinson, A.J.H. 1947. The bacteriology of dried egg. Medical Research Council (GB.), Spec. Rep. Ser., No. 260. pp.8.
- Hall, G., Kirk, M., Becker, N., Gregory, J., Unicomb, L., Millard, G., Stafford, R.J., Lalor, K., OzFoodNet Working Group. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1257–1264 (2005).

- Hamid-Samimi, M., Swartzel, K.R., Ball, H.R. Flow behavior of liquid whole egg during thermal treatments. *Journal of Food Science* 49, 132-136 (1984).
- Hammack, T.S., Sherrod, P.S., Bruce, V.R., June, G.A., Satchell, F.B. & Andrews, W.H. Growth of Salmonella Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. *Poultry Science* 71, 373-377 (1993).
- Hammershøj, M. Effects of dietary fish oil with natural content of carotenoids on fatty acid composition, n-3 fatty acid content, yolk colour and egg quality of hen eggs. *Archiv für Geflügelkunde* 59, 189-197 (1995).
- Hammershøj, M., Larsen, L.B., Ipsen, R.H. & Qvist, K.B. Effect of hen egg production and protein composition on textural properties of egg albumen gels. *Journal of Texture Studies*, 32, 105-129(2001).
- Hammershøj, M., Prins, A. & Qvist, K.B. Influence of pH on surface properties of egg albumen solutions in relation to foaming behaviour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 859- 868 (1999).
- Hammond, R. W., Burke, W. H., & Hertelendy, F. Influence of follicular maturation on progesterone release in chicken granulosa cells in response to turkey and ovine gonadotrophins. *Biology of Reproduction* 24, 1048-1055 (1981).
- Handelman, G.J., Nightingale, Z.D., Lichtenstein, A.H., Schaefer, E.J., Blumberg, J.B. Lutein and zeaxanthin concentrations in plasma after dietary supplementation with egg yolk. *American Journal of Clinical Nutrition* 70, 247-251 (1999).
- HandiStatus II, WORLD / 2004 / Newcastle disease ANIMAL HEALTH STATUS.
- Harbrecht, D.F., Bergdoll, M.S. Staphylococcal enterotoxin B production in hard- boiled eggs. *Journal of Food Science*, 45, 307-309 (2006).
- Hargis, P. S. Modifying egg yolk cholesterol in the domestic fowl – a review. *World's Poultry Science Journal*, 44, 17-29 (1988).
- Hargis, P. S., & Van Elswyk, M. E. Manipulating the fatty acid composition of poultry meat and eggs for the health conscious consumer. *World's Poultry Science Journal*, 49, 245-264 (1993).
- Harris, E. D., Blount, J. E. and Leach, R. M., Jr. Localization of lxyloxidase in hen oviduct: implications in egg shell membrane formation and composition. *Science* 208, 55-56 (1980).
- Harry, E.G. The relationship between egg spoilage and the environment of the egg when laid. *British Poultry Science* 4, 91-100 (1963).
- Hartmann, C., Johansson, K., Strandberg, E. and Wilhelmson, M. One-generation divergent selection on large and small yolk proportions in a White Leghorn line. *British Poultry Science* 41, 280-286 (2000).

- Hartmann, C., Strandberg, E., Rydhmer, L. and Johansson, K. Genetic relations of yolk proportion and chick weight with production traits in a White Leghorn line. *British Poultry Science* 44, 186-191 (2003).
- Hartung, T.E. and Stadelman, W.J. Pseudomonas fluorescens penetration of egg shell membranes as influenced by shell porosity, age of egg, and degree of bacterial challenge. *Poultry Science* 42, 147-50 (1963).
- Hasenstein, J. R., Zhang, G., & Lamont, S. J. Analyses of Five gallinacin genes and the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis response in poultry. *Infection and immunity*, 74(6), 3375–80 (2006).
- Hasenstein, J. R. & Lamont, S. J. Chicken gallinacin gene cluster associated with Salmonella responses in advance intercross line. *Avian Diseases*, 51(2), 561-7 (2007).
- Hatha, A. A. M., Maqbool, T. K., & Kumar, S. S. Microbial quality of shrimp products of export trade produced from aquaculture shrimp. *International Journal of Food Microbiology*, 82,213–221 (2003).
- Hatta, H., Kapoor, M.P. and Juneja, L.R. (2008). Bioactive components in egg yolk. In Y. Mine (Ed.), *Egg bioscience and biotechnology* (pp. 185-238). New Jersey: John Wiley Sons Inc.
- Hawthorne, J.R. Dried albumen: removal of sugar by yeast before drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1, 199-201 (1950).
- Hawthorne, J.R. and Brooks, J. Dried egg. VIII. Removal of the sugar of egg pulp before drying. A method of improving the storage life of spray dried whole egg. *Journal of the Society of Chemical industry* 63, 232-4 (1944).
- Hayes K. C., Pronczuk A., Lindsey S., Diersen-Schade D. Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, 16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in non-human primates. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, 491–498 (1991).
- Hayes, S., Nysten, G., Smith, R., et al. Undercooked hens' eggs remain a risk factor for sporadic Salmonella enteritidis infection. *Communicable Disease and Public Health*, 2, 66–67 (1999).
- He, H., Genovese, K.J., Nisbet, D.J. & Kogut, M.H. Involvement of phosphatidylinositol-phospholipase C in immune response to Salmonella lipopolysaccharide in chicken macrophage cells (HD11). *International Immunopharmacology* 6, 1780–1787 (2006).
- Headrick, M. L., Korangy, S., Bean, N. H., Angulo, F. J., Alterkruse, S. F., Potter, M. E., et al. The epidemiology of raw milk-associated foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. *American Journal of Public Health*, 88, 1219–1221 (1998).
- Heath, J.L. and Wallace, J. Dilute acid immersion as a method of cleaning shell eggs. *Poultry Science*, 57, 149-155 (1978).

- Hegsted, D. M., McGandy, R., Myers, M. & Stare, F. J. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *American Journal of Clinical Nutrition* 17, 281-95 (1965).
- Heinitz, M. L., Ruble, R. D., Wagner, D. E., & Tatini, S. R. Incidence of Salmonella in fish and seafood. *Journal of Food Protection*, 63, 579–592 (2000).
- Helander, I.M., von Wright, A., Mattila-Sandholm, T. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 8, 146-150 (1997).
- Heller, C.L., Roberts, B.C., Amons, A.J., Smith, M.E. and Hobbs, B.C. The pasteurization of liquid whole egg and the evaluation of the baking properties of frozen whole egg. *Journal of Hygiene* 60, 135-43 (1962).
- Helms, M., Ethelberg, S., Molbak, K. International Salmonella Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases* 11, 859-867 (2005).
- Helmuth R, Schroeter A. Molecular typing methods for *S. Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 21, 69 (1994).
- Henderson, S.M. and Lorenz, F.W. 1951. Cooling and holding eggs on the ranch. Calif. Agric. Exp. Stn., Circ. No. 405, University of California, Davis.
- Hennessy, T.W., Hedberg, C.W., Slutsker, L., White, K.E., Besser- Wiek, J.M., Moen, M.E., Feldman, J., Coleman, W.W., Edmon- son, L.M., MacDonald, K.L., Osterholm, M.T. and The Investigation Team. A national outbreak of Salmonella enteritidis infections from ice cream. *The New England Journal of Medicine* 334, 1281–1286 (1996).
- Herald, T.J., Smith, D.M. Functional properties and composition of liquid whole egg proteins as influenced by pasteurization and frozen storage. *Poultry Science* 68, 1461-1469 (1989).
- Herbert, S. M., & Van Elswyk, M. E. Dietary marine algae promotes efficient deposition of n-3 fatty acids for the production of enriched shell eggs. *Poultry Science* 75, 1501–1507 (1996).
- Hermawan, N., Evrendilek, G.A., Dantzer, W.R., Zhang, Q.H., Richter, E.R. Pulsed electric field treatment of liquid whole egg inoculated with *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Food Safety* 24, 71-85 (2004).
- Herrero, A. y Romero de Avila, M. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina- Universidad de Navarra* 50, 71-74 (2006).
- Herron, K. L., & Fernandez, M. L. Are the current dietary guidelines regarding egg consumption appropriate? *The Journal of Nutrition*, 134,187-190 (2004).
- Heyndrickx, M., Pasmans, F., Ducatelle, R., Decostere, A., & Haesebrouck, F. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: The need for clarification. *Veterinary Journal*, 170(3), 275–277 (2005).

- Higgs, R., Lynn, D.J., Gaines, S., McMahon, J., Tierney, J., James, T., Lloyd, A.T., Mulcahy, G. & O'Farrelly, C. The synthetic form of a novel chicken beta-defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens. *Immunogenetics* 57, 90–98 (2005).
- Himathongkham, S., Reinmann, H. and Ernst, R. Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella enteritidis*, implications for egg testing. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 161-167 (1999).
- HPA (2010 a). Recuperado el 17 de junio de 2012 de <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Salmonella/EpidemiologicalData/>
- HPA. Increase in *Salmonella* Typhimurium DT8 in 2010 linked to duck eggs. *Health protection report*, 4 (37) (2010b).
- Ho, S. Y., Mittal, G. S., Cross, J. D., & Griffith, M. W. Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science* 60(6), 1337–1340 (1995).
- Hobbs, B.C. and Gilbert, R.J. 1978. The vehicle of infection, in *Food Poisoning and Food Hygiene*, 4<sup>th</sup> edn, Arnold, London, pp. 51-76.
- Hogue, A., Akkina, J., Angulo, F., Johnson, R., Petersen, K., Saini, P., Schlosser, W., 1997. Situation Assessment *Salmonella* Typhimurium DT104. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Washington, D.C.
- Holley, R.A. and Proulx, M. Use of egg wash water pH to prevent survival of *Salmonella* at moderate temperatures. *Poultry Science*, 65, 922-928 (1986).
- Holt, P.S., Stone, H.D., Gast, R.K. & Porter, Jr. R.E. Growth of *Salmonella* Enteritidis (SE) in egg contents from hens vaccinated with an SE bacterin. *Food Microbiology* 13, 417–426 (1996).
- Hoop, R.K. & Pospischil, A. Bacteriological, serological, histological and immunohistochemical findings in laying hens with naturally acquired *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection. *Veterinary Microbiology* 133, 391–393 (1993).
- Hopkins, P.N. Effects of dietary cholesterol on serum cholesterol: a meta-analysis and review. *American Journal of Clinical Nutrition* 55, 1060-1070 (1992).
- Hopper, S.A. and Mawer, S.L. *Salmonella* enteritidis in a commercial layer flock. *Veterinary Record* 123, 351 (1988).
- Hou, H., Singh, R.K., Muriana, P.M. and Stadelman, W.J. Pasteurization of intact shell eggs. *Food Microbiology*, 13 (2), 93-101 (1996).
- Howard, Zoe R. 2003. Invasion of avian reproductive tissues by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. Master's thesis, Texas A&M University. Texas A&M University. Available electronically from <http://hdl.handle.net/1969.1/275>.



- Howard, Z. R., Moore, R.W., Zabala-Diaz, I. B., Kim, W. K., Birkhold, S. G., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. In vitro survival and growth of Salmonella Typhimurium inoculated on yolk membrane after long term refrigerated storage of shell eggs. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 1, 30–34 (2006).
- Howard, Z. R., Moore, R. W., Zabala-Diaz, I. B., Kim, W. K., Birkhold, S. G., Byrd, J. A., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., & Ricke, S. C. Inoculation of a poultry isolate Salmonella Enteritidis on egg vitelline membrane: Survival and growth in egg components after different refrigeration storage times. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 2, 123–129 (2007).
- Howard, Z.R., Moore, R.W., Zabala-Diaz, I.B., Landers, K.L., Byrd, J.A., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., Birkhold, S.G. & Ricke, S.C. Ovarian laying hen follicular maturation and in vitro Salmonella internalization. *Veterinary Microbiology* 108, 95–100 (2005).
- Howard, Z. R., O'Bryan, C. a., Crandall, P. G. & Ricke, S. C. Salmonella Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Research International* 45, 755–764 (2012).
- Hu, F.B., Stampher, M.J., Rimm, E.B., Manson, J.E., Ascherio, A., Colditz, G.A., et al. A prospective study of egg consumption and risk of cardiovascular disease in men and women. *Journal of the American Medical Association* 281(15), 1387-1394 (1999).
- Huang, E., Mittal, G.S., Griffiths, M.W. Inactivation of Salmonella Enteritidis in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. *Biosystems Engineering* 94, 403-413 (2006).
- Hughey, V.L., and Johnson, E.A. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2165-2170 (1987).
- Hughey, V.L., Wilser, P.A. and Johnson, E.A. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *Listeria monocytogenes* Scott A in foods. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 631-638 (1989).
- Humphrey T.J. Contamination of egg shell and contents with Salmonella Enteritidis: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 21, 31-40 (1994a).
- Humphrey, T.J. 1994b. Contamination of eggs with potential human pathogens, in *Microbiology of the Avian Egg* (Eds.), R.G. Board and R. Fuller, Chapman & Hall, London, pp. 93-116.
- Humphrey T.J. 1999. Contamination of eggs and poultry meat with Salmonella enterica serovar Enteritidis. In *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: Epidemiology, pathogenesis, and control*. Saeed A.M. Ames, Iowa: Iowa State University Press, pp.183-191.
- Humphrey, T.J., Baskerville, A., Mawer, S., Rowe, B. & Hopper, S. Salmonella Enteritidis phage type 4 from contents of intact eggs: a study involving naturally infected eggs. *Epidemiology & Infection* 103, 415–423 (1989b).

