



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“PERMEABILIZACIÓN DE HUEVOS COMO MODELO DE
INFECCIÓN *in ovo* CON *Salmonella* Enteritidis”

MARÍA PAZ LOBOS CAÑETE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO M.V., M.Sc.

SANTIAGO, CHILE
2010



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“PERMEABILIZACIÓN DE HUEVOS COMO MODELO DE
INFECCIÓN *in ovo* CON *Salmonella* Enteritidis”

MARÍA PAZ LOBOS CAÑETE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO: DR. JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA
PROFESORA CONSEJERA: DRA. ANITA SOTO CORTÉS

SANTIAGO, CHILE
2010

Esta memoria de título fue financiada por el proyecto **FONDECYT N° 1080291**:
“Permeabilización de huevos como modelo de infección *in ovo* con *Salmonella*
Enteritidis”.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora guía, Dra. Consuelo Borie, le agradezco infinitamente haberme permitido formar parte de este proyecto. Muchas gracias por la confianza y el apoyo depositado, por su presencia y preocupación constante a lo largo de toda la experiencia, ambas fueron cruciales para el buen desarrollo de mi trabajo. Y porque no todo en la vida es trabajo, le agradezco de forma personal por su paciencia y comprensión en los momentos difíciles, por sus palabras de cariño y apoyo, sinceramente muchas gracias.

A la Dra. María Luisa Sánchez, le agradezco de forma especial por la preocupación y el apoyo brindado de manera cotidiana, su grata compañía, sus consejos y su experiencia de vida serán recuerdos valiosos que me acompañarán por siempre.

Al Señor Juan Carlos González, Gerente Comercial de CODIPRA, le agradezco sinceramente su excelente disposición, colaboración y amabilidad, por habernos brindado su atención semana a semana de manera confiable y siempre responsable, muchas gracias.

También agradezco al Dr. José Luis Arias, por el interés y apoyo demostrado desde el inicio de mi trabajo, por sus correcciones y sugerencias. Al Dr. Leonardo Sáenz, por habernos facilitado el programa computacional empleado en esta memoria, muchas gracias por su colaboración. A la Dra. Valeria Rojas, gracias por el apoyo brindado en el área estadística, el cual fue de gran ayuda para el entendimiento de esta difícil área.

A los funcionarios del Dpto. Medicina Preventiva Animal, agradezco sinceramente la colaboración y amabilidad de Don Humberto Antilef, Carlos Campos, Patricio Toledo, Pamela Muñoz y Estelita Arellano. Agradezco además a Fernanda Urrutia, Marcela Peñaloza y Patricia Molina, bibliotecarias de la facultad, quienes siempre me ayudaron y facilitaron gratamente la búsqueda de los textos que permitieron el desarrollo de esta memoria.

Agradezco de forma muy especial a mis compañeras y amigas: Francisca, Juliana, Mirla, Lisette y Nasrim, con las cuales compartí durante todos estos años mi vida universitaria. Les agradezco mucho todo el cariño, el apoyo, los momentos de amistad y de alegría, tantos almuerzos, clases, pruebas, les agradezco a todas por estar siempre conmigo.

También agradezco a mis amigas de la vida: Andrea, Francisca y Verónica; por la amistad incondicional y el apoyo demostrado a lo largo de tantos años, por el millón de buenas vibras enviadas tantas veces, por estar ahí, siempre creyendo en mí, muchísimas gracias, las quiero mucho.

De forma muy especial, agradezco a mi Familia, a mis padres Oscar y Marisol, mi hermana María José y mi hermano Ignacio, quienes me dieron su apoyo incondicional durante todos mis años de estudiante. El camino no fue fácil, y siempre requirió de mucho sacrificio, sin embargo agradezco a Dios por haberlos tenido conmigo. A mi Papá, le agradezco su enorme esfuerzo por darme estudios, hoy puedo decir con mucho orgullo que gracias a él, logré convertirme en Médico Veterinario. A mi Mamá, le agradezco por su amor y preocupación, por siempre darme ánimo y regalarme en los momentos más difíciles. A mis queridos hermanos, les agradezco todo su apoyo, sus bailes y chistes, los cuales siempre me hicieron sentir mucho mejor y lograron hacerme sonreír.

Para finalizar, agradezco a todas las personas que de alguna manera contribuyeron en la realización de mi memoria, y que producto de mi desconsideración no fueron mencionadas. De todo corazón, muchas gracias.

RESUMEN

Los modelos de experimentación biológica han surgido como una herramienta para el estudio de agentes patógenos, teniendo por finalidad simular de la manera más natural posible la interacción del patógeno con su hospedero. Sin embargo, muchos de ellos, no han conseguido generar los niveles de infección adecuados, lo cual sugiere que deben ser mejorados.

El objetivo del presente estudio es optimizar el modelo de infección bacteriana *in ovo* por inmersión, a través de un protocolo químico o físico (por temperatura) de permeabilización, que mejore el ingreso de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (S. Enteritidis) hacia el interior de los huevos, sin generar efecto bactericida residual.

Para ello, se analizaron inicialmente dos reactivos permeabilizantes: Urea e Hipoclorito de Sodio, en distintas concentraciones. Se utilizaron grupos de 20 huevos por cada concentración, los cuales fueron precalentados y posteriormente permeabilizados por inmersión en el reactivo diluido, durante 30 minutos. Luego, los huevos fueron puestos en una solución de fucsina concentrada, para visualizar la presencia del paso de colorante en el interior de las cáscaras, determinando con ello el nivel de permeabilización. Se seleccionó de cada reactivo, la menor concentración capaz de permeabilizar 100% de los huevos, con un nivel elevado de penetración de fucsina. Finalmente, se decidió utilizar Urea, ya que logró resultados similares a Hipoclorito de Sodio, pero a diferencia de éste, no había sido utilizado en modelos de infección *in ovo*. Se evaluó el efecto bactericida residual en un grupo de 90 huevos permeabilizados con Urea y contaminados por inmersión con S. Enteritidis; cuatro horas después los huevos fueron incubados en una estufa por 24 horas a 37°C. Terminado este período, fueron vaciados de manera aséptica,

y recolectados individualmente, para posteriormente ser analizados por bacteriología cualitativa (% de contaminación) y cuantitativa (UFC/mL). Se incluyó un grupo control de infección, el cual fue permeabilizado por un método abrasivo.

Los resultados de este estudio mostraron que el porcentaje de huevos contaminados con *S. Enteritidis* fue mayor en el grupo control (98,5%) que en el grupo permeabilizado con Urea (63,2%) ($p \leq 0,05$). Se discute el efecto bactericida residual observado en el grupo permeabilizado con Urea. El presente estudio concluyó que el uso de Urea en concentración 0,025 M logra permeabilizar eficientemente la cáscara de los huevos, sin embargo, genera un efecto bactericida residual sobre *S. Enteritidis*.

También fue analizado el efecto de la temperatura sobre la permeabilización de los huevos, utilizando dos grupos de 40 huevos, de los cuales, un grupo fue refrigerado a 4-8°C y el otro fue calentado a 37°C, durante 4 horas. Posteriormente, los huevos fueron puestos a inmersión en una solución fría de fucsina (4-8°C). Los resultados indicaron que en el grupo de huevos calentados a 37°C, el porcentaje de ingreso de colorante fue mayor que en el grupo de huevos refrigerados, demostrando que al inducir un diferencial térmico, la permeabilización en los huevos también es mayor. Como conclusión, se sugiere que la inducción de un diferencial térmico marcado, optimiza mejor el modelo de infección *in ovo* con *S. Enteritidis*, que la permeabilización de los huevos con Urea 0,025 M.

SUMMARY

The biological experimental models have emerged as a tool for the study of pathogens, with the finality of simulating in the most natural way possible the interaction of the pathogen with its host. However, many of them have not been able to achieve the adequate levels of infection, which suggests that they need to be improved.

The objective of this current study is to optimize the bacterial infection model *in ovo* by immersion, through a chemical or physical (by temperature) permeabilization protocol, which improves the entrance of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*) inside the eggs, without generating the residual bactericide effect.

To achieve this, two permeabilizant reactives were initially analyzed: Urea and Sodium Hypochlorite, each in different concentrations. Groups of 20 eggs for each concentration were used, and all of them were preheated and later permeabilized by immersion in the diluted reactive during 30 minutes. Afterwards the eggs were put in a concentrated fuchsin solution to visualize the passing of the coloring towards the interior of the egg shells, determining with this the level of permeabilization. Each reactive was selected according to the lowest level of concentration capable of permeabilizing 100% of the eggs, with a high level of fuchsin penetration. Finally the decision was to use Urea, because it achieved similar results with sodium hypochlorite, but unlike the latter, it had not been used by *in ovo* infection models. The residual bactericide effect was evaluated in a group of 90 eggs permeabilized with urea and contaminated by immersion with *S. Enteritidis*; four hours later the eggs were incubated in a stove for 24 hours at 37 ° C. At the end of this period, they were emptied in an aseptic manner, and recollected individually, to be analyzed by qualitative (% of contamination) and quantitative (CFU/mL)

bacteriology. An infection control group was included, which was permeabilized by an abrasive method.

The results of this study showed that the percentage of contaminated eggs with *S. Enteritidis* was higher in the Control group (98.5%) compared with the Urea permeabilized group (63.2%) ($p \leq 0.05$). The residual bactericide effect observed in the Urea permeabilized group can be discussed. This study concludes that the use of Urea in a concentration higher than 0.025 M is able to efficiently permeabilize the egg shell, however, it creates an residual bactericide effect on *S. Enteritidis*.

The effect of temperature over the permeabilization of the eggs was also analyzed, using two groups of 40 eggs each, one of which was refrigerated at 4-8° C and the other was heated at 37° C during 4 hours. Later, the eggs were put in immersion in a cold fuchsin solution (4-8° C). The results indicated that in the group with heated eggs, the coloring entry percentage was higher than the refrigerated egg group, showing that by inducing a temperature difference, the egg permeabilization becomes higher. As conclusion it is seen that a marked temperature difference optimizes in a greater way the *in ovo* infection model with *S. Enteritidis*, than the egg permeabilization with Urea 0.025 M.

INTRODUCCIÓN

Los modelos biológicos de infección han surgido como herramientas de importancia en el estudio de distintos agentes patógenos que afectan tanto a los animales como al ser humano, permitiendo de esta manera conocer sus mecanismos de infección y patogenicidad, e idear planes de control y prevención de las enfermedades.

Para el estudio de *Salmonella*, específicamente del serotipo Enteritidis, se han desarrollado modelos de infección en gallinas, pollos y embrión de pollo. Por otro lado, los huevos embrionados y comerciales de gallina, también han sido utilizados para este fin, siendo contaminados externamente mediante dos vías: inoculación en cámara de aire e inmersión. La contaminación en la cámara de aire posee como desventajas ser laboriosa, provoca ruptura del huevo, y requiere de mayor tiempo para su realización. A su vez, la contaminación por inmersión, no compromete la estructura de la cáscara, permitiendo la realización de un mayor número de muestras, de forma rápida y simultánea, cualidades sumamente deseadas en cualquier investigación científica. El método de inmersión para contaminación *in ovo* con *Salmonella* ha sido poco satisfactorio, debido a que la capacidad de ingreso de la bacteria se ve disminuida por la presencia de la cutícula, la cual cumple un rol fundamental como barrera física primaria en la entrada de patógenos al huevo. Por ello, este trabajo pretende implementar un método químico que logre extraer la cutícula, sin dañar la cáscara del huevo ni tener actividad bactericida residual, mejorando con ello el ingreso de microorganismos al interior del huevo. Por otro lado, también será evaluado el rol de la temperatura en la permeabilización de los huevos. Los resultados contribuirán a optimizar el modelo de infección *in ovo*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los modelos de experimentación biológica han surgido como una herramienta de importancia en el estudio de agentes patógenos, teniendo por finalidad simular de la manera más natural posible la interacción del patógeno con su hospedero. De este modo, se hace posible conocer los mecanismos de infección y patogenicidad, e idear planes de control y prevención de las enfermedades que causan dichos patógenos.

Para esto, los animales de laboratorio han sido piezas fundamentales en el estudio de las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos, hasta la fecha, son irremplazables. Basta recordar sus aportes en la generación de las vacunas de la rabia, viruela, tétanos, difteria, tos convulsiva y poliomielitis; el desarrollo de diversos antibióticos, la insulina y el conocimiento de las bases genéticas de la herencia. Los avances de la investigación en cáncer, cardiología, transplantes de órganos, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedad de Alzheimer, se deben también a las contribuciones de los estudios realizados en animales de laboratorio (Hernández, 2004).

