



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DEL CAMBIO DE TEMPERATURA SOBRE LA
PENETRACIÓN DE *Salmonella* Enteritidis A TRAVÉS DE LA
CÁSCARA DEL HUEVO

PAULA VERÓNICA BRAVO ARREDONDO

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
2011

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
I. Generalidades.....	7
II. <i>Salmonella</i> Enteritidis y Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	7
III. Contaminación de los huevos con <i>Samonella</i> Enteritidis	9
III. 1. Transmisión vertical.....	11
III. 2. Transmisión horizontal.....	12
IV. Medidas para el control de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	15
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
1. Huevos.....	21
2. Cepa desafío.....	21
3. Preparación y determinación de la concentración del inóculo bacteriano.....	22
4. Modelo experimental.....	22
5. Bacteriología cualitativa.....	24
6. Bacteriología cuantitativa.....	25
7. Procesamiento de huevos control.....	25
8. Normas de bioseguridad.....	26

9. Análisis estadístico.....	26
RESULTADOS.....	27
I. Concentración del inóculo bacteriano.....	27
II. Bacteriología cualitativa.....	27
III. Bacteriología cuantitativa.....	29
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39
ANEXOS.....	50

RESUMEN

En la actualidad, *Salmonella* Enteritidis (SE) es considerada una de las principales causas de toxiinfecciones alimentarias a nivel internacional, habiéndose determinado a los huevos como uno de los vehículos más importantes de este patógeno. Por este motivo, se han estudiado diversos métodos que permitan controlar el ingreso de SE al contenido del huevo, surgiendo la refrigeración como una importante alternativa, debido a que permitiría inhibir la penetración y multiplicación bacteriana. Sin embargo, algunos estudios señalan que la refrigeración de huevos mantenidos previamente a temperatura ambiente, favorecería la penetración de la bacteria a través de la cáscara, debido a que la diferencia de temperaturas genera una presión negativa en éstos, provocando la succión de las bacterias presentes en la superficie del huevo. A partir de estos datos, surge la inquietud de determinar el real efecto de la refrigeración en el control de la penetración de SE al contenido de huevos conservados previamente a temperatura ambiente.

Para esto se emplearon 100 huevos frescos, que fueron mantenidos durante 15 días a temperatura ambiente (25°C; grupo A). Al cabo de este periodo, los huevos fueron contaminados mediante la técnica de pinceladas de las cáscaras, con una concentración bacteriana de $2,6 \times 10^9$ UFC SE/ mL. Luego de la contaminación, se formaron dos grupos al azar de 50 unidades cada uno. Uno de ellos fue refrigerado (4-8°C) – grupo A/R –, y el otro se mantuvo a temperatura ambiente (25°C) – grupo A/A –, durante seis días. Transcurridos seis días de almacenamiento, los huevos de ambos grupos fueron abiertos, y sus yemas y albúminas fueron separadas, para realizar análisis bacteriológico cualitativo (porcentaje de positividad) y cuantitativo (recuento bacteriano).

Contrariamente a lo esperado, los resultados de la bacteriología cualitativa del grupo A/R, mostraron un 32% de yemas y un 12% de albúminas positivas a SE, mientras que en el grupo A/A, un 100% de yemas y un 66% de albúminas fueron positivas a la bacteria. Las diferencias entre ambos grupos, tanto para albúminas como para yemas, fueron significativas ($p = 0,00001$). En cuanto al análisis cuantitativo de las

yemas, solo se obtuvo resultados positivos en el grupo A/A, lográndose un recuento promedio de 2,24 log₁₀ UFC SE/ mL.

La obtención de un menor número de muestras A/R positivas a SE, respecto a lo ocurrido en las muestras A/A, se explicaría por la inhibición de la multiplicación bacteriana ocurrida a temperatura de refrigeración, y probablemente también por disminución de la penetración bacteriana, en contraste con el favorecimiento de estas a temperatura ambiente.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten concluir que el exponer los huevos a un diferencial de temperatura no afectaría la penetración de SE a través de la cáscara.

SUMMARY

Today, *Salmonella* Enteritidis (SE) is considered one of the main international cause of food poisoning, eggs have been established as the most important vehicle for this pathogen. For this reason, different methods to control the migration of SE into the egg content, suggesting that refrigeration is an important alternative, because it would allow to avoid penetration and bacterial multiplication. Nevertheless, some studies show that refrigeration of eggs previously kept at room temperature, facilitates the bacterial penetration through the eggshell, due to the difference in temperatures generates a negative pressure, which would produce the suction of bacteria present in the egg surface. Bases on this data, concern arises to determinate the real effect of refrigeration in the control of SE's penetration into the egg content maintained at room temperature.

For this purpose, 100 eggs were kept for 15 days at room temperature (25°C). Once this period was over, the eggs were contaminated using a brush technique over the shell, with a bacterial concentration of 2.6×10^9 CFU SE/ ml. Then after contamination, two groups of 50 unities each, were randomly formed. One group was refrigerated (4-8°C) – group A/R – and the second one was kept at room temperature (25°C) – group A/A –, for six days. After six days of storage, the eggs of both groups were opened, album and yolk were separated, to perform a qualitative (positive percentage) and quantitative (bacterial count) bacterial analysis.

Contrary to what was suggested, results of qualitative bacteriology of group A/R, show that 32% of yolk and 12% of albumin samples were positive to SE, while in group A/A, a 100% of yolk and 66% of albumin samples were positive to the bacteria. The differences between the two groups, both albumin as yolks, were significant ($P=0.00001$). Concerning the quantitative analysis of yolk, positive results were obtained only in the A/A group reaching an average count of 2.24 log₁₀ CFU SE/ ml.

The fact of a lower number of A/R positive samples to SE, compared to A/A samples, can be explained by an inhibitory effect of refrigeration temperature over the multiplication of the bacteria, and probably also because of the decrease of penetration by the bacteria , in contrast with room temperature which has a facilitating effect.

Finally, the results show that exposing eggs to a gradient of temperature do not affect the penetration of SE through the shell.

INTRODUCCIÓN

En Chile, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (SE) apareció en forma epidémica en el año 1994. A partir de ese momento este patógeno ha sido señalado como una de las principales causas de toxiinfecciones alimentarias en el país, asociada fuertemente al consumo de productos avícolas insuficientemente cocidos, donde los huevos y sus productos derivados, como mayonesa y merengue, juegan un rol fundamental.

Debido a lo anterior, uno de los grandes desafíos que enfrenta el sector avícola es evitar la contaminación del contenido del huevo con SE, sea por transmisión vertical u horizontal. En el primer caso, se han diseñado métodos que reducen el riesgo de ingreso del patógeno al huevo durante su formación y en torno a la ovipostura, tal como la vacunación de las gallinas. Para el control del traspaso horizontal, se emplean mecanismos como la inspección y eliminación de huevos trizados, recolección temprana de huevos, limpieza de los restos de heces de la superficie, lavado de la cáscara y desinfección con productos químicos. Así mismo, la refrigeración de los huevos constituiría un mecanismo de control de la multiplicación de SE, y otros patógenos, debido a que a bajas temperaturas se inhibe el crecimiento bacteriano, permitiendo de esta forma reducir la probabilidad de contaminación del contenido del huevo con los posibles patógenos presentes en la cáscara.

Por este motivo, a nivel internacional, la mayoría de los reglamentos sobre la correcta mantención de los huevos, establecen que la refrigeración es la forma más adecuada. En Chile, en cambio, las normas no son tan claras, estipulando que se deben mantener a una “temperatura adecuada” y que se deben evitar fluctuaciones de la temperatura ambiente, de modo de reducir el riesgo de contaminación. Debido a esta poca claridad en las normas, los huevos, mantenidos a temperatura ambiente en los supermercados, son posteriormente refrigerados en la mayoría de los hogares, cambio que podría resultar perjudicial, debido a que el diferencial de temperatura al que se exponen podría generar una presión negativa en ellos, favoreciendo la penetración bacteriana.

De esta forma, parece pertinente determinar si la exposición de los huevos a un diferencial de temperatura (de temperatura ambiente a temperatura de refrigeración), podría afectar la penetración de SE a través de la cáscara.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. GENERALIDADES DE *Salmonella* Enteritidis

Salmonella enterica subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (SE) pertenece al género *Salmonella*, el cual, a su vez, es parte de la familia Enterobacteriaceae (Tindall, 2005). En cuanto a las características del género *Salmonella*, estas bacterias se reconocen por ser bacilos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos y que se comportan como patógeno intracelular facultativo (Popoff *et al.*, 2003).

Cabe destacar que SE es un patógeno entérico, que tiene la capacidad de afectar tanto a humanos como animales, produciendo kjug generalmente infecciones asintomáticas en estos últimos seres (Uzzau *et al.*, 2000). Respecto al cuadro clínico, este es autolimitado, y se caracteriza por producir una enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal, que, generalmente, no se prolonga por más de ocho días (Fica *et al.*, 2001).

II. *Salmonella* Enteritidis Y ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Anualmente se presentan numerosos casos de toxiinfecciones alimentarias asociadas a SE alrededor de todo el mundo, por lo que esta bacteria constituye un importante problema de salud pública a nivel internacional. En la Unión Europea, por ejemplo, se confirmaron cerca de 165.023 casos de salmonelosis en el 2006, de los cuales el 62,5% fueron provocados por SE (Gantois *et al.*, 2008), mientras que en el 2008, en una unidad militar ubicada en el centro de la ciudad de Isparta (Turquía), se notificó un brote de salmonelosis donde se aisló SE desde 276 muestras de heces y sangre, pertenecientes a 445 hospitalizados (Kilic *et al.*, 2010). Por otro lado, en el 2009, se determinó que de 1003 casos de gastroenteritis por *Salmonella* notificados en el Reino Unido, en un período de 10 años, el 59% de ellos fueron provocados por el serotipo Enteritidis (Matheson *et al.*, 2010).

En Chile, las infecciones por SE aparecieron dramáticamente en 1994. Desde ese momento, hubo un incremento de casi tres veces en los casos registrados, en relación a las apariciones esporádicas de este patógeno ocurridas históricamente (Fica *et al.*, 2001). Años más tarde, Figueroa (2007) señaló que entre los años 2001 y 2006, SE fue la principal causa de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el país, constituyendo casi el 50% del total de cepas de *Salmonella* registradas en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). Así mismo, en un estudio desarrollado por Vaquero *et al.* (2011) se informa que entre los años 2005 y 2011, del total de cepas de *Salmonella* spp. aisladas, tanto de alimentos como de muestras clínicas, el 83% de ellas corresponde a SE.

La mayoría de las toxiinfecciones provocadas por SE tienen un origen común: el consumo de productos avícolas, tales como carne y huevos insuficientemente cocidos, considerándose a estos últimos como los principales vehículos de dicha infección (Prado *et al.*, 2002; Figueroa, 2007; Gantois *et al.*, 2008). Según el análisis realizado por Greig y Ravel (2009) entre los años 1988 y 2007, respecto a brotes de ETA notificados en la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, se determinó que un 46,9% de estos fueron causados por *Salmonella* spp., determinándose al serotipo Enteritidis como el más frecuente (24,1%), seguido por el serotipo Typhimurium (6,6%). Además, se concluyó que la principal fuente de diseminación de SE fueron los huevos, adjudicándose el 43,4% de los casos, mientras que la carne de pollo fue causal tan sólo del 9,9% de ellos.