- Humphrey, T.J., Chapman, P.A., Rowe, B. and Gilbert, R.J. A comparative study of the heat resistance of Salmonellas in homogenized whole egg, egg yolk or albumen. *Epidemiology & Infection* 104, 237-41 (1990).
- Humphrey, T.J., Baskerville, A., Chart, H., Rowe, B. & Whitehead, A. Salmonella Enteritidis PT4 infection in specific pathogen free hens: influence of infecting dose. *Veterinary Record* 129, 482-485 (1991b).
- Humphrey, T.J., Baskerville, A., Mawer, S., Rowe, B. & Hopper, S. Salmonella Enteritidis phage type 4 from contents of intact eggs: a study involving naturally infected eggs. *Epidemiology & Infection* 103, 415-423 (1989b).
- Humphrey, T.J., Greenwood, M., Gilbert, R.J., Rowe, B. and Chapman, P.A. The survival of Salmonellas in shell eggs cooked under simulated domestic conditions. *Epidemiology & Infection* 103, 35-45 (1989a).
- Humphrey, T.J., Richardson, N.P., Stutton, K.M. and Rowbury, R.J. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in Salmonella enteritidis phage type 4. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3120-2 (1993).
- Humphrey, T.J., Whitehead, A., Gawler, A.H.L., Henley, A. and Rowe, B. Numbers of Salmonella enteritidis in the contents of naturally contaminated hens eggs. *Epidemiology & Infection* 106, 489-96 (1991a).
- Humphrey, T.J., Baskerville, A., Chart, H., Rowe, B. & Whitehead, A. Salmonella Enteritidis PT4 infection in specific pathogen free hens: influence of infecting dose. *Veterinary Record* 129, 482-485 (1991b).
- Humphrey, T.J. & Whitehead, A. Techniques for the isolation of Salmonella from eggs. *British Poultry Science* 33, 761-768 (1992).
- Humphrey, T. J. & Whitehead, A. Egg age and the growth of Salmonella Enteritidis PT4 in egg contents. *Epidemiology & Infection*, 111, 209-219 (1993).
- Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., & Schade, R. 2007. Bioactive egg compounds. Berlin, Germany: Springer.
- Ibeh, I. N., & Izuagbe, Y. S. An analysis of the microflora of broken eggs used in confectionery products in Nigeria and the occurrence of enterotoxigenic Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 3, 71-77. (1986)
- Ibrahim, H.R., Iwamori, E., Sugimoto, Y. & Aoki, T. Identification of a distinct antimicrobial domain within the N-lobe of ovotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1401, 289-303 (1998).
- Ibrahim, E.M., Rahman, A.K.M.S., Isoda, R., Umeda, K., Sa, N.V. and Kodoma, Y. In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). *Vaccine* 17, 2073-2080 (2008).
- Ibrahim, H. R. 2000. Ovotransferrin. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Ibrahim, H.R., Thomas, U. and Pellegrini, A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization actions. *Journal of Biological Chemistry* 276, 43767-43774 (2001).
- Ijichi, K., Garibaldi, J.A., Kaufman, V.F., Hudson, C.A. and Lineweaver, H. Microbiology of a modified procedure for cooling pasteurized salt yolk. *Journal of Food Science* 38, 1241-3 (1973).
- Imai, C. Some characteristics of psychrophilic bacteria isolated from green rotten eggs. *Poultry Science* 55, 606-10 (1976).
- INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias). 2007. Reporte Anual de Investigaciones e Innovación Tecnológica 2007. Red Biotecnología. Cerdo, pollo y huevo. Recuperado el 5 de junio de 2012 de <http://www.utep.inifap.gob.mx/tecnologias/8.%20Aves/4.%20Sanidad/Desarrollo%20de%20un%20PCR%20para%20la%20detecci%C3%B3n%20de%20Salmonella%20en%20carne%20de%20cerdo,%20pollo%20y%20huevo%20para%20consumo.pdf>
- Instituto de Estudios del Huevo. 2001. España. El Huevo en la alimentación y la Salud. (en línea) España, Consultado en octubre 2004. Recuperado el 21 de junio de 2012 de <http://www.institutohuevo.com>
- Instituto de Estudios del Huevo. 2002. Lecciones sobre el huevo. Madrid. Recuperado el 18 de junio de 2012 de [http://www.institutohuevo.com/images/archivos/lecciones\\_del\\_huevo\\_completo.pdf](http://www.institutohuevo.com/images/archivos/lecciones_del_huevo_completo.pdf)
- Instituto de Estudios del Huevo. 2004. Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos. Madrid. Recuperado el 12 de junio de 2012 de [http://www.senba.es/recursos/pdf/seguridad\\_alimentaria\\_huevos\\_ovoproductos.pdf](http://www.senba.es/recursos/pdf/seguridad_alimentaria_huevos_ovoproductos.pdf).
- Instituto de Estudios del Huevo. 2007. Manejo del huevo y los ovoproductos en la cocina. Madrid. Recuperado el 12 de junio de 2012 de [http://www.inprovo.com/images/archivos/manual\\_manejo\\_del\\_huevo\\_y\\_ovoproductosn\\_en\\_la\\_cocina\\_13125246.pdf](http://www.inprovo.com/images/archivos/manual_manejo_del_huevo_y_ovoproductosn_en_la_cocina_13125246.pdf)
- Instituto de Estudios del Huevo. El huevo en la dieta del niño. Madrid. Recuperado el 7 de junio de 2012 de [http://www.institutohuevo.com/que\\_hacemos\\_material\\_divulgativo\\_folletos.asp](http://www.institutohuevo.com/que_hacemos_material_divulgativo_folletos.asp)
- Instituto de Estudios del Huevo. ¿Son necesarias las restricciones en la ingesta de huevos en la dieta hipocolesterolémica? Nuevas evidencias científicas. Madrid. Recuperado el 30. De junio de 2012 de [http://www.institutohuevo.com/que\\_hacemos\\_material\\_divulgativo\\_publicaciones.asp](http://www.institutohuevo.com/que_hacemos_material_divulgativo_publicaciones.asp)
- International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los alimentos. Nota de información INFOSAN 3/2005-Salmonella. 13 de abril de 2005.

International Egg Commission <http://internationalegg.com>

- Ishikawa, S. I., Tamaki, S., Arihara, K., & Itoh, M. Egg yolk protein and egg yolk phosphitin inhibit calcium, magnesium, and iron absorptions in rats. *Journal of Food Science*, 72(6), 412-419 (2007).
- Ito, T., Abe, Y., & Adachi, S. Comparative studies on the [alpha]-and [beta]-phosvitin from hen's egg yolk. *Journal of Food Science*, 48, 1755-1757 (1983).
- Jan, S., Brunet, N., Techer, C., Le Maréchal, C., Koné, A.Z., Grosset, N., Gillard, A., Gautier, M., Puterflam, J. and Baron, F. Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected on farm and in egg product industry. *Food microbiology* 28, 261-5 (2011).
- Jeantet, R., Baron, F., Nau, F., Roignant, M., & Brule, G. High intensity pulsed electric fields applied to egg white: effect on *Salmonella enteritidis* inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Protection* 62(12), 1381-1387 (1999).
- Jiang, Y., Noh, S.K., Koo, S.I. Egg Phosphatidylcholine Decreases the Lymphatic Absorption of Cholesterol in Rats. *Journal of Nutrition* 131, 2358-2363 (2001).
- Jiang, Z., Ahn, D.U. and Sim, J.S. Effects of feeding flax and two types of sunflower seeds on fatty acid compositions of yolk lipid classes. *Poultry Science* 70, 2467-2475 (1991).
- Jiang, Z., Ahn, D. U., Ladner, L., & Sim, J. S. Influence of feeding full-fat flax and sunflower seeds on internal and sensory qualities of eggs. *Poultry Science* 71, 378-382 (1992).
- Jin, T., Zhang, H., Boyd, G. & Tang, J. Thermal resistance of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* K12 in liquid egg determined by thermal-death-time disks. *Journal of Food Engineering* 84, 608-614 (2008).
- Jin, T., Zhang, H., Hermawan, N., Dantzer, W. Effects of pH and temperature on inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in liquid whole egg by pulsed electric fields. *International Journal of Food Science & Technology* 44, 367-372 (2009).
- Johns, C.K. and Berard, H.L. Further bacteriological studies relating to egg drying. *Scientia Agricola* 25, 551-65 (1945).
- Johns, C.K. and Berard, H.L. Effect of certain methods of handling upon the bacterial content of ditty eggs. *Scientia Agricola*, 26, 11-15 (1946).
- Johnson, A. L. 2000. Reproduction in the female. In G. C. Whittow (Ed.), *Sturkie's avian physiology* (5th edition): Academic Press.
- Johnson, E. A., Nelson, J. H., & Johnson, M. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, Part II, microbiology. *Journal of Food Protection*, 53, 519-540 (1990).
- Jones. 2000. Laboratory aspects of *Salmonella*. In C. Wray, & A. Wray (Eds.), *Salmonella in domestic animals*. CABI, pp. 393-405.

- Jones, D.R., Anderson, K.E., Curtis, P.A. & Jones, F.T. Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science* 81, 715–720 (2002).
- Jones, D.R., Musgrove, M.T. Assessment of microbial contaminants present on vacuum loaders in shell egg processing facilities. *Journal of Food Safety* 28, 346–354 (2008).
- Jones, D.R., Musgrove, M.T., Caudill, A.B., Curtis, P.A. Frequency of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* and *Enterobacteriaceae* detection in commercially cool water-washed shell eggs. *Journal of Food Safety* 26, 264–274 (2006).
- Jones, F.T., Rives, D.V. and Carey, J.B. *Salmonella* contamination in commercial eggs and an egg production facility. *Poultry Science*, 74, 753-7 (1995).
- Jones, M.A., Wigley, P., Page, K.L., Hulme, S.D. & Barrow, P.A. *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. *Infection and Immunity* 69, 5471–5476 (2001).
- Joyce, D.A. and Chaplin, N.R.C. Hygiene and hatchability of duck eggs-a field study. *Veterinary Record*, 103, 9-12 (1978).
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P., Bibek, R. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (11), 4174–4177 (1994).
- Kaplan, A.M., Solowey, M., Osborne, W.W. and Tubiash, H. Resting cell fermentation of egg white by streptococci. *Food Technology* 4, 474-7 (1950).
- Kapperud G, Stenwig H, Lassen J. Epidemiology of *Salmonella* Typhimurium 0:4-1 infection in Norway: evidence of transmission from an avian wildlife reservoir. *American Journal of Epidemiology* 147, 774-782 (1998).
- Kaufman, V.F. Detection of leaks in the regeneration section of egg pasteurizers. *Journal of Milk and Food Technology* 32, 94-8 (1969).
- Keller, L. H., Benson, C. E., Krotec, K., & Eckroade, R. J. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*, 63, 2443–2449 (1995).
- Keller, L. H., Schifferli, D. M., Benson, C. E., Aslam, S., & Eckroade, R. J. Invasion of chicken reproductive tissues and forming eggs is not unique to *Salmonella enteritidis*. *Avian Diseases*, 41(3), 535–539 (1997).
- Keys, A., Anderson, J. & Grande, F. Serum cholesterol of responses to changes in the diet: particular fatty acids in the diet. *Metabolism*, 14, 776-87 (1965).
- Khakhria, R., Duck, D. and Lior, H. Distribution of *Salmonella enteritidis* phage types in Canada. *Epidemiology & Infection*. 106, 25-32 (1991).

- Khan, S., Sung, K., Nawaz, M.S., Cerniglia, C.E., Tamplin, M.L., Phillips, R.W. and Kelley, L.C. The survivability of *Bacillus anthracis* (Sterne strain) in processed liquid eggs. *Food microbiology* 26, 123-27 (2009).
- Khan, M.A, Newton, J.A., Seaman, A. and Woodbine, M. 1975. The survival of *Listeria monocytogenes* inside and outside its host, in *Problems of Listeriosis* (Ed.), M. Woodbin. Leicester, England: Leicester University Press, pp. 75.
- Khosla P., Hayes K. C. Comparison between dietary saturated (16:0), mono-unsaturated (18:1) and polyunsaturated (18:2) fatty acids on plasma lipoprotein metabolism in cebus and rhesus monkeys fed cholesterol-free diets. *American Journal of Clinical Nutrition* 55, 51–62 (1992).
- Kijowski, J, Lesnierowski, G., Zabielski, J., Fiszer, W. and Magnuski, T. 1994. Radiation pasteurization of frozen whole egg, in *Egg Uses and Processing Technologies* (Eds.), J.S. Sim and S. Nakai. UK: CAB International, Wallingford, pp. 340-8.
- Kilara, A. and Shahani, K.M. Removal of glucose from eggs: a review. *Journal of Milk and Food Technology* 36, 509-13 (1973).
- Kilic, Z. Acar, O. Ulasan, M. Ilim, M. Determination of lead, copper, zinc, mangesium, calcium, and iron in fresh eggs by atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 76, 107-116 (2002).
- Kim, C.J., Emery, D.A., Rinke, H., Nagaraja, K.V., Halvorson, D.A. Effect of time and temperature on growth of *Salmonella enteritidis* in experimentally inoculated eggs. *Avian Diseases* 33, 735-742 (1989).
- Kim, D.K., Jang, I.K., Seo, H.C., Shin, SO., Yang, S.Y. and Kim, J.W. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against truncated fusion protein derived from WSSV. *Aquaculture* 237, 21-30 (2004).
- Kim, H.S., Cho, J.H., Park, H.W., Yoon, H., Kim, M.S. & Kim, S.C. Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta. *Journal of Immunology* 168: 2356–2364 (2002).
- Kim, S.H., No, H.K., Kim, S.D. and Prinyawiwatkul, W. Effect of plasticizer concentration and solvent types on shelf-life of eggs coated with chitosan. *Journal of Food Science* 71 (4)S349-S353 (2006).
- Kinde, H., Shivaprasad, H.L., Daft, B.M., Read, D.H., Ardans, A., Breitmeyer, R., Rajashekar, G., Nagaraja, K.V. & Gardner, I.A. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella Enteritidis*, phage type 4. *Avian Diseases* 44, 239–248 (2000).
- King, D.J. (2004). Newcastle Disease and Its Influence on the International Poultry Market. *Seminario Internacional de Patología Aviar*. Univ. De Valdivia, Chile, Sept. 2004.
- Kirkland, P.D. Virulent Newcastle disease virus in Australia: in through the 'back door'. *Australian Veterinary Journal*, 78, 331-333 (2000).

