



Fundación para la
Innovación Agraria



UST
UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS



Informe Técnico Final

Inmunoprotección de Huevos contra Bacterias del Género Salmonella

Código de Iniciativa PYT-2013-0048



OFICINA DE PARTES 2 FIA.	
RECEPCIONADO	
Fecha	07 OCT 2015
Hora	11:15
Nº Ingreso	24251

I. RESUMEN EJECUTIVO

Resumen ejecutivo del desarrollo del proyecto, sus resultados y los impactos esperados. Debe ser globalizante, incorporando aspectos de importancia general dentro del proyecto, y dejando la discusión de detalle en el Texto Principal. Debe ser corto y específico, no repitiendo las discusiones, análisis y calificaciones específicas contenidas en el Texto Principal.

El objetivo del proyecto FIA PYT-2013-0048 consiste en desarrollar una Tecnología de Inmunización por vía oral contra la bacteria *Salmonella enteritidis* en Aves y huevos, para el mejoramiento de la producción avícola, entregando así, productos microbiológicamente más seguros para la comunidad.

En el mercado de países desarrollados hay disponibles productos para inmunización, los que han sido desarrollados con bacterias vivas atenuadas, cuyas vacunas en general producen inmunizaciones parciales en los animales, son de elevado costo por la cadenas de frío a que obligan las vacunas vivas además que el uso de bacterias vivas constituye un riesgo que se debiera evitar (Nobilis Salenvac, Avipro *Salmonella* VAC E, Cevac SG9R).

Otro tipo de patente disponible en Europa -donde la vacunación es obligatoria- (ej. la Nobilis Salenvac T.), utiliza bacterias inactivadas pero se administra al animal mediante inyección y aunque alcanza niveles de inmunización importantes la inyección intramuscular (pechuga) es resistida por los avicultores ya que produce estrés y baja de postura de huevos.

Este proyecto ha realizado un gran número de experimentos buscando una fórmula que genere respuesta inmune protectora frente a *Salmonella enteritidis* cuando esta se administre por vía oral junto con el alimento sin provocar estrés en las aves.

Una de las preparaciones evaluadas en este proyecto utiliza un producto denominado Natto (NT) el cual, cuando se asocia al antígeno (*salmonella* inactivada) se comporta



como un excelente inductor de respuesta inmune de anticuerpos de clase IgM, IgY e IgA.

Esta preparación podría resultar una solución importante en la industria avícola para la protección contra esta bacteria.

Las características que hacen novedosa nuestra propuesta consisten en que el antígeno administrado es inactivado (no son agentes vivos) lo que implica que la producción del antígeno, el costo de transporte y almacenamiento (que no requiere cadena de frío) es más económico, son productos naturales, no hay riesgos de contaminación por bacterias vivas (aunque estén atenuadas) y se administran por vía oral junto con los alimentos lo que disminuye los costos de inmunización (no requiere personal especializado, no usa jeringas ni otros insumos)

II. TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.

Mediante el desarrollo de la inmunización de huevos contra el género enteropatógeno *Salmonella sp* se pretende generar una alternativa de producción ovocárnica limpia y segura en la zona, considerado este producto como uno de los principales en la región tanto en producción como en consumo.

Se pretende producir alimentos seguros para los consumidores y la reducción de toxiinfecciones presentadas por este patógeno en la región. El desarrollo del Sistema tecnológico de producción de un Antígeno específico para producir Huevos libres de *Salmonella*, es una iniciativa innovadora e importante en la zona que generaría el mejoramiento de la calidad microbiológica de los productos avícolas en la zona y con la posibilidad en un futuro no lejano de implementar esta tecnología en otras regiones del país.

Países como Estados Unidos, Holanda, México y Canadá han desarrollado vacunas contra la *Salmonella sp*, pero al tratarse de cepas nativas, Chile debe desarrollar su propia tecnología, incluyendo además la iniciativa innovadora de incorporar el antígeno al ave por vía oral, siendo esta una vía natural que evitaría problemas asociados a las inyectadas intramuscularmente, las cuales generan problemas en los animales y sus carnes.

En la actualidad la mayor inversión de los productores está basada en la aplicación de técnicas de higiene preventivas, tema que además se reforzaría con la aplicación del desarrollo tecnológico propuesto por el proyecto.

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

Descripción breve de los resultados obtenidos, comparación con los objetivos planteados, y razones que explican las discrepancias

El **objetivo general** proponía: “Desarrollar un Sistema para la obtención de Huevos libres de Salmonella mediante la inmunización oral de Aves en la zona de Cunco IX Región de la Araucanía, Chile.

Este proyecto nos ha permitido desarrollar y proponer un protocolo de preparación antigénica y un sistema de inmunización que protege a las aves de la infección por Salmonella según se desprende de los resultados experimentales de la evaluación de anticuerpos en el suero de las gallinas y en la yema de sus huevos.

El Sistema de producción desarrollado consiste en un preparado bacteriano obtenido a partir de cultivos de una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis aislada en la zona de Cunco y caracterizada molecularmente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**objetivo 1**), inactivadas (muertas) por una combinación de tratamiento térmico y químico con formalina (seguido de un proceso de lavado, eliminación de contenidos bacterianos intracelulares por criofractura y posterior liofilización o idealmente microencapsulación con el objeto de proteger y retardar la digestión del antígeno antes de alcanzar el duodeno. Finalmente, el preparado antigénico (**objetivo 2**) es mezclado con alimento lo que puede realizarse antes de su potencial envasaje, transporte o inmediatamente antes de su administración en dosis inmunogénicas (que no producen tolerancia). La inmunización (administración de la mezcla antígeno-alimento, **objetivo 3**) se realiza por un período de 5 días seguidos a pollitas de entre 12 a 20 días de edad en horarios habituales de comida. Se recomienda repetir el procedimiento cada 6 meses.

El procedimiento anteriormente descrito genera respuestas protectoras de anticuerpos de clase IgY y también IgA, los que se encuentran en la sangre, en la mucosa digestiva y en la yema de los huevos (Yamamoto H., 1975) en concentraciones significativamente superiores a la de aves controles no inmunizadas. La IgA de mucosa es un reconocido agente protector de infecciones (Corthésy B., 2013) en este caso protegiendo la mucosa intestinal y su función es unirse a los antígenos potencialmente patogénicos favoreciendo su captura por las células M. Por otra parte los anticuerpos anti salmonella de clase IgY son transportados desde la sangre a la yema del huevo donde se encuentran en alta concentración lo cual está suficientemente reportado en la literatura lo también hemos podido comprobar a través de varias pruebas de laboratorio que permiten evaluar la actividad de la respuesta inmune, principalmente técnicas de enzimoimmunoanálisis (**objetivo 4**). Así mismo, anticuerpos IgA e IgM aunque en mucha menor concentración (no medidos) también se encontrarán en la clara del huevo.

Finalmente, experimentos de desafío infectando gallinas directamente con elevadas dosis de salmonellas vivas (10^8 UFC) demostraron que las gallinas inmunizadas están protegidas comparadas con el grupo control.

El Sistema descrito protege de la infección por salmonella enteritidis a pollitas inmunizadas entre los 12 a 20 días (**objetivo 5**) pero no es efectivo en gallinas ya infectadas previamente y no se ha evaluado si puede proteger gallinas no infectadas de edad mayor a lo indicado (primera inmunización entre los 12 a 20 días de edad)

Este último objetivo proponía validar el procedimiento de inmunización en terreno en la misma avícola Huichahue, trabajo que finalmente –debido al riesgo de infección al trabajar con bacterias vivas- se trasladó a una dependencia especialmente habilitada ubicada en la Universidad Santo Tomás.

3. Aspectos metodológicos del proyecto:

- **Descripción de la metodología efectivamente utilizada**
- **Principales problemas metodológicos enfrentados**
- **Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta**
- **Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.**

3.1 DESCRIPCION DE LA METODOLOGIA ASOCIADA AL OBJETIVO 1

3.1.1. Objetivo 1: Aislar y caracterizar bacteriológicamente y molecularmente las cepas de Salmonella sp nativas de la zona de Cunco.

Número de muestras analizadas y lugares de muestreo

El muestreo fue realizado en avícolas de la IX Región de la Araucanía, entre los meses de mayo del 2013 a noviembre de 2014. Con el propósito de pesquisar serotipos de Salmonella en huevos, heces y cloacas de gallinas.

Las muestras se obtuvieron de las avícolas Huichahue, Quepe, Niagara, Cunco, Vilcun, Cholchol, Cani Loncoche, Tromen, Fundo del Carmen, Pucón, camino Villarrica, Rancagua, feria Pinto de Temuco y colegio agrícola Santa Cruz Temuco.