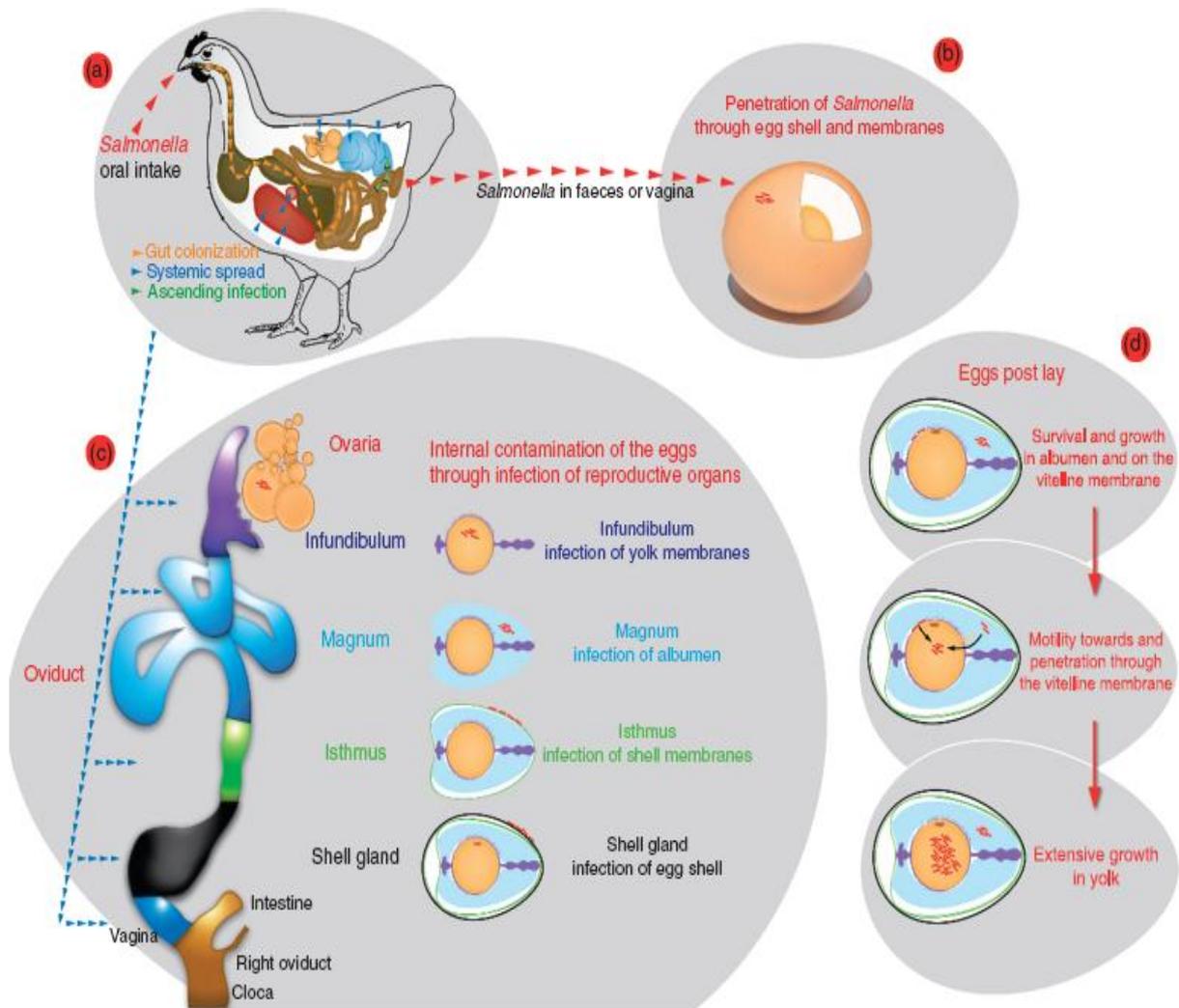
En un estudio realizado por Alexandre *et al.* (2000) en la Región Metropolitana de Chile, se comparó la presencia de *Salmonella* spp. en diferentes productos de origen avícola, concluyéndose que la carne y menudencias de ave estaban contaminadas más frecuentemente que los huevos (7,08% y 0,09% respectivamente). De igual forma, en el estudio elaborado por Vaquero *et al.* (2011), en el que fueron consideradas todas las regiones de Chile, se determinó que la detección de SE en alimentos se concentra principalmente en la carne de ave (49%), seguida por los huevos y ovoproductos (15%). A pesar de esto, la contaminación de los huevos es epidemiológicamente mucho más trascendental, debido a que su consumo *per capita*, a

nivel nacional, es bastante alto – 175 unidades/habitante/año (ODEPA, 2008) –, consumiéndose muchas veces con un inadecuado nivel de cocción. Cabe destacar además, que la presencia de un solo huevo contaminado puede comprometer toda una preparación alimenticia, fundamentalmente cuando ésta no es refrigerada, debido a que a mayor temperatura se favorece la multiplicación bacteriana (Gast *et al.*, 2006).

III. CONTAMINACIÓN DE LOS HUEVOS CON SE

La contaminación de los huevos con SE puede producirse mediante dos vías (Figura N° 1). La primera, es por medio de la penetración de la bacteria a través de la cáscara durante o después la oviposición (transmisión horizontal). La segunda posibilidad, es la contaminación directa de la yema, albúmina, membranas de la cáscara o cáscara antes de la oviposición, debido a la colonización de los órganos reproductivos (transmisión vertical) (De Buck *et al.*, 2004). Sin embargo, es imposible discriminar si la contaminación ocurrió durante la formación del huevo o por penetración a través de la cáscara (De Buck *et al.*, 2004), por lo que no existe un consenso sobre cual de las dos formas es más importante. A pesar de esto, se manifiesta una mayor inclinación hacia la transmisión vertical (Gantois *et al.*, 2008).

Figura N° 1. Contaminación del huevo por *Salmonella* spp.



(a) *Salmonella* ingresa oralmente en la gallina y entra al tracto intestinal. Las bacterias que colonizan el lumen intestinal son capaces de invadir las células epiteliales intestinales (colonización del intestino). Como consecuencia, células inmunes, más específicamente macrófagos, son atraídos al sitio de la invasión y encierran a las bacterias *Salmonella*. Esto le permite a la bacteria sobrevivir y multiplicar en el ambiente intracelular del macrófago. Estos macrófagos infectados migran a los órganos internos tales como los órganos reproductivos (propagación sistémica). Además de la propagación sistémica, la bacteria puede también llegar al oviducto a través de infecciones ascendentes desde la cloaca. (b) Una ruta de posible contaminación del huevo es por la penetración de la *Salmonella* a través de la cáscara y membranas de la cáscara después de la contaminación externa. La contaminación de la superficie puede ser el resultado tanto de la infección de la vagina o por contaminación fecal. (c) La segunda ruta posible es por contaminación directa de la yema, membranas de la yema, albúmina, membranas de la cáscara y cáscara originada por la contaminación del ovario, infundíbulo, magnum, istmos y glándulas de la cáscara, respectivamente. (d) *Salmonella* depositada en la albúmina y sobre la membrana vitelina es capaz de sobrevivir y crecer en el ambiente antibacteriano. Ellas son también capaces de migrar y penetrar en la membrana vitelina a fin de llegar a la yema. Después de llegar a este entorno rico pueden crecer extensamente (Fuente: Traducido de Gantois *et al.*, 2008).

III. 1. Transmisión vertical

La transmisión vertical consiste en el paso de bacterias hacia el huevo en formación desde el ovario y/u oviducto previamente infectados (Gantois *et al.*, 2008; De Buck *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2000). La infección del tejido reproductivo de la gallina, ocurre como consecuencia de la diseminación sistémica de *Salmonella* desde el intestino. La invasión de las células epiteliales intestinales, desencadena la infiltración de células inmunes, principalmente macrófagos, los que capturan a SE en su interior. Debido a la capacidad de sobrevivir y replicarse en las células inmunes, las bacterias transportadas en el interior de los macrófagos son diseminadas en el organismo del hospedero, resultando en la colonización de los órganos reproductivos (Gantois *et al.*, 2008). Sin embargo, la presencia de infección sistémica no involucra, necesariamente, la postura de huevos contaminados (Gast y Beard, 1992); es más, en un trabajo realizado por Gast *et al.*, (2004), estudiaron la capacidad de SE de colonizar los órganos reproductivos de las gallinas de postura y así producir la contaminación del contenido de los huevos. Para esto, infectaron experimentalmente gallinas de postura, a través de inoculación oral con SE ($1,5 \times 10^9$ UFC). Las aves fueron sacrificadas en los días 7 y 21 posteriores a la infección, para obtener muestras de ovario y oviducto. Los resultados de esta experiencia mostraron que, al séptimo día post infección, SE se aislaba en alta frecuencia a partir de los ovarios y oviductos (66,7%), sin embargo, en el día 21 después de la inoculación, el aislamiento de la bacteria desde los ovarios era infrecuente, y nunca sobrepasó un 16,7%, mientras que no se logró su aislamiento a partir de los oviductos. En cuanto a la contaminación interna de los huevos, se logró aislar SE en un promedio de 6,97% de las muestras. Esto sugiere que, ni siquiera la presencia del patógeno en los tejidos reproductivos garantiza que la contaminación de los huevos vaya a ocurrir en una alta frecuencia, incluso cuando se infecta con dosis muy altas.

La estructura del huevo que se vea afectada por SE, dependerá de la zona del aparato reproductor que esté infectada (Figura N° 1). Así, la contaminación de la albúmina se produciría durante el pasaje y formación del huevo en el oviducto, mientras que la contaminación de la yema se debería a la infección ovárica (De Buck *et al.*, 2004). Por otro lado, la mayoría de los autores identifican a la albúmina como el

compartimiento más frecuentemente contaminado por SE (Shivaprasad *et al.*, 1990; Humphrey *et al.*, 1991; Gast y Beard, 1993), sin embargo, estudios más recientes han detectado una mayor incidencia de infección en la yema (Gast y Holt, 2000; Gast *et al.*, 2002).

Cabe destacar que en un estudio realizado por Keller *et al.* (1995), se determinó que las gallinas infectadas ponen huevos contaminados en forma intermitente y fluctuante en el tiempo, fenómeno que podría ser provocado por estrés, variaciones hormonales y fluctuaciones en la protección inmunológica, entre otros factores (Holt, 1993; Holt y Gast, 2002; Holt, 2003).