- Kline, L. and Sonoda, T.T. Role of glucose in the storage deterioration of whole egg powder. I. Removal of glucose from whole egg mélange by yeast fermentation before drying. *Food Technology* 5, 90-4 (1951).
- Kline, L., Sugihara, T.F., Bean, M.L. and Ijichi, K. Heat pasteurization of raw liquid egg white. *Food Technology* 19, 1709-18 (1965).
- Kline, L. Sugihara, T.F. and Ijichi, K. Further studies on heat pasteurization of raw liquid egg white. *Food Technology* 20, 1604-6 (1966).
- Knowles, N.R. The prevention of microbial spoilage in whole shell eggs by heat treatment methods. *Journal of Applied Bacteriology*, 16, 107-118 (1956).
- Ko, K. Y., Mendonca, A. F., & Ahn, D. U. Effect of ethylenediaminetetraacetate and lysozyme on the antimicrobial activity of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. *Poultry Science*, 87, 1649–1658 (2008).
- Ko, K. Y., Mendonca, A. F., Ismail, H., & Ahn, D. U. Ethylenediaminetetraacetate and lysozyme improves antimicrobial activities of ovotransferrin against *Escherichia coli* O157:H7. *Poultry Science*, 88, 406–414 (2009).
- Kohl, W.F. A new process for pasteurizing egg whites. *Food Technology* 25, 1176-84 (1971).
- Kollberg, H., Carlander, D., Olesen, H., Wejåker, P.E., Johannesson, M. and Larsson, A. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatric Pulmonary* 35, 433-440 (2003).
- Kollowa, J and Kollowa, C. Occurrence and survival of *Campylobacter jejuni* on the shell surface of hen eggs. *Monatsh Veterinarmed*, 44, 63-5 (1989).
- Konjufca, V.H., Pesti, G.M. and Bakalli, R.I. Modulation of cholesterol levels in broiler meat by dietary garlic and copper. *Poultry Science* 76, 1264-1271 (1997).
- Kraft, A.A., Ayres, J.C., Forsythe, R.H. and Schultz, J.R. Keeping quality of pasteurized liquid egg yolk. *Poultry Science* 46, 1282 (1967a).
- Kraft, A.A., Torrey, G.S., Ayres, J.C. and Forsythe, R.H. Factors influencing bacterial contamination of commercially produced liquid egg. *Poultry Science* 46, 1204-10 (1967b).
- Krell, R. 1996. Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin* No: 124. Food and Agriculture Organization of the United States, Rome, Italy.
- Kritchewsky, S. B. A review of scientific research and recommendations regarding eggs. *Journal of the American College of Nutrition* 23, 596S–600S (2004).
- Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., Nomura, N. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology* 26, 592-597 (2009).

- Kuda, T., Iwase, T., Yuphakhun, C., Takahashi, H., Koyanagi, T. and Kimura, B. Surfactant-disinfectant resistance of Salmonella and Staphylococcus adhered and dried on surfaces with egg compounds. *Food microbiology* 28, 920–5 (2011).
- Kuhl, H. Washing and sanitizing hatching eggs. *Int. Hatch. Prac.* 2 (3), 20-21 (1987).
- Kutchai, H. & Steen, J. B. Permeability of the shell and shell membranes of hens' eggs during development. *Respiration physiology* 11, 265–78 (1971).
- Kwon, A.S., Park, G.C., Ryu, S.Y., Lim, D.H., Lim, D.Y., Park, Y., Lim, Y., 2008. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32, 68-72.
- Laca, A., Paredes, B. and Díaz, M. A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions. *Food Hydrocolloids* 24, 434-443 (2010).
- Laird, J.M., Bartlett, F.M., McKellar, R.C. Survival of *Listeria monocytogenes* in egg wash water. *International Journal of Food Microbiology* 12, 115–122 (1991).
- Lammerding, A.M. and A, Fazil. Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 58, 147-57 (2000).
- Lancaster, J.E. and Crabb, W.E. Studies on disinfection of eggs and incubators. *British Veterinary Journal* 109, 139-48 (1953).
- Larrosa, M. et al. Colecalciferol o calcidiol ¿qué metabolito utilizar en el déficit de vitamina D? *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 16, 48–52 (2007).
- Lategan, P.M. and Vaughn, R.H. The influence of chemical additives on the heat resistance of *Salmonella typhimurium* in liquid whole egg. *Journal of Food Science* 29, 339-44 (1964).
- Latimer, H. K., Jaykus, L.-A., Morales, R. a, Cowen, P., & Crawford-Brown, D. Sensitivity analysis of *Salmonella enteritidis* levels in contaminated shell eggs using a biphasic growth model. *International Journal of Food Microbiology*, 75(1-2), 71–87 (2002).
- Lawler, F.K. Thaw frozen eggs fast. *Food Engineering* 37(8), 72, 75-6 (1965).
- Layman DK. Protein quantity and quality at levels above RDA improves adult weight loss. *Journal of the American College of Nutrition* 23(6), 631S-636S (2004).
- Layman D, Walker D. Potential importance of leucine in treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Journal of Nutrition* 136:319S-323S (2006).
- Le Denmat, M., Anton, M., & Beaumal, V. Characterisation of emulsion properties and of interface composition in oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, 14, 539–549 (2000).



- Le Denmant, M., Anton, M. and Gandemer, G. Protein denaturation and emulsifying properties of plasma and granules of egg yolk as related to heat treatment. *Journal of Food Science* 64(2), 194-197 (1999).
- Le Floch-Fouéré, C., Pezennec, S., Lechevalier, V. et al. Synergy between ovalbumin and lysozyme leads to non-additive interfacial and foaming properties of mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23, 352–365 (2009).
- Leach, S.A., Williams, A., Angela, C.D., Wilson, J., Marsh, P.D. & Humphrey, T.J. Aerosol route enhances the contamination of intact eggs and muscle of experimentally infected laying hens by *Salmonella* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* 171, 203–207 (1999).
- Leasor, S.B. and Foegeding, P.M. *Listeria* species in commercially broken raw liquid whole egg. *Journal of Food Protection* 52, 777-80 (1989).
- Leclair, K., Heggart, H., Oggel, M., Bartlerr, F.M. and McKellar, R.C. Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in simulated egg wash water. *Food Microbiology*, 11, 345-353 (1994).
- Lee, D.U., Heinz, V., Knorr, D. Evaluation of processing criteria for the high hydrostatic pressure treatment of liquid whole egg: rheological study. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie* 32 (5), 299–304 (1999).
- Lee, D.U., Heinz, V., Knorr, D. Biphasic inactivation kinetics of *Escherichia coli* in liquid whole egg by high hydrostatic pressure treatment. *Biotechnology Progress* 17, 1020–1025 (2001).
- Lee, E.N., Sunwoo, H.H., Menninen, K. and Sim, J.S. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science* 81, 632-641 (2002).
- Lee, D.U., Heinz, V., Knorr, D. Effects of combination treatments of nisin and high intensity ultrasound with high pressure on the microbial inactivation in liquid whole egg. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4, 387–393 (2003).
- LeJeune, J. T., & Rajala-Schultz, P. J. Unpasteurized milk: A continued public health threat. *Clinical Infectious Diseases*, 48, 93–100 (2009).
- Leleu, S., Herman, L., Heyndrickx, M., De Reu, K., Michiels, C.W., De Baerdemaeker, J. and Messens, W. Effects *Salmonella* shell contamination and trans-shell penetration of coating hens' eggs with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 43-48 (2011).
- Leeson S. Potential of modifying poultry products. *Journal of Applied Poultry Research* 2, 380-385 (1993).
- Lewis, N.M., Seburg, S. and Flanagan, N.L. Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poultry Science* 79, 971-974 (2000).

- Lewis, N. M., Schalch, K., & Scheideler, S. E. Serum lipid response to n-3 fatty acid enriched eggs in persons with hypercholesterolemia. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, 365–367 (2000).
- Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Estoepangestie, A.T., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Long, H.T., Hanh, N.T., Webby, R.J., Poon, L.L., Chen, H., Shorridge, K.F., Yuen, K.Y., Webster, R.G. and Peiris, J.S. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*, 430, 209-213 (2004).
- Li, W., Watari, S. & Kodama, H. Identification of glycosphingolipid binding sites for SEF21-fimbriated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken oviductal mucosa. *Veterinary Microbiology* 93, 73–78 (2003).
- Li, S., Zhang, Z., Pace, L., Lillehoj, H. & Zhang, S. Functions exerted by the virulence associated type three secretion system during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection of chicken oviduct epithelial cells and macrophages. *Avian Pathology*, in press (2009).
- Li-Chang, E.C., Y., Powrie, W.D. and Nakai, S. (1995). The chemistry of eggs and egg products. In W.J. Stadelman, & O.J. Cotterill (Eds.), *Egg science and technology* (pp.105-175). New York: Food Products Press.
- Liang, Y. & Kristinsson, H.G. Structural and foaming properties of egg albumen subjected to different pH-treatments in the presence of calcium ions. *Food Research International*, 40, 668– 678 (2007).
- Lifshitz, A., Baker, R.C. and Naylor, H.B. The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. *Journal of Food Science* 29, 94-9 (1964).
- Lineweaver, H., Palmer, H.H., Putnam, G.W., Garibaldi, J.A. and Kaufman, V.F. 1969. Egg pasteurization manual. ARS 74-48. USDA Agric. Res. Serv., Albany, California.
- Ling, A.C. and Lund, D.B. Fouling of heat transfer surfaces by solutions of egg albumen. *Journal of Food Protection* 41, 187-94 (1978).
- Lineweaver, H., Cunningham, H.E., Garibaldi, J.A. and Ijichi, K. 1967. Heat stability of egg white proteins under minimal conditions that kill salmonellae. ARS 74-39. USDA Agric. Res. Serv. Albany, California.
- Lister, S.A. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. *Veterinary Record* 123, 350-355 (1988).
- Liu, W.T., Karavolos, M.H., Bulmer, D.M., Allaoui, A., Hormaeche, R.D., Lee, J.J., Khan, C.M. Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence. *Microbial Pathogenesis* 42, 2–10 (2007).
- Lloyd, W.E. and Harriman, L.A. Method of treating egg whites. US Patent 2, 776, 214 (1957).
- Lock, J.L., and R.G. Board. Persistence of contamination of hens' egg albumen in vitro with *Salmonella* serotypes. *Epidemiology and Infection* 108, 389-396 (1992).

- Loir, Y.V., Baron, F., Gautier, M., Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* 2, 63-76 (2003).
- López-Fandiño, R., Recio, I. and Ramos, M. (2007). Egg-protein-derived peptides with antihypersensitive activity. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, & R. Schade (Eds.), *Bioactive egg compounds* (pp. 199-212). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lorenz, F.W. and Starr, P.B. Spoilage of washed eggs. I. Effects of sprayed versus static water under different washing temperatures. *Poultry Science*, 31, 204-214 (1952).
- Lorenz, F.W., Starr, P.B., Starr, M.P. and Ogasawara, F.X. The development of *Pseudomonas* spoilage in shell eggs. I. Penetration through the shell. *Food Research*, 17, 351-360 (1952).
- Lu, S., Killoran, P.B. & Riley, L.W. Association of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis YafD with resistance to chicken egg albumen. *Infection and Immunology* 71, 6734-6741 (2003).
- Lublin, A., & Sela, S. The impact of temperature during the storage of table eggs on the viability of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Virchow in the Eggs. *Poultry Science*, 87(11), 2208-2214 (2008).
- Lunestad, B. T. & Borlaug, K. Persistence of *Salmonella enterica* serovar Agona in oil for fish feed production. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 1, 73-77 (2009).
- Lyle BJ, Mares-Perlman JA, Klein B, Klein R, Greger J. Antioxidant intake and risk of incident age-related nuclear cataracts in the Beaver Dam Eye Study. *American Journal of Epidemiology* 149, 801-9 (1999).
- Ma, L., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. 1997. Inactivation of *Escherichia coli* in liquid whole eggs using pulsed electric fields technology. In G. V. Barbosa-Canovas, S. Lombardo, G. Narishman, & Martin Okos (Eds.), *Proceedings of the Fifth Conference of Food Engineering* NY: American Institute of Chemical Engineers, pp. 216-221.
- MacDonald, F., Sutherland, A.D. Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two *Listeria* enrichment broths. *Journal of Dairy Research* 61, 433-436 (1994).
- MacIndoe, R.N. Egg quality, collection and Storage. *Poultry International* 1981.
- Mancera, M.A, Vázquez, N.J, Heneidi, Z.A. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. *Técnica Pecuaria en México*, 42(2), 287-294 (2004).
- Mancera, A., Vázquez, J., Ontiveros, M.L., Duran, V., López, D. y Tenorio V. Identificación de *Salmonella Enteritidis* en huevo para consume en la Ciudad de México. *Técnica Pecuaria en México* 43(2), 229-237 (2005).