De acuerdo a lo señalado por Trull (2005), Presidente de la FBR ("Foundation for Biomedical Research", de EE.UU), aproximadamente el 95% de todos los animales de laboratorio corresponden a ratas y ratones. Los primates representan menos del 0,25%; los perros y gatos combinados menos de 0,5% y el resto incluye a conejos, cobayos, cerdos, ovejas, armadillos, peces cebra, calamar, cangrejos, caracoles de mar y moscas

de la fruta, entre otros. Los roedores son el modelo animal de elección, ya que tienen una vida corta (dos o tres años) que permite a los científicos observar en "avance rápido" lo que ocurre durante el progreso o la patogénesis de la enfermedad. Además, los avances en ingeniería genética han permitido desarrollar excelentes líneas de roedores para la investigación.

Sin embargo, es necesario reconocer que el uso de animales como reactivos biológicos debe cumplir una serie de requisitos, como poseer una composición genético-sanitaria definida, ser sometido a crianza y mantención en ambientes controlados con los requerimientos específicos para cada especie, además de garantizar el bienestar animal. Para normar el uso de estos animales en la experimentación biológica surge la bioética animal, la cual postula lo siguiente: el uso de animales de laboratorio deben ser realizados con el número mínimo necesario de animales que permitan obtener resultados científicamente válidos; los procedimientos *in vivo* deben ser reemplazados siempre que sea posible por métodos alternativos que no usen animales vivos, como modelos matemáticos, simulación por computador, test serológicos, cultivos celulares y sistemas biológicos *in vitro*, y las experiencias deben ser refinadas aplicando metodologías que aseguren la ausencia de un sufrimiento innecesario (Arias, 2007).

El ratón ha sido uno de los modelos experimentales más usados para el estudio particular de *Salmonella spp.* Su utilización se ha basado, entre otras aplicaciones, en el estudio y desarrollo de vacunas (Chin'ombe *et al.*, 2009a), investigación sobre mecanismos de defensa inmunitarios (Chin'ombe *et al.*, 2009b) y terapia antimicrobiana efectiva contra *Salmonella* (Garner *et al.*, 2009).

Las aves también han sido utilizadas como modelos de experimentación con *Salmonella*, debido a que son hospederos naturales de muchos serotipos de la bacteria, los cuales comúnmente también se encuentran en el hombre. Es así como el pollo broiler ha sido utilizado con el objeto de conocer la dinámica de *Salmonella* en el hospedero, evaluando la rapidez de infección y/o eliminación de la bacteria al medio ambiente (Van Immerseel *et al.* 2004; López 2007). Las ventajas del modelo radican en que los pollos recién nacidos son económicamente asequibles y están disponibles en casi cualquier lugar, además de ser animales de fácil manipulación e identificación. Sin embargo, por ser aves y no mamíferos, no son tan comparables al ser humano como otros animales experimentales (López, 2007). Este modelo ha permitido formular nuevas estrategias de control y prevención en el sector avícola (Chambers y Lu 2002; Gast, 2007).

Las gallinas comerciales de postura han sido utilizadas como modelos experimentales de infección con *Salmonella*, ya sea a través del desafío oral (Keller *et al.*, 1995; Gast *et al.*, 2004; Gast *et al.*, 2005; Gantois *et al.*, 2006) o parenteral (Miyamoto *et al.*, 1998). El objetivo radica en conocer la dinámica de la bacteria en su hospedero. Además, las gallinas de postura han sido usadas para el desarrollo de terapias preventivas que buscan reducir la incidencia de infección y eliminación de *Salmonella* en las aves y sus huevos, siendo las vacunas uno de los temas más estudiados en este modelo (Miyamoto *et al.*, 1998; Gantois *et al.*, 2006). El modelo posee como ventaja principal imitar la infección “natural” con *Salmonella*, sin embargo el animal, el alimento y la mantención tienen mayores costos que los de otros modelos animales, como por ejemplo el ratón o el pollo.

También ha sido descrito el uso de huevos embrionados como un modelo de infección para *Salmonella*. El empleo del embrión de pollo ha sido sugerido para

recuperar la patogenicidad de cepas de *Salmonella* que han sido liofilizadas o congeladas por periodos mayores a dos años, y analizar las características genómicas de cepas de *Salmonella* mutadas (Figueroa y Verdugo, 2005).

No sólo el huevo embrionado se ha utilizado como modelo de infección para *Salmonella*, sino que también el huevo comercial. Este modelo ha sido de mucha utilidad a la industria avícola, ya que ha permitido estudiar en detalle los distintos factores que permiten la infección de los huevos de consumo con serotipos de importancia para la salud pública como lo es *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (*S. Enteritidis*), y desarrollar estrategias de prevención y control a la infección (Messens *et al.*, 2005b; De Reu *et al.*, 2006; Gantois *et al.*, 2009).

Para comprender el desarrollo de un modelo de infección experimental en huevos, se hace necesario conocer las vías naturales de transmisión desde la gallina, mediante dos vías. Por la **vía vertical**, *S. Enteritidis* coloniza los órganos reproductivos de la gallina (ovario y oviducto), infectando directamente a la yema, albúmina, membranas de la cáscara o cáscara antes de la ovipostura (Miyamoto *et al.*, 1997, Gantois *et al.*, 2009). Por la **vía horizontal**, los huevos se infectan por contacto de la cáscara del huevo con la cloaca colonizada de la gallina, o con las heces contaminadas, durante o después de la ovipostura (Messens *et al.*, 2005b; De Reu *et al.*, 2006, Gantois *et al.*, 2009). De tal manera, la contaminación de los huevos puede realizarse a través de la infección experimental de la gallina (vía vertical) o bien mediante la contaminación externa (vía horizontal) en la superficie de la cáscara del huevo.

Para la generación de modelos de infección en huevo se ha utilizado con frecuencia la vía horizontal, ya que la infección de huevos a través de la gallina (vía

vertical), genera bajos porcentajes de infección, como lo demuestra el estudio realizado por Keller *et al.* (1995), en el cual gallinas ponedoras de 23 a 25 semanas de edad, fueron desafiadas por vía oral con una dosis de *S. Enteritidis* de $8 \log_{10}$ UFC/mL. Los resultados indicaron contaminación de 27,1 a 31,4% del total de huevos en formación extraídos del oviducto, y de 0 a 0,6% de los huevos puestos recientemente. Es por esto que se han generado modelos de infección directamente en los huevos (***in ovo***). Dentro de las ventajas que sugiere el modelo ***in ovo*** se encuentran: bajos costos de implementación del modelo, facilidad de mantención a nivel de laboratorio y no compromete las normas bioéticas para la experimentación biológica, toda vez que los huevos no sean embrionados.

Los modelos experimentales de **infección *in ovo***, se han desarrollado utilizando dos vías de entrada al huevo: **cámara de aire** (Clay y Board 1991; Clay y Board 1992; Adam *et al.*, 2002) e **inmersión** (Schoeni *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998; Himathongkham *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; De Reu *et al.*, 2006; Messens *et al.*, 2006).

Modelo de infección *in ovo* por cámara de aire

Esta técnica se basa en crear un daño estructural en la cáscara, facilitando con esto el ingreso de la bacteria hacia los contenidos del huevo. Sin embargo, la incidencia de infección lograda por esta vía depende de una serie de factores como son: la concentración del inóculo, posición del huevo al momento del almacenamiento, temperatura de almacenamiento de los huevos infectados y medio de inoculación de la bacteria (Clay y Board 1991; Clay y Board 1992).

En el estudio realizado por Clay y Board (1991) fue posible determinar la importancia de la concentración del inóculo aplicado. Es así como huevos de menos de 4 días de postura fueron inoculados con 0,1 mL de cultivo de *S. Enteritidis* en tres distintas concentraciones: 2, 4 y 7 Log UFC/mL. Posteriormente los huevos fueron almacenados por 5 semanas a 25°C. Los resultados indicaron que la tasa de infección en los huevos aumentó al usar el inóculo de concentración más alta.

De mismo modo, Clay y Board (1991) visualizaron que la posición en la cual son dejados los huevos en almacenamiento luego de la inoculación, posee un efecto sobre la infección de los contenidos del huevo. Esto se demostró dejando la mitad de los huevos con cámara de aire hacia arriba y la otra mitad con cámara de aire hacia abajo, concluyendo que cuando los huevos son dejados con sus cámaras de aire hacia arriba, la tasa de infección es mayor, independiente del tamaño del inóculo.

En un estudio posterior, Clay y Board (1992) evaluaron la incidencia de la temperatura de almacenamiento en la infección de huevos con *S. Enteritidis*. Utilizaron huevos de menos de dos días de postura, los cuales fueron inoculados con 0,1 mL de un cultivo de *S. Enteritidis* en concentración de 4 Log UFC/mL, y posteriormente fueron almacenados por 5 semanas a 10°C o 25°C. Los resultados del experimento indicaron que *S. Enteritidis* creció en 100% de las albúminas de los huevos almacenados a 25° C, pero no creció en albúmina de los huevos almacenados a 10°C.

Clay y Board (1992), también determinaron que el crecimiento de *S. Enteritidis* en la albúmina de huevo varía según en el medio utilizado para inocular la bacteria (suero ringer, extracto fecal o extracto fecal con remoción de hierro). Es así como la incidencia de huevos con contaminación elevada (más de 10^6 UFC/mL de albúmina), fue mayor en

aquellos inoculados con bacterias suspendidas en extracto de heces (con y sin adición de hierro) en comparación con aquellos en solución de ringer.

Modelo de infección *in ovo* por inmersión

La inmersión para la contaminación bacteriana del huevo, ha sido desarrollada como una técnica no invasiva, que además otorga un enfoque más cercano a la infección natural con *Salmonella* a través de la cáscara (Schoeni *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998; Himathongkham *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; De Reu *et al.*, 2006; Messens *et al.*, 2006). Entre los factores que afectan la incidencia de contaminación de huevos a través de esta vía, se mencionan: grado de contaminación de la cáscara y tipo de cepa bacteriana (Messens *et al.*, 2005b; Messens *et al.*, 2006; De Reu *et al.*, 2006). Es importante señalar que la infección por esta vía tiene también una directa relación con factores propios de cutícula y cáscara del huevo, los cuales serán revisados más adelante.

Messens *et al.* (2006), estudiaron la influencia del grado de contaminación de la cáscara del huevo en la penetración de *Salmonella* Enteritidis, para lo cual vaciaron el contenido de huevos y los sustituyeron con agar. Posteriormente infectaron los huevos mediante inmersión de un minuto en una suspensión de *S. Enteritidis* ($5,3 \times 10^6$ UFC/mL) para finalmente ser almacenados a 20 °C y 45-75% HR (humedad relativa) por 20 días. Los resultados indicaron que contaminaciones de la cáscara mayores a 4 log₁₀ UFC tenían un 90% de posibilidad de contaminar el interior de los huevos en cambio, las cáscaras contaminadas con cantidades inferiores a 1 log₁₀ UFC, tenían un 50% de posibilidad de ser contaminados en su interior. Al analizar los resultados, los autores demostraron que mientras mayor era la contaminación de la cáscara al final del período

de almacenamiento, mayor era la posibilidad de que *S. Enteritidis* llegara al contenido del huevo.

Del mismo modo, Messens *et al.* (2005b) utilizaron huevos de un día de postura los cuales fueron obtenidos de un grupo de gallinas a las 26, 42, 65 y 69 semanas de edad. Los huevos fueron vaciados de sus contenidos, rellenos con agar (por cámara de aire), sellados y sumergidos durante un minuto en una solución salina con *S. Enteritidis* en concentración de $6,7 \log_{10}$ UFC/mL siendo almacenados a 20°C y 60% HR por 20 días. Los resultados demostraron que un 39% de los huevos fueron penetrados por *S. Enteritidis*.