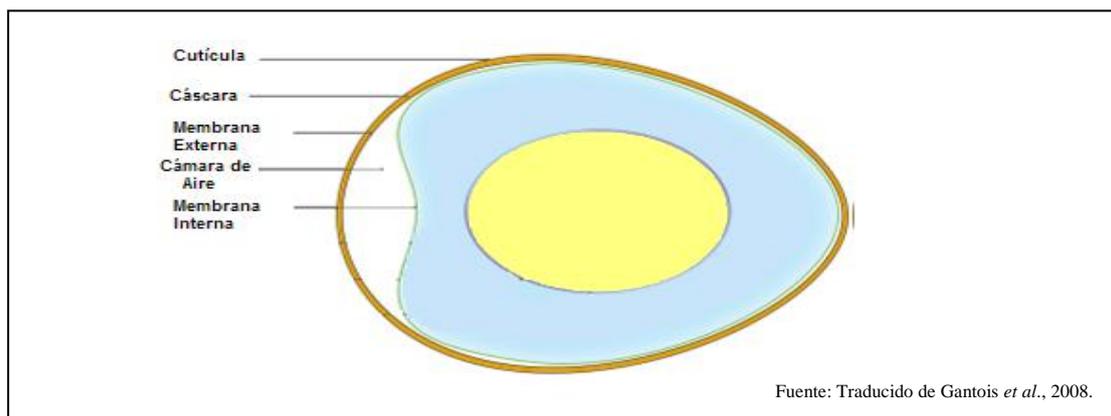
III. 2. Transmisión horizontal

La transmisión horizontal consiste en el paso de bacterias desde la superficie contaminada de la cáscara hacia el contenido del huevo, durante o después de la oviposición. Dicha contaminación puede ser producto de la infección del tracto reproductivo bajo o por la presencia de contaminación medio ambiental, principalmente heces (Cox *et al.*, 2000; De Buck *et al.*, 2004; Gantois *et al.*, 2008). Cox *et al.* (2000) describen que la forma más probable de contaminación natural del huevo por esta ruta, ocurre inmediatamente después de la oviposición, producto del cambio de temperatura al que éste se expone, desde la temperatura corporal de la gallina (42°C) a la temperatura ambiental, en presencia de contaminación fecal sobre la cáscara; esto, debido a que el diferencial de temperatura generado sobre el huevo, provocaría una presión negativa que facilitaría la migración del patógeno a través de la cáscara y sus membranas (Board, 1966; Bruce y Drysdale, 1994). No obstante, el ingreso de patógenos producto de contaminación ambiental, inmediatamente después de la oviposición, podría ocurrir también a través de los poros o trizaduras en la cáscara (De Buck *et al.*, 2004). De hecho, se describe que durante los primeros minutos luego de la oviposición, algunos poros pueden permanecer abiertos, debido a la inmadurez de la cutícula (Gantois *et al.*, 2008)

La principal barrera física que impide la penetración bacteriana al interior del huevo es la cáscara (Figura N° 2), la cual tiene una cubierta proteica, o cutícula, que la

recubre externamente, ocluyendo los poros que ésta posee (Messens *et al.*, 2005b). Sin embargo, la humedad e inmadurez de la cutícula luego de los primeros minutos tras la oviposición, la hace menos efectiva en la prevención de la penetración bacteriana, debido a que algunos poros podrían encontrarse descubiertos (Padron, 1990; Miyamoto *et al.*, 1998; Gantois *et al.*, 2008). Por otro lado, las membranas de la cáscara (interna y externa) ofrecen cierto grado de protección contra dicha penetración, a pesar de lo cual, varios estudios han demostrado una rápida y profunda penetración por parte de varias bacterias, incluyendo *Salmonella* (Cox *et al.*, 2000). De hecho, en un estudio realizado por Himathongkham *et al.* (1999), en el cual infectaron huevos mediante inmersión por cinco segundos, en un cultivo con 10^8 UFC/mL de SE, e incubados por 3 horas a 20°C, lograron aislar la bacteria en el 85% de las membranas de la cáscara de dichos huevos.

Figura N° 2. Representación esquemática de las estructuras del huevo que actúan como barreras físicas de protección.



Además de las barreras físicas, existen barreras químicas que protegen al huevo de la contaminación bacteriana. Estas están formadas por una serie de proteínas con propiedades antibacteriales que se encuentran en su mayoría en la albúmina, pero también han sido asociadas con la cáscara y las membranas de la cáscara del huevo. Algunas de estas proteínas son la lisozima, ovotransferrina y ovocalyxina-36 (Arias *et al.*, 2007; Gantois *et al.*, 2008). Además, se reconoce que la albúmina es restrictiva para el crecimiento y sobrevivencia de microorganismos, como SE, debido al pH básico que posee (aproximadamente 9.0), el cual podría contribuir a la actividad bacteriostática de las proteínas antibacterianas (Kang *et al.*, 2006).

Messens *et al.* (2005a) llevaron a cabo un estudio para determinar la capacidad de penetración de SE a través de la cáscara. Para ello, utilizaron huevos de un día de postura, los cuales fueron vaciados de sus contenidos, rellenos con agar, sellados y sumergidos durante un minuto en una solución salina con $6,7 \log_{10}$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) SE/ml. Posteriormente, fueron almacenados a 20°C con 60% de Humedad Relativa (HR) por 20 días. Los resultados demostraron que existió un 39% de huevos contaminados con SE. En otro estudio realizado por De Reu *et al.* (2006), utilizando una técnica similar a la descrita previamente, sumergieron huevos durante un minuto en una solución "Buffer" fosfato salino que contenía 10^7 - 10^8 UFC/ml. Luego, estos huevos se almacenaron por 21 días a 20°C con 60% HR, periodo al cabo del cual se observó que SE logró un 40% de penetración a través de la cáscara. Ambos estudios de inoculación experimental demuestran una baja capacidad en la penetración de SE al huevo almacenado a 20°C ; esto comparado con otras bacterias que muestran mayores porcentajes de penetración a la misma temperatura. Así, *Pseudomonas ssp.* y *Alcaligenes ssp.*, presentan frecuencias de penetración de 60 y 58% respectivamente (De Reu *et al.*, 2006). Sin embargo, Gantois *et al.*, (2009) sugieren que SE poseería características intrínsecas que le permitirían establecer una interacción específica con los componentes del huevo, gracias a la presencia del gen *rfbH*, el cual favorecería su sobrevivencia, debido a que le permitiría evadir los ataques de las moléculas antimicrobianas. Esto explicaría la gran cantidad de brotes de salmonelosis asociados a huevos y SE, a pesar de la baja capacidad mostrada por esta bacteria para penetrar la cáscara.

En otro estudio, Messens *et al.* (2006) investigaron la influencia del grado de contaminación de la cáscara del huevo en la penetración de *Salmonella* Enteritidis a través de ésta. Al analizar los resultados, los autores determinaron que contaminaciones de la cáscara mayores a $4 \log_{10}$ UFC tenían un 90% de probabilidad de contaminar el interior de los huevos, en cambio, las cáscaras contaminadas con cantidades inferiores a $1 \log_{10}$ UFC tenían un 50% de probabilidad de ser contaminados en su interior. De esta forma, quedo demostrado que mientras mayor es la contaminación de la cáscara al final del período de almacenamiento, mayor es la probabilidad de que SE llegue al contenido del huevo, independiente de la temperatura de almacenaje y la humedad relativa.

IV. MEDIDAS PARA EL CONTROL DE *Salmonella* Enteritidis EN HUEVOS

Independiente de la vía de ingreso de SE, los problemas que genera en salud pública son los mismos. Es por esto, que los productores avícolas se han visto en la necesidad de implementar mecanismos que les permitan disminuir la probabilidad de que la bacteria llegue a la población. De esta forma, se han establecido diversos planes de control, los que se basan fundamentalmente en el aseguramiento de un entorno productivo adecuado, a través del manejo de heces, control de roedores e insectos, desinfección, entre otros.

La vacunación de las gallinas de postura es uno de los métodos más específicos establecidos para el control de la contaminación tanto de la carne como de los huevos, antes y durante la oviposura. De Buck *et al.* (2004) describen la existencia de dos tipos de vacunas contra *Salmonella*: vacunas vivas y bacterinas, las cuales, si bien han logrado reducir la contaminación, no han sido capaces de prevenirla por completo, especialmente cuando se enfrentan a altas dosis bacterianas (Gast, 2007; De Buck *et al.*, 2004). Otro mecanismo desarrollado para el control de la transmisión vertical de SE, es el denominado “Control de colonización gastrointestinal”. Este método consiste en la administración de cultivos bacterianos definidos o indefinidos, conocidos como probióticos. Estos probióticos ejercen su acción fundamentalmente mediante exclusión competitiva (Gast, 2007), ocupando los receptores que corrientemente ocupan otras bacterias, como SE.

El uso de antimicrobianos es otra de las estrategias empleadas por el sector avícola para reducir la contaminación de los huevos vía vertical. Por mucho tiempo se ha recurrido al uso de estas drogas para prevenir las infecciones bacterianas y promover el crecimiento de las aves. Sin embargo, esta práctica ha sido severamente criticada debido al incremento de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, ya que esto podría generar importantes problemas de salud pública (Ruiz *et al.*, 2006). Además, si el período de resguardo no es respetado, existe el riesgo de consumir carne y huevos que contengan restos de los antibióticos utilizados.

Por este motivo, algunos investigadores han propuesto a los fagos como una potencial alternativa al uso de los antimicrobianos, tanto en modelos animales – vacas (Slanetz y Jawetz, 1941), ratones (Bogovazova *et al.*, 1991; Biswas *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2007) – como en distintos tipos de alimentos – leche (Ellis *et al.*, 1973), queso ricota, budín de chocolate (Loessner *et al.*, 1997), melones, manzanas (Leverentz *et al.*, 2001; Leverentz *et al.*, 2003) y salmón (Soni y Nannapaneni, 2010) –. En el caso de la industria avícola, la efectividad de los fagos ha sido estudiada en gallinas y pollos infectados con SE (Borie *et al.*, 2008a; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009) y en huevos contaminados con la misma bacteria (Armijo, 2010; Farfán, 2010). El estudio de los fagos como método de control bacteriano se debe, entre otros factores, a que ha sido posible determinar que son inocuos sobre las células eucariotas (Greer, 2005), por lo cual no significarían un mayor riesgo para la salud pública, a diferencia de lo que ocurre con los antibióticos. Pese a lo anterior, la aplicación de los fagos sigue siendo controversial.

Por otro lado, los mecanismos que se emplean para el control de la contaminación horizontal de los huevos con SE, tienen como finalidad minimizar el contacto de éste con las heces de la gallina, puesto que cualquier material orgánico húmedo facilita la sobrevivencia y crecimiento de *Salmonella* al otorgarle protección física y nutrientes. Entre estos mecanismos se encuentran la recolección temprana, limpieza de impurezas en la superficie, lavado y desinfección de la cáscara, inspección y eliminación de huevo trizados, entre otros. Dichas técnicas no han logrado disminuir significativamente la contaminación de los huevos, por lo que se cree que la penetración ocurriría antes de llevar a cabo estos procedimientos (Gantois *et al.*, 2008).

La refrigeración es otra de las medidas que se han tomado en torno a la prevención de la penetración de SE al huevo. Gast *et al.* (2006) estudiaron el efecto de la refrigeración en la habilidad de SE de migrar a través de la membrana vitelina. Para ello, yemas inoculadas en su superficie se separaron en cuatro grupos. El primero de ellos fue refrigerado inmediatamente, el segundo se almacenó a 30°C por dos horas y luego se refrigeró por 22 horas más, el tercero se almacenó a 30°C por seis horas y posteriormente se refrigeró por 18 horas y el último se almacenó a 30°C por 24 horas. Al finalizar el experimento observaron que en el primer grupo no hubo penetración

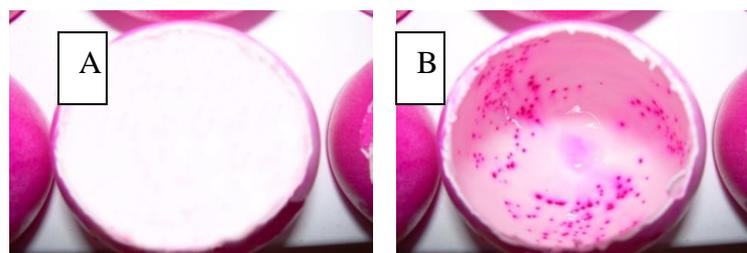
bacteriana, mientras que en los otros tres se evidenció la presencia de SE en el contenido de la yema, presentándose recuentos más altos de dicho patógeno mientras más tiempo se mantuvo la muestra a 30°C. Dicha experiencia permitió concluir que la refrigeración inhibe de manera efectiva la penetración y multiplicación bacteriana, siempre que los huevos sean enfriados lo más rápidamente posible. De forma similar, Hope *et al.* (2002), identificaron a la pronta refrigeración de huevos frescos, como un punto crítico en la reducción del riesgo de transmisión de enfermedades desde los huevos a los consumidores. Esto, probablemente debido a que a temperaturas inferiores a 10°C, se preservaría tanto la integridad de los agentes antimicrobianos de la albúmina como la de la membrana vitelina (Chen *et al.*, 2005), dificultando la penetración y multiplicación del patógeno.