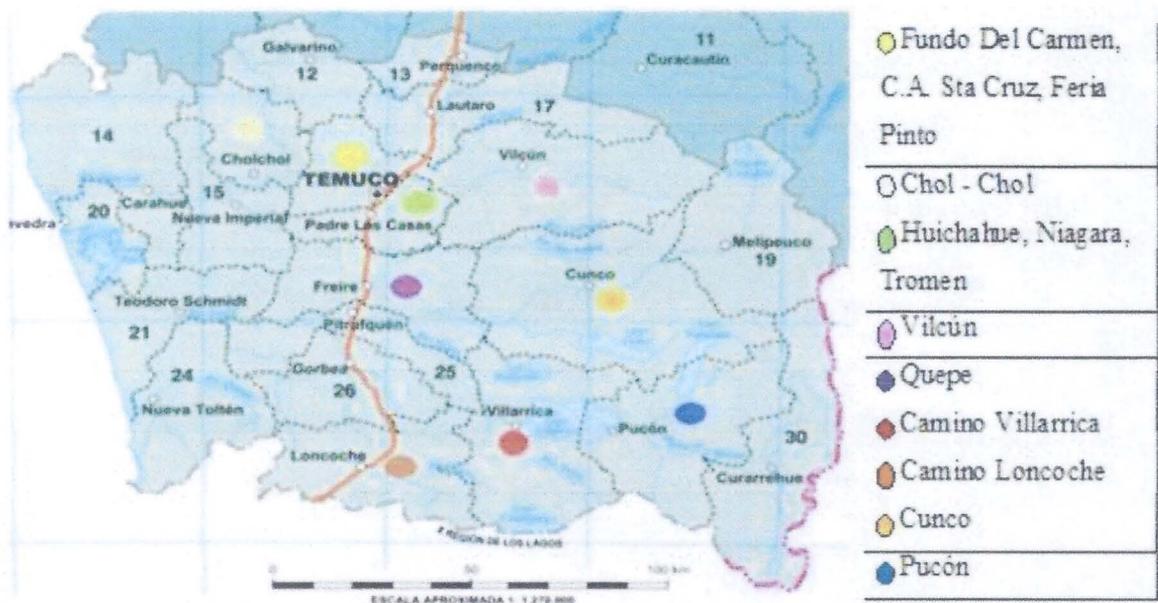
Para el cálculo del tamaño muestral (Duffau 1999) se contempló un nivel de confianza del 95%, con una precisión absoluta del 2% y con una proporción estimada en la población del 9% según el estudio chileno de Alexandre y col. año 2000. En el caso de Hisopado Cloacal se consideró una muestra de 765 (N 28.000 Pollas), para el caso de Fecas se consideró una muestra de 689 (N 5.600 Jaulas) y para muestras de Huevo se consideró una muestra de 756 (N 19.600 huevos diarios).



Fundación para la
Innovación Agraria

Se analizaron en definitiva 2413 muestras obtenidas de las avícolas antes mencionadas, cuyo detalle fue de 901 muestras de huevos, 741 muestras de heces y 771 de hisopados cloacales, correspondientes a un 37% de huevos, 32% cloacas y 31% heces, cumpliendo así con lo planificado.

A continuación se evidencia el rango territorial abordado en el desarrollo del proyecto.



Desglose de las localidades por comuna, de la procedencia de las muestras del estudio realizado en el periodo de mayo 2013 a noviembre 2014.

Las pruebas de laboratorio fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Santo Tomás sede Temuco. Los distintos tipos de muestras se procesaron de forma independiente debido a sus diferencias biológicas.

Aislamiento y caracterización bioquímica y serológica para la identificación de Salmonella a partir de muestras de Huevos

Se procedió a realizar aislamiento e identificación bacteriológica tradicional a través del Procedimiento de Detección de Salmonella en Alimentos por el Método Convencional

PRT-712.03-012 del Instituto de Salud Pública de Chile, que consiste en un pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos diferenciales, identificación con tabla TLM e identificación por serología.

Aislamiento y caracterización bioquímica y serológica para la identificación de Salmonella a partir de muestras de Hisopados Cloacales y Heces de Gallinas

Se procedió a utilizar aislamiento e identificación bacteriana por métodos microbiológicos tradicionales, que consiste en un pre-enriquecimiento en agua peptonada tamponada, enriquecimiento en 3 caldos selectivos para Salmonella, aislamiento en medios selectivos diferenciales, identificación con tabla TLM e identificación por serología.

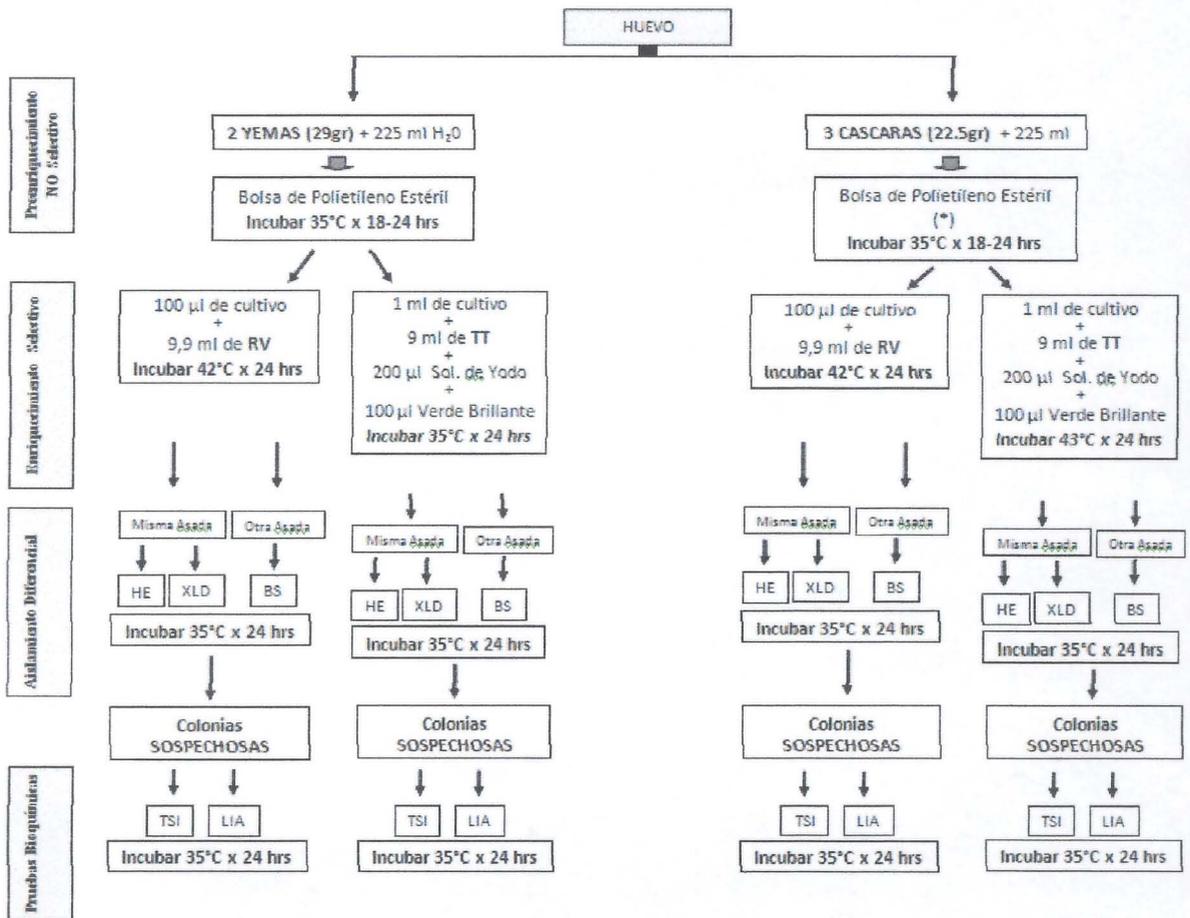
Descripción de la metodología utilizada para Aislar y caracterizar bacteriológicamente y molecularmente las cepas de Salmonella sp nativas

a. Aislamiento y caracterización bioquímica y serológica para la identificación de Salmonella a partir de muestras de Huevos.

Las muestras consistían en huevos frescos del día que fueron recolectados y transportados en bandejas desechables a temperatura ambiente al laboratorio de microbiología para su posterior análisis.

1. El pre – enriquecimiento de la muestra de cascara (tres huevos fue la equivalencia a una muestra de aproximadamente 25g) se suspendieron en 225ml de agua peptonada tamponada en bolsa estéril agitando en forma manual durante 5 minutos para permitir una homogeneidad de la muestra. Luego se retiró el huevo y fue lavado con alcohol 70%, se secó al aire y se rompió para separar la clara de la yema (2 yemas equivalen 1 muestra de aproximadamente 25g), esta fue depositada en una bolsa estéril con 225ml de agua peptonada tamponada y homogenizado en el equipo Hismatic por 2 minutos. Ambas muestras se sometieron al mismo ambiente de incubación a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa de cultivo durante 18-24 horas.
2. La etapa de enriquecimiento selectivo se realizó de las muestras pre-enriquecidas en agua peptonada de cáscara de huevo y yema, se extrajeron 1000 μL los cuales se adicionaron a 9ml caldo tetrionato + 200 μL Yodo + 100 μl verde brillante. Luego se extrajeron 100 μL de las muestras pre- enriquecidas y se agregaron a 9,9 mL caldo de Rappaport Vassiliadis. Ambas se dejaron incubar a $43 \pm 1^\circ\text{C}$ en el baño termorregulador por 18-24 horas.

3. De cada medio enriquecido se tomó una muestra con asa calibrada de 10 μ l para realizar la siembra en medios sólidos como Agar XLD, Agar Sulfito Bismuto (BS) y Agar HEKTOEN (HE) los cuales se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa de cultivo por 18-24 horas.
4. Las colonias sospechosas obtenidas de los medios de cultivo Agar XLD, Agar BS y Agar HE se inocularon cada una de las colonias en TSI y LIA se incubaron los medios a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa de cultivo por 24 horas.
5. Se confirmaron las muestras con técnicas serológicas en donde las muestras sospechosas se sembraron en agar nutritivo por 18 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ para realizar la aglutinación serológica de las colonias sospechosas con antisueros específicos.
6. Las muestras positivas a la reacción de aglutinación para *Salmonella* spp. fueron conservadas en leche a temperatura de -20°C , hasta su caracterización por biología molecular para la confirmación de identificación del género y serotipo bacteriano.