Por otro lado, en el estudio realizado por De Reu *et al.* (2006), se comparó el grado de penetración de distintas bacterias a través de la cáscara del huevo. Para esto utilizaron huevos de un día de postura, los cuales se dividieron en dos grupos: un grupo de huevos intactos y otro grupo de huevos vaciados y rellenos con agar. Posteriormente fueron puestos en inmersión por un minuto en suspensiones (10^5 - 10^6 UFC/ml) de siete cepas bacterianas diferentes: *Staphylococcus warneri*; *Acinetobacter baumannii*; *Alcaligenes sp.*; *Serratia marcescens*; *Carnobacterium sp.*; *Pseudomonas sp.* y *S. Enteritidis*, para luego ser almacenados por 21 días a 20°C y 60% HR. En el caso de los huevos rellenos con agar, las cepas que penetraron con mayor frecuencia fueron: *Pseudomonas sp* (60%), *Alcaligenes sp* (58%) y *S. Enteritidis* (43%). Por otro lado, en el caso de los huevos intactos, se midió la penetración de las cepas en los contenidos del huevo (albúmina más yema), observando que *S. Enteritidis* fue la cepa con el mayor porcentaje de penetración a través de la cáscara (30%), seguido por *Carnobacterium sp* (23%) y *Serratia marcescens* (17%). Como conclusión, todas las cepas fueron capaces de

penetrar en ambos grupos de huevos, siendo *S. Enteritidis* una de las cepas más predominantes en la infección de huevos intactos.

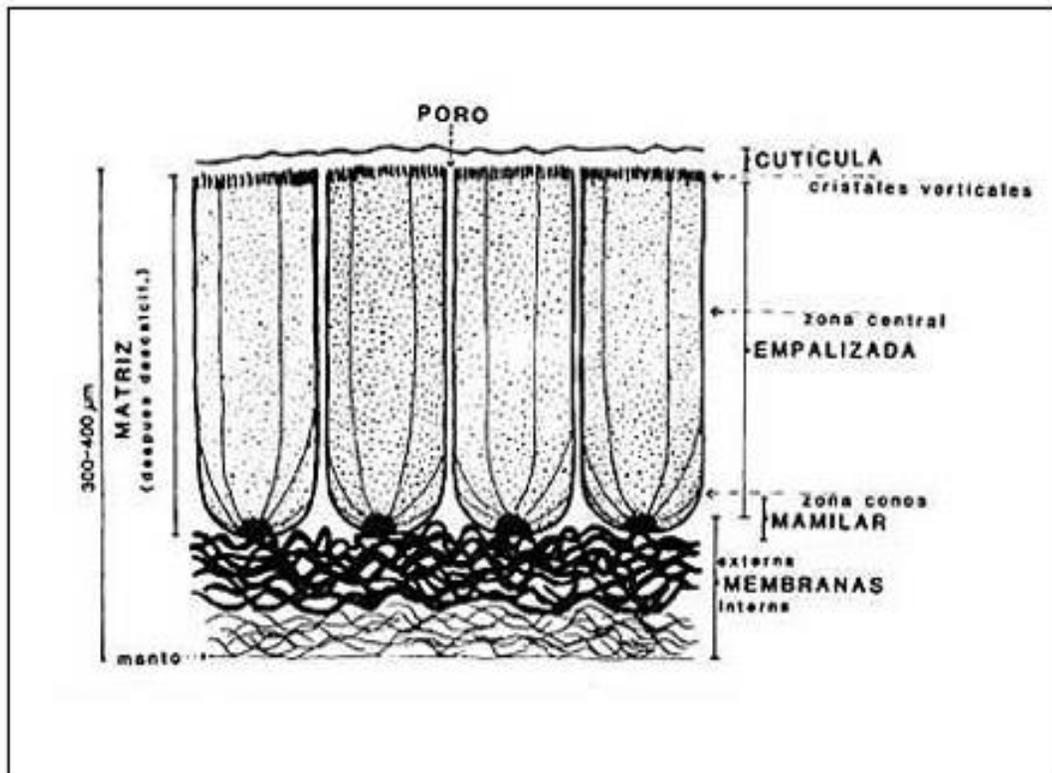
Los modelos *in ovo* se han desarrollado mayormente mediante la infección por la cámara de aire, puesto que ha logrado obtener mejores porcentajes de infección usando menores cantidades de inóculo bacteriano en comparación a la inmersión. Sin embargo posee notorias desventajas al momento de su implementación en laboratorio, ya que es una técnica laboriosa que implica el uso de una herramienta especial para generar el sitio de inoculación y de tiempo para su realización. También se debe tener presente que existen mayores riesgos de pérdida de huevos por generación de trizaduras al momento de crear los orificios en cada cáscara o de contaminación del área de trabajo debido al sellado inadecuado de la cámara de aire. En cambio, la vía de inmersión permite trabajar simultáneamente con un gran número de muestras en forma rápida y práctica.

Es necesario tener en cuenta que los bajos porcentajes de infección obtenidos por la vía de inmersión son de cierta forma esperados, ya que los estudios realizados hasta la fecha, no describen algún proceso que facilite el ingreso de las bacterias a través de las barreras naturales del huevo, específicamente la cáscara (Schoeni *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998; Himathongkham *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; De Reu *et al.*, 2006; Messens *et al.*, 2006).

Entre las barreras naturales del huevo existen barreras químicas y físicas. La **albúmina**, está compuesta por 13 proteínas, de las cuales, Ovotransferrina y Lisozima (Arias *et al.*, 2007), poseen actividad antimicrobiana. Además, la albúmina posee un pH alcalino que contribuye a la actividad bactericida. Por otro lado, las barreras físicas son la **membrana perivitelina**, la cual rodea y contiene a la yema del huevo, las **membranas de**

la **cáscara**; la **cáscara** del huevo (Figura 1), y la **cutícula**, la cual cubre la superficie de la cáscara del huevo y la apertura de sus poros.

Figura 1: Estructura de la cáscara del huevo



Fuente: Arias *et al.* (2007).

La **albúmina** es la barrera que le otorga defensas químicas al huevo en contra de *S. Enteritidis* debido a que posee una serie de componentes antimicrobianos, siendo los más importantes: Lisozima, la cual afecta la pared celular de las bacterias y Ovotransferrina que a través de la quelación de hierro y el daño en la membrana citoplasmática de las

bacterias, genera un efecto bacteriostático (Gantois *et al.*, 2009). Además, el pH básico de la albúmina (9,0) también contribuye a la actividad bactericida.

Dentro de las barreras físicas que protegen al huevo y sus nutrientes, la **membrana perivitelina** en su rol de filtro, ha sido capaz de disminuir el paso de bacterias hacia el interior de la yema. En el estudio realizado por Gast y Holt (2001) se analizó el ingreso de *S. Enteritidis* a la yema a través de la membrana perivitelina y fue comparada con la inoculación directa en ella. Se utilizaron 20 muestras en cada ensayo, las cuales fueron inoculadas con 100 UFC de *S. Enteritidis* e incubadas a 25° C. Los resultados de la inoculación sobre membrana perivitelina indicaron positividad a las 6 horas en 10% de las yemas, aumentando al 75% después de 24 horas. Respecto a las muestras inoculadas directamente en el contenido de yema, el 100% de las muestras fueron positivas a las 6 horas de incubación. Es posible concluir entonces que la bacteria es capaz de atravesar la membrana perivitelina y multiplicar en yema, sin embargo se presentan diferencias en los porcentajes de ingreso cuando la membrana perivitelina está presente.

Por otra parte, las **membranas de la cáscara** ofrecen cierto grado de protección contra la penetración bacteriana, ya que actúan como un filtro temporal al movimiento de bacterias hacia el interior del huevo (Berrang *et al.*, 1999). Himathongkham *et al.* (1999) realizaron un estudio en el cual infectaron huevos mediante inmersión por 5 segundos en un cultivo con 10⁸ UFC/mL de *S. Enteritidis*, siendo posteriormente incubados por 3 horas a 20 °C; tras la incubación, se logró aislar la bacteria en el 85% de las membranas de la cáscara, mientras que en el contenido de los huevos, no se logró el aislamiento (Citado por Messens *et al.*, 2005a).

Otro factor de relevancia en el ingreso de patógenos al huevo es la **cáscara**. Se han realizado diversos estudios para determinar los factores que inciden en su función, entre

ellos: calidad de la cáscara, contaminación bacteriana presente en la superficie de la cáscara, grado de porosidad y espesor (Bruce y Drysdale, 1994; Jones *et al.*, 2002; Messens *et al.* 2005b; Messens *et al.*, 2006).

La selección genética con el fin de obtener una mayor producción de huevos y de mayor peso, ha comprometido la calidad, generando por defecto cáscaras más delgadas y quebradizas, lo cual predispone a mayor contaminación de huevos (Jones *et al.*, 2002). Del mismo modo, Messens *et al.* (2005b) concluyeron que la presencia de grietas en la cáscara es un factor fuertemente correlacionado con la penetración bacteriana hacia el interior del huevo, luego de realizar un desafío con *S. Enteritidis* en el cual 93% de los huevos agrietados fueron penetrados.

Ahora, para evaluar la relación entre el grado de contaminación presente en la superficie de la cáscara de huevo y la penetración bacteriana, Messens *et al.*, (2006) infectaron un grupo de huevos en cultivos de *S. Enteritidis* de dos distintas dosis, una alta y otra baja, concluyendo que el porcentaje de penetración bacteriana fue fuertemente influenciado por la mayor dosis de infección presente en la superficie de las cáscaras.

Por otro lado, la cáscara del huevo presenta aproximadamente entre 10.000 a 17.000 poros, cada uno de los cuales mide entre 15 a 65 micras de diámetro, siendo significativamente más grandes que la mayoría de los microorganismos que van generalmente desde 1 a 5 micras (Bruce y Drysdale, 1994). Es por esto, que Drysdale (1985) (citado por Bruce y Drysdale, 1994), estudió la relación entre la porosidad de la cáscara y la incidencia de contaminación de los huevos con *S. Enteritidis*, para establecer si los huevos con una mayor porosidad son más susceptibles a la penetración bacteriana bajo condiciones comerciales. En este estudio se midió la porosidad de más de 3.000 huevos embrionados de broiler y se determinó que no existía una relación directa entre la

porosidad, medida como la conductancia de vapor de agua, y la susceptibilidad a la penetración bacteriana. Esto fue igualmente corroborado en los estudios de Messens *et al.* (2005b) y de Reu *et al.* (2006). Estos resultados pueden ser explicados por la existencia de la cutícula que es una capa capaz de cubrir la mayoría de los poros impidiendo la penetración bacteriana.

Respecto al espesor de la cáscara del huevo, en el estudio desarrollado por Messens *et al.*, (2005b) fue evaluada la influencia de este factor en la penetración de *S. Enteritidis* hacia el interior de huevos rellenos con agar, y determinaron que no tuvo influencia significativa en la penetración de *Salmonella* hacia el interior del huevo. Del mismo modo, De Reu *et al.*, (2006) infectaron huevos con distintas cepas incluida *S. Enteritidis* bajo similares condiciones experimentales, concluyendo que este factor tampoco tuvo influencia en la penetración de ninguna de las cepas utilizadas.

Por último, la **cutícula** juega un rol fundamental como defensa física primaria ante el ingreso de patógenos externos. Es la capa más exterior del huevo que recubre por completo la porción calcificada de la cáscara y tiene un espesor promedio de 10 μm . Su principal composición es mucina, es decir, glicoproteínas de alto peso molecular asociadas a moléculas de carbohidratos. Su presencia parece proteger al huevo de invasiones bacterianas, posiblemente debido a mecanismos de reconocimiento y ligamiento de bacterias a través de los residuos de carbohidratos como los que han sido descritos para diferentes glicoproteínas. No obstante, su principal función es contribuir a la prevención de la excesiva pérdida de agua desde el huevo y favorecer el intercambio de gases (Arias *et al.*, 2007). Esta capa se distribuye de manera irregular sobre toda la cáscara con un grosor promedio de 0,5 a 12 micras (Sparks, 1994).

Es importante señalar, que los primeros minutos después de la ovipostura, la cutícula está usualmente húmeda y por esto es menos efectiva en su rol de prevenir la penetración de bacterias al interior del huevo (Padron, 1990 y Miyamoto *et al.*, 1998). Cuando el huevo es recién ovipuesto, la cutícula permanece húmeda por un periodo aproximado de 3 minutos, y posteriormente se seca. Spark y Board (1985) realizaron estudios en los cuales fue medida la penetración bacteriana en áreas “húmedas” y “secas” de la cáscara comprobando que la mayor incidencia de contaminación se genera en las zonas donde la cutícula aún se mantiene húmeda, y por lo tanto, se hace razonable suponer que la contaminación microbiana sería menos probable una vez que la cutícula se ha secado (citado en Bruce y Drysdale, 1994).