Por otro lado, Sansosti *et al.* (2009), evaluaron el desarrollo de SE en huevos frescos, contaminados experimentalmente con diferentes concentraciones bacterianas, y sometidos a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento. Para ello, utilizaron 90 huevos frescos, los que dividieron en dos grupos (A y B) de 45 unidades cada uno, subdividiendo estos a su vez en tres lotes (1, 2 y 3) de 15 huevos cada uno. Posteriormente, los huevos del lote uno de cada grupo, fueron contaminados con una dosis “alta” de SE (10^7 UFC/ mL), y los del lote dos con una dosis “baja” (10^5 UFC/mL). Los huevos pertenecientes al lote tres de cada grupo no fueron contaminados, constituyendo el grupo control. A continuación, los huevos del grupo A fueron almacenados durante cinco horas a 37°C, y luego dejados a temperatura ambiente (20°C) durante 45 días, tiempo que duró el estudio. Por su parte, los huevos del grupo B fueron almacenados durante todo el ensayo a temperatura ambiente (20°C). Luego de la contaminación, se realizaron muestreos al azar a los 15, 25 y 45 días de almacenamiento, lográndose aislar SE desde yemas y albúminas solo a los 45 días de almacenamiento, y únicamente en los huevos pertenecientes al lote uno de cada grupo (A y B). Estos resultados permitieron concluir que SE puede ser aislada desde el contenido de huevos mantenidos a temperatura ambiente, pero recién a partir del día 45 de almacenamiento, y solo cuando la dosis de contaminación es elevada. No obstante, se recomienda la refrigeración de los huevos cuando el periodo de almacenamiento supera los 25 días, debido a que los mecanismos de defensa del huevo disminuyen cuando el almacenamiento a temperatura ambiente es muy prolongado.

Algunos autores sugieren que el cambio de temperatura que se genera en la ovipostura, entre la temperatura corporal de la gallina (42°C) y la ambiental, sería responsable del paso de la contaminación presente en la cáscara hacia el interior del huevo (Gantois *et al.*, 2008; Cox *et al.*, 2000). Esto se debería a que el rápido enfriamiento de los huevos, producto de la diferencia de temperatura entre estos y el ambiente, generaría una presión negativa que favorecería el paso de bacterias desde la superficie hacia su interior; fenómeno similar al que se observaría al refrigerar huevos que han sido mantenidos a temperatura ambiente.

En un estudio preliminar, realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Lobos, 2010), se evaluó la aplicación de distintas temperaturas como método de permeabilización de la cáscara del huevo. Para ello se colocaron huevos refrigerados (4-8°C) y huevos calentados (37°C) en una solución de fucsina refrigerada (4-8°C). A través de esta experiencia fue posible observar que el diferencial de temperatura generado entre los huevos calentados y la fucsina fría, provocó una mayor penetración del colorante en estos (95% de los huevos) que en los huevos refrigerados (12,5% de los huevos), lo que permite reafirmar el hecho de que al generar un diferencial de temperatura entre el huevo y el ambiente al que es sometido, se favorece la penetración (Foto N° 1).

Foto N° 1. Visualización de la permeabilización de los huevos



A: Huevo no permeabilizado, donde no se evidencia presencia del colorante en la superficie interna de la cáscara.

B: Huevo permeabilizado, donde se evidencia presencia del colorante en la superficie interna de la cáscara.

(Fuente: Lobos,2010)

Por otro lado, se ha informado que *Salmonella* no sólo podría sobrevivir a temperaturas cercanas a los 5°C, sino que podría adaptarse al estrés térmico, mediante la

producción de algunas proteínas específicas, logrando reiniciar su multiplicación a bajas temperaturas (Miller *et al.*, 2000. Citado por Wesche *et al.*, 2008).

Cabe destacar que no existen normas estandarizadas respecto a la temperatura óptima de almacenamiento de los huevos. Por ejemplo, en Estados Unidos el plan nacional de control de SE, exige la refrigeración de los huevos desde que son empacados para el consumidor final, tanto durante su transporte como en el almacenamiento (U.S. FDA, 2009). En Cuba, el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos ha determinado como requisito de conservación y transporte de huevos enteros, que estos sean enfriados o congelados para evitar el deterioro de su contenido (Cardona *et al.*, 2003). Por otro lado, en Chile, la Comisión Nacional de Buenas Prácticas Agrícolas (2004), dentro de las normas de correcta manipulación de dicho producto, señala que los huevos se deben almacenar lejos de la luz solar directa y a una “temperatura adecuada”, además de evitar las variaciones significativas en la temperatura ambiente para así reducir el riesgo de contaminación. De esta forma, es común que el público refrigere los huevos en sus hogares, luego de que estos permanecieran a temperatura ambiente en los lugares de venta, evidenciando la poca claridad de la información entregada.

A partir de los datos expuestos respecto a la temperatura de almacenamiento de los huevos, se hace evidente la necesidad de comprobar el verdadero efecto de la refrigeración, en relación a la penetración de SE en huevos comerciales mantenidos previamente a temperatura ambiente, en comparación con aquellos que se conservan exclusivamente sin refrigerar.

HIPÓTESIS

La diferencia de temperatura provocada en el huevo, al refrigerarlo inmediatamente después de ser mantenido a temperatura ambiente, favorece la succión de SE desde la superficie de la cáscara, debido al efecto de presión negativa generada por el diferencial térmico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del cambio de temperatura sobre la penetración de SE a través de la cáscara, en huevos comerciales previamente mantenidos a temperatura ambiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el grado de penetración de SE a través de la cáscara, en huevos almacenados a temperatura ambiente y posteriormente refrigerados durante seis días.
2. Establecer el grado de penetración de SE a través de la cáscara, en huevos mantenidos a temperatura ambiente, sin refrigerar.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Huevos

Se utilizaron 110 huevos, con 24 horas desde su ovipostura, obtenidos a partir de gallinas comerciales de un plantel de la Región Metropolitana (Codipra S.A) que cuenta con un programa de vacunación contra SE. Durante el año 2009 se trabajó al menos con 300 huevos provenientes de dicho plantel, no habiéndose aislado *Salmonella* spp. (Borie, C. 2011)¹. Una vez adquiridos, los huevos se inspeccionaron con un ovoscopio, y aquellos que presentaron trizaduras, grietas u otras imperfecciones, fueron descartados para así asegurar el correcto desarrollo del estudio. Todos los huevos, a su llegada, se limpiaron con papel desechable y alcohol de 70°, y se mantuvieron en cajas selladas, en estufa a temperatura ambiente (25°C), durante 15 días. Se consideró un período de almacenamiento de 15 días, tomando como referencia el tiempo promedio de permanencia de los huevos en el mercado, desde que son envasados hasta que son comprados. Este valor se obtuvo luego de visitar cinco supermercados y revisar las fechas correspondientes, al menos, en tres marcas distintas.

- Cepa desafío

Se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis, aislada desde una gallina reproductora y donada por el Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola Ganadero. Se seleccionó una cepa mutante espontánea con resistencia al Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*) (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Instituto de Biología, Laboratorio de genética Bacteriana, Dr. James Robeson).

¹ Comunicación personal Dra. Consuelo Borie. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

- Preparación y determinación de la concentración del inóculo bacteriano

El inóculo bacteriano empleado para la contaminación de los huevos, se obtuvo cultivando la cepa durante 24 horas en caldo común a 37°C. Para esto, se sembró SE *rif^r nal^r* en cuatro matraces con 75 mL de caldo común cada uno, los cuales fueron colocados en un agitador (Thermolyne) durante toda la noche para favorecer el crecimiento de la bacteria.

Para determinar la concentración del inóculo, se mezcló el contenido de los cuatro matraces luego de las 24 horas de incubación. A partir de la suspensión total, se tomó un mL para realizar 12 diluciones al décimo en agua peptonada fosfatada (APF, Oxoid®). Desde cada dilución se extrajeron 100 µL, los cuales fueron sembrados por extensión en placas de agar XLD (Difco™) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 mg/mL, Arlab®). Estas placas fueron mantenidas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió al recuento de colonias, determinándose su concentración en unidades formadoras de colonia (UFC) / mL.

- Modelo experimental

De los 110 huevos mantenidos a temperatura ambiente (25°C) por 15 días, 100 fueron contaminados con SE al cabo de dicho período. Los 10 restantes constituyeron el grupo control, el cual no fue contaminado y se almacenó a 25°C durante toda la experiencia.

Para llevar a cabo la contaminación, los huevos fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de 50 unidades cada uno. En cada grupo, los huevos fueron marcados con las letras A/A (ambiente/ambiente) en el caso de aquellos que seguirían a temperatura ambiente, o con las letras A/R (ambiente/refrigerados) en el caso de los que serían refrigerados después de la contaminación. Dicha contaminación se realizó con un pincel estéril (Sansosti *et al.*, 2009) a partir del inóculo preparado. Para evitar la contaminación del personal, el pincelado se llevó a cabo con los huevos en

sus respectivas bandejas, las cuales fueron depositadas dentro de fuentes plásticas, y éstas, a su vez, se colocaron sobre un mesón cubierto con papel absorbente (Foto N° 2). De esta forma, cada huevo fue pincelado cuatro veces y dejado secar a temperatura ambiente entre cada pincelada. Finalmente, cada grupo de huevos fue colocado en cajas selladas, dejando al grupo A/R en el refrigerador (4-8°C) y al grupo A/A a temperatura ambiente (25°C en estufa) por un período de seis días.

Transcurridos los seis días, se procedió a la apertura de los huevos, la cual se realizó en forma aséptica, es decir, los huevos se tomaron con guantes, se sumergieron en alcohol de 70° durante 30 segundos, y se quebraron en un borde aguzado cubierto por papel aluminio (Gast *et al.*, 2004). Así, se separaron yemas de albúminas, las cuales fueron colocadas en bolsas individuales, estériles y herméticas (*Whirl Pak, Nasco®*), las que fueron numeradas correlativamente, del uno al 50, colocando igual número en las muestras de yema y albúmina provenientes de un mismo huevo. A las albúminas se les adicionó caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) en razón 1:3, y se dejaron durante 48 horas a 37°C para luego realizar bacteriología cualitativa (Armijo, 2010). Las yemas, por su parte, fueron incubadas sin medio de enriquecimiento durante cuatro horas a 37°C, para realizar la bacteriología cuantitativa; el tiempo de incubación de las yemas fue determinado mediante ensayos previos, los que arrojaron que a las cuatro horas de incubación a 37°C, sin la adición de medios de enriquecimiento, se logra un adecuado recuento bacteriano. Posteriormente, luego de realizada la siembra para la bacteriología cuantitativa, las yemas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, tiempo al cabo del cual se les adicionó caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) en razón 1:3, y fueron nuevamente incubadas durante 24 horas a 37°C para realizar la bacteriología cualitativa.