COLONIAS SOSPECHOSAS REALIZAR SEROLOGÍA

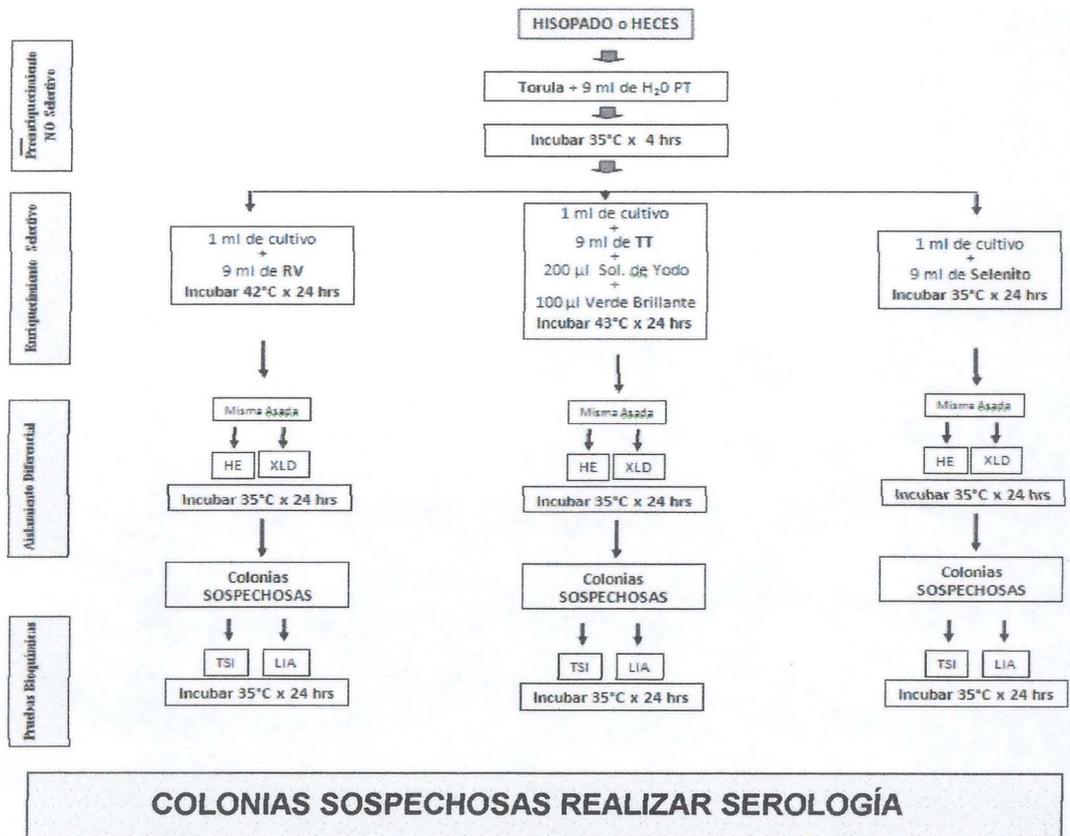
b. Aislamiento y caracterización bioquímica y serológica para la identificación de Salmonella a partir de muestras de Hisopados Cloacales y Heces de Gallinas

Se recolectaron muestras de heces frescas e hisopados cloacales, cuyas muestras se tomaron al azar del recto con tórula estéril previa inmovilización de la gallina en forma manual. Ambas muestras se depositaban en un medio de transporte Cary – Blair y eran transportadas en Nevera tipo Coleman® al laboratorio de Microbiología para su procesamiento.

1. En el pre- enriquecimiento las tórulas con muestras de hisopado cloacal y heces fueron retiradas del medio transporte Cary - Blair y fueron puestas en tubos con 10 ml de agua peptonada tamponada e incubadas en $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa de cultivo durante 4 y 18 horas observando el crecimiento bacteriano.
2. La etapa de enriquecimiento consta de tres medios en donde las muestras de heces e hisopados cloacales pre - enriquecidas se extrajeron 1 ml y se adicionaron a 9ml tetrionato + 200 μl Yodo + 100 μl Verde Brillante. Para 9,9ml caldo Rappaport se agregaron 100ul de las muestras pre- enriquecidas ambas se dejaron incubar a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño termorregulador κ MODEL: YCW - 035 por 18-24 horas. Por último se obtuvieron 100 μl de las muestras pre- enriquecidas y se adicionaron a 9,9 ml selenito se dejó incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas en estufa de cultivo.
3. Luego de cada medio de enriquecimiento, se tomó una muestra con asa calibrada de 10 μl para realizar la primera inoculación y luego se cambió a un asa de 1ul para realizar el aislamiento. Esto se hizo en Agar XLD y Agar HE las cuales se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa de cultivo por 18-24 horas.
4. Las colonias sospechosas (colonias con precipitado negro, lactosa negativa) obtenidas de los medios de cultivo Agar XLD y Agar HE se inocularon en TSI y LIA e incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en estufa de cultivo por 24 horas.



- Se confirmaron las muestras con técnicas serológicas en donde las muestras sospechosas se sembraron en agar nutritivo por 18 horas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ para realizar la aglutinación serológica de las colonias sospechosas con antisueros específicos.
- Las muestras positivas a la reacción de aglutinación para *Salmonella* spp. fueron conservadas en leche a temperatura de -20°C , hasta su caracterización por biología molecular para la confirmación de identificación del género y serotipo bacteriano.



c. Confirmación Molecular de Muestras Sospechosas Proveniente de Muestras de Huevo e Hisopados Cloacales y de Heces

La extracción de ADN se realizó utilizando un kit de extracción comercial (Kit High Pure PCR Template Preparation) Una vez obtenido el ADN se realizó la etapa de amplificación en la cual se agregaron 12,5 ul de GoTaq, 1ul de cada partidior -forward y reverse- descritos por Alvarez et. al (2003), 9,5ul de agua bidestilada esteril y 1 ul de ADN obtenido en la etapa anterior, esto se realizó con cada cepa. Los partidiores utilizados para la identificación de *Salmonella Enteritidis* utilizados son los recomendados en la literatura (Álvarez et. al. 2003). Para realizar este estudio la técnica de PCR se estandarizó según se indica a continuación

Estandarización de la Técnica de Reacción de Polimerasa en Cadena Múltiple (PCR-m) para Identificación de *Salmonellas* Enteritidis y Typhimurium.

Para los ensayos de la PCR-m se utilizaron las cepas *S. Enteritidis* ATCC 13076 (Microbiologics KWIK-STIK) y *S.Typhimurium* ATCC14028 (Microbiologics KWIK-STIK), que fueron replicadas en agar MacConkey y luego conservadas a -30°C hasta su uso.

A partir de estos aislamientos las cepas fueron cultivadas en caldo infusión cerebro corazón (MERCK) a 37°C por 18 horas.

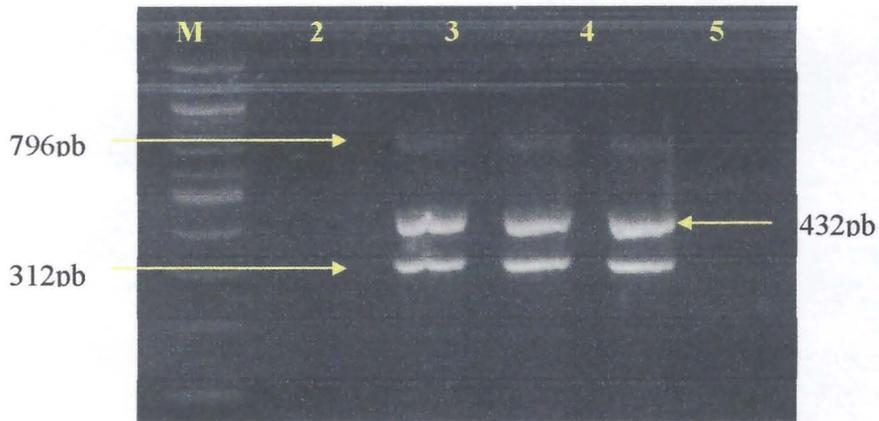
Para el análisis realizado de la PCR-m, se utilizaron tres pares de partidiores: **Inv A**, que es específico para *Salmonella spp.* que amplifica un fragmento de 796pb (Fratamico & Strobaugh, 1998), **IE 1**, específico para *Salmonella* Enteritidis que amplifica un fragmento de 316 pb (Wang & Yeh, 2002) y el partidior **Flic C** específico para *Salmonella* Typhimurium que amplifica un fragmento de 432pb (Paião et., al 2010).