Por otra parte, la deposición de la cutícula sobre la cáscara del huevo ha mostrado disminuir conforme avanza la edad del lote de aves (Sparks y Board, 1984; Messens *et al.*, 2005b), permitiendo la exposición de un mayor número de poros, los cuales podrían eventualmente ser sitios de penetración bacteriana. Por lo tanto, la calidad de la cutícula y su capacidad para cubrir eficazmente la totalidad de los poros de la cáscara presenta directa relación con la contaminación en los huevos. Es así como en el estudio realizado por Drysdale (1985) (citado por Bruce y Drysdale, 1994), se concluye que la incidencia de contaminación bacteriana es significativamente mayor en los huevos que poseen una cutícula pobre (40% de infección), comparados con aquellos huevos con una mediana o buena calidad de cutícula (26% de infección). Es importante conocer que la deposición cuticular es un factor directamente relacionado con la calidad, es por esto que en el estudio desarrollado por Board y Halls (1973) estudiaron la deposición cuticular concluyendo que de manera natural, de un total de 453 huevos analizados, una pequeña fracción (3,5%) no presentó cutícula, mientras que un 8% la presentó de forma incompleta, estando ausente en ápex y/o extremo romo de los huevos.

En la naturaleza, a pesar de las barreras físicas y químicas, los huevos siguen infectándose con distintos patógenos, entre ellos *S. Enteritidis*. Esto se debe en parte, a que hay factores que dejan al huevo más susceptible a la contaminación. El primero sugiere que en el momento inmediato después de la ovipostura, la cutícula es inmadura y algunos poros pueden estar abiertos. Como segundo factor, cuando el huevo está expuesto a un medio ambiente más frío que la temperatura del cuerpo de la gallina (promedio: 42 °C), una presión negativa se desarrolla permitiendo a las bacterias migrar más fácilmente a través de la cáscara del huevo y membranas (Gantois *et al.*, 2009). Como un tercer factor se encuentra la humedad, ya que cuando los huevos son removidos desde un lugar refrigerado a uno temperado, ellos “transpiran” debido a la condensación del agua en la superficie del huevo (Bruce y Drysdale, 1994) y de esta forma se facilitaría la penetración bacteriana, aunque no sería un factor esencial para el proceso (Bruce y Drysdale, 1994; Berrang *et al.*, 1999).

Basado en lo anterior, para la obtención de un modelo de infección por inmersión óptimo en huevo, se hace necesario entonces facilitar el ingreso de las bacterias a través de la cáscara, haciendo uso del conocimiento teórico sobre los diferentes factores que permiten este proceso. Una de las medidas contempla la extracción de la cutícula en los huevos, mediante la acción de algunos reactivos químicos que logran permeabilizar la cáscara del huevo, ya sea por alteración proteica de la cutícula o de la matriz de carbonato de calcio de la cáscara (Wellman-Labadie *et al.*, 2008). Los reactivos químicos que se han utilizado para este propósito han sido Urea, EDTA y HCl en las siguientes concentraciones:

- a) Urea solución 8 M (Molar) en 50mM Tris-HCl (pH 7,5). Este reactivo se utilizó para extraer las proteínas desde la superficie externa de la cáscara sin provocar

descalcificación. Un tratamiento por 60 minutos a temperatura ambiente (T° : 22-24°C) permitió la mayor extracción proteica y la menor remoción de la masa de las cáscaras (3-5%) (Wellman-Labadie *et al.*, 2008).

- b) EDTA solución de 0,5 M en 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). Este reactivo provocó descalcificación parcial y liberación de proteínas atrapadas dentro de la matriz externa de la cáscara de los huevos. Un tratamiento por 60 minutos fue el más adecuado porque obtuvo la mayor extracción proteica y no mostró ninguna contaminación química en albúmina (Wellman-Labadie *et al.*, 2008).
- c) HCl solución de 1 N (N: Normal). Un tratamiento por 5 minutos produjo una elevada extracción de proteína y disolución parcial de la cáscara. (Wellman-Labadie *et al.*, 2008).

En todos los extractos obtenidos con Urea 8M, EDTA 0,5 M y HCl 1N se detectó la presencia de Lisozima C, Ovotrasferrina y Ovocalixina-32, las cuales corresponden a proteínas de acción antimicrobiana, inmovilizadas en la cutícula y cáscara del huevo.

Farfán (2010) desarrolló distintos protocolos de permeabilización de cáscara de huevos SPF (Libres de Patógenos Específicos) de gallina, para facilitar el ingreso de bacteriófagos hacia el interior de los huevos. El estudio se basó fundamentalmente en lograr cuatro objetivos: altos porcentajes de permeabilización de los huevos, elevado nivel de permeabilización, que no genere cambios macroscópicos en la cáscara del huevo (descalcificación) ni efecto bactericida. Para visualizar permeabilización positiva en los huevos, se utilizó una solución de colorante fucsina. Los reactivos utilizados fueron los siguientes: Ácido ascórbico al 0,5%, EDTA al 5%; NaOH al 5%, Ácido cítrico y succínico al 1%, Hipoclorito de Sodio 0,00825% y Urea 8M disuelta en 50 mM de Tris-HCl (pH 7, 5). Los mejores resultados fueron obtenidos con el protocolo de Hipoclorito de Sodio

0,00825% ya que generó permeabilización en 100% de huevos, de los cuales 90% lograron alto nivel de ingreso del colorante. El segundo mejor protocolo fue Urea 8M disuelta en 50 mM de Tris-HCl (pH 7, 5), con el cual se generó 90% de permeabilización en los huevos, pero con grados variables en el ingreso de colorante. Por otro lado, con el protocolo de Ácido ascórbico al 0,5% también se generó un 100% de permeabilización, sin embargo el nivel de ingreso fue mucho menor respecto del anterior (sólo el 20% obtuvo alto ingreso). En el caso de EDTA 5% y NaOH 5% los resultados fueron 80% y 40% de permeabilización, respectivamente. Ambos protocolos no se consideraron como alternativas para su uso en esta experiencia debido a que generaron descalcificación de la cáscara y los valores obtenidos fueron menores a los logrados con Hipoclorito de sodio. Por último, el reactivo Ácido cítrico al 1% generó permeabilización de tan sólo el 20%, mientras que el Ácido succínico al 1% no logró generar permeabilización en ninguno de los huevos. Finalmente, los huevos del estudio fueron permeabilizados con Hipoclorito de Sodio e infectados con 0,1 mL de una suspensión de *S. Enteritidis* (10^2 UFC/mL) en la cámara de aire, dejando reposar por 2 horas a temperatura ambiente e incubando a 37° C por 24 horas. Posteriormente se realizaron recuentos bacterianos, observando que no hay diferencias significativas entre el grupo permeabilizado y el grupo control de infección (huevos no permeabilizados), lo que determinó que Hipoclorito de sodio en concentración 0,00825%, no genera efecto bactericida.

Si bien se ha descrito que la cutícula resulta fácilmente extraíble (permeabilización) sumergiendo los huevos enteros en una solución al 5% de EDTA por 90 min. o, en una solución al 0,25% de Hipoclorito de sodio a 40° C por cinco minutos (Arias *et al.*, 2007), la permeabilización no ha sido empleada en los modelos de infección *in ovo* existentes de tal forma de optimizar la penetración bacteriana ni tampoco se ha determinado el posible efecto bactericida sobre *Salmonella* u otro patógeno (Schoeni *et*

al., 1995; Miyamoto *et al.*, 1998; Himathongkham *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; De Reu *et al.*, 2006; Messens *et al.*, 2005b ; Messens *et al.*, 2006).

Este trabajo pretendió generar un modelo de infección *in ovo* con *S. Enteritidis* mediante la vía de inmersión, implementando al menos un protocolo químico que logre la permeabilización o extracción de la cutícula, sin generar daño estructural en la cáscara del huevo, ni poseer actividad bactericida sobre *S. Enteritidis*. Además, se evaluó el efecto de la temperatura, como una posible forma de permeabilización en los huevos.

HIPÓTESIS

La capacidad de ingreso de *S. Enteritidis* al interior del huevo se logra aumentar mediante la permeabilización química de la cáscara, siendo la temperatura un factor facilitador.

OBJETIVO GENERAL

Optimizar el modelo de infección bacteriana *in ovo* por inmersión en huevos comerciales de gallinas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar un protocolo para permeabilizar la cáscara de huevos comerciales de gallina, mediante reactivos químicos y temperatura.
2. Determinar la acción bactericida sobre *S. Enteritidis* de los productos permeabilizantes.
3. Cuantificar el ingreso de *S. Enteritidis* en el contenido de huevos permeabilizados y contaminados por inmersión.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Financiamiento

El presente estudio se efectuó bajo el financiamiento del proyecto Fondecyt N° 1080291 “Control de *Salmonella* Enteritidis en avicultura: bacteriófagos en aves de postura y alimentos derivados de la industria avícola”. Fue realizado en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

2. Huevos

Se trabajó con huevos comerciales para consumo de 24 horas desde su ovipostura, los cuales fueron obtenidos desde un plantel de la Región Metropolitana (Empresa Codipra S.A), que informó vacunar periódicamente a sus gallinas contra *Salmonella*. Se utilizaron huevos intactos, visualizando mediante un ovoscopio aquellos huevos trizados o rotos para su descarte. Posteriormente las unidades seleccionadas fueron mantenidas en refrigeración (4-8 °C) por un máximo de 24 horas, antes de aplicar cada método de permeabilización.

3. Cepa Bacteriana

Se utilizó una cepa nativa de *S. Enteritidis* de origen aviar, la cual fue donada por el Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Posteriormente, en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, se seleccionó una cepa mutante espontánea con resistencia al

Ácido Nalidíxico (*nal*) y Rifampicina (*rif*). La cepa recibió nueve pasajes en pollos para exacerbar su virulencia.

El inóculo de *S. Enteritidis nal rif* fue preparado cultivando la cepa en un matraz con 500 mL de agua peptonada fosfatada (APF, *Oxoid*®) el cual fue puesto sobre un agitador orbital (*Thermolyne*®) y dejado en incubación a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó la dilución del inóculo en razón 1:15 en agua destilada estéril. La suspensión bacteriana de inmersión (inóculo total diluido) fue utilizada el mismo día para la contaminación de los huevos. Para corroborar la concentración de la suspensión bacteriana de inmersión se realizó un recuento (UFC/mL) con 9 diluciones al décimo en suero fisiológico, a partir del inóculo total diluido. Posteriormente de cada dilución fueron extraídos 100 µL para ser sembrados por extensión sobre placas de agar XLD (*Difco*®) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/ml de cada uno, *Arlab*®) e incubados a 37°C por 24 horas.

4. Permeabilización de huevos

Antes de iniciar la permeabilización, se consideró un grupo control de 20 huevos, los cuales no recibieron permeabilización de ningún tipo, de tal manera de corroborar la impermeabilización natural de la cáscara de los huevos. Para ello, los huevos fueron puestos en inmersión en una solución de fucsina básica (*Difco*®; 94% de pureza) en concentración 1 gramo/Litro de agua destilada. Pasado este tiempo, los huevos fueron lavados con agua potable, dejados secar por 10 minutos a temperatura ambiente, y luego vaciados de su contenido, para visualizar la ocurrencia de penetración de colorante en el interior de la cáscara del huevo.

4.1. Reactivos químicos permeabilizantes

Se analizó la capacidad permeabilizante de dos reactivos, cada uno en diferentes concentraciones, basándose en los protocolos descritos por Wellman-Labadie *et al.*, 2008.

- Urea con Tris-HCl (pH: 7,5): Se preparó una solución de Tris-HCl de 50 mM (miliMoles) con 6,04 gramos de base Tris (*Merck*®), disueltos en 1 litro de agua destilada. A esta solución se le ajustó su pH a 7,5 mediante la adición de HCl al 37% (*Merck*®). Posteriormente, a la solución de Tris-HCl se le adicionó el reactivo Urea (*Merck*®) en cantidad variable, según las molaridades deseadas: 1M, 0,5M, 0,1M, 0,05M, 0,025M, 0,0125M y 0,00625M (Anexo 1).
- Hipoclorito de Sodio (NaClO): Se utilizó Cloro comercial al 5% (*Clorinda*®), el cual fue disuelto en 1 litro de agua destilada, en cantidad necesaria para generar las siguientes concentraciones teóricas: 0,00825%, 0,004125%, 0,0020625%, 0,0010313% y 0,0005157% (Anexo 2).