Foto N° 2. Contaminación de la superficie de los huevos con la ayuda de un pincel.



- Bacteriología cualitativa

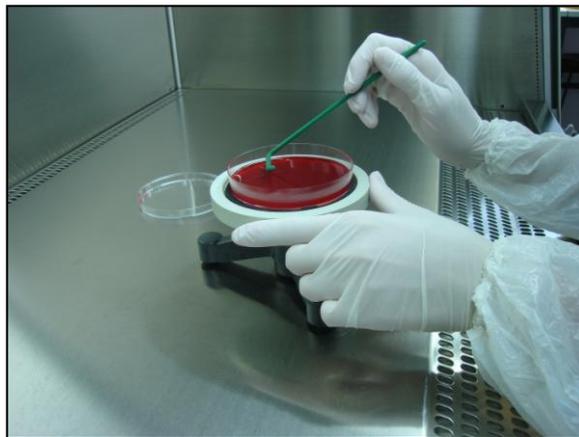
A las 24 horas de incubación a 37°C, las muestras de yema fueron enriquecidas con caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) en razón 1:3. Estas muestras fueron nuevamente incubadas a 37°C por hasta 96 horas, realizando la primera siembra a las 48 horas, y resembrando las muestras con resultados negativos a las 72 y 96 horas de incubación. Se trabajó con asa calibrada, colocando 50 µL de la muestra en placas de agar XLD (Difco™) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (50 mg/mL de agar, Arlab®). Dichas placas, luego de ser sembradas, fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

En cuanto a las albúminas, estas fueron incubadas a 37°C por hasta 96 horas, realizando la primera siembra a las 48 horas, y resembrando las muestras con resultados negativos a las 72 y 96 horas de incubación. Para ello, se extrajeron 50 µL de cada bolsa con asa calibrada, los que se sembraron en placas de agar XLD (Difco™) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (50 mg/mL de agar, Arlab®). Estas placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C.

- Bacteriología cuantitativa

Al cabo de cuatro horas de incubación a 37°C, las yemas fueron retiradas de la estufa. De cada muestra se tomó un mL al cual se le realizaron cuatro diluciones al décimo en agua peptonada fosfatada (APF, Oxoid®). De las cuatro diluciones se extrajeron 100 µL, los cuales fueron sembrados por extensión (Foto N° 3) en placas de agar XLD (Difco™) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (50 mg/mL de agar, Arlab®). Posteriormente, estas placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para realizar el recuento de colonias.

Foto N° 3. Siembra por extensión con asa de Digrafsky, de una muestra de yema diluida.



- Procesamiento de huevos controles

El grupo control fue procesado de la misma forma descrita para los grupos experimentales, pero esta vez se consideró el uso de agar XLD (Difco™) con y sin antibiótico, para así corroborar la ausencia de *Salmonella spp.* en los huevos comerciales, y descartar la posibilidad de contaminación al interior del laboratorio con la cepa desafío. Las muestras fueron incubadas a 37°C por hasta 96 horas, realizando la primera siembra a las 48 horas, y resembrando las muestras con resultados negativos a las 72 y 96 horas de incubación.

- Normas de bioseguridad

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

Se utilizó delantal y accesorios desechables (mangas y guantes). Se trabajó bajo gabinete de bioseguridad (Heal Force ®) y/o mecheros. La desinfección del área de trabajo se realizó con alcohol yodado y cloro comercial (1.000 ppm). Todos los residuos orgánicos fueron incinerados o esterilizados en autoclave, según correspondiese.

- Análisis estadístico

Los resultados de la bacteriología cuantitativa, fueron expresados como unidades logarítmicas (\log_{10}), y las diferencias entre los dos grupos experimentales se determinaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el programa INFOSTAT 2004.

Los resultados de la bacteriología cualitativa se expresaron como proporciones de yemas y albúminas positivas, y las diferencias entre grupos experimentales se determinaron por la prueba de independencia de Chi cuadrado (χ^2) (INFOSTAT, 2004).

RESULTADOS

I. CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO

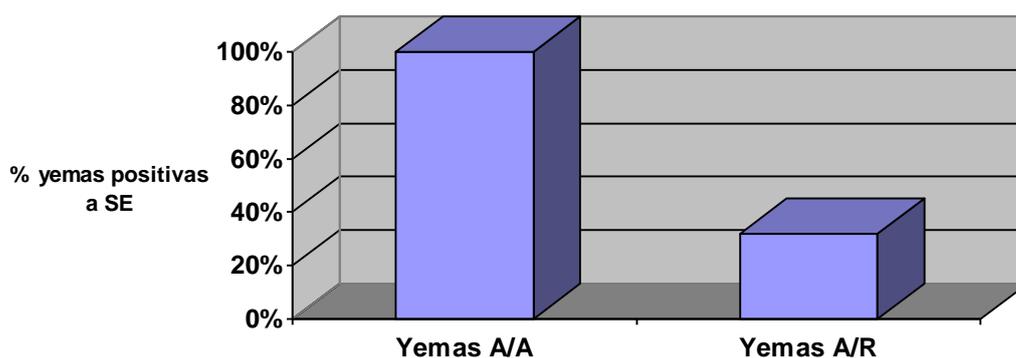
Mediante el recuento de colonias de SE, se determinó que la concentración bacteriana utilizada en la contaminación de los huevos fue de $2,6 \times 10^9$ UFC SE/ mL.

II. BACTERIOLOGÍA CUALITATIVA

II. 1. YEMAS

Los resultados obtenidos en la bacteriología cualitativa, mostraron que SE fue aislada en el 100% (50) de las yemas pertenecientes a los huevos mantenidos continuamente a temperatura ambiente (grupo A/A), mientras que en los huevos refrigerados (grupo A/R), la bacteria se aisló solo en el 32% (16) de las yemas (Gráfico N° 1). Las diferencias de proporciones entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas ($p = 0,00001$).

Gráfico N°1. Porcentaje de yemas A/A* y A/R** positivas a *Salmonella* Enteritidis.



*Yemas A/A= Huevos mantenidos por 15 días a temperatura ambiente, contaminados, y luego mantenidos a temperatura ambiente por seis días.

**Yemas A/R= Huevos mantenidos por 15 días a temperatura ambiente, contaminados, y luego refrigerados por seis días.

Del total de yemas A/A (50) positivas a SE al final de la experiencia, 20 fueron detectadas a las 48 horas de incubación, mientras que a las 72 y 96 horas de

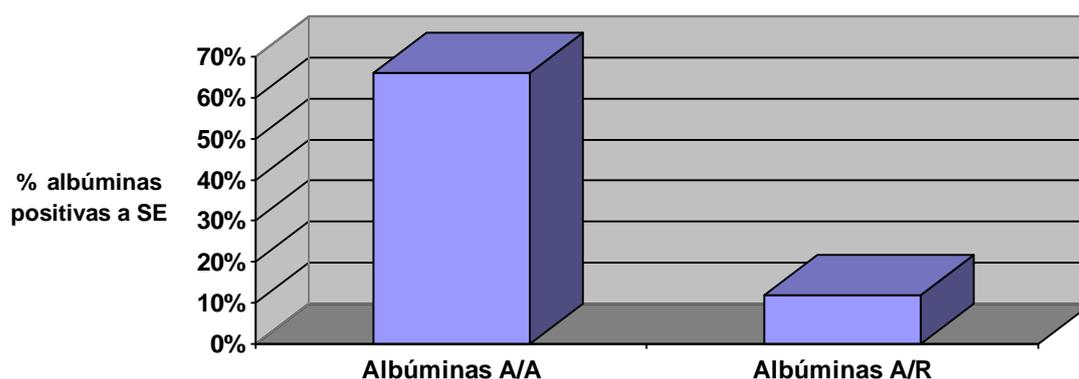
incubación se detectó, adicionalmente, SE en 26 y cuatro de las yemas respectivamente (Anexo N° 1).

En cuanto a las yemas del grupo A/R, solo una de las muestras arrojó resultados positivos a las 48 horas de incubación, mientras que a las 72 y 96 horas de incubación, se obtuvo resultados positivos en seis y nueve de las yemas respectivamente, alcanzando, al final de la experiencia, un total de 16 muestras A/R positivas a la bacteria (Anexo N° 2).

II. 2. ALBÚMINAS

Al analizar estos resultados, se observó que SE se aisló en el 66% (33) de las albúminas pertenecientes a los huevos del grupo A/A (ambiente/ambiente), mientras que en las albúminas pertenecientes a los huevos del grupo A/R (ambiente/refrigerados), la bacteria se detectó solo en el 12% (6) de las muestras (Gráfico N° 2). Las diferencias de proporciones entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas ($p = 0,00001$).

Gráfico N°2. Porcentaje de albúminas A/A* y A/R** positivas a *Salmonella* Enteritidis.



*Albúminas A/A= Huevos mantenidos por 15 días a temperatura ambiente, contaminados, y luego mantenidos a temperatura ambiente por seis días.

**Albúminas A/R= Huevos mantenidos por 15 días a temperatura ambiente, contaminados, y luego refrigerados por seis días.

Del total de albúminas A/A (33) positivas a SE al final de la experiencia, 30 de ellas fueron detectadas a las 48 horas de incubación. Las tres restantes fueron detectadas a las 72 horas de incubación, mientras que a las 96 horas de incubación no se detectó muestras positivas en este grupo (Anexo N° 1).

De las seis albúminas A/R positivas al final de la experiencia, tres fueron detectadas a las 48 horas de incubación, mientras que a las 72 y 96 horas de incubación, la bacteria fue detectada en una y dos de las muestras respectivamente (Anexo N° 2).

Cabe destacar que en los huevos del grupo A/R, solo a uno se le detectó SE tanto en yema como en albúmina (muestra n° 10; Anexo N° 2). El resto de las muestras positivas a la bacteria, ya sean yemas o albúminas, pertenecían a huevos diferentes.

En el cuadro N° 1 se presentan los resultados resumidos de lo observado en ambos grupos experimentales.

Cuadro N° 1. Detección (%) de SE en yemas y albúminas, provenientes de huevos almacenados con y sin diferencial de temperatura.

Grupo	Porcentaje de muestras positivas a SE	
	Yemas	Albúminas
A/A*	100%	66%
A/R**	32%	12%

* Huevos mantenidos por 15 días a temperatura ambiente, contaminados, y luego mantenidos a temperatura ambiente por seis días.

** Huevos mantenidos por 15 días a temperatura ambiente, contaminados, y luego refrigerados por seis días.

III. BACTERIOLOGÍA CUANTITATIVA

La bacteriología cuantitativa se aplicó solamente a las muestras de yema incubadas durante cuatro horas sin medios de enriquecimiento. En las yemas del grupo

A/A se logró obtener recuentos de SE sólo en el 22% (11/50) de las muestras, mientras que en las yemas del grupo A/R no se obtuvo desarrollo bacteriano después de 4 horas de incubación a 37°C. Los recuentos obtenidos en las yemas del grupo A/A, se muestran en el cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Recuentos de SE en yemas de huevos experimentalmente contaminados y mantenidos a temperatura ambiente (25 °C).

N° de yema (grupo A/A*)	Recuentos log10 (UFC/mL)
18	2,34
19	2,03
20	1,80
23	2,83
24	2,17
27	1,11
33	2,15
34	1,88
40	0,50
46	1,60
47	2,60

* Huevos mantenidos por 15 días a temperatura ambiente, contaminados, y luego mantenidos a temperatura ambiente por seis días.