Partidor	Longitud	Secuencia 5'→3'	Producto (pb)	
InvA F	22	CGGTGGTTTTAAGCGTACTCT T	796	<i>Salmonella spp</i>
InvA R	21	CGAATATGCTCCACAAGGTTA		
IE1 F	20	AGTGCCATACTTTTAATGAC	316	<i>Salmonella Enteritidis</i>
IE1 R	19	ACTATGTTCGATACGGTGGG		
Flic C F	20	CCCGCTTACAGGTGGACTAC	432	<i>Salmonella Typhimurium.</i>
Flic C R	20	AGCGGGTTTTTCGGTGGTTGT		

Se procedió a la búsqueda de la temperatura óptima de annealing para obtener las amplificaciones de cada partidor, para esto se realizó un gradiente de temperatura con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos consistentes en desnaturalización 1 minuto a 95°C, hibridación de 1 minuto de 55°C a 65°C y la extensión de 30 segundos a 72°C, el último paso consiste en la extensión final de 10 minutos a 72°C.

En una nueva PCR-m se evidenció que los tiempos y temperaturas ideales son: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos consistentes de desnaturalización 1 minuto a 95°C, hibridación de 1 minuto a 55,3°C y extensión de 30 segundos a 72°C, el último paso consiste en la extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR-m fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 90V durante 45 minutos en TBE al 0,5X como buffer de corrida, teñido con GelRed (biotium) y visualizado en un transiluminador (Vilber Lourmat).

A continuación se muestra el resultado de la amplificación de una misma muestra evaluada por triplicado, obteniéndose las 3 bandas amplificadas correspondientes a un pool de *Salmonella spp.*, *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis*.

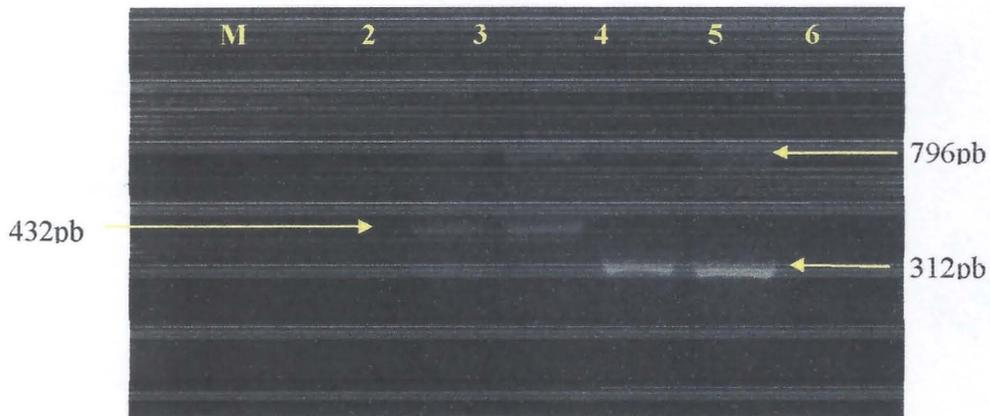


Evaluación de la especificidad de la PCR-m.

Para evaluar la especificidad del partidor IE 1 F/R se sometieron a análisis las cepas ATCC 13076 correspondiente a *Salmonella* Enteritidis y ATCC 13036 correspondiente a *Salmonella* Pullorum, estas fueron cultivadas en caldo infusión cerebro corazón por 18 horas a 37°C y posteriormente fueron sometidas al proceso de extracción de ADN.

Para evaluar la especificidad del partidor FlicC F/R se sometió a análisis la cepa ATCC 14028 correspondiente a *Salmonella* Typhimurium, esta fue cultivada en caldo infusión cerebro corazón por 18 horas a 37°C y posteriormente fue sometida al proceso de extracción de ADN.

El análisis del partidor InvA F/R que amplifica un producto de 796 pb correspondiente a *Salmonella* spp., se realiza en conjunto con el estudio de todas las cepas analizadas, obteniéndose como resultado la amplificación del producto de 796 pb en cada cepa ATCC estudiada, todas correspondientes al género *Salmonella*.

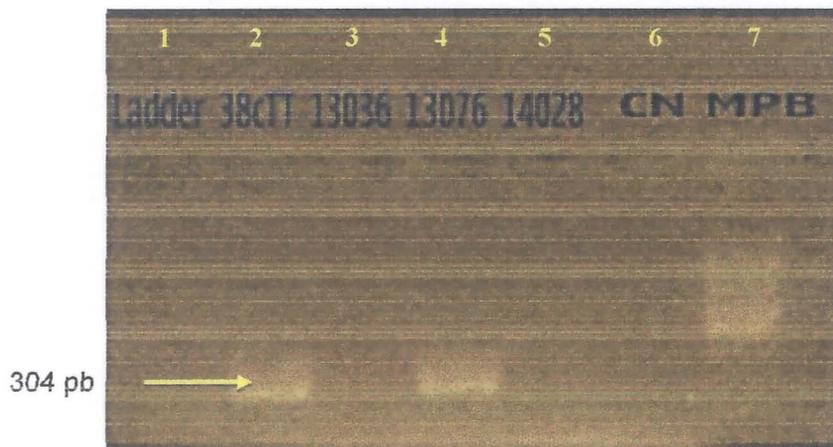


Gel de agarosa 1,5% teñido con GelRed para evaluación de la especificidad de los partidores IE 1, Flic C e InvA. Carril M: marcador peso molecular de 100pb; Carril 2: control negativo; Carril 3: control positivo (pool); Carril 4: *Salmonella* Typhimurium.; Carril 5: *Salmonella* Enteritidis; Carril 6: *Salmonella* Pullorum.

Al comparar los resultados obtenidos podemos observar que los productos amplificados poseen la especificidad para identificar *Salmonella* Typhimurium, sin embargo no es capaz de diferenciar los serotipos de *Salmonella* Enteritidis de *Salmonella* Pullorum, de esta forma se descarta la especificidad del partidor IE 1 para aislamientos de origen aviar, si bien se puede utilizar para la identificación de aislamientos de muestras clínicas de origen humano, no es factible su utilización para muestras de origen aviar. Debido a esto se propone la utilización de otro par de partidores para la identificación de *Salmonella* Enteritidis.

Partidor	Secuencia 5'→3'	Producto (pb)
Ent F	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAG	304
Ent R	TGAACTACGTTTCGTTCTTCTGG.	

(Extraído de Alvarez et., al 2003)



En la corrida electroforética se observa Carril 1: Ladder de pares de bases; Carril 2: Muestra 38cTT aislada de Hisopado Cloacal; Carril 3: *Salmonella pullorum* ATCC 13036; Carril 4: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076; Carril 5: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; Carril 6: Control negativo ATCC 25923 y Carril 7: Marcador de Pares de Bases.

Confirmación Molecular de Muestras Sospechosas Proveniente de Muestras de Huevo e Hisopados Cloacales y de Heces

La extracción de ADN se realizó mediante el Kit High Pure PCR Template Preparation.

1. Las colonias obtenidas y guardadas en leche, se sembraron en agar nutritivo A 35°C por 24 horas. Al obtener las bacterias se realiza una suspensión de 10 colonias en 1 ml de agua bidestilada estéril.
2. En un eppendorf estéril se agregaron 200ul de las suspensiones bacterianas previamente realizadas más 200ul de Binding Buffer + 50ul de proteinasa K, se deja incubar por 10 minutos a 72°C en el baño termorregulador.
3. Se trasvasijó la suspensión incubada a un tubo con su respectiva columna colector, se centrifugó a 8000g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante que queda en el tubo colector.

4. Se agregó otro tubo colector y se adicionaron 500ul de inhibidor removal buffer, se centrifugó a 8000g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante que quedo en el tubo colector.
5. Se agregó otro tubo colector, y se adicionó 450ul de wash buffer, se centrifugó a 8000g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante que quedo en el tubo colector.
6. Se agregó otro tubo colector, este paso se realizó dos veces, se volvió a centrifugar por 10 segundos a 13.000g y se descartó el tubo colector.
7. Se adicionaron 50ul de buffer de elusión, se centrifuga a 8000g por 1 minuto se descartó el tubo y se guarda el eppendorf con el ADN extraído para su posterior amplificación.

Amplificación (PCR-m)

Una vez obtenido el ADN se realizó la etapa de amplificación en la cual se agregaron 12,5 ul de GoTaq, 1ul de cada partidior (forward y reverse) descritos por Alvarez et., al 2003, 9,5ul de agua bidestilada esteril y 1 ul de ADN obtenido en la etapa anterior, esto se realizó con cada cepa.

Luego se cargaron las muestras en el termociclador (Biometra Tpersonal Thermocycler), se programaron los ciclos de la siguiente forma.

Ciclos	Temperaturas °C	Tiempo	Ramp (c/s)
1	95	05	4
2	95	01	4
3	55,3	01	4
4	72	00:30	4
5	72	10:00	4
6	04, 0	59:00	##

Se dejaron correr 30 ciclos, hasta lograr una amplificación útil y con un número de copias necesarias para una excelente visualización.

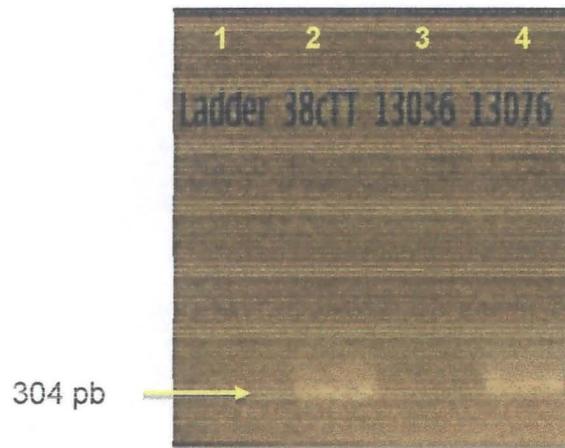
Partidores utilizados para la identificación de *Salmonella Enteritidis*.