4.1.1 Método de permeabilización química

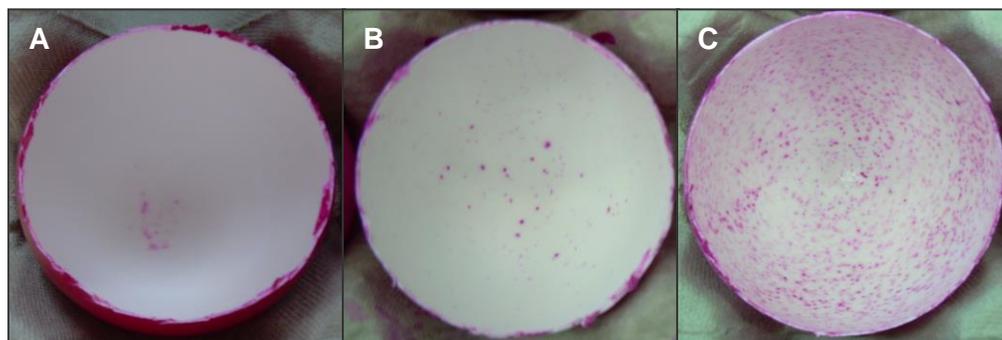
Para determinar la actividad permeabilizante de ambos reactivos, se formaron grupos de huevos, de 20 unidades cada uno, para cada concentración analizada (7 concentraciones de Urea y 5 concentraciones de NaClO). Previo a su uso, los huevos fueron llevados y mantenidos en una estufa a 37° C por cuatro horas. Luego de este tiempo, cada grupo de huevos fue colocado por un periodo de 30 minutos en inmersión con el reactivo permeabilizante en solución fría (refrigerada por 12 horas a 4-8 °C). Posteriormente, los huevos fueron lavados con agua potable, y dejados secar a

temperatura ambiente durante 10 minutos. Una vez secos, se colocaron en inmersión por 90 minutos en una solución de fucsina básica (*Difco*®; 94% de pureza) de concentración 1 gramo/Litro de agua destilada. Terminado el tiempo de inmersión, los huevos se lavaron rápidamente y se vació su contenido a través de la abertura de la cámara de aire, visualizándose en el interior de la cáscara el ingreso del colorante (manchas de color fucsia). Para determinar el reactivo químico que originó mayor permeabilización, se procedió a contar las manchas presentes en las paredes de la cáscara, asignando arbitrariamente cruces según el número contado (Tabla 1 y Fotografía 1).

Tabla 1. Clasificación del ingreso de fucsina al huevo permeabilizado, según escala de cruces.

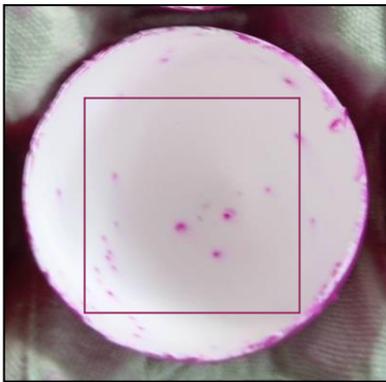
Número de Cruces	Número de manchas de fucsina (Nivel)
+	< 20 (Bajo)
++	≥20 a <40 (Medio)
+++	≥40 (Alto)

Fotografía 1. Ingreso de fucsina a los huevos, según escala de cruces

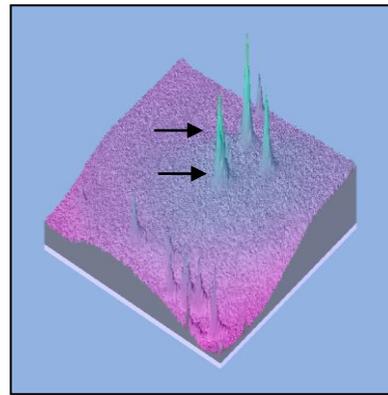


A: Huevo clasificado con (+); B: Huevo clasificado con (++); C: Huevo clasificado con (+++).

Para contabilizar de forma más objetiva el número de manchas de colorante presentes en el interior de la cáscara del huevo, se utilizó el programa Melanie Viewer 7.0 (Biology Software Net, 2003), el cual es un software que permite la graficación digital en dos dimensiones. En la totalidad de los huevos experimentales, se seleccionó de forma arbitraria, la zona del fondo de la cáscara de cada huevo para la graficación digital (Fotografías 2 y 3).



Fotografía 2: Área seleccionada del huevo para análisis con programa M. Viewer 7.0



Fotografía 3: Imagen digital en Melanie Viewer (Las flechas indican "peaks" de ingreso de colorante)

Según número de manchas y programa Melanie Viewer 7.0 se seleccionó el reactivo químico que logró la mayor permeabilización de los huevos.

Finalmente, se midió el espesor de cáscara de todos los huevos mediante un micrómetro digital (*Mitutoyo®*), realizando tres medidas milimétricas en distintas zonas de la porción media del huevo, con las cuales se obtuvo un promedio. El objetivo fue conocer la variabilidad de este factor (**Fotografía 4**).



Fotografía 4: Medición del espesor de la cáscara de un huevo a través del Micrómetro digital.

4.1.2 Evaluación del efecto bactericida residual del permeabilizante químico seleccionado

Un grupo de 90 huevos fueron permeabilizados, siguiendo el método seleccionado previamente (punto 4.1.1). Luego de ser permeabilizados, fueron dejados en inmersión por cuatro horas a temperatura ambiente en una suspensión fría con *S. Enteritidis naf rif* en concentración conocida (Farfán, 2010). Posteriormente, los huevos fueron desinfectados por cinco segundos en Etanol al 70% (Gast y Holt, 2001) para evitar que *S. Enteritidis naf rif* continuara penetrando al interior del huevo. Los huevos desinfectados fueron puestos de forma aséptica en portahuevos de cartón (30 huevos cada uno) por 24 horas a 37° C. Para evitar cualquier posible contaminación del laboratorio e incubadora, los portahuevos fueron sellados individualmente con una bolsa de nylon limpia, en la cual se identificó el nombre del grupo y fecha. Luego de la incubación, fueron abiertos de manera aséptica: se tomó el huevo con guantes y se quebró en el borde de un vaso precipitado estéril (Gast y Holt, 2001), recolectando las muestras del contenido de cada huevo (albúmina y yema), en bolsas plásticas para Stomacher (*Whirl Park, Nasco®*). Las

muestras fueron pesadas, y se les añadió caldo Rappaport Vassiliadis (RV, *Difco*®), en razón de 1:3, para posteriormente ser homogeneizadas individualmente por 180 segundos en un equipo Masticador (*Instruments*®). Finalmente con las muestras homogeneizadas, se realizó el estudio de bacteriología cualitativa (porcentaje de huevos contaminados) y cuantitativa (recuento bacteriano).

Se consideró además un grupo control de 90 huevos, los cuales a diferencia del grupo permeabilizado con reactivo químico, fueron sometidos a permeabilización con un método abrasivo - no invasivo (**Fotografía 5**), mediante el uso de una esponja de fibra áspera (*Scotch-Brite*®). Luego de la permeabilización abrasiva, los huevos fueron sometidos al mismo protocolo descrito para los huevos permeabilizados químicamente.



Fotografía 5: Permeabilización de un huevo mediante método abrasivo con esponja

4.2 Método de permeabilización por Temperatura

Se trabajó con dos grupos de huevos de 40 unidades cada uno. En el primer grupo (R), los huevos fueron refrigerados (4-8 °C) por 12 horas, y luego siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.1.1, fueron puestos en inmersión en una solución de fucsina fría por un tiempo de 90 minutos, sin precalentamiento previo ni permeabilización química.

En el segundo grupo (C), los huevos fueron calentados a 37° C por 4 horas, y trascurrido este tiempo, fueron colocados en inmersión en una solución de fucsina fría por 90 minutos. Este grupo también siguió el mismo protocolo descrito en el punto 4.1.1, pero sin permeabilización química.

Al igual que a los huevos permeabilizados químicamente, se les midió el espesor de las cáscaras mediante un micrómetro digital (*Mitutoyo*®).

5. Bacteriología: Fue realizada en base a las pautas de Murray y Barton (1993).

Bacteriología Cualitativa: Las 180 muestras totales, una vez pesadas y adicionadas con caldo RV en razón 1:3, fueron homogeneizadas e incubadas a 37° C por 72 horas. A las 48 y 72 horas de incubación, las muestras fueron sembradas sobre placas de agar XLD (*Difco*®) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 ug/ml de cada uno, *Arlab*®) e incubadas a 37° C durante 24 horas. Luego se determinó la presencia de colonias sospechosas a *S. Enteritidis* (centro negro y halo transparente) las cuales fueron corroboradas mediante prueba de aglutinación con suero anti-*Salmonella* grupo D1 (*Difco*®).

Bacteriología Cuantitativa: Para el recuento de la cepa desafío presente en las muestras de huevo, se extrajo 1 mL de los homogeneizados en caldo RV incubado por 15 horas y luego se realizaron cuatro diluciones al centésimo, en APF (*Oxoid*®). De cada dilución se obtuvieron 100 µL, los cuales fueron sembrados por extensión con asas de Digrafsky, en placas de agar XLD (*Difco*®) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 ug/ml de cada uno, *Arlab*®). Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37° C para

luego realizar la lectura del recuento de colonias (UFC), tanto en los huevos del grupo control, como en los huevos del grupo permeabilizado con reactivo químico.

6. Análisis Estadístico

Para determinar el efecto bactericida del reactivo químico seleccionado para la permeabilización de los huevos, los resultados de la bacteriología cualitativa fueron expresados como proporciones de positividad entre ambos grupos experimentales, y las diferencias entre éstos, fueron evaluadas mediante una prueba de independencia con X^2 (InfoStat, 2004).

Los resultados de la bacteriología cuantitativa (recuentos), fueron expresados como unidades logarítmicas (\log_{10}) y las diferencias entre ambos grupos fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANDEVA) (InfoStat, 2004). Para este análisis, se consideró que toda muestra negativa a la bacteriología cuantitativa y cualitativa tiene un valor cero, mientras que toda muestra negativa a la bacteriología cuantitativa pero positiva a la cualitativa, tiene un valor uno.

7. Normas de Bioseguridad

Este estudio se realizó bajo las normas recomendadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para el nivel 2 de bioseguridad para agentes de riesgo moderado, correspondiente a *Salmonella* no Typhi (Richmond y McKinney, 1999).

Dentro de las normas implementadas se utilizó vestimenta desechable (mascarilla, mangas y guantes), delantal, mecheros y gabinete de bioseguridad IIA (*Heal Force®*). La desinfección del área de trabajo se realizó con alcohol yodado y cloro (5000 ppm) y los residuos orgánicos fueron incinerados o autoclavados, según correspondía.

RESULTADOS

Previo a la selección de un protocolo para la permeabilización de los huevos del estudio, se evaluó la capacidad de penetración natural del colorante, en un grupo de huevos no permeabilizados (20 huevos). Los resultados obtenidos indicaron ingreso de colorante en el 5% de los huevos analizados (1/20 huevos), mientras que el 95% restante (19/20 huevos) no permitieron la entrada de colorante (**Fotografía 6**).