En promedio, la cantidad de bacterias presentes en la yema fue de $1,72 \times 10^2$ UFC SE/ mL (2,24 log10 UFC SE/ mL). Cabe destacar que las 11 muestras de yema en las que se logró realizar recuento de colonias, también fueron positivas en el análisis bacteriológico Cualitativo.

Respecto a los huevos del grupo control, no hubo muestras positivas a SE, lo cual permite descartar la contaminación de estos tanto desde su origen (cepa de campo), como dentro del laboratorio con la cepa desafío.

DISCUSIÓN

La concentración bacteriana utilizada en esta experiencia para la contaminación de los huevos, fue de $2,6 \times 10^9$ UFC SE/ mL. Esta podría considerarse elevada si se compara con la empleada por Sansosti *et al.* (2009), quienes, usando la técnica de contaminación de la cáscara con pincel, contaminaron huevos con una dosis de 10^7 UFC SE/ mL, logrando aislar la bacteria desde yema y albúmina del total de huevos contaminados (10/10), a los 45 días de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C). En el presente estudio se utilizó una dosis de SE mayor, debido a que el tiempo de almacenamiento de los huevos fue de solo seis días, a diferencia de los 45 aplicados por Sansosti *et al.* (2009). De hecho, los autores mencionados, analizaron las muestras a los 15, 25 y 45 días de almacenamiento a temperatura ambiente, obteniéndose resultados positivos solamente a los 45 días. Esto podría deberse a que, al aplicar una concentración bacteriana menor, se requirió de mayor tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente para que el patógeno se multiplicara, y alcanzara, en el contenido del huevo, una concentración detectable por la técnica de cultivo tradicional.

Cabe destacar que, previo al desarrollo de esta experiencia, se realizaron diversos ensayos con el objeto de determinar la concentración bacteriana exacta a emplear. La exigencia era encontrar la dosis que pudiese ser detectada en yemas y albúminas, a los seis días de almacenamiento de los huevos contaminados, tanto en aquellos mantenidos a temperatura ambiente (25°C) como en los refrigerados (4-8°C). De esta forma, se analizaron dosis que iban desde 10^6 a 10^8 UFC SE/ mL, sin lograr resultados satisfactorios, por lo que finalmente se preparó un inóculo más concentrado, con el que se llevó a cabo la contaminación de los huevos.

Para la técnica de contaminación de los huevos, los dos métodos más frecuentemente utilizados son: inmersión y pincelado. Respecto a la inmersión, diversos autores han utilizado exitosamente esta técnica. Messens *et al.* (2005a) sumergieron 340 huevos en una suspensión bacteriana con 10^6 UFC SE/mL durante un minuto, logrando que la bacteria penetrara en un 44,7% de los huevos. De igual forma, De Reu *et al.* (2006) y Jones *et al.* (2002), utilizando suspensiones bacterianas con una concentración de 10^6 UFC SE/mL, sumergieron huevos por no más de 10 minutos, logrando aislar la

bacteria sin problemas desde yemas y albúminas. En el presente estudio no se utilizó la inmersión, ya que en un ensayo previo, tras sumergir los huevos, por no más de cuatro horas, en suspensiones bacterianas con concentraciones que variaron entre 10^6 a 10^8 UFC SE/mL, no fue posible aislar la bacteria en las muestras, después de almacenar los huevos a temperatura ambiente o en refrigeración por hasta seis días. Debido a estos resultados negativos, se buscó otro mecanismo de contaminación de la superficie del huevo.

Considerando los buenos resultados obtenidos por Sansosti *et al.* (2009), al contaminar los huevos mediante la técnica de pincelado de la cáscara, se decidió emplear esta técnica. De esta forma, se llevaron a cabo una serie de ensayos en los cuales los huevos fueron pincelados con concentraciones bacterianas de 10^6 a 10^8 UFC SE/mL, y luego almacenados por seis días a temperatura ambiente o en refrigeración. Después de varias pruebas en las que se obtuvo menos del 20% de las muestras positivas a SE, se decidió aplicar la misma técnica, pero esta vez utilizando un inóculo más concentrado (10^9 UFC SE/mL), con el cual se logró obtener resultados satisfactorios. Finalmente, la técnica de pincelado de los huevos no sólo permitió obtener un elevado porcentaje de contaminación de las muestras, sino también su aplicación fue más sencilla y menos riesgosa que la técnica de inmersión.

Inicialmente, se planteó que el cambio de temperatura al que se exponen los huevos, al refrigerarlos luego de permanecer por al menos 15 días a temperatura ambiente, favorecía el traspaso de SE desde la cáscara hacia yema y albúmina. Esto, basado en que la presión negativa generada en el huevo, producto del diferencial de temperatura al cual es enfrentado, provocaría un efecto de succión de la bacteria desde la superficie (Board, 1966; Bruce y Drysdale, 1994). Sin embargo, los resultados arrojaron mayor positividad a SE en huevos mantenidos continuamente a temperatura ambiente (25°C) que en huevos refrigerados ($4\text{-}8^{\circ}\text{C}$) (Anexos 1 y 2), luego de seis días de almacenamiento post-contaminación. Esto se podría deber a que, a temperatura ambiente, se ve favorecida la multiplicación bacteriana, lo que habría permitido aislar la bacteria en un mayor número de muestras, respecto de lo ocurrido en los huevos refrigerados. Por otro lado, la restricción de la multiplicación bacteriana ocurrida a bajas temperaturas (Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Gast *et al.*, 2006), habría impedido

que SE se multiplicara hasta niveles detectables en la mayoría de las muestras refrigeradas, aún cuando las bacterias hubiesen penetrado, debido al efecto de succión. Quizás hubiese sido interesante evaluar el efecto de succión generado por el diferencial térmico en períodos de tiempo tan breves como 12-24 horas de almacenamiento post-contaminación, y no a los seis días. Esto debido a que a mayor tiempo de permanencia de SE en el huevo aumentan las posibilidades de que se reduzca la población bacteriana debido a la acción de los agentes antimicrobianos de la albúmina, lo que sumado a la menor multiplicación por la baja temperatura, pudo contribuir a la obtención de una menor proporción de muestras A/R (ambiente/refrigerados) positivas a SE, respecto a lo ocurrido con las muestras A/A (ambiente/ambiente). Por otro lado, es posible que el uso de una técnica de detección bacteriana diferente al cultivo en placa, permitiera detectar tempranamente el posible efecto de succión debido a la exposición del huevo a un diferencial térmico. Una técnica efectiva pudo haber sido la empleada por Messens *et al.* (2006), quienes vaciaron los huevos de su contenido y los rellenaron con agar TTC (“5-triphenyl tetrazolium chloride”), el cual es reducido durante el crecimiento bacteriano, resultando en la aparición de puntos de color rojo oscuro, que representan las colonias bacterianas. Así, aquellos huevos con mayor penetración bacteriana hubiesen presentado mayor número de puntos rojo oscuro, pudiendo determinar de forma más certera si la exposición a un cambio de temperatura aumenta la penetración a través de la cáscara. Otra técnica útil pudo haber sido el uso de una cepa fenotípicamente marcada – por ejemplo, con un agente químico –, la cual es independiente del tiempo de almacenamiento, ya que a pesar de la multiplicación bacteriana en el contenido del huevo, serían sólo bacterias marcadas las que indicarían el nivel de penetración a través de la cáscara.

Respecto a la frecuencia de aislamiento de la bacteria en las yemas (bacteriología cualitativa), SE fue detectada en todas las muestras pertenecientes a los huevos del grupo A/A, mientras que en los huevos del grupo A/R, la bacteria se detectó solo en un 32% de las yemas. Esto se debería a que la temperatura ambiental (25°C) favorecería la multiplicación bacteriana, además de provocar la declinación de la viscosidad de los agentes antimicrobianos de la albúmina y la integridad de la membrana vitelina (Humphrey and Whitehead, 1993; Hara-Kudo *et al.*, 2001; Messens *et al.*, 2004), aumentando las posibilidades de que SE penetre hasta el contenido del

huevo en una concentración detectable por la técnica de cultivo empleada en este estudio. Por otro lado, a temperatura de refrigeración (4-8°C) se limita considerablemente la multiplicación de la bacteria (Chen *et al.*, 2005), con lo cual las probabilidades de que ésta penetre la cáscara y alcance concentraciones detectables en el contenido del huevo serían menores.

Al analizar las frecuencias de aislamiento de SE en yemas, a las 48, 72 y 96 horas de incubación a 37°C, se observó que, conforme aumentaban las horas de incubación, se acrecentaban las frecuencias de aislamiento de la bacteria en ambos grupos experimentales. Este efecto se debería a que a mayor tiempo de incubación a 37°C, mayor multiplicación bacteriana. Sin embargo, las yemas A/A obtuvieron mejores resultados que las yemas A/R a las distintas horas de incubación a 37°C, lo cual se podría explicar, como se mencionó anteriormente, por la mayor replicación bacteriana a temperatura ambiente, en contraste con lo ocurrido a temperatura de refrigeración.

En las albúminas, SE fue aislada más frecuentemente desde las muestras provenientes del grupo A/A (ambiente/ambiente) que de las muestras provenientes del grupo A/R (ambiente/refrigerados), lo cual se debería, al igual que en las yemas, al favorecimiento de la multiplicación bacteriana a temperatura ambiental (25°C), respecto de lo ocurrido a temperatura de refrigeración (4-8°C). Al analizar lo sucedido en las muestras de albúmina a las 48,72 y 96 horas de incubación a 37°C, se observó que, a medida que aumentaban las horas de incubación, se incrementaba el número total de albúminas positivas a SE en el grupo A/R, mientras que en el grupo A/A este aumento se produjo solo hasta las 72 horas de incubación, no lográndose aislar la bacteria a las 96 horas de incubación. Esto podría deberse a la acción antimicrobiana propia de la albúmina (Orsi, 2004; Sellier *et al.*, 2007; Wellman-Labadie *et al.*, 2008), dada por diversas proteínas bactericidas (Arias *et al.*, 2007, Gantois *et al.*, 2008) que, ayudadas por la temperatura a la cual se encontraban (25°C), probablemente redujeron la población bacteriana en el grupo A/A, hasta una concentración que sobrepasó la sensibilidad de la técnica de cultivo. Sin embargo, Chen *et al.* (2005) determinaron que el almacenamiento prolongado de huevos a temperatura ambiente genera un aumento en el pH de la albúmina, lo que lleva a la disociación del complejo proteico ovomucina-

lisozima, generando la pérdida de la viscosidad de esta matriz; además, se favorece la desintegración de las proteínas de membrana, lo que desencadena el decaimiento de la integridad de la membrana vitelina. A partir de esto, los autores concluyeron que la conservación prolongada de huevos a temperatura ambiente favorece la multiplicación bacteriana en el contenido de estos, debido a la pérdida de la integridad de las barreras protectoras. De esta forma, si se hubiese prolongado la duración del presente estudio (seis días), probablemente hubiese sido posible observar este fenómeno.

A pesar del incremento en el total de albúminas positivas a SE, al aumentar el tiempo de incubación a 37°C, los valores parciales obtenidos a las diferentes horas de incubación fueron disminuyendo, en contraste con lo ocurrido en las yemas. Esto se podría deber a las características antimicrobianas de la albúmina, que al tener mayor tiempo de contacto con el patógeno, redujeron paulatinamente su población. Sin embargo, similar a lo ocurrido con las yemas, las albúminas del grupo A/A obtuvieron mejores resultados que las del grupo A/R, a los distintos tiempos de incubación a 37°C, lo que otra vez se explicaría por la mayor multiplicación bacteriana a temperatura ambiente, en contraste con lo ocurrido a temperatura de refrigeración.