Partidor	Secuencia 5'→3'	Producto (pb)
Ent F	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAG	304
Ent R	TGA ACTACGTTTCGTTCTTCTGG.	

(Extraído de Alvarez *et.*, al 2003)

Visualización de productos de ADN

Se preparó un gel de agarosa al 2 % en el cual se le agrego 1ul de Red Gel (BIOTUM Gel red Nucleic Acid Stain 10.000X in DMSO) por 100ml de agar, y se dejó solidificar, se cargaron las muestras de 10ul en cada carril y como control se utilizó un ladder de pares de bases en el primer carril, luego la muestra problema en la segunda, ATCC 13036 *Salmonella Pullorum* en el tercer carril, ATCC 13076 *Salmonella Enteritidis* en el cuarto carril, ATCC 14028 *Salmonella Typhimurium* en el quinto carril y ATCC 25923 como control negativo (Las ATCC 13036 y 14028 fueron utilizadas como control interno negativo del partidor descrito por Alvarez *et.*, al 2003). Luego se dejó correr en la cámara MS MAYOR SCIENCE MP-300V por 45 minutos a 100 amperes, se visualizó en cámara reveladora WISE UV WISD WUV-L10 los resultados de la migración de ADN en el gel de agarosa.



En la corrida electroforética se observa Carril 1: Ladder de pares de bases; Carril 2: Muestra 38cTT aislada de Hisopado Cloacal; Carril 3: *Salmonella pullorum* ATCC 13036; Carril 4: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

3.2 ASPECTOS METODOLOGICOS ASOCIADOS AL OBJETIVO 2

3.2.1. Preparación del antígeno inactivado

Se cultivó la cepa nativa de *Salmonella Enteritidis*, obtenida aislada en la fase anterior. Se hicieron alícuotas en tubos eppendorf estériles los que se guardaron en leche-glicerol a -20 grados. Cada vez que fue necesario preparar antígeno uno de estos tubos conteniendo la cepa se recuperó sembrándola en agar Mac Conkey (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) preparado según indicaciones del fabricante durante 24 hrs a 37°C, luego se traspasaron alícuotas obtenidas con un asa estéril a frascos de 1 Litro conteniendo 500 ml de medio de cultivo caldo Cerebro Corazón (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) preparado según las indicaciones del fabricante, en una estufa de cultivo (Binder, ZDP-2080) a 37°C por 72 horas con agitación suave esporádica.

Terminado el tiempo de incubación se inactivaron las bacterias (frasco sin abrir) en un baño termostático (YCM-01) a 65°C por 60 minutos. Las bacterias obtenidas en el paso anterior se centrifugaron a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada (Dynamica 18R-FA15C) para obtener el pellet, el precipitado se resuspendió en suero fisiológico estéril y se centrifugó por 10 minutos a 9.000 RPM, este procedimiento se repitió 3 veces para eliminar los restos de caldo del medio de cultivo.

Para asegurar y complementar la inactivación bacteriana se procedió a resuspender el pellet en formalina 1 g/dL, a 4°C durante 18 horas, luego se realizaron 3 lavados con NaCl 0.9 g/dL estéril a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C con el objeto de eliminar el exceso de formalina (Torres *et al*, 1995).

El pellet húmedo recuperado se masó en una balanza digital (0.01 g) y se almacenó a -20°C hasta su liofilización (Facultad de Ingeniería de la Universidad Católica de Temuco o microencapsulación (Departamento de Agroindustria de la Universidad de la Frontera de Temuco)

Luego de cada proceso de inactivación, se realizó un control de viabilidad sembrando uno de los frascos al azar, en placas de agar Mac Conkey, incubándolas durante 24 horas a 37°C . No se observó crecimiento bacteriano en ningún caso durante el desarrollo del proyecto, lo que sumado a 2 sucesivos procesos de congelación y descongelación que en las condiciones experimentales provocan criofractura de las estructuras celulares aseguran la total inocuidad de este preparado antigénico..

El pellet húmedo obtenido fue congelado a -20°C durante a lo menos 72 horas antes de proceder a su liofilización, microencapsulación sonicación o conjugación, dependiendo del tipo de requerimiento de cada experimento.

Los frascos conteniendo el antígeno liofilizado o microencapsulado se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su utilización.

Una parte de las bacterias fue sometida a sonicación para preparar un extracto proteico que se utilizó en los test de Elisa y western blot.

Un resumen del proceso descrito se encuentra a continuación en la figura 3.2.1

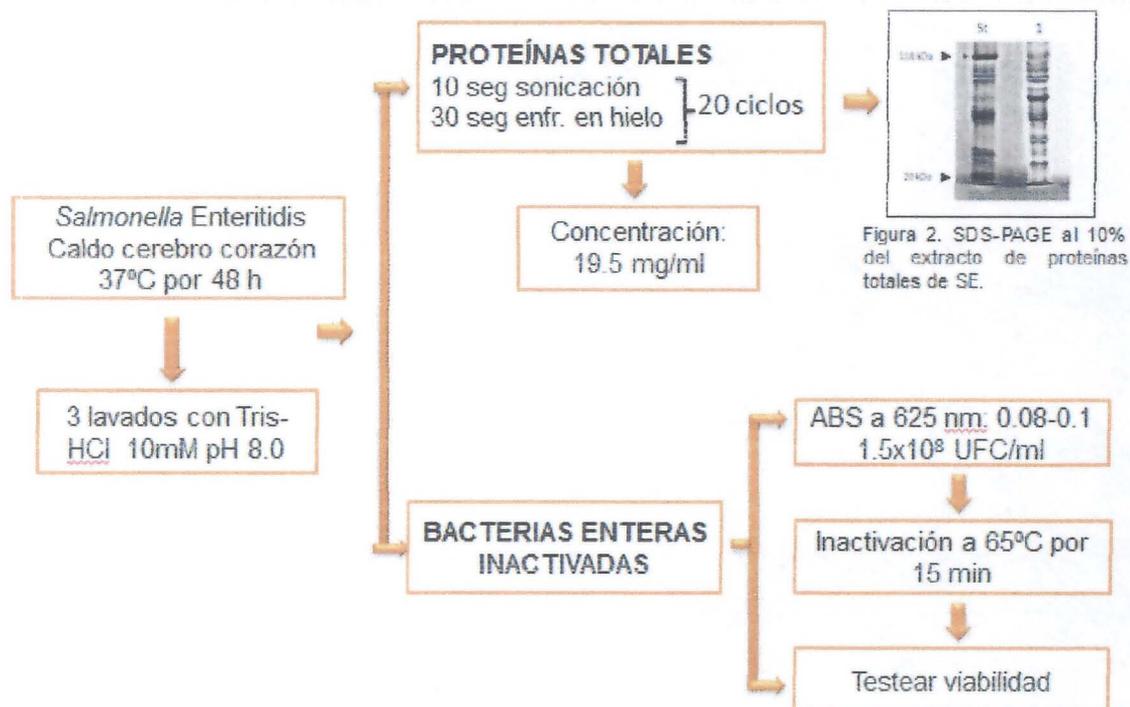


Fig. 3.2.1 Resumen de la preparación de antígenos. Bacterias inactivadas y extractos proteicos para uso en métodos analíticos.

3.2.2. Preparación de adyuvantes

Con el objeto de potenciar el estímulo inmunológico se evaluaron diversas fórmulas para identificar adyuvantes potencialmente útiles para funcionar a nivel de mucosas. En este punto es importante aclarar que aun cuando en los últimos años se han descrito algunos coadyuvantes de uso oral -como por ejemplo la subunidad β de la toxina del cólera- estos tienen aplicación muy limitada a nivel experimental en investigación. Por su elevado costo no tienen posibilidades de aplicación industrial y los efectos secundarios que provocan en los animales constituyen un problema bioético que no discutiremos en este informe (Petrovsky et. als., 2004)

Se evaluaron experimentalmente numerosas preparaciones con potencial efecto adyuvante de la respuesta inmune a nivel de mucosa basados en antecedentes extraídos de la literatura. Entre ellos destacamos a continuación los preparados que mostraron mayor actividad inmunoestimulante experimental en la inmunización de mucosas.

3.2.2. a. Preparación y conjugación de esporas de *Bacillus subtilis* y *Salmonella enteritidis*

Esta elección se realizó para evaluar diversos antecedentes reportados en la literatura que atribuyen poder estimulante de la respuesta inmune de mucosas a esporas de *B. subtilis* asociados a varios antígenos (Vergis 2013, Duc 2003). Estas apreciaciones son válidas para mamíferos como ratones y ratas pero no hay reportes de su comportamiento en aves.

Se utilizó una cepa de *Bacillus subtilis* sp la que se cultivó en caldo Cerebro Corazón en estufa de cultivo por 48 horas a 37°C.

El cultivo anterior se llevó a autoclave a 120 °C por 30 minutos.

Luego se centrifugó a 10.000 RPM por 10 minutos para obtener el pellet. Y se lavó 3 veces con suero salino de NaCl 0.9 g/dL Este pellet se conjugó con salmonella enteritidis inactivada previamente preparada según se describe anteriormente.