- Mancera, M.A., Vázquez, N.J., Ontiveros, C.L., Valladares, J., Tenorio, G.V. Identificación de fagotipos de *Salmonella enteritidis* en aves comerciales de México. XV Congreso Latinoamericano de Avicultura. Cancún, Q. Roo. 1997:139.
- Manfreda, G., Cevoli, C., Lucchi, A., Pasquali, F., Fabbri, A. and Franchini, A. Hot air treatment for surface decontamination of table eggs experimentally infected with *Salmonella*, *Listeria* and *Escherichia coli*. *Veterinary Research Communications*, 34 (Suppl 1), S179-S182 (2010).
- Mann, K. The chicken egg white proteome. *Proteomics* 7, 3558–3568 (2007).
- Mann, K. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. *Proteomics* 8, 2322–2332 (2008).
- Mañas, P., Pagán, R., Raso, J., Sala, F.J., Condón, S. Inactivation of *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, and *Salmonella Senftenberg* by ultrasonic waves under pressure. *Journal of Food Protection* 63 (4), 451-456 (2000).
- Mariconda, S., Wang, Q. & Harshey, R.M. A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility. *Molecular Microbiology* 60, 1590–1602 (2006).
- Marrone, B. L. & Hertelendy, F., 1983. Steroidogenesis by avian ovarian cells: effects of luteinizing hormone and substrate availability. *The American Physiological Society*. 487-493.
- Martelli, F. & Davies, R. H. *Salmonella* serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Research International* 45, 745–754 (2012).
- Martin, F. 2002. Contaminación y microbiología del huevo En: Consejo asesor del Instituto de Estudios del Huevo. (Eds.), *Lecciones sobre el huevo*. Madrid: Instituto de Estudios del Huevo, pp. 76-86.
- Martin-Belloso, O., Vega-Mercado, H., Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. Inactivation of *Escherichia coli* suspended in liquid egg using pulsed electric fields. *Journal of Food Processing Preservation* 21(3), 193–208 (1997).
- Masayama, A., Kuwana, R., Takamatsu, H., Hemmi, H., Yoshimura, T., Watabe, K. and Moriyama, R. A novel lipolytic enzyme Ycsk (LipC), located in the spore coat of *Bacillus subtilis*, is involved in spore germination. *Journal of Bacteriology* 189, 2369-2375 (2007).
- Mason, A. B., & Macgillivray, R. T. A. 2002. Transferrins. In D. Templeton (Ed.), *Molecular and cellular iron transport*. New York: Marcel Dekker, INC.
- Mason, J. *Salmonella enteritidis* control programs in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 155-69 (1994).
- Matic, S., Mihokovic, V., Katusin Razem, B. and Razem, D. The eradication of *Salmonella* in egg powder by gamma irradiation. *Journal of Food Protection* 53, 111-14 (1990).

- Mawer, S.L., Spain, G.E. and Rowe, B. Salmonella enteritidis phage type 4 and hens' egg. *Lancet* I, 280-1 (1989).
- Mayes, J.F., and M.A. Takeballie. Microbial contamination of the hen's egg: a review. *Journal of Food Protection* 46(12), 1092-1098 (1983).
- McGregor, W.C. (Ed.), 1985. *Membrane Separations in Biotechnology*. Marcel Dekker, New York.
- McKenna, R.T. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in raw liquid egg yolk. *Journal of Food Protection* 54, 816 (1991).
- McIlroy, S.G., McCracken, R.M., Neill, S.D. and O'Brien, J.J. Control, prevention and eradication of *Salmonella enteritidis* infection in broiler and broiler breeder flocks. *Veterinary Record*, 125, 545-8 (1989).
- McNeill, K., Hamilton, I.R., 2004. Effect of acid stress on the physiology of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 150, 735-742.
- McCully, K. A., Mok, C. C., & Common, R. H. Paper elec- trophoresis characterization of proteins and lipoproteins of hen's yolk. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 40, 937- 952 (1962).
- McNamara, D.J. Eggs and heart disease risk: perpetuating the misperception [letter]. *American Journal of Clinical Nutrition* 75: 333-334 (2002).
- McQuestin, O. J., Musgrove, M. T. & Tamplin, M. L. Kinetics of growth and inactivation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 in pasteurized liquid egg products. *Food Microbiology* 27, 396-402 (2010).
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625 (1999).
- Mehner, A., 1969. Fundamentos de la producción. En: A. Mehner. (Ed.), *La Gallina. Nociones de Fisiozootecnia (Fisiología, Reproducción, Etología)*. Madrid: Acribia, pp. 107-121.
- Meluzzi, A., Sirri, F., Tallarico, N., & Franchini, A. Effect of different vegetable lipid sources on the fatty acid composition of egg yolk and on hen performances. *Archiv für Geflü gelkunde*, 65, 1-7 (2001).
- Mercuri, A.J., Thompson, E., Rown, J.D. and Norris, K.H. Use of the automatic green rot detector to improve the quality of liquid egg. *Food Technology* 11, 374-7 (1957).
- Merkle, J.A. & Ball, H.R. Jr. (2000). Aqueous extraction process to selectively remove phospholipid form egg yolks. US Patent 6217926.
- Meslar, H.W. and White, H.B. Preparation of lipid-free protein extracts of egg yolk. *Analytical Biochemistry* 91(1), 75-81 (1978).

- Messens, W., Dubocage, L., Grijspeerd, K., Heyndrickx, M. & Herman, L. Growth of *Salmonella* serovars in hens' egg albumen as affected by storage prior to inoculation. *Food Microbiology* 21, 25–32 (2004).
- Messens, W., Grijspeerd, K., Herman, L., & Billet, L. A survey on institutional users of shell eggs and egg products in Flanders. *Journal of Food Safety* 22, 273–290 (2002).
- Messens, W., Grijspeerd, K., De Reu, K., De Ketelaere, B., Mertens, K., Bamelis, F., Kemps, B., De Baerdemaeker, J., Decuypere, E. & Herman, L. Eggshell penetration of various types of hens' eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Food Protection* 70, 623–628 (2007).
- Messens, W. Eggshell penetration by *Salmonella*: A review. *World's Poultry Science Journal* 61, 71–84 (2005a).
- Messens, W., Grijspeerd, K., & Herman, L. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *British Poultry Science* 46, 694–700 (2005b).
- Messens, W., Grijspeerd, K. & Herman, L. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science* 47, 554–560 (2006).
- Methner, U., Al-Shabibi, S. & Meyer, H. Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with *Salmonella* Enteritidis strains. *Journal of Veterinary Medical B* 42, 459–469 (1995).
- Michella, S.M., and Slauch, B.T. Producing and marketing a specialty egg. *Poultry Science* 79, 975–976 (2000).
- Michener, H.D. and Elliott, R.P. Minimum growth temperatures for food poisoning, fecal-indicator and psychrophilic microorganism. *Advances in Food Research* 13, 349-96 (1964).
- Mickelson, M.N. and Flippen, R.S. Use of salmonellae antagonists in fermenting egg white. II. Microbiological methods for the elimination of salmonellae from egg white. *Applied Microbiology* 8, 371-7 (1960).
- Miguel, M., López-Fandiño, R., Ramos, M. y Alexandre, A. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British Journal of Nutrition* 94, 731-737 (2005).
- Milinsk, M. C., Murakami, A. E., Gomes, S. T. M., Matsushita, M., & de Souza, N.E. Fatty acid profile of egg yolk lipids from hens fed diets rich in n-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 83, 287-292 (2003).
- Miller, W.A. Dry cleaning slightly soiled eggs versus washing to prevent penetration of spoilage bacteria. *Poultry Science*, 38, 906-910 (1959).
- Millward DJ. Macronutrient intakes as determinants of dietary protein and amino acid adequacy. *Journal of Nutrition* 134, 1588S-1596S (2004).

- Mine, Y. 2000. Avidin. In C. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton, FL: CRS Press, pp. 253–261).
- Mine, Y. and Yang, M. Recent advances in the understanding of egg allergens: basic industrial and clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 4874-4900 (2008).
- Mishu, B., Koehler, J., Lee, L.A. Rodrigue, D. Brenner, F.H., Blake, P. and Tauxe, R.V. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infections in the United States, 1985-1991. *Journal of Infectious Diseases*. 169 (3), 547-52 (1994).
- Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T. & Arakawa, A. *Salmonella Enteritidis* contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. *Avian Diseases* 41, 296–303 (1997).
- Miyamoto, T., Horie, T., Baba, E., Sasai, K., Fukata, T. & Arakawa, A. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *J Food Protect* 61, 350–353 (1998a).
- Miyamoto, T., Horie, T., Fukata, T., Sasai, K. & Baba, E. Changes in microflora of the cloaca and oviduct of hens after intracloacal or intravaginal inoculation with *Salmonella Enteritidis*. *Avian Diseases* 42, 536–544 (1998b).
- Miyamoto, T., Kitaoka, D., Withanage, G.S., Fukata, T., Sasai, K. & Baba, E. Evaluation of the efficacy of *Salmonella Enteritidis* oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. *Avian Diseases* 43, 497–505 (1999).
- Mizumoto, N., Sasai, K., Tani, H. & Baba, E. Specific adhesion and invasion of *Salmonella Enteritidis* in the vagina of laying hens. *Veterinary Microbiology* 111, 99–105 (2005).
- Moeller, S.M., Jacques, P.F., Blumberg, J.B. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *Journal of the American Collage of Nutrition* 19, 522S-527S (2000).
- Monfort, S., Gayán, E., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. Design of a combined process for the inactivation of *Salmonella Enteritidis* in liquid whole egg at 55°C. *International Journal of Food Microbiology* 145, 476-482 (2011).
- Monfort, S., Gayán, E., Raso, J., Condón, S., Álvarez, I. Evaluation of pulsed electric fields technology for liquid whole egg pasteurization. *Food Microbiology* 27 (7), 845-852 (2010a).
- Monfort, S., Gayán, E., Saldaña, G., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* by pulsed electric fields in liquid whole egg. *Innovating Food Science and Emerging Technologies* 11, 306-313 (2010b).
- Monfort, S., Saldaña, G., Condón, S., Raso, J. and Álvarez, I. Inactivation of *Salmonella* spp. in liquid whole egg using pulsed electric fields, heat, and additives. *Food microbiology* 30, 393–9 (2012).

- Moore, J. and Madden, R.H. Detection and incidence of *Listeria* species in blended raw egg. *Journal of Food Protection* 56, 652-4, 660 (1993).
- Moran, T., and M.P. Hale. Physics of the hen's egg. *Journal of Experimental Biology* 13, 35-40 (1936).
- Morse, D.L., Birkhead, G.S., Guardino, J., Kondracki, S.F. and Guzewich, J.J. Outbreak and sporadic egg associated cases of *Salmonella enteritidis*: New York's experience. *American Journal of Public Health*. 859-860 (1994).
- Mukhopadhyay, S., Tomasula, P.M., Van Hekken, D.L., Luchansky, J.B., Call, J.E., Porto- Fett, A.C.S. Effectiveness of cross-flow microfiltration for removal of microorganisms associated with unpasteurized liquid egg white. *Journal of Food Science* 74 (6), 319–327 (2009).
- Mukhopadhyay, S., Tomasula, P. M., Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. & Call, J. E. Removal of *Salmonella Enteritidis* from commercial unpasteurized liquid egg white using pilot scale cross flow tangential microfiltration. *International journal of food microbiology* 142, 309–17 (2010).
- Mulder, R.W.A.W. and Bolder, N.M. Removal of glucose from egg white products by *Lactobacillus* strains. *Arch. Geflügelk.* 52, 251-4 (1988).
- Mulder, R.W.A.W. and Van der Hulst, M.C. The microflora of liquid whole egg made from incubator reject eggs. *Journal of Applied Bacteriology* 36, 157-63 (1973).
- Murase, T., Fujimoto, K., Nakayama, R. & Otsuki, K. Multiplication and motility of *Salmonella enterica* serovars *Enteritidis*, *Infantis*, and *Montevideo* in in vitro contamination models of eggs. *Journal of Food Protection* 69, 1012–1016 (2006).
- Murdock, C.R., Crossley, E.L., Robb, R., Smith, M.E. and Hobbs, B.C. The pasteurization of liquid whole egg. *Monthly Bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Service* 19, 134-52 (1960).
- Muriana, P.M., HuiYing, H., Singh, R.K. A flow-injection system for studying heat inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg. *Journal of Food Protection* 59, 121–126 1996.
- Myers KP, Olsen CW, Gray GC. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clinical Infectious Diseases*, 44(8), 1084-8 (2007).
- Myint, M.S., Johnson, Y.J., Tablante, N.L. and Heckert, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology* 23, 599-604 (2006).
- Naber, E.C. The effect of nutrition on the composition of eggs. *Poultry Science*, 58, 518–528 (1979).
- Naber, E.C. Cholesterol content of eggs: Can and should it be changed? *Feedstuffs* 62(5): 1, 47, 50-52 (1990).



- Nagaset, H., & Harris, E. D. Ovostatin : A Novel Proteinase Inhibitor from Chicken Egg White, *Journal of Biological Chemistry*, 258(12), 7490–7498 (1983).
- Nakamura Y, Iso H, Kita Y, et al. Egg consumption, serum total cholesterol concentrations and coronary heart disease incidence: Japan Public Health Center-based prospective study. *British Journal of Nutrition* 96, 921-8 (2006).
- Narvaiz, P., Lescano, G. and Kairiyama, E. Physiochemical and sensory analyses on eggpowder irradiated to inactivate Salmonella and reduce microbial load. *Journal of Food Safety* 12, 263-82 (1992).
- Nascimento, V.P., Cranstoun, S. & Solomon, S.E. Relationship between shell structure and movement of Salmonella Enteritidis across the eggshell wall. *British Poultry Science* 33, 37–48 (1992).
- Nascimento, V.P. and Solomon, S.E. The transfer of bacteria (Salmonella enteritidis) across the eggshell wall of eggs classified as poor quality. *Animal Technology* 42, 157-65 (1991).
- Natoli S, Markovic T, Lim D, Noakes M, Kostner K. Unscrambling the research: Eggs, serum cholesterol and coronary heart disease. *Nutrition and Dietetics* 64, 105-111 (2007).
- Naviglio, D., Gallo, M., Le Grottaglie, L., Scala, C., Ferrara, L. and Santini, A. Determination of cholesterol in Italian chicken eggs. *Food Chemistry* 132, 701–708 (2012).
- Neill, S. D., Campbell, J. N., & O'Brien, J. J. Egg penetration by *Campylobacter jejuni*. *Avian Pathology*, 14(3), 313–320 (1985).
- Niewiarowicz, A., Trojan, M. and Zielinska, T. Removal of glucose from raw egg white with the aid of enzyme containing yeast extract. *Przem. Spozyw.* 21, 15-17 (1967).
- Nitcheva, L., Yonkova, V., Popov, V. and Manev, C. Listeria isolation from food of animal origin. *Acta Microbiologica Hungarica* 37, 223-5 (1990).
- Nitsan Z, Mokadi S, Sukenik A. Enrichment o poultry products with 3 fatty acids by dietary supplementation with the alga *Nannochloropsis* and Matur oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 5127-5132 (1999).
- Ng, H. 1699. Heat sensitivity of 300 Salmonella isolates, in *The Destruction of Salmonellae*, ARS 74-37. USDA Agric. Res. Serv. Albany, California, pp. 39-41.
- Secretaría de Salud. Norma Mexicana NMX-FF-079-1991, Productos avícolas. Huevo fresco de gallina. Especificaciones. *Diario Oficial de la Federación*. México, D.F.
- Noble RC, Cochi M. Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Progress in Lipid Research* 29, 107-140 (1990).
- Noh, S. K. & Koo, S. I. Egg sphingomyelin lowers the lymphatic absorption of cholesterol and  $\alpha$ -tocopherol in rats. *Journal of Nutrition* 133, 3571–3576 (2003).