Durante el análisis de los resultados, fue posible observar que existe una amplia diferencia en la frecuencia de aislamiento de SE entre yemas y albúminas de un mismo grupo (Cuadro N° 1). Dicha diferencia se explicaría por la presencia de propiedades antibacteriales en la albúmina (Orsi, 2004; Kang *et al.*, 2006; Sellier *et al.*, 2007; Gantois *et al.*, 2008; Wellman-Labadie *et al.*, 2008), lo que dificulta la sobrevivencia y, por lo tanto, la multiplicación bacteriana, disminuyendo con ello la probabilidad de aislar la bacteria desde esta matriz.

En los huevos del grupo A/A (ambiente/ambiente), todos los que tuvieron su albúmina positiva a SE, también tuvieron su yema positiva. En cambio en los huevos del grupo A/R, no siempre existió tal coincidencia (Anexo N° 2). De las seis albúminas A/R en las que se aisló la bacteria, solo una pertenecía a un huevo de cuya yema también se aisló SE. Esto probablemente se deba a la protección otorgada por la membrana vitelina (Gantois *et al.*, 2008), la que impidió que SE llegara a la yema en cantidades detectables por la técnica de cultivo usada. Además, es probable que los

agentes antimicrobianos de la albúmina y la refrigeración, hayan jugado un rol importante en que esto sucediera. De igual forma, de las 16 yemas A/R positivas a SE, solo una tuvo su albúmina contaminada (Anexo N° 2), lo cual puede haber ocurrido por la acción de los agentes antimicrobianos presentes en esta matriz, los que probablemente redujeron la concentración bacteriana en dichas albúminas, a niveles indetectables por las técnicas empleadas, después de que la bacteria ya estaba en la yema.

Respecto al recuento bacteriano (análisis cuantitativo), en el estudio realizado por Armijo (2010), se determinó que los recuentos en la albúmina pueden arrojar resultados errados, debido a la acción bactericida de esta matriz. Por este motivo, se realizó recuento únicamente en las yemas, lográndose contabilizar colonias solo en las pertenecientes al grupo A/A. Esto probablemente se deba a que temperaturas elevadas favorecerían la migración de SE a través de la membrana de la yema (Humphrey and Whitehead, 1993; Braun and Fehlhaber, 1995; Gast and Holt, 2000; Gast *et al.*, 2005; Murase *et al.*, 2005), producto de la declinación de la viscosidad de la albúmina y la integridad de la membrana vitelina (Humphrey and Whitehead, 1993; Hara-Kudo *et al.*, 2001; Messens *et al.*, 2004). Por otro lado, es probable que no se haya podido contabilizar colonias de SE en las yemas del grupo A/R, debido a la inhibición del crecimiento bacteriano ocurrida a bajas temperaturas (Chen *et al.*, 2005, Gast *et al.*, 2006), la cual no pudo ser revertida con solo cuatro horas de incubación a 37°C post-refrigeración.

Del 22% de las yemas A/A que entregaron resultados positivos en la bacteriología cuantitativa, se obtuvo un recuento promedio de 2,24 log₁₀ UFC SE/ mL. Si se compara este valor con el recuento promedio de 9,8 UFC SE/mL obtenido por Armijo (2010), en yemas contaminadas con 10¹ UFC SE/mL, se podría considerar bajo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que existen diversos factores que pueden haber influido en la obtención de recuentos tan diferentes. En primer lugar, Armijo (2010) realizó la contaminación directamente sobre las yemas, por lo tanto SE no se vió enfrentada a las propiedades antibacterianas de la albúmina (Orsi, 2004; Kang *et al.*, 2006; Sellier *et al.*, 2007; Gantois *et al.*, 2008; Wellman-Labadie *et al.*, 2008), a diferencia de lo ocurrido en el presente estudio, donde probablemente los agentes

bactericidas de esta matriz redujeron considerablemente la población bacteriana, determinando la llegada de un número muy reducido de patógenos a la yema.

Farfán (2010) realizó un estudio en el cual contaminó huevos enteros con una concentración de 10^1 UFC SE/mL. Para la bacteriología cuantitativa, se hizo recuento bacteriano del contenido completo del huevo (yema y albúmina juntas), obteniendo un recuento promedio de $9,18 \log_{10}$ UFC SE/ mL. Este valor es bastante superior al logrado en el presente estudio, sin embargo, es importante considerar que Farfán inoculó SE en cámara de aire, por lo tanto la bacteria no debió atravesar la cáscara y sus membranas, como en el caso de la presente investigación. Además, previo al recuento bacteriano, las muestras del contenido del huevo fueron enriquecidas con caldo Rappaport-Vassiliadis e incubadas durante 15 horas a 37°C , mientras que en la presente investigación, las yemas no fueron enriquecidas antes del recuento bacteriano, y fueron incubadas por solo cuatro horas a 37°C .

CONCLUSIONES

1. Se logró contaminar huevos con cáscara intacta, con una concentración de $2,6 \times 10^9$ UFC SE/ mL, mediante pinceladas.
2. La refrigeración de huevos enteros experimentalmente contaminados con SE, previo almacenamiento a temperatura ambiente (grupo A/R), se traduce en una reducción en la frecuencia de aislamiento de la bacteria desde el contenido del huevo.
3. La conservación continua de huevos enteros experimentalmente contaminados con SE a temperatura ambiente (grupo A/A), genera un aumento en la frecuencia de aislamiento de la bacteria desde el contenido del huevo.
4. Con la metodología utilizada, la exposición a un diferencial térmico, en huevos experimentalmente contaminados con SE, aparentemente no provocó un incremento en la penetración de la bacteria a través de la cáscara.

BIBLIOGRAFÍA

ALEXANDRE, M., POZO, C., GONZÁLEZ, V., MARTINEZ, M., PRAT, S., FERNÁNDEZ, A., FICA, A., FERNÁNDEZ, J., HEITMANN, I. 2000. Detección de *Salmonella* Enteritidis en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. *Revista Médica de Chile* 128. (10): 1075–1083.

ARIAS, J.; MANN, K.; NYS, Y.; GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, S. 2007. Eggshell growth and matrix macromolecules. *In:* Bäuerlein, E.; Behrens, P.; Epple, M.; Pickett-Heaps, J.; Mann, S.; Pompe, W. (Eds). *Handbook of Biomineralization*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Alemania. pp.309-327.

ARMIJO, J. 2010. Uso de bacteriófagos para la reducción *in vitro* de *Salmonella* Enteritidis en albúmina y yema de huevos SPF. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 74 p.

BISWAS, B., ADHYA, S., WASHART, P., PAUL, B., TROSTEL, A., POWELL, B., CARLTON, R., MERRIL, C. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*. 70: 204–210.

BOARD, R.G. 1966. The course of microbial infection of the hen's egg. *Journal of Applied Bacteriology* 29:319-341.

BOGOVAZOVA G.G., VOROSHILOVA N.N., BONDARENKO V.M. 1991. The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection. *Zh Mikrobiology, Epidemiology and Immunobiology*,(4):5-8.

BORIE, C., ALBALA, I., SÁNCHEZ, P., SÁNCHEZ, M. L., RAMÍREZ, S., NAVARRO, C., MORALES, M .A., RETAMALES, J., ROBESON, J. 2008a. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Diseases*. 52:64-67.

BORIE, C.; ZURITA, P.; SANCHE, M.; ROJAS, V.; SANTANDER, J.; ROBESON, J. 2008b. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. Archivos de Medicina Veterinaria. 40:197-201.

BORIE, C.; HAUVA, C.; QUIROGA, J.; RETAMAL, P.; SÁNCHEZ, M.; ROJAS, V.; RETAMALES, J.; ROBESON, J. 2009. Biocontrol de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis mediante bacteriófagos líticos en gallinas comerciales de postura. *In*: XXXI Congreso Chileno de Microbiología. Santa Cruz, Chile. 1-4 Diciembre 2009. Sociedad de Microbiología de Chile. pp. 165-166.

BRAUN, P., FEHLHABER, K. 1995. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. International Journal of Food Microbiology. 25:95-99.

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

CARDONA, M.; DÍAZ, T.; MOREJON, P. 2003. Control sanitario del huevo. Instituto de nutrición e higiene de los alimentos. [en línea]<<http://www.inha.sld.cu/vicedirecciones/huevo.htm>> [consulta:26-04-10].

CHEN, H., ANANTHESWARAN, R. C., KNABEL, S. J. 2002. Effect of rapid cooling on the growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis into egg contents. Journal of Food Safety. 22:255-271.

CHEN, J., THESMAR, H. S., KERR, W. L. 2005. Outgrowth of *Salmonellae* and the physical property of albumen and vitelline membrane as influenced by egg storage conditions. Journal of Food Protection. 68:2553-2558.

COMISIÓN NACIONAL DE BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS, MINAGRI.

2004. Especificaciones técnicas de buenas prácticas agrícolas para producción de huevos de gallina destinados a consumo humano. [en línea]<<http://www.redagropecuariaaraucaia.cl>> [consulta:26-04-10].

COX, N.A., BERRANG, M.E., CASON, J.A. 2000. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in Broiler hatching eggs - A review. Poultry Science. 79:1571-1574.

DE BUCK, J., VAN IMMENSEL, F., HAESBROUCK, F., DUCATELLE, R. 2004. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. Journal of Applied Microbiology. 97: 233-245.

DE REU, K., GRIJSPEERDT, K., MESSENS, W., HEYNDRIKX, 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. 112:253-260.

ELLIS, D., WHITMAN, P. MARSHALL, R. 1973. Effects of Homologous Bacteriophage on Growth of *Pseudomonas fragi* WY in Milk. Applied Microbiology, p. 24-25.

FICA, C., ALEXANDRE, S., PRAT, M., FERNANDEZ, A., FERNANDEZ, J., HEITMANN, I. 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. Revista Chilena de Infectología. 18 (2): 85-93.

FIGUEROA, J. E. 2007. Descripción y análisis de las acciones realizadas por los servicios públicos (salud animal y salud pública), frente a salmonelosis humana.

Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 98 p.

FARFÁN, F. 2010. Efecto de una mezcla de bacteriófagos sobre el recuento de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF, experimentalmente infectados. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 68p.

GANTOIS, I., DUCATELLE, R., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F., GAST, R., HUMPHREY, T., VAN IMMERSEEL, F. 2008. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. Federation of European Microbiological Societies Reviews. 33:718-738.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. 2009. The *Salmonella* Enteritidis lipopolysaccharide biosynthesis gene *rfbH* is required for survival in egg albumen. Zoonoses and Public Health. 56(3): 145 – 149.

GAST, R. K., BEARD, C. W. 1992. Detection and enumeration of *Salmonella* Enteritidis in fresh and stored eggs laid by experimentally infected hens. Journal of Food Protection. 55: 152–156.

GAST, R. K., BEARD, C. W. 1993. Recovery of *Salmonella* Enteritidis from inoculated pools of eggs contents. Journal of Food Protection. 56: 21–24.

GAST, R. K., HOLT, P. S. 2000. 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: 569–563.

GAST, R. K., GUARD-PETTER, J., HOLT, P. S. 2002. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. Avian Diseases. 46: 629–635.

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: 863–869.

GAST, R., HOLT, P. S., MURASE, T. 2005. Penetration of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg into egg yolks in an *In Vitro* contamination model. *Poultry Science*. 84:621-625.