La conjugación se realizó utilizando glutaraldehído de acuerdo a lo descrito en la literatura (Hughes and Thupman, 1970). En resumen por cada 2 gramos de coadyuvante *Bacillus subtilis*, (pellet húmedo) se utilizaron 8 gramos de Salmonella Enteritidis (pellet húmedo) y 8 ml de glutaraldehído al 0,33% y se resuspendió todo en suero fisiológico hasta un volumen total de 40 ml.

Se dejó toda la noche en agitación suave

Para eliminar el exceso de glutaraldehído se dializó la suspensión en una membrana diálisis (10.000 MWCO, 3,7 mL/cm) Se dejó en PBS durante 6 horas con 3 cambios de PBS a la hora, 3 horas y a las 6 horas, finalmente después del último cambio se dejó dializando toda la noche.

El preparado anterior se congeló a – 20°C y se llevó al laboratorio de Agroindustria de la universidad de la Frontera donde fue microencapsulado utilizando una cubierta de maltodextrina.

El preparado final tiene la forma de un polvo fino que se mezcló con alimento para pollitas en una proporción de 4 mg de conjugado microencapsulado con 400 mg de alimento por pollita.

Esta mezcla fue entregada el día de la inmunización previo a una de las raciones de alimento. Este procedimiento se repitió durante 5 días para la primera inmunización y 3 días para la segunda inmunización.

3.2.2 b. Preparación de conjugado coadyuvante PP - *Salmonella Enteritidis*

Se denominó PP a un extracto de *Phaseolus vulgaris* (Poroto tórtola) que se supone es rico en lectinas (Sharon N. 1990, Yachnin S. 1972) principalmente Concanavalina A y cuyo contenido pudimos demostrar durante la preparación de estos extractos. Esta investigación se desarrolló en atención al conocido hecho que muchas lectinas de plantas tienen actividad inmunoestimulante “in vitro” y publicaciones que indican que algunas de estas lectinas tienen efecto inmunoestimulante a nivel de mucosas (Lavelle et. als, 2001). Desarrollamos este experimento pensando que *Phaseolus vulgaris* es una legumbre económica y fácil de conseguir y sabiendo que contiene varias lectinas entre ellas concanavalina A (Con A) una proteína globular de origen vegetal, se obtiene a partir del frijol cuyo contenido varía entre 1 y 3 % en peso.. Los estudios realizados demuestran que Con A es un excelente estimulador de mitosis de los linfocitos y que se puede identificar por su capacidad de aglutinar eritrocitos (Sumner JB, Howell SF. 1936)

Extracción de lectina Concanavalina A (extracto PP) de *Phaseolus vulgaris* (Poroto tórtola): La metodología utilizada para la extracción se basó en lo publicado por Azevedo (Azevedo y Consani 1977). En resumen:

Se masaron 100 gramos de *Phaseolus vulgaris* (Porotos tórtolas), se añadieron 500 ml de NaCl 0,15 M y se dejó a 4°C por 18 hrs. Luego se molieron con una batidora de inmersión durante 10 minutos y se le adicionaron 500 ml de NaCl 0,15 M. Se ajustó a pH 4,5 con HCl 1M, se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se filtró el sobrenadante y se evaluó mediante un test de hemaglutinación (Fig.3.2.2.b.2). Al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio lentamente hasta 18 % de saturación. se le ajusto a pH 7 con NaOH 4M, dejándolo en reposo por 18 hrs a 4°C. El precipitado Se eliminó por centrifugación a 3.000 rpm por 30 minutos a 4 °C.

Se recuperó el sobrenadante y se filtró. Se añadió sulfato de amonio lentamente hasta un 60% de saturación, se ajustó a pH 7 nuevamente con NaOH 4 M y se dejó reposar por 18 hrs a 4°C. El precipitado se recupera por centrifugación a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se resuspendió el precipitado en 100 ml de agua destilada. Luego se filtró nuevamente con papel filtro y se procedió a dializar (membranas de diálisis 10.000 MWCO, 3,7 mL/cm) contra agua destilada, en agitación constante (con agitador magnético) por 2 hrs a 4°C, luego se recambia el agua destilada por NaCl 0,9% 2 veces y se deja por 18 hrs a 4°C. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas por método de BCA (anexo) y para evaluar las fracciones proteicas obtenidas se realizó una electroforesis (SDS-PAGE 10%) y posteriormente un test de hemaglutinación con el objeto de determinar la capacidad aglutinante característica de Con A (Fig. 3.2.2.b.1)

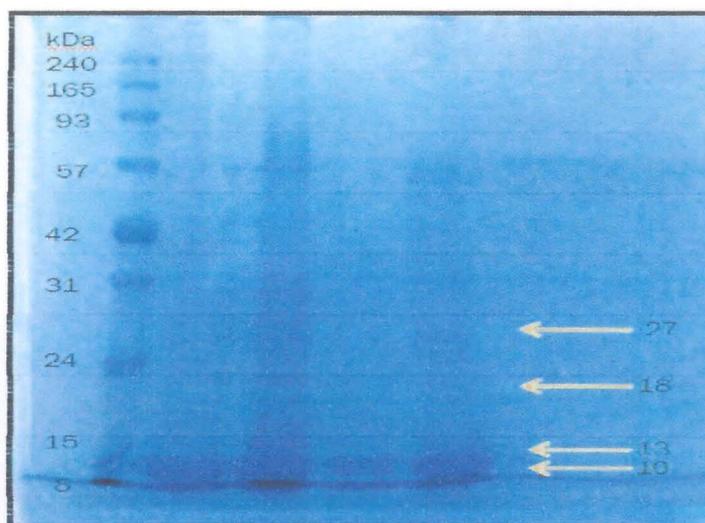
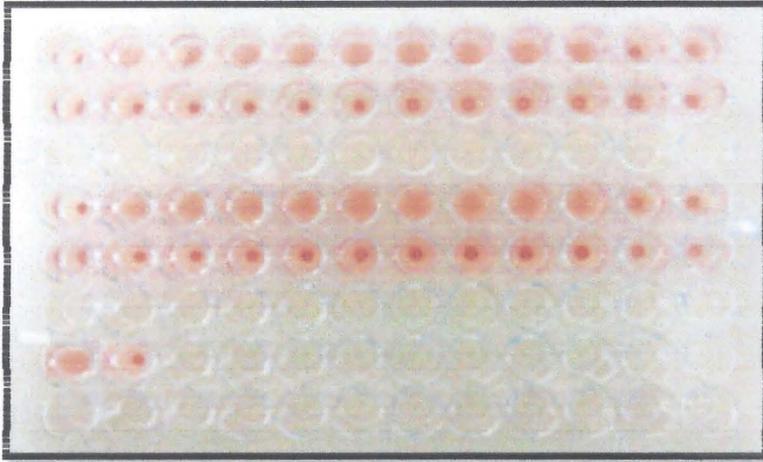


Fig. 3.2.2.b.1. Electroforesis-SDS-PAGE 10%, Concanavalina A.
Se observan tres bandas características (27, 13 y 10 kDa)
Una banda menor es visible en 18 kDa.



3.2.2.b.2 Test de Hemaglutinación del extracto PP para demostrar la presencia de la lectina Con A con glóbulos rojos en diluciones seriadas. La muestra fue Previamente diluida 1/10. Realizado en duplicado. Título 1/512.
(Abajo controles + y -)

3.2.2.c Preparación de soja fermentada con esporas de *B. subtilis* (Natto)

Este potencial adyuvante se eligió en atención a numerosas publicaciones sobre el uso de este preparado probiótico de origen japonés con múltiples efectos beneficiosos sobre la mucosa digestiva, antecedentes científicamente respaldados, entre los que se menciona un potencial efecto estimulador del sistema inmune de la mucosa digestiva

Los antecedentes de este productos así como el procedimiento para prepararlo se encuentra en las referencias adjuntas (Inkyu 2014, Matar 2000, Sun 2010). En resumen la metodología usada en este experimento fue la siguiente:

Parte A. Preparación de esporas de *Bacillus subtilis*

En un frasco de vidrio de 250 ml, se prepararon 100 mL de caldo Trypticase de Soya. Paralelamente se prepararon 300 mL de agar Trypticase de Soya en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Luego se procedió a autoclavar los medios de cultivo preparados a 121°C por 15 minutos.

Se inocularon dos asadas de bacterias *Bacillus subtilis* al caldo de tripticase de soja y se incubó a 37°C durante 18 hrs en aerobiosis. Se tomaron 3 mL de caldo de cultivo, se transfirieron al medio Agar tripticase de soja y se incubó durante 7 días en aerobiosis a 37°C. Después de los 7 días se retiró el matraz de la incubadora y se le añadieron 15 ml de agua destilada estéril. Se agitó manualmente el matraz para tratar de desprender la mayor cantidad de microorganismos. El enjuague se colocó en un tubo Falcon estéril de 50 ml repitiendo este procedimiento por 3 veces, para remover la mayor cantidad de esporas posibles del matraz. Al finalizar el último enjuague, el tubo se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se retiró el tubo de la centrifuga con el cultivo y se aspira el sobrenadante hasta dejar 10ml en el tubo y en seguida se le agrega agua destilada estéril hasta llenar el tubo de centrifuga y se agita en vórtex. y se repite el mismo procedimiento 3 veces a partir del centrifugado. Después de realizar el último centrifugado se retira el sobrenadante y se vuelve a

llenar el tubo con agua estéril, luego se vierte esta solución en una botella ámbar de 250 mL. Se incubó en baño termostático (YCW-01) a 80°C durante 12 minutos (Shock térmico). Por último, se retira la botella ámbar que contenía las esporas de *Bacillus subtilis* (Fig. 3.2.2.c) del baño termostático y se guarda a 4°C hasta ser utilizado.