- Noh, S. K. & Koo, S. I. Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *Journal of Nutrition*, 134, 2611-2616 (2004).
- Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996, Bienes y Servicios. Huevo, sus productos y derivados. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- Notermans, S., Soentoro, P.S., Bolder, N.M., Mulder, R.W. Adaptation of *Listeria* in liquid egg containing sucrose resulting in survival and outgrowth. *International Journal of Food Microbiology* 13 (1), 55-61 (1991).
- North M.O. 1978. Commercial chicken production manual. AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut.
- North, M. y Bell, D., 1993. Formación del huevo. En: M. North y D. Bell. (Eds.), *Manual de producción avícola*. México: El Manual Moderno, pp. 27-39.
- North, M.D., Wieggersma, N. and Van Schothorst, M. Pasteurization of dried egg white by high temperature storage. *Journal of Food Technology*, 13, 25-30 (1978).
- Northolt, M.D., Wieggersma, N. and Van Schothorst, M. Pasteurization of dried egg white by high temperature storage. *Journal of Food Technology* 13, 25-30 (1978).
- Novak, J.S. and Yuan, J.T.C. Increased inactivation of ozone-treated *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores on fabricated beef surfaces using mild heat. *Journal of Food Protection*, 67, 342-346 (2004).
- Nyberg, L., Duan, R. & Nilsson, A. A mutual inhibitory effect on absorption of sphingomyelin and cholesterol. *Journal of Nutritional Biochemistry* 11, 244-249 (2000).
- Nystrom, T., Neidhardt, F.C., Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 6, 3187-3198 (1992).
- O'Brien, J.D.P. Aspects of *Salmonella enteritidis* control in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 46, 119-24 (1990).
- Ochman, H., Lawrence, J.G., Groisman, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405, 299-304 (2000).
- Ohashi, H., Subedi, M., Nishibori, M., Isobe, N. & Yoshimura, Y. Expressions of antimicrobial peptide gallinacin-1, -2 and -3 mRNAs in the oviduct of laying hens. *Journal of Poultry Science* 42, 337-345 (2005).
- Ohkochi, M., Nakazawa, M., Sashihara, N. Detection of *Listeria monocytogenes* in commercially broken unpasteurized liquid egg in Japan. *Journal of Food Protection* 72 (1), 178-181 (2009).
- Ohshima, T., Sato, K., Terauchi, H., & Sato, M. Physical and chemical modifications of high-voltage pulse sterilization. *Journal of Electrostatics* 42, 159-166 (1997).

- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P. & Slotte, J. P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* 41, 66–97 (2002).
- OIE (2002). OIE. Highly pathogenic avian influenza. Recuperado el 4 de agosto de 2012 de [http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a\\_A150.htm](http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/a_A150.htm)
- OIE (2006). Draft from OIE. Appendix 3.6.X.
- Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., & Baba, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*, 45(1), 61–69 (2001a).
- Okamura, M., Miyamoto, T., Kamijima, Y., Tani, H., Sasai, K., & Baba, E. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between *Salmonella* enteritidis and other *Salmonella* serovars. *Avian Diseases*, 45(4), 962–971 (2001b).
- Okamura, M., Sonobe, M., Obara, S., Kubo, T., Nagai, T., Noguchi, M., et al. Potential egg contamination by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 following experimental infection of pullets at the onset of lay. *Poultry Science*, 89(8), 1629–1634 (2010).
- Okubo, T., Akachi, S., & Hatta, H., 1997. Structure of hen eggs and physiology of egg laying. In: T. Yamamoto, L. R. Juneja, H. Hatta, y M. Kim (Eds.), *Hen eggs, their basic and applied science*. New York: CRC Press, Inc., pp. 1-12.
- O'Leary, J. and F.F. Busta. Effect of food components on growth of *Bacillus sterothermophilus*. *Journal of Food Science* 39, 1157-1160 (1974).
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 10, 932–935 (2005).
- OMS (Organización Mundial de la Salud). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2002. Evaluaciones de riesgos de *Salmonella* en huevos y pollo. Recuperado el 24 de junio de 2012 de [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra1\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra1_sp.pdf)
- OMS (2004). OMS. Gripe Aviar. Nota descriptiva. 15 enero 2004. Recuperado el 7 de agosto de 2012 de [http://www.who.int/csr/don/2004\\_01\\_15/es/index.html](http://www.who.int/csr/don/2004_01_15/es/index.html)
- OMS (2005). OMS. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Brotes de gripe aviar por virus H5N1 hiperpatógenos en personas y aves de corral: efectos en cuanto a la inocuidad de los alimentos. Nota de información INFOSAN N° 7/2005 (Rev. 1, 5 de diciembre)- Gripe aviar. Recuperado el 24 de junio de 2012 de [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_07\\_AI\\_Nov05\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_07_AI_Nov05_sp.pdf)
- OMS (2006). WHO. Review of latest available evidence on risks to human health through potential transmission of avian influenza (H5N1) through water and sewage.

Recuperado el 24 de junio de 2012 de [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/avianflu/en/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/avianflu/en/index.html).

- Ontiveros, C.L., Mancera, M.A., Vázquez, N.J., Tenorio, G.V. Determinación de la existencia de plásmidos en aislamientos de *Salmonella enteritidis* (fagotipos 4 y 8) y su análisis en la resistencia antimicrobiana. *Técnica Pecuaria en México*, 42(3), 325-332 (2004).
- Ortega, R.M. El huevo en la alimentación. Importancia nutricional y sanitaria. Instituto de Estudios del Huevo (2002). Recuperado el 10 de junio de 2012 de [http://www.institutohuevo.com/images/archivos/el\\_huevo\\_en\\_la\\_alimentacion.\\_rosa\\_ortega08\\_13135645.pdf](http://www.institutohuevo.com/images/archivos/el_huevo_en_la_alimentacion._rosa_ortega08_13135645.pdf)
- Osborne, W.W., Straka, R.P. and Lineweaver, H. Heat resistance of strains of *Salmonella* in liquid whole egg, egg yolk, and egg white. *Food Research* 19, 451-65 (1954).
- Otani, H., K.Matsumoto, A. Saeki, and A. Hosono. Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technology* 24, 152-158 (1991).
- Ovejero, Ismael. La calidad del huevo para consumo: Factores que la afectan. II Jornadas Técnicas Avicultura. Palencia 1995.
- Overfield, N. Fisiología de la ovoposición, influencia sobre las anomalías internas y externas del huevo. 1992.
- Padron, M.N. *Salmonella Typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Diseases* 34, 463-465 (1990).
- Palmer, S., Parry, S., Perry, D., Smith, R., Evans, M., Nehaul, L., et al. The role of out-breaks in developing food safety policy: population based surveillance of *Salmonella* outbreaks in Wales 1986-98. *Epidemiology and Infection*, 125, 167-472 (2000).
- Palumbo, M.S., Beers, S.M., Bhaduri, S. and Palumbo, S.A. Thermal resistance of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in liquid egg yolk and egg yolk products. *Journal of Food Protection* 58, 960-6 (1995).
- Palumbo, M.S., Beers, S.M., Bhaduri, S. and Palumbo, S.A. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. and in liquid egg white. *Journal of Food Protection* 59, 1182-6 (1996).
- Papadopoulou, C., Dimitriou, D., Levidiotou, S., et al. Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used antibiotics: is there a health hazard for consumers? *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, 20, 35-40 (1997).
- Parker, C.T., Harmon, B. & Guard-Petter, J. Mitigation of avian reproductive tract function by *Salmonella Enteritidis* producing high-molecular-mass lipopolysaccharide. *Environmental Microbiology* 4, 538-545 (2002).

- Parra, M., Durango, J., Mattar, S. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *Revista MVZ (Córdoba)* 7(2), 187-200 (2002).
- Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current Opinion in Microbiology* 11, 560-566 (2008).
- Pasquali, F., Fabbri, A., Cevoli, C., Manfreda, G. and Franchini, A. Hot air treatment for surface decontamination of table eggs. *Food Control*, 21, 431-435 (2010).
- Patrick, M.E., Adcock, P.M., Gomez, T.M., Altekruse, S.F., Holland, B.H. & Tauxe, R.V. Salmonella Enteritidis infections, United States, 1985–1999. *Emerging Infectious Diseases* 10, 1–7 (2004).
- Paul, P., Symonds, H., Varozza, A. and Stewart, G.F. Effect of glucose removal on storage stability of egg yolk solids. *Food Technology* 11, 494-8 (1957).
- Payne, J., Gooch, J.E.T. and Barnes, E.M. Heat-resistant bacteria in pasteurized whole egg. *Journal of Applied Bacteriology* 46, 601-13 (1979).
- Pedersen, J.C.; Senne, D.A.; Woolcock, P.R.; Kinde, H.; King, D.J.; Wise, M.G.; Panigraphy, B. and Seal, B.S. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2329-2334 (2004).
- Peng, P.S., Tsai, W.C., Chou, C.C., 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 65, 105-111.
- Penniston, V.A. and Hedrick, L.R. The reduction of bacterial count in egg pulp by use of germicides in washing dirty eggs. *Food Technology* 1, 240-4 (1947).
- Perales, I. and Audicana, A. The role of hens eggs in outbreaks of salmonellosis in North Spain. *International Journal of Food Microbiology* 8, 175-80 (1989).
- Peralta, R.C., H. Yokoyama, Y. Ikemori, M. Kuroki, and Y. Kodama. Passive immunization against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Medical Microbiology* 41, 29–35 (1994).
- Perez, J., Tello, O., Mata, M. and Fuente, J. 1989. Foodborne infections and intoxications-Outbreaks evolution in Spain: 1976-1984. *Proc. 2<sup>nd</sup> World Congress Foodborne Infections and Intoxications*. Berlin (West), pp. 104-109.
- Periago, M.J. Practica: Higiene, inspección y control de huevos de consume. En *Protocolos control de calidad de huevos*. Universidad de Murcia. Recuperado el 4 de julio de 2012 de <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/higiene-inspeccion-y-control-alimentario-1/practicas-1/protocolos-control-de-calidad-huevos.pdf>
- Perry, J.J., Rodriguez-Romo, L.A. and Yousef, A.E. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in shell eggs by sequential application of heat and ozone. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 620-625 (2008).

- Petrović, M., Gačić, M., Karačić, V., Gottstein, Z., Mazija, H. and Medić, H. Enrichment of eggs in n-3 polyunsaturated fatty acids by feeding hens with different amount of linseed oil in diet. *Food Chemistry* 135, 1563–1568 (2012).
- Philbrook, F.R., MacCready, R., Van Roekel, H., Anderson, E.S., Smyser, C.F., Sanen, F.J., and Groton, W.M. Salmonellosis spread by a dietary supplement of avian source. *The New England Journal of Medicine*, 263, 713-718 (1960).
- Pieskus, J., Milius, J., Michalskiene, I., Zagrebneviene, G. The distribution of *Salmonella* serovars in chicken and humans in Lithuania. *Journal of Veterinary Medicine Series A Physiology Pathology Clinical Medicine* 53, 12–16 (2006).
- Pile, J.C., Malone, J.D., Eitzen, E.M., Friedlander, A.M. Anthrax as a potential biological warfare agent. *Archives of International Medicine* 158, 429-434 (1998).
- Pina-Perez, Silva-Angulo, Rodrigo, Martinez-Lopez. Synergistic effect of pulsed electric fields and CocomOX 12% on the inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. *International Journal of Food Microbiology* 130 (3), 196-204 (2009).
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., Mor-Mur, M. Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology* 16, 357-365 (1999).
- Popoff MY, Bockemuhl J, Gheesling LL. Supplement 2001 (No. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 154, 173-174 (2003).
- Poppe, C., Irwin, R.J., Forsberg, C.M., Clarke, R.C. and Oggel, J. The prevalence of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* spp. among Canadian registered commercial layer flocks. *Epidemiology & Infection*, 106, 259-76 (1991).
- Poppe, C., Johnson, R. P., Forsberg, C. M., & Irwin, R. J. *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56(3), 226–232 (1992).
- Poppe, C., Ziebell, K., Martin, L., Allen, K. Diversity in antimicrobial resistance and other characteristics among *Salmonella Typhimurium* DT104 isolates. *Microb. Drug Res. Mech. Epidemiol. Dis.* 8, 107-122 (2002).
- Powers, J.J. 1964. Action of anthocyanins and related compounds on bacterial cells. In *Proc. Fourth Int. Sym. Food Microbiology*. N. Molin (Ed.), Goteborg, Sweden, pp. 59-75.
- Protais, J. Variación en la calidad interna de los huevos según la temperatura del almacenaje. *Bul. Ploufragan* 1981.
- Proteína Animal. Disponible en: <http://www.proan.com.mx/>
- Pyörälä, K. Dietary cholesterol in relation to plasma cholesterol and coronary heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 45, 1176-1184 (1987).

- Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G., Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *C. R. Food Sci.* 36 (6), 603–627 (1996).
- Qin, B.L., Pothakamury, U.R., Vega, H., Martin, O., Barbosa- Cánovas, G.V., Swanson, B.G. Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields. *Food Technology* 12, 57–59 (1995).
- Quarles, C.L., Gentry, R.F. and Bressler, G.O. Bacterial contamination in poultry houses and its relationship to egg hatchability. *Poultry Science*, 49, 60-6 (1970).
- Qureshi AI, Suri FK, Ahmed S, Nasar A, Divani AA, Kirmani JF. Regular egg consumption does not increase the risk of stroke and cardiovascular diseases. *Medical Science Monitor* 13:CR1-8 (2007).
- Raafat, D. and Sahl, H.G. Chitosan and its antimicrobial potential- a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2, 186-201 (2009).
- Rabsch, W., Andrews, H. L., Kingsley, R. A., Prager, R., Tschape, H., Adams, L. G., et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infection and Immunity*, 70(5), 2249–2255 (2002).
- Radkowski, M. Effect of moisture and temperature on survival of *Salmonella Enteritidis* on shell eggs. *Archiv fur Geflügelkd* 66, 119–123 (2002).
- Rahn, H., Christensen, V.L. and Edens, F.W. Changes in shell conductance, pores and physical dimensions of egg and shell during the first breeding cycle of turkey hens. *Poultry Science* 60, 2536-41 (1981).
- Ramírez, J., Añorve, J., Contreras, E., Jaime, J. y Castañeda O. Incorporación de ácidos grasos omega 3 en huevo de gallinas ponedoras a través de la suplementación con aceite de hígado de bacalao. Universidad Nacional Autónoma del Estado de Hidalgo, Área Académica de Química. (2011).
- Raspoet, R., Gantois, I., Devloo, R., Martel, a, Haesebrouck, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., et al. *Salmonella Enteritidis* universal stress protein (*usp*) gene expression is stimulated by egg white and supports oviduct colonization and egg contamination in laying hens. *Veterinary Microbiology*, 153(1-2), 186–90 (2011).
- Reiber, M.A., Conner, D.E. & Bilgili, S.F. *Salmonella* colonization and shedding patterns of hens inoculated via semen. *Avian Diseases* 39, 317–322 (1995).
- Reilly, P. J. A., & Twiddy, D. R. *Salmonella* and *Vibrio cholera* in brackishwater cultured tropical prawns. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 293–301 (1992).
- Reznik, D. and Knipper, A. 1994. Method of electroheating liquid egg and product thereof. US Patent 5, 290, 583, March 1, 1994.
- Ribaya-Mercado JD, Blumberg JB. Lutein and zeaxanthin and their potential roles in disease prevention. *Journal of the American Collage of Nutrition* 23, 567S-587S (2004).

- Ribera, J.M. Huevo y Salud: nuevas evidencias científicas 2003-2006. Consumo de proteínas, ejercicio y envejecimiento. Instituto de Estudios del Huevo 25-31 (2006).
- Ricke, S. C., Birkhold, S. G., & Gast, R. K. 2001. Eggs and egg products. In F. P. Downes, & K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 473–482). Washington, D.D.: American Public Health Association.
- Ridgway, N. D. Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1484, 129–141 (2000).
- Rincón, D., Ramírez, R. y Vargas, J. Transmisión de Salmonella entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Salud UIS*, 43 (2), 167-177 (2011).
- Rivoal, K., Protais, J., Quéguiner, S., Boscher, E., Chidaine, B., Rose, V., Gautier, N., Ermel, G., Salvat, G. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of Salmonella serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology* 129, 180-186 (2009).
- Rivoal, K., Quéguiner, S., Boscher, E., Bougeard, S., Ermel, G., Salvat, G., Federighi, M., Jugiau, F. and Protais, J. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE. *International journal of food microbiology* 138, 56–62 (2010).
- Rizk, S.S., Ayres, J.C. and Kraft, A.A. Effect of holding condition on the development of salmonellae in artificially inoculated hens' eggs. *Poultry Science* 45, 823-9 (1966).
- Roberts, D. Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970–1979. *Journal of Hygiene*, 89, 491–498 (1983).
- Roberts, J. R., & Brackpool, C. E. The ultrastructure of the avian egg shells. *Poultry Science Reviews*, 5, 245–272 (1994).
- Roberts, T., Ahl, A. and McDowell, R. 1995. Risk assessment for foodborne microbial hazards, In: T. Robert. H. Jensen and I. Unnevehr, (Eds.), *Tracking Foodborne Pathogens from Farm to Table: Data Needs to Evaluate Control Options*. U.S. Dept. Agriculture, Economic Research Service, Food and Consumer Economics Division, Miscellaneous Pub. No. 1532. Washington, D.C., pp. 95-115.
- Rodriguez, D.C, Tauxe, R.V. and Rowe, B. International increase in Salmonella enteritidis: a new pandemic? *Epidemiology & Infection* 105, 21-27 (1990).
- Rodriguez-Romo, L.A. and Yousef, A.E. Inactivation of Salmonella enterica serovar Enteritidis in shell eggs by ozone and UV radiation. *Journal of Food Protection*, 68, 711-717 (2004).
- Rodriguez-Romo, L.A., Vurma, M., Lee, K. and Yousef, A.E. Research note: penetration of ozone gas across the Shell of hen eggs. *Ozone Science & Engineering*, 29, 147-150 (2007).



- Rogers, A.B., Sebring, M. and Kline, R.W. 1966. Hydrogen peroxide pasteurization process for egg white, in *The Destruction of Salmonellae*, ARS 74-37. USDA Agric. Res. Serv. Albany, California, pp. 68-72.
- Romanoff, A.L., and A.J. Romanoff. 1949. *The avian egg*. Wiley and Sons, New York.
- Rose, J.B., Haas, C.N. and Gerba, C.P. 1996. Linking microbial criteria for foods with quantitative risk assessment. In: J. J. Sheridan, R.L. Buchanan and T.J. Montville. (Eds.), *HACCP: An integrated approach to assuring the microbiological safety of meat and poultry*. Food Nutrition Press, Trum- bull, CT., pp. 159-170.
- Rosser, F.T. Preservation of eggs. II. Surface contamination on egg shell in relation to spoilage. *Can. J. Res. D.* 20, 29-6 (1942).
- Rudel, L.L., Haines, J.L. & Sawyer, J.K. Effects on plasma lipoproteins of monounsaturated, saturated and polyunsaturated fatty acids in the diet of African green monkeys. *Journal of Lipid Research* 31, 1873-82 (1990).
- Rudra, J.S., Dave, K. and Haynie, D.T. Antimicrobial polypeptide multilayer nanocoatings. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 17, 1301-1315.
- Ruiz Pérez, Lidio. *Huevo. Calidad del huevo fresco, factores que le afectan, defectos y roturas; forma de evitarlo*. Nanta 1977.
- Ruy, J.H., Beuchat, L.R., Formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *Journal of Food Protection* 68, 2614-2622 (2005).
- Saari, A., Powrie, W. D., & Fennema, O. Isolation and characterization of low-density lipoproteins in native egg yolk plasma. *Journal of Food Science*, 29, 307-315 (1964).
- Saeed, A.M., Koons, C.W. Growth and heat resistance of *Salmonella Enteritidis* in refrigerated and abused eggs. *Journal of Food Protection* 56, 927-931 (1993).
- Sagoo, S., Board, R. and Roller, S. Chitosan inhibits growth of spoilage microorganism in chilled pork products. *Food Microbiology*, 19 (2-3), 175-182 (2002).
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. and Kamat M.Y. The Carotenoid Pigment Zeaxanthin A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7, 29-49 (2008).
- Sandstrom B, Kivisto B, Cederblad A. Absorption of zinc from soy protein meals in humans. *Nutrition* 117, 321-327 (1987).
- Santomá Boixeda, G. *Influencia de la nutrición sobre la calidad del huevo. 2ª Calidad interna del huevo*. 1993.
- Sastre, A. *Huevo y Salud: nuevas evidencias científicas 2003-2006. Proteína y adultos mayores*. Instituto de Estudios del Huevo 33-39 (2006).

- Sastre, A. Ortega, R. Tortuero, F. y et al. Lecciones sobre el huevo. Madrid. Instituto de Estudios del HUEVO, 2002.
- Sauter, E.A. and Peterson, C.F. The effect of egg shell quality on penetration by *Pseudomonas fluorescens*. *Poultry Science* 48, 1525-8 (1969).
- Sauter, E.A. and Peterson, C.F. The effect of egg shell quality on penetration by various salmonellae. *Poultry Science* 53, 2159-62 (1969).
- Sauter, E.A., Peterson, C.F. and Lampman, C.E. The effectiveness of various sanitizing agents in the reduction of green rot spoilage in washed eggs. *Poultry Science*, 41, 468-473 (1962).
- Sauter, E.A. & Petersen, C.F. The effect of eggshell quality on penetration by various *Salmonellae*. *Poultry Science* 53, 2159-2162 (1974).
- Sauveur, B. *Reproduction des volaille et production d'oeuf*. INRA 1988.
- Sauveur, B. y De Reviere, M., 1991. Reproducción: Formación del Huevo. En: B. Sauveurs y M. De Reviere. (Eds.), *Reproducción de las aves*. Madrid: Mundi- Prensa, pp. 36-77.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. -A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffen, P. M. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15 (2011).
- Schaffner, D.F., Hamdy, M.K., Toledo, R.T. and Tift, M.L. *Salmonella* inactivation in liquid egg by thermoradiation. *Journal of Food Science* 54, 902-5 (1989).
- Scheideler, S.E. and Froning, G.W. The combined influence of dietary flaxseed variety, level, form, and storage conditions on egg production and composition among vitamin E-supplemented hens. *Poultry Science* 75, 1221-1226 (1996).
- Schiemann, D.A. & Montgomery, A.L. Immune response in chickens against *Salmonella* Typhimurium monitored with egg antibodies. *Veterinary Microbiology* 27, 295-308 (1991).
- Schmid, H., Burnens, A. P., Baumgartner, A., & Oberreich, J. Risk factors for sporadic salmonellosis in Switzerland. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 15, 725-732 (1996).
- Schmidt, J.O. 1997. Bee products: Chemical composition and application. In *Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy*. A. Mizrahi and Y. Lensky. (Eds.), Plenum Press. New York, NY, pp. 15-26.
- Schoeni, J.L., Glass, K.A., McDermott, J.L. & Wang, A.C. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs. *International Journal of Food Microbiology* 24, 385-393 (1995).
- Schumann BE, Squires EJ, Leeson S. Effect of dietary flaxseed, flax oil and n- 3 fatty acid supplement on hepatic and plasma characteristics relevant to fatty liver haemorrhagic syndrome in laying hens. *British Poultry Science* 41, 465-473 (2000).

- Schuman, J.D., Sheldon, B.W., Vandepopuliere, J.M. and Ball, H.R. Jr. Immersion heat treatments for inactivation of *Salmonella enteritidis* with intact eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 438-444 (1997).
- Scott, D. Glucose conversion in the preparation of albumen solids by glucose-oxidase catalase system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1, 727-30 (1953).
- Scott, W.M. Food poisoning due to eggs. *British Medical Journal* 11, 56-8 (1930).
- Scuderi, G., Fantasia, M., Filetici, E., & Anastasio, M. P. Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991–4. *Epidemiology and Infection*, 116(3), 257–265 (1996).
- SAGARPA. Secretaría de Salud. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Recuperado el 4 de junio de 2012 de <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>
- SAGARPA. Secretaría de Salud. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). Programa Nacional Pecuario 2007-2012. México. Recuperado el 4 de junio de 2012 de <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Programa%20Nacional%20Pecuario/Attachments/1/PNP260907.pdf>
- Sellier, N., Vidal, M.L., Baron, F., Michel, J., Gautron, J., Protais, M., Beaumont, C., Gautier, M. & Nys, Y. Estimations of repeatability and heritability of egg albumen antimicrobial activity and of lysozyme and ovotransferrin concentrations. *British Poultry Science* 48, 559–566 (2007).
- Selma, M.V., Beltran, D., Allende, A., Chacon-Vera, E. and Gil, M.I. Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in lettuce and water. *Food Microbiology*, 24, 492-499 (2007).
- Senne, D.A. 2003. Exotic Newcastle disease virus characterization. Proceedings of the fifty second western Sacramento, California, March 8-11, pp. 28-30 poultry disease conference.
- Senne, D.A., Panigrahy, B. y Morgan, R.L. Effect of composting poultry carcasses on survival of exotic avian viruses: highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus and adenovirus of egg drop syndrome-76. *Avian Diseases*, 38(4), 733-737 (1994).
- Sensoy, I., Zhang, Q. H., & Sastry, S. K. Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric fields. *Journal of Food Processing Engineering* 20, 367–381 (1997).
- Seol, K. -H., Lim, D. -G., Jang, A., Jo, C., & Lee, M. Antimicrobial effect of kappa-carrageenan-based edible film containing ovotransferrin in fresh chicken breast stored at 5 °C. *Meat Science*, 83, 479–483 (2009).
- Sert, D., Aygun, A. and Demir, M.K. Effects of ultrasonic treatment and storage temperature on egg quality. *Poultry Science*, 90, 869-875 (2011).
- Seviour, E.M. and Board, R.G. The behavior of mixed bacterial infections in the shell membranes of the hens' egg. *British Poultry Science* 13, 33-43 (1972).