GAST, R., HOLT, P. S., GURAYA, R. 2006. Effect of refrigeration on *In Vitro* penetration of *Salmonella* Enteritidis through the egg yolk membrane. *Journal of Food Protection* 69:1426-1429.

GAST, R. 2007. Serotype-Specific and Serotype-Independent Strategies for Preharvest Control of Food-Borne *Salmonella* in Poultry. *Avian Diseases* 51:817–828.

GREER, G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*. 68:1102-1111.

GREIG, J.; RAVEL, A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology*. 130(2): 77-87.

HARA-KUDO, Y., SAKAKIBARA, Y., KONUMA, H., SAWADA, T. KUMAGAI, S. 2001. Laying Seaton and egg shell crack son the growth of *Salmonella* Enteritidis in the egg albumen Turing storage. *Journal of Food Protection*. 64:1134-1137.

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): 161–167.

HOLT, P. S. 1993. Effect of induced molting on the susceptibility of White Leghorn hens to a *Salmonella* Enteritidis infection. Avian Diseases. 37: 412–417.

HOLT, P. S., GAST, R. K. 2002. Comparison of the effects of infection with *Salmonella* Enteritidis, in combination with an induced molt, on serum levels of the acute phase protein, α 1 acid glycoprotein, in hens. Poultry Science. 81: 1295–1300.

HOLT, P. S. 2003. Molting and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: the problem and some solutions. Poultry Science. 82: 1008–1010.

HOPE, B. K., BAKER, A. R., EDEL, E. D., HOGUE, A. T., SCHLOSSER, W. D., WHITING, R., MC DOWELL, R. M., MORALES, R. A. 2002. An overview of the *Salmonella* Enteritidis risk assessment for shell eggs and eggs products. Risk Analysis. 22:203-218.

HUMPHREY, T. J., WHITEHEAD, A., GAWLER, A. H. L., HENLEY, A., ROWE, B. 1991. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens's eggs. Epidemiology and Infection. 106: 489–496.

HUMPHREY, T. J., WHITEHEAD, A. 1993. Egg age and the growth of *Salmonella* Enteritidis in egg contents. Epidemiology and Infection. 111:209-291.

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 81:715–720.

KANG, H.; LOUI, C.; CLAVIJO, R.; RILEY, L.; LU, S. 2006. Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. Epidemiology and Infection. 134(5): 967 – 976.

KELLER, L. H., BENSON, C. E., KROTEC, K., ECKROADE, R. J. 1995. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*. 63 (7): 2443–2449.

KILIC, A., BEDIR, O., KOCAK, N., LEVENT, B., EYIGUN, C. P., TEKBAS, O. F., GORENEK, L., BAYLAN, O., BASUSTA OGLU, A. C. 2010. Analysis of an outbreak of *Salmonella* Enteritidis by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Internal Medicine*.49(1):31-36.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W.; FUCHS, Y.; CAMP, M.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A. 2001. Examination of bacteriophages as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *Journal of Food Protection*. 64:1116-1121.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.; CAMP, M.; JANISIEWICZ, W.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTER, R.; SULAKVELIDZE, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:4519-4526.

LOBOS, M. P. 2010. Permeabilización de huevos como modelo de infección *in ovo* con *Salmonella* Enteritidis. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 52 p.

LOESSNER, M., RUDOLF, M., SCHERER, S. 1997. Evaluation of Luciferase Reporter Bacteriophage A511::*luxAB* for Detection of *Listeria monocytogenes* in Contaminated Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2961–2965.

MATHESON, N., KINGSLEY, R. A., STURGEES, K., ALIYU, S.H., WAIN, J., DOUGAN, G., COOKE, F. J. 2010. Ten years experience of *Salmonella* infections in Cambridge, UK. *Journal of Infection*. 60(1):21-25.

MESSENS, W., DUBOCCAGE, L., GRIJSPEERDT, K., HEYNDRICKX, M., HERMAN, L. 2004. Growth of *Salmonella* serovars in hens' egg albumen as affected by storage prior to inoculation. *Food Microbiology*. 21:25-32.

MESSENS, W., GRIJSPEERDT, K., HERMAN, L. 2005a. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *British Poultry Science* 46:649-700.

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

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

MILLER, A. J., BAYLES, D., EHLEN, B. S. 2000. Cold shock induction of thermal sensitivity in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:4345-4350.

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

MURASE, T., HOLT, P. S., GAST, R. K. 2005. Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in albumen and yolk contents of eggs inoculated with this organism onto the vitelline membrane. *Journal of Food Protection*. 68:718-721.

ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. 2008. Producción de huevos (situación actual y perspectivas). [en línea] <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2109.pdf>> [consulta: 06 enero 2011].

ORSI, N. 2004. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals: an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*. 17(3): 189 – 196.

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

POPOFF M. Y., BOCKEMUHL J., GHEESLING L. L. 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology*. 154 (3): 173–174.

PRADO, V., SOLARI, V., ALVAREZ, I. 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: Período 1999–2000. *Revista Médica de Chile*. 130 (5): 495–501.

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/od/ohs/pdf/bmb14_spanish.pdf> [consulta: 10-04-10].

RUIZ, J. D., SUÁREZ, M. C., URIBE, C. 2006. Susceptibilidad antimicrobiana *In Vitro* de cepas de *Salmonella spp.* en granjas de ponedoras comerciales del departamento de Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19 (3): 297–305.

SANSOSTI, L., VELILLA, A., TERZOLO, H. 2009. Efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre huevos experimentalmente contaminados con diferentes concentraciones de *Salmonella* Enteritidis. Fuente: Engormix (www.engormix.com)

SELLIER, N.; VIDAL, M.; BARON, F.; MICHEL, J.; GAUTRON, J.; PROTAIS, M.; BEAUMONT, C.; GAUTIER, M.; NYS, Y. 2007. Estimations of repeatability

and heritability of egg albumen antimicrobial activity and of lysozyme and ovotransferrin concentrations. *British Poultry Science*. 48(5): 559 – 566.

SHIVAPRASAD, H. L., TIMONEY, J. F., MORALES, S., LUCIO, B., BAKER, R. C. 1990. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding and serologic responses. *Avian Disease*. 34: 548–557.

SLANETZ, L., JAWETZ, E. 1941. Isolation and characteristics of bacteriophages for staphylococci of bovine mastitis. University of New Hampshire Agricultural Experiment Station.

SONI, K.A., NANNAPANENI, R. 2010. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *Journal of Food Protection*. 73(1):32-8.

TINDALL, B. J., GRIMONT, P. A. D., GARRITY, G. M., EUZEBY, J. P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 55: 521–524.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2009. Prevention of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs during production: Proposed rule. *Federal Register*. 69:56824-56906.

UZZAU, S., BROWN, D. J., WALLIS, T., RUBINO, S., LEORI, G., BERNARD, S., CASADESÚS, J., PLATT, D. J., OLSEN, J. E. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*. 125 (2): 229–255.

VAQUERO, A., FERNÁNDEZ, A., DÍAZ, J. 2011. Informe *Salmonella* Enteritidis. www.deis.minsal.cl [consulta: 15-03-11].

WATANABE, R., MATSUMOTO, T., SANO, G., ISHII, Y., TATAEDA, K., SUMIYAMA, Y., UCHIYAMA, J., SAKURAI, S., MATSUZAKI, S., IMAI, S., YAMAGUCHI, K. 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 446-452.

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*. 49:133-143.

WESCHE, A. M., GURTLER, J. B., MARKS, B. P., RYSER, E. T. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 72:1121-1138

Anexo N° 1. Recuento (log10 UFC/ mL) y tiempo de incubación para detectar SE, en yemas y albúminas del grupo A/A.

N° de huevo	Yemas		Albúminas**
	Tiempo de* incubación	Recuento (UFC/ mL)	Tiempo de* incubación
1	72 horas	----	----
2	72 horas	----	----
3	72 horas	----	----
4	72 horas	----	----
5	72 horas	----	----
6	72 horas	----	----
7	72 horas	----	----
8	48 horas	----	----
9	72 horas	----	----
10	72 horas	----	48 horas
11	72 horas	----	----
12	72 horas	----	----
13	72 horas	----	----
14	72 horas	----	----
15	72 horas	----	----
16	72 horas	----	----
17	72 horas	----	----
18	48 horas	2,34 log10	48 horas
19	48 horas	2,03 log10	48 horas
20	48 horas	1,8 log10	48 horas
21	48 horas	----	72 horas
22	48 horas	----	48 horas
23	48 horas	2,83 log10	48 horas
24	48 horas	2,17 log10	48 horas
25	48 horas	----	48 horas
26	72 horas	----	48 horas
27	48 horas	1,11 log10	48 horas
28	48 horas	----	48 horas
29	96 horas	----	48 horas
30	48 horas	----	48 horas
31	72 horas	----	72 horas
32	72 horas	----	48 horas
33	48 horas	2,15 log10	48 horas
34	48 horas	1,88 log10	48 horas
35	72 horas	----	48 horas
36	48 horas	----	48 horas
37	48 horas	----	48 horas
38	48 horas	----	48 horas
39	96 horas	----	48 horas
40	96 horas	0,5 log10	72 horas

41	48 horas	----	48 horas
42	72 horas	----	48 horas
43	72 horas	----	48 horas
44	72 horas	----	48 horas
45	72 horas	----	----
46	48 horas	1,6 log ₁₀	48 horas
47	48 horas	2,6 log ₁₀	48 horas
48	72 horas	----	48 horas
49	96 horas	----	48 horas
50	72 horas	----	48 horas
Total huevos A/A (ambiente/ambiente) positivos a SE : 100%			

----: Muestras con resultados negativos.

*48, 72 y 96 horas: Tiempo de incubación que requirió la muestra para dar resultados positivos en la B. cualitativa.

** : a las albúminas no se les realizó bacteriología cuantitativa.

Anexo N° 2. Recuento (log10 UFC/ mL) y tiempo de incubación para detectar SE, en yemas y albúminas del grupo A/R.

N° de huevo	Yemas		Albúminas**
	Tiempo de* incubación	Recuento (UFC/ mL)	Tiempo de* incubación
1	----	----	----
2	96 horas	----	----
3	96 horas	----	----
4	96 horas	----	----
5	----	----	----
6	96 horas	----	----
7	96 horas	----	----
8	----	----	----
9	96 horas	----	----
10	48 horas	----	48 horas
11	72 horas	----	----
12	----	----	----
13	----	----	----
14	----	----	----
15	----	----	----
16	72 horas	----	----
17	72 horas	----	----
18	72 horas	----	----
19	----	----	----
20	----	----	----
21	----	----	----
22	----	----	----
23	----	----	----
24	----	----	----
25	----	----	----
26	96 horas	----	----
27	96 horas	----	----
28	----	----	----
29	----	----	----
30	----	----	----
31	----	----	----
32	----	----	----
33	----	----	----
34	----	----	----
35	----	----	----
36	----	----	----
37	72 horas	----	----
38	----	----	----
39	----	----	----
40	----	----	----
41	----	----	48 horas
42	----	----	----
43	----	----	96 horas
44	----	----	48 horas
45	----	----	----
46	----	----	72 horas
47	----	----	----
48	96 horas	----	----
49	----	----	96 horas
50	72 horas	----	----

Total huevos A/R (ambiente/refrigerados) positivos a SE : 42%

----: Muestras con resultados negativos.

*48, 72 y 96 horas: Tiempo de incubación que requirió la muestra para dar resultados positivos en la B. cualitativa.

** : a las albúminas no se les realizó bacteriología cuantitativa.