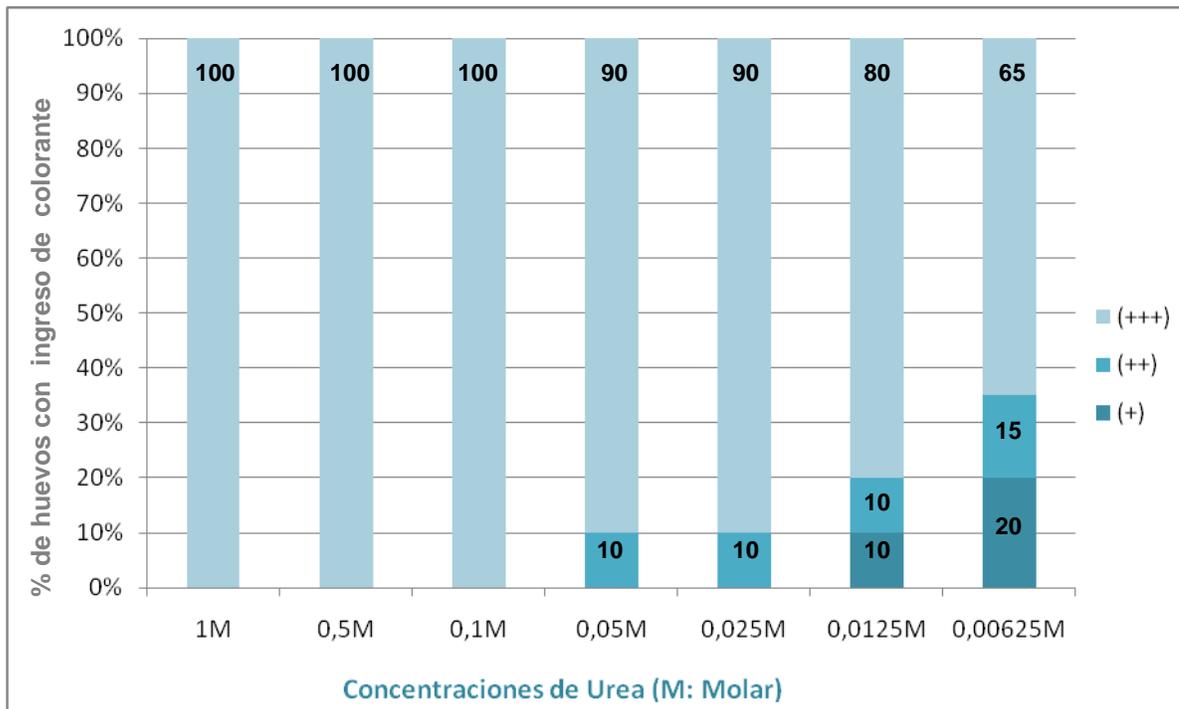
*Fotografía 6. Ingreso de fucsina en huevos no permeabilizados.
(La flecha indica el huevo con ingreso de colorante)*

Cabe señalar que el huevo positivo al ingreso de fucsina mostró bajo nivel (menos de 20 manchas), según la clasificación de ingreso de colorante, detallada previamente en la tabla 1.

De los protocolos realizados en base a Urea con Tris-HCl, se seleccionó como mejor protocolo el de concentración 0,025 M (1,5 gramos de Urea en 1 litro de solución

Tris-HCl), puesto que permitió el ingreso de colorante en el 100% de los huevos utilizados además de poseer la menor concentración capaz de mantener un abundante ingreso de colorante en los huevos. Los resultados obtenidos en los 7 protocolos realizados, se resumen en el gráfico 1.

Gráfico 1. Porcentaje de huevos permeabilizados y nivel de penetración de fucsina en el interior de la cáscara de huevo, según la concentración de Urea con Tris/HCl (Molar)



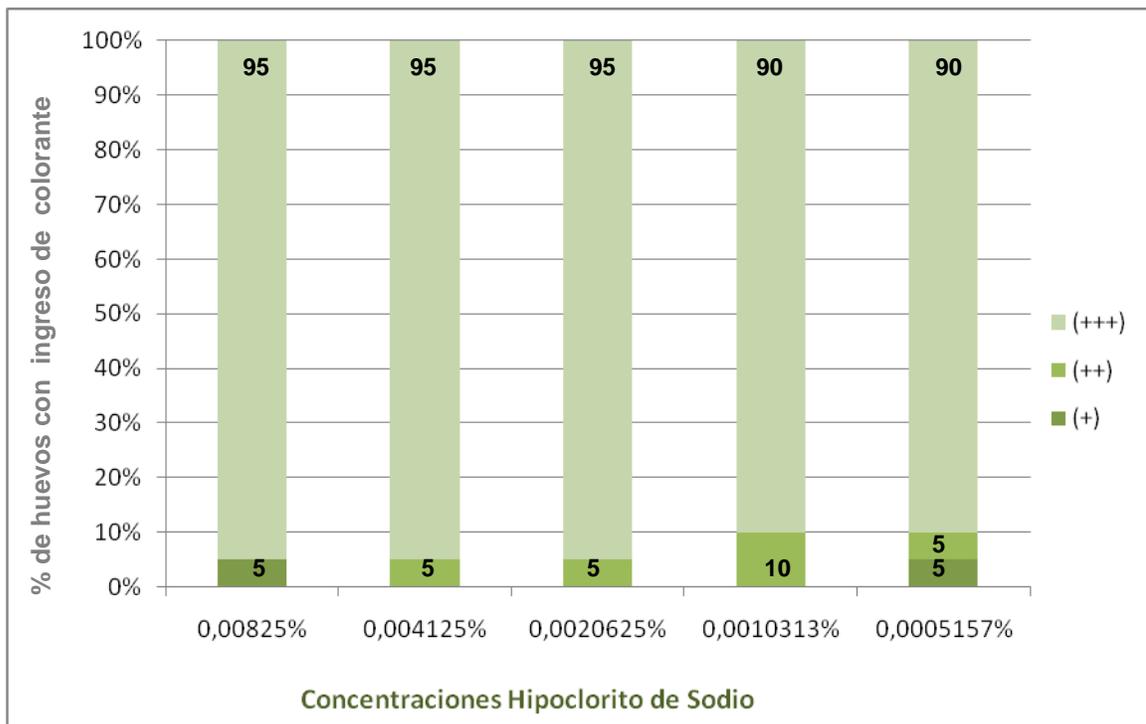
(+++)= Nivel Alto (más de 40); (++) = Nivel Medio (más de 20 y menos de 40); (+) = Nivel Bajo (menos de 20).

Como se observa en el gráfico 1, todas las concentraciones realizadas lograron permeabilizar el 100% de los huevos, sin embargo se observaron diferencias en el nivel de ingreso del colorante. Es así como concentraciones mayores o iguales a 0,025M mostraron una elevada entrada de colorante, con más del 90% de los huevos clasificados

en alto nivel (+++), sin embargo con concentraciones menores, el nivel de ingreso de colorante en los huevos fue disminuyendo.

En cuanto a la serie de protocolos (5 protocolos) realizados con el reactivo Hipoclorito de Sodio en distintas concentraciones, el mejor protocolo fue el de concentración 0,0010313%, puesto que permeabilizó el 100% de los huevos sometidos al ensayo. Además, resultó ser la menor concentración capaz de mantener un abundante ingreso de colorante al interior de los huevos. Los resultados obtenidos se resumen en el gráfico 2.

Gráfico 2. Porcentaje de huevos permeabilizados y nivel de penetración de fucsina en el interior de la cáscara, según la concentración de Hipoclorito de Sodio (%).



(+++)= Nivel Alto (más de 40); (++) = Nivel Medio (más de 20 y menos de 40); (+) = Nivel Bajo (menos de 20).

Como se observa en el gráfico 2, todas las concentraciones lograron permeabilizar el 100% de los huevos, sin embargo se aprecian diferencias en el nivel de ingreso del colorante. Es así como concentraciones mayores o iguales a 0,0010313% mostraron un alto ingreso de colorante, con más del 90% de los huevos clasificados en alto nivel (+++), mientras que con concentraciones menores disminuyó la intensidad de ingreso de colorante en los huevos.

Tanto el protocolo de Urea con Tris/HCl 0,025M como el protocolo de Hipoclorito de Sodio 0,0010313% demostraron permeabilizar el 100% de los huevos, con niveles equivalentes de penetración de colorante. Finalmente se seleccionó Urea con Tris/HCl 0,025 M, como el único protocolo de permeabilización del estudio, ya que a pesar de no poseer ventajas comparativas respecto del otro en términos de permeabilización, un estudio previo demostró que la concentración de Hipoclorito de Sodio al 0,00825% no genera efecto bactericida sobre *S. Enteritidis* al interior de los huevos tratados (Farfán, 2010), por lo tanto, resultó de mayor relevancia evaluar el efecto bactericida residual del protocolo con Urea seleccionado.

A continuación se detallan los valores de grosor promedio de las cáscaras de huevos (20 huevos por protocolo) por ensayo realizado (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Grosor promedio y Nivel de ingreso de colorante en las cáscaras de huevos permeabilizadas con distintas concentraciones de Urea-Tris/HCl.

Concentraciones Urea-Tris/HCL (M)	Grosor promedio de cáscara de huevo	Nivel de ingreso de colorante
1 M	0,353 mm	100%(alto)
0,5 M	0,351 mm	100%(alto)
0,1 M	0,600 mm	100%(alto)
0,05 M	0,595 mm	90%(alto)
0,025 M	0,574 mm	90%(alto)
0,0125 M	0,567 mm	80%(alto)
0,00625 M	0,581 mm	65%(alto)

M: Molaridad; **mm:** milímetros

Tabla 3. Grosor promedio y Nivel de ingreso de colorante en las cáscaras de huevos permeabilizadas con distintas concentraciones de Hipoclorito de Sodio (NaClO).

Concentraciones NaClO (%)	Grosor promedio de cáscara de huevo	Nivel de ingreso de colorante
0,00825%	0,551 mm	95%(alto)
0,004125%	0,576 mm	95%(alto)
0,0020625%	0,579 mm	95%(alto)
0,0010313%	0,579 mm	90%(alto)
0,0005157%	0,564 mm	90%(alto)

(%): porcentaje; **mm:** milímetros

En la Tabla 2, se muestra por ejemplo que las concentraciones de Urea-Tris/HCl 1M y Urea-Tris/HCl 0,1M presentan diferencias claras en sus promedios de grosor (0,353 mm y 0,600 mm respectivamente), sin embargo poseen el mismo porcentaje de nivel de ingreso de colorante (100%). Del mismo modo en la Tabla 3, se evidencian distintos valores de grosor promedio con el mismo porcentaje de nivel de ingreso de colorante. Debido a ello, no fue posible establecer una relación entre el grosor promedio de las cáscaras de huevo y el porcentaje de ingreso de colorante, por lo tanto, pareciera ser que

el factor grosor promedio de la cáscara de huevo no sería determinante en una mayor entrada de colorante al interior de los huevos.

Los resultados de la bacteriología cualitativa (% de contaminación) y cuantitativa (UFC/mL) se resumen, en el Tabla N° 4.

Tabla N° 4. Huevos contaminados (%) y recuentos bacterianos (\log_{10} UFC/mL) en huevos comerciales, permeabilizados con Urea-Tris/HCl en concentración 0,025M y contaminados experimentalmente con *S. Enteritidis*.

Grupos Experimentales	N° de huevos	Porcentaje de contaminación con S.E.	Recuento promedio de S.E. (\log_{10} UFC/mL) \pm D.E.*	Recuentos mínimos y máximos de S.E. (\log_{10} UFC)
Huevos Control**	87	98,85% ^a	8,95 ^a \pm 2,45	1,00 – 11,52
Huevos Permeabilizados	87	63,21% ^b	4,32 ^b \pm 4,37	1,00 – 10,16

*D.E.: desviación estándar

**Huevos permeabilizados con método abrasivo.

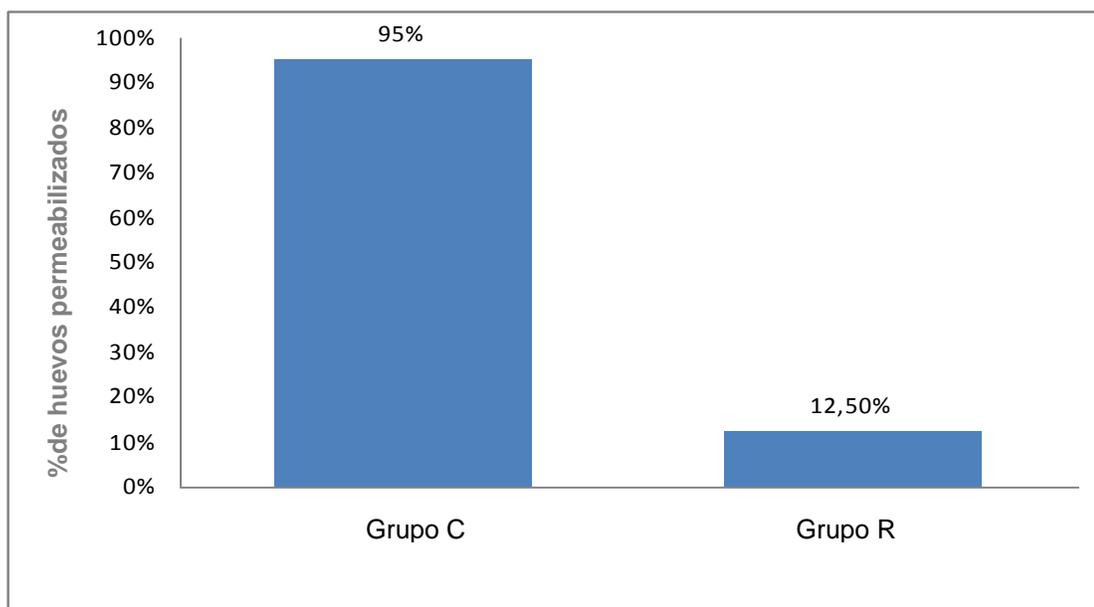
a y b: Letras distintas señalan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

En relación a la bacteriología cualitativa, en el Grupo Control, de un total de 87 huevos, 86 fueron positivos y uno resultó negativo a la infección con *S. Enteritidis* (98,85% de positividad). En el Grupo de huevos Permeabilizados, de un total de 87 huevos, 55 fueron positivos y 43 huevos resultaron negativos a la infección con *S. Enteritidis* (63,21% de positividad). Las diferencias de proporciones entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

En relación a los recuentos bacterianos, al comparar las medias aritméticas del grupo control y del grupo de huevos permeabilizados, se determinaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), (**Tabla N°4**), lo que significaría que hubo un efecto bactericida en el grupo de huevos permeabilizados químicamente. Es importante señalar que en el grupo control, en 2 de las 86 muestras positivas a la bacteriología cualitativa no se observó crecimiento bacteriano en ninguna dilución. Del mismo modo, en el grupo permeabilizado, 9 de las 55 muestras positivas a la bacteriología cualitativa fueron negativas a la bacteriología cuantitativa.