- Shafi, R., Cotterill, O.J. and Nichols, M.L. Microbial flora of commercially pasteurized egg products. *Poultry Science* 49, 578-85 (1970).
- Shah, D.B., Bradshaw, J.G. and Peeler, J.T. Thermal resistance of egg associated epidemic strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Science* 56, 391-3 (1991).
- Shang, H.M., Hu, T.M., Lu, Y.J. and Wu, H.X. Effects of inulin on performance, egg quality, gut microflora and serum and yolk cholesterol in laying eggs. *British Poultry Science* 51(6), 791-796 (2010).
- Shanawany, M.M. Ahemeral light cycle des and egg quality. WPSJ 1990.
- Shane, M., Gifford, D.H. and Yogasundrum, Y. *Campylobacter jejuni* contamination of eggs. *Veterinary Research Communications*. 10, 487-92 (1986).
- Shanker, S., Lee, A. and Sorrell, T.C. *Campylobacter jejuni* in broilers: the role of vertical transmission. *Journal of Hygiene*, 96, 153-9 (1986).
- Sharp, P.F. and R. Whitaker. The relation of hydrogen ion concentration of egg white to its germicidal action. *Journal of Bacteriology*, 14, 17-46 (1927).
- Shivaprasad, H.L., Timoney, J.F., Morales, S., Lucio, B. & Baker, R.C. Pathogenesis of *Salmonella Enteritidis* infection in laying hens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serological responses. *Avian Diseases* 34, 548-557 (1990).
- Silphaduang, U., Hincke, M.T., Nys, Y. & Mine, Y. Antimicrobial proteins in chicken reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 648-655 (2006).
- Silversides, F.G., A Study relating to the validity of the Haugh unit correction for egg weight in fresh eggs. *Poultry Science* 1993.
- Simkiss, K. 1968. The structure and formation of the shell and shell membranes. Egg quality: A study of the hen's egg. T.C. Carter (Ed.), Oliver and Boyd, Edinburg
- Simmons, E.R., Ayres, J.C. and Kraft, A.A. Effects of moisture and temperatures on ability of salmonellae to infect shell eggs. *Poultry Science*, 49, 761-768 (1970).
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 43, 573-583 (2010).
- Simopoulos, A.P. & Salem, N. Egg yolk as a source of long-chain polyunsaturated fatty acids in infant feeding. *American Journal of Clinical Nutrition* 55, 411-414 (1992).
- Sionkowski, P.J. and Shelef, L.A. Viability of *Listeria monocytogenes* in egg wash water. *Journal of Food Protection* 50, 103-7 (1990).
- Skoll, S.L. and Dillenberg, H.O. *Salmonella Thompson* in cake mix. *Canadian Journal of Public Health* 54, 325-9 (1963).

- Slater, C. and Sanderson, D.C.W. Salmonellosis and eggs. *British Medical Journal* 298, 322 (1989).
- Smeltzer, T.I., Orange, K., Peel, B. and Range, G.I. Bacterial penetration in floor and nest-box eggs from meat and layer birds. *Australian Veterinary Journal*, 55, 592-3 (1979).
- Smittle, R.B. Microbiology of mayonnaise and salad dressing: a review. *Journal of Food Protection* 40, 415-22 (1977).
- Snow, L. C., Davies, R.H., Christiansen, K.H., Carrique-Mas, J. J., Wales, A. D., O'Connor, J. L., et al. Survey of the prevalence of *Salmonella* species on commercial laying farms in the United Kingdom. *The Veterinary Record*, 161 (14), 471-476 (2007).
- Solomon, S.E. 1997. Egg and eggshell quality. The Veterinary Press. Manson Publishing, Iowa State University Press, Ames, pp. 11-36..
- Solowey, M., McFarlane, V.H., Spaulding, E.H. and Chemerda, C. Microbiology of spray-dried whole egg. II. Incidence and types of *Salmonella*. *American Journal of Public Health* 37, 971-82 (1947).
- Sourjik, V. Receptor clustering and signal processing in *Escherichia coli* chemotaxis. *Trends in Microbiology* 12, 569-576 (2004).
- Sousa, M. and McKay, D. Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure*, 9, 1135-1141 (2001).
- Southam, G., Pearson, J. and Holley, R.A. Survival and growth of *Yersinia enterocolitica* in egg wash water. *Journal of Food Protection*, 50, 103-107 (1987).
- Sparks, H.C. 1994. Shell accessory materials: structure and function, in *Microbiology of the Avian Egg* (Eds.), R.G. Board and R. Fuller, Chapman & Hall, London, pp. 25-42.
- Sparks, N.H.C. and Board, R.G. Cuticle, shell porosity, and water uptake through hen's eggshells. *British Poultry Science* 25, 267-76 (1984).
- Sparks, N.H.C. & Board, R.G. Bacterial penetration of the recently developed oviposited shell of hens' eggs. *Australian Veterinary Journal* 62, 169-170 (1985).
- Speck, M.L. and Tarver, F.R., Jr. Microbiological populations in blended eggs before and after commercial pasteurization. *Poultry Science* 46, 1321 (1967).
- St. Louis, M.E., Morse, D.L., Potter, M.E., DeMelfi, T.M., Guzewich, J.J., Tauxe, R.V., Blake, P.A. and the *Salmonella enteritidis* Working Group. The emergency of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. *Journal of the American Medical Association* 259, 2103-7 (1988).
- Stadelman, W.J. 1994. Contamination of liquid egg products, in *Microbiology of the avian*. R.G. Board and R. Fuller (Eds.), Chapman & Hall. Ltd. London, pp. 139-151.

- Stahl, J. L., Cook, M. E., and Sunde, M. Zinc supplementation: its effect on egg production, feed conversion, fertility and hatchability. *Poultry Science* 65, 2104-2109 (1986).
- Stahl, J. L., Cook, M. E. and Greger, J.L. Zinc, Iron, and Copper Contents of Eggs from Hens Fed Varying Levels of Zinc. *Journal of Food Composition and Analysis* 1, 309-315 (1988).
- Steele, F.R. Jr., Vadehra, D.V. and Baker, R.C. Recovery of bacteria following pasteurization of liquid whole egg. *Poultry Science* 46, 1322 (1967).
- Sternberger, B.H., Mueller, W.J. and Leach, R.M., Jr.: Micro- scopic study of the initial stages of egg shell calcification. *Poultry Science* 56, 537-543 (1977).
- Stevens, L. Egg white proteins. *Comparative Biochemistry Physiology- Part B* 100, 1-9 (1991).
- Stewart, G.R. and Kline, R.W. 1941. Dried egg albumen. I. Solubility and color denaturation. *Proceedings, Institute of Food Technology*, pp. 48-56.
- Stokes, J.L., Osborne, W.W. and Bayne, H.G. Penetration and growth of Salmonella in shell eggs. *Food Research* 21, 510-18 (1956).
- Stuart, L.S. and Goresline, H.E. Bacteriological studies on the "natural" fermentation process of preparing egg white for drying. *Journal of Bacteriology* 44, 541-9 (1942a).
- Stuart, L.S. and Goresline, H.E. Studies of bacteria from fermenting egg white and the production of pure culture fermentations. *Journal of Bacteriology* 44, 625-32 (1942b).
- Suárez, M.C. y Mantilla, J.R. Presencia de Salmonella serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. *Iatreia* 13, 238-245 (2000).
- Suárez, M.M., Kizlansky, A. y López, L. Evaluación de la calidad de las proteínas en los alimentos calculando el score de aminoácidos corregido por digestibilidad. *Nutrición Hospitalaria* 21(1), 47-51 (2006).
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim,W., Hall, H., Perdue, M., Swayne,D., Bender, C.,Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. and Cox, N. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 279, 393-396 (1998).
- Sugiarto, H. & Yu, P.L. Avian antimicrobial peptides: the defense role of beta-defensins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323, 721-727 (2004).
- Sui, J.X., Lin, H., Cao, L.M., Wang, J.X. and Wang, G.H. Preparation and characterization of chicken egg yolk antibodies against *Listeria monocytogenes*. *Food and Fermentation Industries* 35, 1-6 (2009).
- Sui, J.X., Cao, L.M. and Lin, H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 1946-1950 (2011).

- Sung, K., Khan., S.A, Nawaz, M.S., Cerniglia, C.E., Tamplin, M.L., Philips, R.W. and Kelley, L.C. Lysozyme as a barrier to growth of *Bacillus anthracis* strain Sterne in liquid egg white, milk and beef. *Food microbiology* 28, 1231–1234 (2011).
- Subedi, K., Isobe, N., Nishibori, M. & Yoshimura, Y. Changes in the expression of gallinacins, antimicrobial peptides in ovarian follicles during follicular growth and in response to lipopolysaccharide in laying hens (*Gallus domesticus*). *Reproduction* 133, 127–133 (2007).
- Swanson, M. 1959. Shell egg preservation in the Midwest: progress in shell treatments, in Conference on Eggs and Poultry, ARS 74-12, USDA Agric. Res. Serv. Albany, California, pp. 41-42.
- Swayne, D.E. (2008). Avian influenza. In: Foreign animal diseases. Boca Raton, FL: United States Animal Health Association, pp. 137-46.
- Swayne, D.E. y Beck, J.R. Heat inactivation of avian influenza and Newcastle disease viruses in egg products *Avian Pathology* 33(5): 512-518 (2004).
- Swayne, D.E. Microassay for measuring thermal inactivation of H5N1 high pathogenicity avian influenza virus in naturally infected chicken meat. *International Journal of Food Microbiology* 25, 108(2), 268-71 (2006).
- Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., Kimura, B. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology* 50, 618-625 (2010).
- Takase, K., Nakayama, T., Kawai, T. & Fujikawan, H. Growth of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in egg yolks from highly immunized hens. *Journal of Veterinary Medical Science* 61, 959–960 (1999).
- Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., Faille, C. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology* 110, 254-262 (2006).
- Tauxe, R.V., Doyle, M.P., Kuchenmüller, T., Schlundt, J. and Stein, C.E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* 139(S1), S16-S-28 (2010).
- Taylor, L.W., and J.H. Martin. Factors influencing thickness of egg shell. *Poultry Science* 8, 39-44 (1929).
- Terzolo, H. Modelo de gestión segura para uso de vacunas a bacteria viva. En: Seminario Internacional sobre Salmonellosis Aviar: Rio de Janeiro, Brasil, 2011, pp. 1-22. Recuperado el 25 de junio de 2012 de <http://www.abef.com.br/seminario/015.pdf>
- Terzolo, H. 2012. Salmonelosis. Apuntes para completar la clase. Recuperado el 21 de junio de 2012 de [http://www.mdp.edu.ar/agrarias/grado/772\\_Microbiologia\\_Alimentos/archivos/Salmonel\\_Mayo\\_2012.pdf](http://www.mdp.edu.ar/agrarias/grado/772_Microbiologia_Alimentos/archivos/Salmonel_Mayo_2012.pdf)

- Thatcher, F.S. and Montford, J. Egg-products as a source of salmonellae in processed foods. *Canadian Journal of Public Health* 53, 61-9 (1962).
- Thayer, D.W., Boyd, G., Muller, W.S., Lipson, C.A., Hayne, W.C. and Baer, S.H. Radiation resistance of Salmonella. *Journal of Industrial Microbiology* 5, 383-90 (1990).
- Thiagarajan, D., Saeed, A.M. & Asem, E.K. Mechanism of transovarian transmission of Salmonella Enteritidis in laying hens. *Poultry Science* 73, 89-98 (1994).
- Thiagarajan, D., Saeed, A.M., Turek, J. & Asem, E.K. In vitro attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by Salmonella Enteritidis phage type 8. *Infection and Immunity* 64, 5015-5021 (1996a).
- Thomson, N.R., Clayton, D.J., Windhorst, D. et al. Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Research* 18, 1624-1637 (2008).
- Thorns, C. J. Bacterial food-borne zoonoses. *Revue Scientifique et Technique*, 19(1), 226-239 (2000).
- Threlfall, E.J. Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 141-148 (2002).
- Timoney, J.F., Shivaprasad, H.L., Baker, R.C. & Rowe, B. Egg transmission after infection of hens with Salmonella Enteritidis phage type 4. *Veterinary Record* 125, 600-601 (1989).
- Toro, H.; Hoerr, F.J.; Farmer, K.; Dykstra, C.C.; Roberts, S.R. y Perdue, M. Pigeon Paramyxovirus: Association with common avian pathogens in chickens and serologic survey in wild birds. *Avian Diseases*, 49(1), 92-98 (2005).
- Tryhnew, L.J., Gunaratne, K.W.B and Spencer, J.V. Effect of selected coating materials on the bacterial penetration of the avian egg shell. *Journal of Milk and Food Technology*, 6, 272-275 (1973).
- Tullet, S.G. Science and the art of incubation. *Poultry Science*, 69, 1-15 (1990).
- UNA. Unión Nacional de Avicultores de la República Mexicana. Datos de la producción avícola en publicación divulgativa.
- Unión Europea. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuffs, food and man in the European Union and Norway in 2002. Serial online: 2004 Sept 29. Cited: 2004 Oct 28. Available from: <http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/salmonella/zoonoses>.
- Ukeshima, A. & Fujimoto, T., 1984. Ultrastructure of primordial germ cells in the early chick embryo. In: *Ultrastructure of Reproduction*. J. Van Blerkom and P. M. Motta, (Eds.), Martinus Nijhoff, Boston, pp. 12-18.
- Ukeshima, A. Abandonment of germ cells in the embryonic chick ovary: TEM and SEM Studies. *The anatomical record* 240, 261-266 (1994).



- US-FDA (United States Food and Drug Administration), 2006. Code of Federal Regulations, Title 21, Section 173.368, issued April 2006. Washington, DC: Government Printing Office, Available from: <http://www.grokfood.com/regulations/173.368.html>
- U.S. Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS), 1998. Salmonella Questions and Answers. Washington, DC, February.
- U.S. Food and Drug Administration, 1997. Food Safety from farm to table: a national food safety initiative, Report to the President, Food and Drug Administration. U.S. Department of Agriculture, U.S. Environmental Protection Agency, Centers for Disease Control and Prevention, May.
- USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 24 (2011). Recuperado el 17 de Julio de 2012 de <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>
- USDA, 1969. Egg Pasteurization Manual. ARS 74-48. Poultry Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Albany, CA.
- USDA, 1975a. Regulations Governing the Grading of Shell Eggs and United States Standards, Grades, and Weight Classes of Shell Eggs, 7 CFR Part 56, US Govt. Print. Off., Washington, DC.
- USDA, 1975b. Regulations Governing the Inspection of Eggs and Egg Products, 7 CFR Part 59, US Govt. Print. Off., Washington, DC.
- USDA-APHIS. United States Department of Agriculture- Animal and plant health inspection service. Importation of animals and animal products; Proposed rule. 9 CFR Part 92, et al. USA. 1996.
- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A.H., Vermeulen, A., Jacxsens, L., De Loy, A., Van Impe, J.F. and Devlieghere, F. Prevalence and challenge test of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology* 133, 94–104 (2009).
- Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S., et al. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection* 125, 229-255 (2000).
- Vaddehra, D.V. and Baker, R.C. Effect of egg shell sweating on microbial spoilage of chicken eggs. *Journal of Milk and Food Technology*, 36, 321-322 (1973).
- Vaddehra, D.V., Steele, F.R. Jr. and Baker, R.C. Shelf-life and culinary properties of thawed frozen pasteurized whole egg. *Journal of Milk and Food Technology* 32, 362-4 (1969).
- Vaddehra, D.V., Baker, R.C. and Naylor, H.B. Infection routes of bacteria into chicken eggs. *Journal of Food Science* 35, 61-2 (1970).
- Vaddehra, D.V., Baker, R.C. and Naylor, H.B. Distribution of lysozyme activity in the exteriors of eggs from *Gallus gallus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 43, 503-508 (1972).

- Valenti, P., Stasio, A., Seganti, L., Mastromarino, P., Sinibaldi, L., & Orsi, N. Capacity of Staphylococci to grow in the presence of ovotransferrin or CrCl<sub>3</sub> as a character of potential pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 445–447 (1980).
- Valenti, P., Antonini, G., Fanelli, M. R., Orsi, N., & Antonini, E. Antibacterial activity of matrix-bound ovotransferrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21, 840–841 (1982).
- Valenti, P., Antonini, G. R. H., Visca, P., Orsi, N., & Antonini, E. Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. *International Journal of Tissue Reactions*, 5, 97–105 (1983).
- Van Elswyk, M. E., Hatch, S. D., Stella, G. G., Mayo, P. K., & Kubena, K. S. (1999). Eggs as a functional food alternative to fish and supplements for consumption of DHA. In J. S. Sim, S. Nakai, & W. Guenter (Eds.), *Egg Nutrition and Biotechnology* (pp. 121–133). New York: CABI.
- Vander Wal, J.S., Marth, J.M., Khosla, P., Jen, C. y Dhurandhar, N.V. Short-Term Effect of Eggs on Satiety in Overweight and Obese Subjects. *Journal of the American College of Nutrition* 24(6), 510–515 (2005).
- Varma, J.K., Molbak, K., Barrett, T.J., Beebe, J.L., Jones, T.F., Rabatsky-Ehr, T., Smith, K. E., Vugia, D.J., Chang, H.G.H., Angulo, F.J. Antimicrobial-resistant non-typhoidal Salmonella is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. *Journal of Infectious Diseases* 191, 554-561 (2005).
- Velge P, Cloeckert A, Barrow P. Emergence of Salmonella epidemics: The problems related to Salmonella enterica serotype Enteritidis in multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research* 36, 267- 288 (2005).
- Vermeulen, A., Gysemans, K.P., Bernaerts, K., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. and Devlieghere, F. Influence of pH, water activity and acetic acid concentration on *Listeria monocytogenes* at 7°C: data collection for the development of a growth model. *International Journal of Food Microbiology* 114, 332-341 (2007a).
- Vermeulen, A., Smigic, N., Rajkovic, A., Gysemans, K., Bernaerts, K., Geeraerd, A., Van Impe, J., Debevere, J. and Devlieghere, F. Performance of a growth/no growth model for *Listeria monocytogenes* developed for mayonnaise-based salads: influence of strain variability, food matrix, inoculation level, and presence of sorbic and benzoic acid. *Journal of Food protection* 701, 2118-2126 (2007b)
- Vidotto, C.M., Goes, C.R., Taque, J., Tanuri, A., Santos, D.S. Cloning of structural genes for colicin V and their invasive role in pathogenicity of invasive *E. coli*. *Brazilian Journal of Genetics* 14, 1–8 (1991).
- Vishwanathan, R., Gendron, C. M., Goodrow-Kotyła, E. F., Wilson, T. a & Nicolosi, R. J. Increased consumption of dietary cholesterol, lutein, and zeaxanthin as egg yolks does not decrease serum concentrations and lipoprotein distribution of other carotenoids, retinol, and tocopherols. *Nutrition research* 30, 747–55 (2010).
- Voetsch, A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C., Tauxe, R.V. and the Emerging Infections Program FoodNet Working Group. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal

- Salmonella infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 15, S127–S134 (2004).
- Vollmer, G., Josst, G., Schenker, D., Sturm, N., Vreden, N. (1999). Huevos, leche y quesos. En: *Elementos de Bromatología descriptiva*. Zaragoza: Acribia, S.A., pp. 365- 376.
- Walden, C.C., I.V.F. Allen, and P.C. Trussell. The role of egg shell membranes in resisting the entry of microorganisms. *Poultry Science* 35, 1190-1196 (1956).
- Walzem RL. Lipoproteins and the laying hen: form follows function. *Poultry and Avian Biology Reviews* 7, 31-64 (1996).
- Wangensteen, O., Wilson, D. and Rahn H. Diffusion of gases across the shell of the hen's egg. *Respiration Physiology* 11, 16-30 (1970).
- WanNorhana, M.N., Poole, S. E., Deeth, H.C. & Dykes, G.A. Prevalence, persistence and control of Salmonella and Listeria in shrimp and shrimp products: A review. *Food Control*, 21, 343–361 (2010).
- Warburton, D.W., Harwing, J. and Bowen, B. The survival of Salmonella in homemade chocolate and egg liqueur. *Food Microbiology* 10, 405-10 (1993).
- Ward LR, de Sa JD, Rowe B. A phage typing scheme for Salmonella Enteritidis. *Epidemiology & Infection* 99, 291- 294 (1987).
- Ward, L. R., Threlfall, J., Smith, H. R., & O'Brien, S. J. Salmonella enteritidis epidemic. *Science*, 287(5459), 1753–1754 author reply 1755–1756 (2000).
- Washburn, K.W. and Nix, D.F. Genetic basis of yolk cholesterol content. *Poultry Science* 53, 109-115 (1974).
- Waters, V.L., Corsa, J.H. Colicin V virulence plasmids. *Microbiology Reviews*, 55, 437–450 (1991).
- WattAgNet.com. El productor de huevo más grande de Latinoamérica. Recuperado el 5 de junio de 2012 de [http://www.wattagnet.com/El\\_producto\\_de\\_huevo\\_m%C3%A1s\\_grande\\_de\\_Latinoam%C3%A9rica.html](http://www.wattagnet.com/El_producto_de_huevo_m%C3%A1s_grande_de_Latinoam%C3%A9rica.html)
- Wegener, H. C., T. Hald, D. Lo Fo Wong, M. Madsen, H. Korsgaard, F. Bager et al. Salmonella control programs in Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 9, 774–780 (2003).
- Weijers, M., Sagis, L.M.C., Veerman, C., Sperber, B. & van der Linden, E. Rheology and structure of ovalbumin gels at low pH and low ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 16, 269–276 (2002).
- Westbury, H. Newcastle disease virus: an evolving pathogen. *Avian Pathology*, 30, 5-11 (2001).

- Wethington, M.C. and Fabian, F.W. Viability of food poisoning staphylococci and salmonellae in salad dressing and mayonnaise. *Food Research* 15, 125-34 (1950).
- Whiting, R.C. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 240-246 (1993).
- Whiting, R.C. Microbial database building-What have we learned? *Food Technology* (Accepted for publication). (1997).
- Whiting, R. C. & Buchanan, R. L. Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 36(2-3), 111–25 (1997).
- Wierup M, Engström B, Engavall A, Wahlström H. Control of *Salmonella Enteritidis* in Sweden. *Food Microbiology* 25, 219-226 (1995).
- Wigley, P., Berchieri, A., Page, K.L., Smith, A.L. & Barrow, P.A. *Salmonella enterica* serovar Pullorum persists in splenic macrophages and in the reproductive tract during persistent, disease-free carriage in chickens. *Infection and Immunology* 69, 7873–7879 (2001).
- World Health Organization. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. *Emerging Infectious Diseases* 3, 223-228 (1997).
- World Health Organization [WHO]. Avian influenza ("bird flu") fact sheet [online]. WHO; 2006 Feb. Available at: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian\\_influenza/en/index.html#humans](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html#humans).
- World Health Organization [WHO] Avian influenza – H5N1 infection found in a stone marten in Germany [online]. WHO; 2006 March. Available at: [http://www.who.int/csr/don/2006\\_03\\_09a/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2006_03_09a/en/index.html).
- Wilkin, M. and Winter, A.R. Pasteurization of egg yolk and white. *Poultry Science* 26, 136-42 (1947).
- Williams, A., Davies, A. C., Wilson, J., Marsh, P. D., Leach, S., & Humphrey, T. J. Contamination of the contents of intact eggs by *Salmonella typhimurium* DT104. *The Veterinary Record*, 143(20), 562–563 (1998).
- Williams, J.E., Dillard, L.H. & Hall, G.O. The penetration patterns of *Salmonella Typhimurium* through the outer structures of chickens eggs. *Avian Diseases* 12, 645–649 (1968).
- Williams, J. B., & Sharp, P. J. Ovarian morphology and rates of ovarian follicular development in laying broiler breeders and commercial egg-producing hens. *Poultry Science* 63, 786 (1978).
- Williams, K.C. Some factors affecting albumen quality particular reference to Haugh unit score. *WPSJ* 1992.

- Williams, L.P. and Hobbs, B.C. 1975. Enterobacteriaceae infections, in Diseases Transmitted from Animals to Man (Eds.), W.T. Hubbert, W.F. McCulloch and P.R. Schnurrenberger, Thomas, Springfield, IL, pp. 33-109.
- Wong, M., Hendrix, M. J., von der Mark, K., Little, C. & Stern, R. Collagen in the egg shell membranes of the hen. *Developmental biology* 104, 28–36 (1984).
- Wood, S. and Waites, M. Factors affecting the occurrence of *Bacillus cereus* in liquid whole egg. *Food Microbiology* 5, 103-107 (1988).
- Woodward, M.J. and SES, Kirwan. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. *Veterinary Record* 138, 411-413 (1996).
- Wrigley, D.M., Llorca, N.G. Decrease of *Salmonella typhimurium* in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. *Journal of Food Protection* 55, 678–680 (1992).
- Wrinkle, C., Weiser, H.H. and Winter, A.R. Bacterial flora of frozen egg products. *Food Research* 15, 91-8 (1950).
- Wu, J., & Acero-Lopez, A. Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. *Food Research International*, 46(2), 480–487 (2012).
- Xu, Y.P., Jin, L.J., Li, X.Y., Zhen, Y.H., Lu, Y.N., Wang, L.H., et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulin in land and aquatic animal diseases control. *Journal of Biotechnology* 136, S9-S10 (2008).
- Yalçın, S., Yalçın, S., Uzunoğlu, K., Duyum, H.M. and Eltan, Ö. Effects of dietary yeast autolysate (*Saccharomyces cerevisiae*) and black cumin seed (*Nigella sativa* L.) on performance, egg traits, some blood characteristics and antibody production of laying hens. *Livestock Science* 145, 13-20 (2012).
- Yang, S., Chui, Y. R., Chou, C. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* and the production of Staphylococcal enterotoxin in egg products. *International Journal of Food Microbiology* (2001)
- Yokoyama, H., K. Umeda., R. C. Peralta., T. Hashi., F. C. Icatlo., M. Kuroki., Y. Ikemori., and Y. Kodama. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*. *Vaccine* 16, 388–393 (1998a).
- Yokoyama, H., R. C. Peralta, K. Umeda, T. Hashi, F. C. Icatlo, M. Kuroki, Y. Ikemori, and Y. Kodama. Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies. *American Journal of Veterinary Research* 59, 416–420 (1998b).
- Yolken, R.H., F. Leister, S. E. Wee, R. Miskuff, and S. Vonder-fecht. Antibodies to rotaviruses in chickens' eggs: A potential source of antiviral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics* 81, 291–295 (1988).

- York, L.R. and Dawson, L.E. Shelf-life of pasteurized liquid whole egg. *Poultry Science* 52, 1657-8 (1973).
- Yoshida, M. Efecto del almacenamiento de los huevos sobre el sabor de la albúmina y la facilidad de su pelado, una vez hervido. *Japanese Poultry Science* 1980.
- Yoshimura, Y., Ohashi, H., Subedi, K., Nishibori, M. & Isobe, N. Effects of age, egg-laying activity and Salmonella inoculation on the expression of gallinacin mRNA in the vagina of the hen oviduct. *Journal of Reproduction and Development* 52, 211–218 (2006).
- Yuan, Y., Hu, Y., Yue, T., Chen, T. and Lo, Y.M. Effect of ultrasonic treatments on thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 370-383 (2009).
- Zaidi M.B, López M.C, Calva E. Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2), 121-125 (2006).
- Zakikhany, K., Harrington, C.R., Nimtz, M., Hinton, J.C.D., Römling, U., 2010. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* 77, 771-786.
- Zeisel, S.H. Nutritional importance of choline for brain development. *Journal of the American Collage of Nutrition* 23, 621S-626S (2004).
- Zhang, W.W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discover Today* 8, 364-371 (2003).
- Zhen, Y.H., Jin, L.J., Guo, J., Li, X.Y., Chen, J. et al. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 130, 126-133 (2008).
- Zhou, D., Mooseker, M.S. & Galan, J.E. Role of the *Salmonella Typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* 283, 2092–2095 (1999).