El efecto de aplicar distintas temperaturas para lograr permeabilización en huevos, se observa en el gráfico 3.

Gráfico 3. Porcentaje de huevos permeabilizados según temperatura de almacenaje.



(C): Grupo de huevos calentados a 37°C previo a la inmersión en colorante frío (4-8°C);
(R): Grupo de huevos refrigerados a 4-8°C previo a la inmersión en colorante frío (4-8°C).

En los huevos refrigerados (R), el colorante logró penetrar sólo el 12,5% del total de huevos, del cual 2,5% tuvo nivel de ingreso alto; 2,5% nivel de ingreso medio y el 7,5% restante un nivel de ingreso bajo.

Por otro lado, en el grupo de huevos calentados (C), el colorante logró penetrar al 95% del total de huevos. De este porcentaje, 75% tuvo nivel de ingreso alto; 15% nivel de ingreso medio y el 5% restante un nivel de ingreso bajo.

Los resultados de ambos grupos fueron comparados a través de la prueba X^2 , observándose diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

En la presente investigación, para optimizar el modelo de infección bacteriana *in ovo* por inmersión, se decidió usar huevos de pocas horas de ovipuestos (de aproximadamente 48 horas), de tal modo de garantizar una buena calidad de cutícula y con ello permitir que los protocolos de permeabilización fueran efectivos por sí mismos. Esto fue señalado por Mayes y Takeballi (1983), quienes concluyeron que a medida que el huevo envejece, la cutícula se deshidrata, lo que podría generar un aumento en el número de poros expuestos en la cáscara (citado por Messens *et al.*, 2005a). Por otro lado, en los estudios internacionales de infección *in ovo*, siempre se usan huevos frescos, con tiempos que oscilan entre uno a tres días desde que son ovipuestos (Schoeni *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002; De Reu *et al.*, 2006; Messens *et al.*, 2006). Para evaluar de alguna manera la presencia de cutículas de buena calidad en los huevos adquiridos, se comprobó en un grupo de huevos no permeabilizados, que el colorante no pudiera penetrar en forma pasiva; así, el 95% de ellos no mostró ingreso de fucsina hacia el interior de la cáscara, lo que garantiza la existencia de cutículas intactas y funcionales en los huevos utilizados.

La extracción de la cutícula de los huevos mediante permeabilización, busca optimizar la entrada de *S. Enteritidis* a través de las cáscaras intactas, debido a que esta capa glicoproteica no sólo actúa como una barrera física, que impide la entrada de microorganismos a través de los poros de la cáscara del huevo, sino que también posee componentes químicos, que pueden interactuar con los microorganismos al momento de la infección. Esto fue demostrado por Wellman-Labadie *et al.*, (2008), quienes realizaron un estudio de detección de las proteínas presentes en cutícula y superficie externa de la cáscara del huevo, indicando que en todos los extractos obtenidos hubo presencia de

Lisozima tipo C, Ovotransferrina y Ovocalixina-32, todas proteínas con reconocidas propiedades antimicrobianas.

La efectividad de los reactivos permeabilizantes, fue medida exclusivamente por el ingreso del colorante al interior de las cáscaras, y por lo tanto, su visualización debió ser lo más objetiva posible. De los métodos utilizados para ello, el programa computacional Melanie Viewer 7.0 fue una herramienta de fácil manejo, que facilitó el recuento de manchas mediante la graficación en relieve de cada una de ellas, permitiendo generar un registro digital del área seleccionada de cada huevo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen alrededor de 10.000 – 14.000 poros en la cáscara de un huevo, siendo más abundantes en el extremo romo, por lo tanto, la zona seleccionada podría llegar a tener hasta 400 o 500 manchas (Bruce y Drysdale, 1994). Esto último implica tomar un tiempo considerable para la realización de los recuentos, sin embargo, podría ser una alternativa para estimar el grado de porosidad de alguna zona determinada de la cáscara del huevo. El segundo método de visualización utilizado fue la simple observación de manchas en el interior de las cáscaras, con lo cual se clasificó en forma directa el grado de permeabilización de los huevos, según niveles de ingreso del colorante (alto, medio, bajo). Ambos métodos permitieron seleccionar de manera concordante el mejor protocolo de permeabilización, sin embargo, la visualización simple constituyó la forma más rápida y sencilla de cumplir con dicho objetivo.

La selección de los reactivos Urea e Hipoclorito de Sodio para permeabilizar la cáscara de los huevos sin generar efecto bactericida residual, se basó en los estudios de Wellman-Labadie *et al.*, (2008) y Farfán (2010). En el presente estudio, si bien ambos reactivos lograron permeabilizar el 100% de los huevos, con niveles equivalentes de penetración de colorante (90% con nivel alto), se decidió continuar el estudio con Urea-

Tris/HCl en concentración 0,025 M, puesto que Farfán (2010) determinó que Hipoclorito de Sodio en concentración 0,00825%, no presentaba efecto bactericida sobre un cultivo de *S. Enteritidis*. Por otro lado, no hay estudios publicados que describan un posible efecto bactericida residual de la Urea en bajas concentraciones sobre *S. Enteritidis*.

Adicionalmente, en todos los grupos experimentales usados para la selección del reactivo permeabilizante, se midió de forma individual el espesor promedio de la cáscara, con el fin de observar una posible relación con el ingreso de colorante. Los resultados parecen indicar que no hay relación entre ambos factores, situación comprobada por Messens *et al.*, (2005b) y De Reu *et al.*, (2006), los cuales realizaron infección de huevos con *S. Enteritidis*, sin evidenciar influencia del espesor de la cáscara sobre la penetración bacteriana.

Los resultados obtenidos desde la bacteriología cualitativa, señalaron que el método abrasivo fue más eficiente, ya que logró un mayor porcentaje de huevos contaminados (98,85%), comparado con el porcentaje logrado por la permeabilización con Urea (63,21%). La menor eficiencia del método químico podría ser explicada parcialmente en base a los diferenciales de temperatura generados dentro de cada grupo, ya que en el grupo Control, se generó un diferencial térmico marcado, a diferencia del grupo permeabilizado con Urea, en el cual, la variación de temperatura fue menor. El diferencial térmico adquiere importancia, si se considera que un huevo, cuando se encuentra expuesto a un medio ambiente más frío que la temperatura del cuerpo de la gallina (promedio 42°C), desarrolla una presión negativa en su interior, lo que permite a las bacterias migrar más fácilmente a través de la cáscara y membranas (Gantois *et al.*, 2009).

Es importante mencionar que la técnica abrasiva, si bien logró una mayor permeabilización de la cáscara, requirió de un tiempo mayor de realización comparado con el tratamiento químico, lo cual es importante de considerar cuando se trabaja con gran cantidad de muestras. Además, se debe tener en cuenta que esta técnica resultará efectiva, siempre y cuando se realice de forma pareja y sistemática en cada superficie de los huevos.

En relación al efecto de la Urea, el estudio desarrollado por McDonald y Weinstein (1946), señala que puede generar efecto bactericida sobre algunas cepas bacterianas suspendidas en un medio líquido, según la concentración utilizada. Es así como una concentración de Urea al 12% (Urea 2 M) logró inhibir fuertemente el crecimiento de *E. coli*, en un período de 8 a 10 horas, situación que se repitió en sólo 3 horas al utilizar una concentración al 20% (Urea 3,3 M). Concentraciones de Urea al 2% (0,33 M) y al 4% (0,66 M) generaron un efecto bactericida leve sobre *E. coli*. Por otro lado, se observó un leve efecto bactericida sobre *S. aureus*, cuando fue expuesto a una solución de Urea al 12%. Los autores concluyeron que bacterias Gram-negativas como *E. coli* son más susceptibles al efecto de la Urea que bacterias Gram-positivas como *S. aureus*. Por otro lado, la concentración del inóculo bacteriano también mostró importancia, ya que con inóculos más concentrados el efecto bactericida observado fue menor. Por último, este estudio sugiere tres posibilidades que explicarían los efectos antibacterianos de la Urea: i) alteración del pH del medio que impediría la sobrevivencia de la bacteria, ii) cambios en la presión osmótica que provocarían una hipertonicidad no tolerada por la bacteria y iii) la inhibición de algunos sistemas enzimáticos esenciales para las bacterias.

En el presente estudio, los resultados del efecto bactericida indicaron que la Urea tuvo un efecto residual ($p \leq 0,05$) sobre la cepa desafío, lo que indica que no debería

utilizarse en la concentración 0,025 M para el modelo de contaminación experimental *in ovo*. Estos resultados no eran esperados, puesto que si bien, uno de los escasos estudios publicados en la literatura respecto al tema (McDonald y Weinstein, 1946) describe que la Urea tiene efecto bactericida sobre ciertas cepas bacterianas, tales como *E. coli*, las condiciones experimentales en las cuales se desarrolló dicho experimento (cepas bacterianas, tiempos de acción del reactivo, medios de dilución y concentraciones del reactivo) fueron muy distintas, y no permiten extrapolar sus resultados hacia el presente estudio. Cabe destacar que no hay estudios publicados en la literatura que hagan referencia al efecto bactericida de este reactivo sobre cepas de *Salmonella*, por lo tanto, estos resultados podrían ser el punto de partida de futuras investigaciones al respecto.

Las muestras del estudio que resultaron positivas a la bacteriología cualitativa pero negativas a la bacteriología cuantitativa (2 en el grupo control y 9 en el grupo permeabilizado), se explicarían debido a que al realizar la bacteriología cuantitativa, dichas muestras no poseían aún un número de bacterias detectables por la sensibilidad de técnica de cultivo (10^3 UFC/mL), y por lo tanto, cuando se realizó la bacteriología cualitativa a las 48 y 72 horas de incubación a 37°C, las muestras resultaron positivas. Por otro lado, el uso de una técnica con un mayor nivel de sensibilidad como la reacción de polimerasa en cadena (PCR) puede ser en muchos casos una alternativa a la técnica de cultivo tradicional, sin embargo, no es posible de ser usada en este caso particular, debido a que detecta secuencias de DNA bacteriano, el cual estará presente tanto en las bacterias vivas como en las muertas, lo cual podría generar falsos positivos.

De forma complementaria a la permeabilización química, fue evaluado el efecto que genera el diferencial de temperatura sobre la penetración de colorante a través de la cáscara de un huevo intacto. Los resultados indicaron que en el grupo de huevos en los

que no se generó un diferencial de temperatura (huevo refrigerado e inmersión fría), el efecto de succión del colorante (12,5% de positividad) fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) que en el grupo de huevos tibios sometidos a inmersión fría (95% de positividad). Estos resultados permiten suponer que el diferencial térmico es un factor clave, que potenciaría el ingreso de *Salmonella* hacia el interior de los huevos frescos, lo cual sería interesante de comprobar en futuros estudios de penetración *in ovo*.

Finalmente, los resultados sugieren que el uso de la permeabilización con Urea-Tris/HCl en concentración 0,025 M cumple eficientemente con el objetivo de extraer la cutícula, sin provocar algún daño estructural macroscópico de la cáscara, sin embargo, por su efecto bactericida residual en el contenido de los huevos, no sería la mejor opción para realizar modelos de infección *in ovo* con esta bacteria. No obstante, dadas las ventajas que ofrece este método y a que los resultados de infección logrados en esta experiencia fueron superiores a todos los obtenidos por los estudios de inmersión *in ovo* descritos en la literatura (Schoeni *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998; Himathongkham *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002; De Reu *et al.*, 2006; Messens *et al.*, 2006), sería interesante generar nuevos estudios de permeabilización, con concentraciones menores a la utilizada en el presente estudio.

CONCLUSIONES

- Los reactivos Urea e Hipoclorito de Sodio lograron permeabilizar 100% de los huevos con una eficiencia similar.
- El reactivo Urea-Tris/HCl 0,025 M fue la menor concentración que permeabilizó con mayor eficiencia la cáscara de los huevos, respecto al resto de las seis concentraciones analizadas.
- El uso de Urea-Tris/HCl en concentración 0,025 M genera un efecto bactericida residual sobre *S. Enteritidis* en los huevos permeabilizados por inmersión.
- La técnica abrasiva demostró mayor efectividad de permeabilización que Urea-Tris/HCl en concentración 0,025 M.
- El grupo de huevos calentados generó un mayor diferencial de temperatura que el grupo de huevos refrigerados, provocando mayor porcentaje de permeabilización en este grupo.

BIBLIOGRAFÍA

ADAM, R.; MUSSA, S.; LINDERMANN, D.; OELSCHLAEGER, T.; DEADMAN, M.; FERGUSON, D.; MOXON, R.; SCHROTEN, H. 2002. The avian chorioallantoic membrane in ovo - a useful model for bacterial invasion assays. *International Journal of Medical Microbiology*. 292 (3-4) :267-275p.

ARIAS, J.; MANN, K.; NYS, Y.; GARCIA, J.; FERNANDEZ, S. 2007. Eggshell Growth and Matrix Macromolecules *In:* BAUERLEIN, E. Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation. 18: 309-327p.

ARIAS, J. 2007. Ética en investigaciones *In:* KOTTOW, M. Marcos normativos en ética de la investigación científica con seres vivos. 191p.

BERRANG, M.; COX, N.; FRANK, J.; BUHR, R. 1999. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. *Journal of Applied Poultry Reseach*. 8: 499-504p.

BOARD, R. G., HALLS, N. A. 1973. The cuticle: a barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *British Poultry Science*. 14: 69-97p.

BRUCE, J.; DRYSDALE, E. 1994. Trans-shell transmission. *In:* Board, R.; Fuller, R. (Eds.). Microbiology of the Avian Egg. Chapman y Hall; Londres, Inglaterra. 63-86p.

CHAMBERS, J.; LU, X. 2002. Probiotics and Maternal Vaccination for *Salmonella* Control in Broiler Chickens. *Journal of Applied Poultry Reseach*. 11: 320-327p.

CHEN, H.; ANANTHESWARAN, R.; KNABEL, S. 2002. Effect of rapid cooling on the growth and penetration of *Salmonella enteritidis* into egg contents. *Journal of Food Safety*. 22 (4): 255-271p.

CHIN'OMBE, N.; BOURN, W.; WILLIAMSON, A.; SHEPHARD, E. 2009a. An oral recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutant elicits systemic antigen-specific CD8+ T cell cytokine responses in mice. *Gut Pathogens* [en línea] < <http://www.gutpathogens.com/content/1/1/9>> [consulta: 29-05-2010].

CHIN'OMBE, N.; BOURN, W.; WILLIAMSON, A.; SHEPHARD, E. 2009b. Oral vaccination with a recombinant *Salmonella* vaccine vector provokes systemic HIV-1 subtype C Gag-specific CD4+ Th1 and Th2 cell immune responses in mice. *Virology Journal*. [en línea] < <http://www.virologyj.com/content/6/1/87>> [consulta: 29-05-2010].

CLAY, C.E.; BOARD, R.G. 1991. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens shell eggs. *Epidemiology and Infection*. 106: 271-281p.

CLAY, C.E.; BOARD, R.G. 1992. Effect of faecal extract on the growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens eggs. *British Poultry Science*. 33: 755-760p.

DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. 2004a. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology*. 97(2): 233-245p.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, M.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*. 112 (3): 253-260p.

FARFÁN, F. 2010. Efecto de una mezcla de bacteriófagos sobre el recuento de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF experimentalmente infectados. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 68p.

FIGUEROA, I.; VERDUGO, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47 (1-2): 25-42p.

GARNER, C.; ANTONOPOULOS, D.; WAGNER, B.; DUHAMEL, G.; KERESZTES, I.; ROSS, D.; YOUNG, V.; ALTIER, C. 2009. Perturbation of the Small Intestine Microbial Ecology by Streptomycin Alters Pathology in a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Murine Model of Infection. *Infection and Immunity*. 2691-2702 p.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; TIMBERMONT, L.; BOYEN, F.; GAST, R.; BOHEZ, L.; HAESBROUCK, F. ; PASMANS, F. ; VAN IMMERSEEL, F. 2006. Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac[®] E and TAD *Salmonella* vac[®] T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine*. 24: 6250-6255p.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T.; VAN IMMERSEEL, F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *Federation of European Microbiological Societies Reviews*. 20: 1-21p.

GAST, R. K., HOLT, P. S. 2001. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella enteritidis* deposition on the egg yolk membrane. *Poultry Science*. 80: 997–1002p.

GAST, R. K., GUARD–BOULDIN, J., HOLT, P. S. 2004. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella heidelberg* and *Salmonella enteritidis*. *Avian Diseases*. 48: 863–869p.

GAST, R. K., GUARD–BOULDIN, J., HOLT, P. S. 2005. 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: 382–386p.

GAST, R. 2007. Serotype–specific and serotype–independent strategies for preharvest control of food–borne *Salmonella* in poultry. *Avian Diseases*. 51: 817–828p.

HERNANDEZ, S. 2004. El modelo animal en las investigaciones biomédicas [en línea] <www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf> [consulta: 15-05-2010] *Biomedicina*. 2(3): 252-256 p.

HIMATHONGKHAM, S.; RIEMANN, H.; ERNST, R. 1999. Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella enteritidis*. Implications for egg testing. *International Journal of Food Microbiology*. 49 (3): 161-167p.

INFOSTAT. 2004. InfoStat, versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Editorial Brujas. Argentina. 314 p.

JONES, D. R., ANDERSON, K. E., CURTIS, P. A., JONES, F. T. 2002. Microbial contamination in inoculated shell eggs: I. Effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*. 81: 715-720p.

KELLER, L.; BENSON, CH.; KROTEC, K.; ECKROADE, R. 1995. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*. 63 (7): 2443-2449p.

LÓPEZ, A. 2007. Descripción de la infección experimental en pollos con una cepa nativa de *Salmonella Enteritidis* nal elevado a r elevado a r P-9. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 63p.

MCDONALD, A.; WEINSTEIN, L. 1946. The action of Urea and some of its derivatives on bacteria. *The Journal of Immunology*. 54: 117-130p.

MELANIE VIEWER 7.0 2003. Biology Software Net 2D Gel Analysis [en línea] <<http://en.bio-soft.net/draw/ImageMaster.html>> [consulta: 07-10-2009]

MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. 2005a. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. *World's Science Journal*. 61: 71-85p.

MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. 2005b. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *British Poultry Science*. 46 (6): 694-700p.

MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. 2006. Eggshell penetration of hens eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science*. 47: 554-560p.

MIYAMOTO, T.; BABA, E.; TANAKA, T.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. 1997. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. *Avian Diseases*. 41 (2): 296-303p.

MIYAMOTO, T.; HORIE, T.; BABA, E.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAWAKA, A. 1998. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*. 61 (3): 350–353p.

MURRAY, C.; BARTON, M. 1993. Salmonellosis bacteriology. *In*: Corner, L. And Bagust, T. (Eds). *Australian Standard Diagnostic Techniques For Animal Diseases*. Australia. 3-8p.

PADRON, M. 1990. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. *Avian Diseases*. 34: 463–465p.

RICHMOND, J. Y.; MCKINNEY, R.W. 1999. Section II: principles of biosafety. *In*: Centers for disease control and prevention, CDC. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. [en línea] <<http://www.cdc.gov>> [consulta: 26-08-09].

SHOENI, J.; GLASS, K.; MCDERMONTT, J.; WONG, A. 1995. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. *International Journal of Food Microbiology*. 24: 385-396p.

SPARKS, N. H. C., BOARD, R. G. 1984. Cuticle, shell porosity and water uptake through hens eggshells. *British Poultry Science*. 25 (2): 267–276p.

SPARK, N.; BOARD, R. 1985. Bacterial penetration of the recently oviposited Shell of hens eggs. *Australian Veterinary Journal*. 5: 169-70p.

SPARKS, N.H.C. 1994. Shell accessory materials: structure and function. In: *Microbiology of the Avian Egg* (Board, R.G. and Fuller, R. Eds.). London, Chapman and Hall. 25-42p.

TRULL, F. 2005. The Essential Need for Animals in Medical Research. Foundation for Biomedical Research. [en línea] <<http://www.americanchronicle.com/articles/view/2756> > [consulta: 15-05-2010].

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; BOHEZ, L.; BOYEN, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. 2004. Intermittent Long-Term Shedding and Induction of Carrier Birds after Infection of Chickens Early Posthatch with a Low or High Dose of *Salmonella Enteritidis*. *Poultry Science*. 83 (11): 1911-1916p.

WELLMAN-LABADIE, O.; PICMAN, J.; HINCKE, M. 2008. Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds. *British Poultry Science*. 49 (2): 133-143p.

ANEXO N° 1. Protocolo de permeabilización con reactivo Urea-Tris/HCl (M: molar)

- Revisión de huevos (20 unidades por protocolo) con un ovoscopio para el descarte de rotos y trizados.
- Pre calentamiento de huevos a 37°C por 4 hrs.
- Inmersión de huevos por 30 minutos en solución de Urea-Tris/HCl (M).
- Preparación de reactivo: 6.04 grs de base Tris disueltos en 1 litro de agua destilada.
- Bajar pH de la solución Tris con HCl al 37% hasta dejar en pH: 7.5
- Solución de Urea Molar: gramos de Urea disueltos en 1 litro de solución Tris-HCl.

La cantidad de Urea (gramos) necesaria para realizar cada concentración se detallan a continuación:

Concentración de Urea Molar	Gramos de Urea disueltos en Tris-HCl
1 Molar	60 gramos
0,5 Molar	30 gramos
0,1 Molar	6 gramos
0,05 Molar	3 gramos
0,025 Molar	1,5 gramos
0,0125 Molar	0,75 gramos
0,00625 Molar	0,375 gramos

- Lavado de los huevos con agua potable y secado por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Inmersión en solución fría de fucsina básica (1 gramo/Litro) por 90 minutos.
- Vaciado de huevos y visualización de manchas de colorante presentes en la parte interna de la cáscara del huevo.

ANEXO Nº 2. Protocolo de permeabilización con reactivo Hipoclorito de Sodio comercial (5%)

- Revisión de huevos (20 unidades por protocolo) con un ovoscopio para el descarte de rotos y trizados.
- Precalentamiento de huevos a 37°C por 4 hrs.
- Inmersión de huevos por 30 minutos en solución con Hipoclorito de Sodio.
- Preparación de reactivo: cantidad de Cloro 5% (mL) disuelta en 1 litro de agua destilada. La cantidad de Cloro 5% (mL) necesaria para realizar cada concentración se detallan a continuación:

Concentración de NaClO (%)	Cloro al 5% (mL) disueltos en 1 litro de agua destilada
0,00825%	1,65 mL
0,004125%	0,825 mL
0,0020625%	0,4125 mL
0,0010313%	0,20625 mL
0,0005157%	0,103125 mL

- Lavado de los huevos con agua potable y secado por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Inmersión en solución fría de fucsina básica (1 gramo/Litro) por 90 minutos.
- Vaciado de huevos y visualización de manchas de colorante presentes en la parte interna de la cáscara del huevo.