Parte B. Fermentación de soja (*Glycine max*)

Se masaron 50 g de *Glycine max* y se lavaron con abundante agua de la llave. Posteriormente se dejaron durante 8 horas con 500 ml de agua y luego se coció en olla a presión durante 45 minutos. Se agregaron 10 ml de la suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* (ver Parte A) al frasco y se dejó incubar a 37°C durante 18 hrs. Luego son sacados de la incubación y se dejan a 4°C. Se utilizaron 2 tubos Falcon de 50 ml. A cada uno se agregó 10 g de extracto de soja fermentada y se le adicionaron 40 ml de agua destilada esterilizada, se mezcló utilizando un vortex. Luego se dejó por 24 hrs a temperatura ambiente, y se centrifugó a 23.000 x g por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a 4°C hasta ser utilizado.

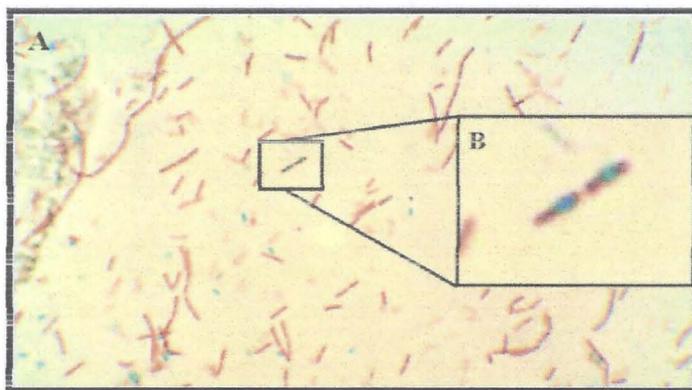


Fig. 3.2.2.c. Tinción de esporas de *B. subtilis* con verde de malaquita.
A) Aumento de 100 X. B) Aumento con zoom.

Parte C. Conjugación del preparado Natto con Antígeno inactivado (*Salmonella*)

Se utilizó una relación de 28 ml de Natto por cada 5 gramos de *Salmonella Enteritidis* y 5,6 ml de glutaraldehído 0,33% y se dejó toda la noche en agitación suave.

Al día siguiente se puso la suspensión en una membrana de diálisis y se dejó en buffer PBS (3 litros) con cambio a las 1, 3 y 6 horas. Finalmente se cambió PBS nuevo y se dejó en agitación toda la noche.

Una vez listo se sacó la membrana de diálisis del PBS y se le agregó carbowax para concentrar hasta el volumen inicial.

Los preparados anteriores se llevaron al laboratorio de Agroindustria de la universidad de la Frontera donde fueron microencapsulados utilizando una cubierta de maltodextrina. Las preparaciones finales tenían la forma de un polvo fino, cada uno de los cuales se mezcló con alimento para pollitos en una proporción de 4 mg de conjugado microencapsulado con 400 mg de alimento por pollita. Esta mezcla fue entregada el día de la inmunización previo a una de las raciones de alimento. Este procedimiento se repitió durante 5 días para la primera inmunización y 3 días para la segunda inmunización.

3.2.2.d Conjugado coadyuvante-AA-*Salmonella Enteritidis*

Numerosas referencias de la medicina popular atribuyen al carozo de albaricoque (damasco) propiedades anticancerígenas y estimuladoras de células del sistema inmune. No encontramos en la literatura respaldo científico a esas afirmaciones por lo que la difusión de estas apreciaciones se basan solo en numerosos testimonios personales.

No obstante lo anterior y por tratarse de un sub producto natural de fácil acceso decidimos evaluar el potencial efecto de un extracto crudo acuoso al que denominamos AA. Para su preparación se masaron 100 g de carozo de albaricoque, se molieron en NaCl 0.9 g/dL agregándolo hasta completar 200 mL en una trituradora de alimentos. Se incubó una noche a 4 °C, e centrifugó a 10.000 rpm y se recuperó el sobrenadante que se denominó AA.

Se utilizaron 45 mL de AA, 10 gramos de *Salmonella Enteritidis* y 11,2 ml de glutaraldehído 0,33%. Se dejó durante toda la noche en agitación suave, luego se

trasladó la suspensión a una membrana de diálisis (10.000 MWCO, de 3,7 mL/cm) contra agua destilada, en agitación constante (con agitador magnético) por 1 hr a 4°C, luego se recambia el agua destilada por NaCl 0,9% y se deja por 3 y 6 horas respectivamente. Luego del último cambio se dializa toda la noche a 4°C.

Una vez listo se retiró la membrana de diálisis del PBS y se concentró hasta el volumen inicial utilizando goma Carbowax

El preparado anterior se llevó al laboratorio de Agroindustria de la universidad de la Frontera donde fue microencapsulado utilizando una cubierta de maltodextrina. El microencapsulado final tenía la forma de un polvo fino que se mezcló con alimento para pollitos en una proporción de 4 mg de conjugado microencapsulado con 400 mg de alimento por pollita. Esta mezcla fue entregada el día de la inmunización previo a una de las raciones de alimento. Este procedimiento se repitió durante 5 días para la primera inmunización y 3 días para la segunda inmunización.

3.2.2.e. Preparación de conjugado Sábila (Aloe Vera) - *Salmonella Enteritidis*

Numerosas publicaciones tanto científicas como de la medicina popular atribuyen a Aloe Vera (Sábila) numerosas propiedades medicinales incluida su capacidad de potenciar el sistema inmune tanto sistémico como digestivo de mucosa (Castellanos 2006, Amar 2008, Sydiskis 1991, Sandi 2007, Rageswari 2012, Akira 2015, entre otros) en este vegetal se han descrito mas de 200 componentes con actividad biológica varios de los cuales actúan sobre el sistema inmune (Maharjan H.R. 2014) razón por la cual se optó por evaluar su potencial actividad como coadyuvante a nivel de mucosas.

Se utilizaron las hojas frescas de *Aloe vera* de plantas de 2 años aproximadamente, las cuales fueron lavadas con agua potable y escurridas, luego se procedió a separar en fragmentos la totalidad de la hoja, incluyendo las puntas, la base, y la corteza.

Todos los fragmentos se procesaron en una batidora de inmersión (“Black&Decker” SB400), utilizando agua destilada como solvente. Finalmente se almacenó en frascos de 50 mL a -20°C hasta el proceso de liofilización. El extracto de *Aloe vera* liofilizado posteriormente se mezcló en partes iguales con el antígeno también liofilizado. 4 mg de esta mezcla fue entregada el día de la inmunización previo a una de las raciones de alimento. Este procedimiento se repitió durante 5 días para la primera inmunización y 3 días para la segunda inmunización.

3.2.2.f. Preparación de conjugado Lupino (*Lupinus albus*) - *Salmonella Enteritidis*

En la medicina popular a esta especie (lupino) se le atribuyen propiedades medicinales, y se comercializan comprimidos obtenidos de extractos puros de granos de *Lupinus albus* como complemento dietario para combatir la gota y el reumatismo (Planchuelo, 2007). Las semillas de lupino se utilizan para curar infecciones por parásitos, reducir forúnculos y enfermedades de la piel, y curar llagas entre otros usos (Shawna, 2014). También llaman la atención estudios sobre la capacidad de lupino para inducir la expresión de genes del sistema inmune (Universidad católica, Temuco. 2013). Otros trabajos que sugieren potencial efecto sobre el sistema inmune son los reportados por Harbans y Andarwulan (Harbans 2012, Andarwulan et als.1999). Para evaluar un potencial efecto adyuvante del lupino sobre la respuesta mucosal digestiva de las aves se procedió como se describe a continuación:

Los granos de *Lupinus albus* fueron procesados en un molino, obteniendo pequeños fragmentos, los que posteriormente se redujeron a polvo en una procesadora de alimentos, obteniendo el extracto completo de semillas de lupino en partículas pequeñas, el cual se almacenó a 4°C para su posterior administración. Antes de la inmunización el polvo de *Lupinus albus* se mezcló rigurosamente en partes iguales con el antígeno mezclando al menos durante 5 minutos en un mortero de porcelana.

4 mg de esta preparación se mezclaron con 400 mg de alimento por pollita y fue entregada el día de la inmunización previo a una de las raciones de alimento. Este procedimiento se repitió durante 5 días para la primera inmunización y 3 días para la segunda inmunización.

3.2.2.g. Preparación de extracto de Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) – *Salmonella enteritidis*.

Saccharomyces cerevisiae (levadura de pan) es una fuente económica de β -glucanos. Los β -glucanos son polisacáridos de elevado peso molecular que se encuentran en forma natural en la pared celular de diversos organismos vivos como bacterias, levaduras, hongos y plantas y se les ha atribuido importantes propiedades inmunoestimulantes demostrada en numerosas publicaciones (Pizarro *et al*, 2014) especialmente como activadoras de la respuesta innata (Goodridge HS, 2009) lo que la convierte en un importante objeto de estudio ya que el sistema inmune detecta precisamente estas moléculas de glucanos sobre los patógenos activándose (Neil A. R. Gow *et als*. 2010).

Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* adquirida comercialmente en un supermercado (Levadura seca Collico), se procedió a su activación según se describe en la literatura (Hunter *et al*, 2002). En resumen, se procedió a activar la levadura añadiéndole NaOH 0,1 mol y se agitó durante 30 minutos a una temperatura de 60°C. Luego se dejó reposar durante 1 hora y finalmente se centrifugó 10.000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sedimento, se lavó tres veces con agua destilada y finalmente el sedimento se almacenó en frascos de 50 ml, a -20°C hasta el proceso de liofilización. El liofilizado de *Saccharomyces cerevisiae* posteriormente se mezcló en un mortero en partes iguales con el antígeno y se administró por vía oral con el alimento en la misma proporción utilizada anteriormente para otras preparaciones.

3 ASPECTOS METODOLOGICOS ASOCIADOS AL OBJETIVO 3

3.3.1. Animales. Alojamiento de pollitas y alimentación

Se utilizaron pollitas de la línea Lohmann Brow y de la línea Lohmann Lite, adquiridas en diferentes períodos del proyecto, las que fueron mantenidas en jaulas apropiadas. Dependiendo del experimento estas fueron mantenidas en la avícola Huichahue en la mismas condiciones estándares que el resto de las aves.

Cuando fue necesario las pollitas fueron alojadas en un galpón acondicionado e implementado en la universidad Santo Tomás y contó con la infraestructura adecuada para la crianza de las aves, el ambiente de dicho galpón (temperatura, ventilación y humedad) fueron adecuadas para las edades correspondientes. Aseo y retiro de excretas 2 veces por día.

El proyecto respetó las normas de bienestar animal propuestos por el comité asesor de bioética FONDECYT – CONICYT relacionado con los aspectos bioéticos de la experimentación animal, ley 20.380 sobre protección de animales, guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio y protección de los animales utilizados para fines científicos especialmente en lo que respecta a la infraestructura, ambiente controlado dentro del galpón, densidad en jaula, alimentación y manejo de dichas aves.

Grupos experimentales.

Para cada experimento se formaron grupos de 10 a 15 pollitas las que fueron debidamente identificadas manteniéndolas en jaulas separadas y en ocasiones con anillos plásticos colorados en una de sus patas.

3.3.2 Inmunización Oral

Para la inmunización por vía oral se administraron 20 mg de la mezcla antígeno – adyuvante (descritos en el punto 3.2) distribuido en 5 días la primera inmunización y 3 días la segunda inmunización (o refuerzo) esto es 4 mg por día, mezclado con una pequeña cantidad de alimento (en promedio 2 g por dosis diaria por pollita) El antígeno así administrado se entregó siempre con el primer alimento del día (en las mañanas) y se vigilaron las pollitas hasta que consumieron la dosis. Inmediatamente después se continuó con la entrega del alimento diario. El consumo agua no fue restringido ni modificado en ningún caso.

Durante este procedimiento las aves no fueron sometidas a ningún tipo de estrés.

Inmunización Parenteral (controles)

Cuando fue necesario inmunizar un grupo control positivo, esto se hizo por inyección intramuscular en el músculo pectoral utilizando bacterias inactivadas ($1,5 \times 10^8$ UFC x mL más 60 mg de hidróxido de aluminio en un volumen final de 0.5 mL) disminuyendo la cantidad de bacterias a la mitad para la segunda dosis de reinmunización.

3.3.3 Obtención de muestras de sangre y heces y órganos

Antes (control basal) y durante el proceso experimental de inmunización se obtuvo entre 0,5 – 1 mL de sangre de la vena braquial de cada pollita o gallina, la cual fue depositada en tubos Eppendorf. Los tubos fueron rotulados y trasladados al laboratorio y 2 horas después de formado el coágulo se centrifugaron a 3500 rpm por

15 minutos, se recuperó el suero el cual se conservó a -20°C hasta su utilización. El procedimiento se repitió en las siguientes tomas de muestra.

Las muestras de heces se tomaron por hisopado cloacal (aproximadamente 0,5 gr) con una tórula, la cual fue depositada en tubos Khan con 0,5 ml de suero fisiológico conteniendo inhibidores de proteasas 1X (Proteasa Inhibitor cocktail I; Calbiochen), para evitar la digestión de los anticuerpos. Se homogeneizó y se centrifugó a 3500 RPM por 10 min y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su análisis.

Las heces para medir anticuerpos se utilizaron en forma de pool, sin individualizar cada gallina.

Cuando fue necesario realizar cultivos para buscar Salmonellas se utilizó un hisopo estéril, el cual fue introducido en el recto de las gallinas, procurando que la punta de éste quedara completamente embebida con heces. Las muestras de heces fueron depositadas en tubos de transporte Carry Blair y trasladadas al laboratorio de microbiología para su procesamiento.

3.3.4. Experimentos de desafío

El desafío se realizó 10 días posteriores a la última inmunización. Las gallinas fueron desafiadas oralmente con 5×10^6 a 10^8 UFC de Salmonella Enteritidis dependiendo del experimento, diluidas en 1 ml de NaCl 0,9 g/dL, contenidas en una jeringa de 3 ml, la cual se les dio de beber con una sonda directamente al esófago.

Muestras de órganos

El día 14 posterior al desafío se realizaron las necropsias de las aves desafiadas con *Salmonellas* viables.. Durante este procedimiento las aves fueron sacrificadas por sobre dosis de anestesia, fueron extraídas las muestras de órganos los que fueron analizados macroscópicamente y luego depositadas en frascos con formalina hasta su procesamiento histológico.

3.4 ASPECTOS METODOLOGICOS ASOCIADOS AL OBJETIVO 4

3.4.1. Métodos para la evaluación de la respuesta inmune en el suero.

3.4.1.a Test de ELISA (Enzimoimmunoanálisis) utilizado para evaluar la producción de anticuerpos de clase IgM, IgY e IgA en el suero y anticuerpos IgY en los extractos de yema de huevos.

Preparación del antígeno proteico por Sonicación para sensibilizar las placas

Se utilizaron 8,5 ml de una suspensión con 500 mg de bacterias (*Salmonella Enteritidis*) en buffer de lisis (Tritón x-100 0,1%. Glicerol 10% y Tris HCl 50 mM, pH 8), Se adicionó 1,5 ml de un cocktail inhibidor de proteasas (Complete-Mini Cocktail I, Calbiochem) Completando un volumen final de 10 ml.

La muestra se mantuvo a 4°C por 10 minutos después de preparado, para trabajar en frío.

Luego se preparó un recipiente con hielo para mantener la muestra sumergida, durante todo el proceso de sonicación. Se trabajó con un sonicador (UP 100H. HIELSCHER), a 0,5 ciclos y 60% de amplitud. El tiempo de Sonicación fue de 30 minutos en total, el proceso fue dividido en tres fases de trabajo de 10 minutos cada uno y con detenciones de 3 minutos entre las fases.

Finalizado el proceso del sonicado, se procedió a centrifugar la muestra para separar

las proteínas obtenidas de los detritos celulares que se generaron durante el proceso de sonicación. Se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se separó el sobrenadante y se almacenó a -20°C. Finalmente se determinó la concentración de proteínas por método BCA (anexo 4) y se realizó una electroforesis SDS-PAGE al

10% para confirmar el proceso de sonicado. La concentración de proteínas conseguida fue 1,2 mg/mL.

Preparación de las placas de ELISA

Se ajustó la concentración del antígeno proteico de *Salmonella Enteritidis* a 10 µg/ml con buffer carbonato 50 mM pH 9,6. Se agregaron 200 uL de esta solución a cada pocillo de la placa de ELISA, y se incubó toda la noche a 4°C dejando las placas bien tapadas.

Al día siguiente se lavó la placa 3 veces con solución de lavado [PBS 1X + Tween 20 (0,05%)], incubando 5 minutos entre lavado y lavado.

Se agregó a cada pocillo 250 uL de solución de bloqueo (BSA 1% + suero de conejo al 1%), se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Procedimiento de Elisa Indirecto para detectar anticuerpos anti Salmonellas.

Se utilizó un procedimiento previamente descrito para este antígeno (Nandre *et al* 2011) cuyos detalles están incluidos en la referencia. Todas las muestras se realizan por duplicado.

En resumen consiste en lo siguiente:

- Agregar a cada pocillo de la placa 100 uL de una dilución de las muestras de suero de pollitas de cada grupo experimental utilizando diluciones seriadas de acuerdo al isotipo de Anticuerpo y al día post inmunización.

- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Para la determinación en heces, las muestras se utilizaron sin diluir después de centrifugar las muestras a 2500 rpm por 10 minutos. Se ocupa el sobrenadante.
- Lavar por triplicado agregando 250 μ l de buffer de lavado a cada pocillo.
- Agregar 100 μ l del conjugado (antiIgY-M o A) diluido previamente según indicaciones del proveedor e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
Lavar 3 veces durante 5 minutos con buffer de lavado.
- Agregar 100 μ L de sustrato tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno preparado en partes iguales de la solución A y solución B (KPL lab.) o según indicaciones del fabricante. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos
- Detener la reacción con 100 μ l de solución Stop (ácido O-fosfórico, Merck, 3N)
- Leer las absorbancias en lector de MicroElisa a 405 nm (microplate reader DNM-9602)

3.4.1.b Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes

Cuando fue necesario demostrar el efecto de la sonicación para la preparación de antígeno o para preparar un western blot, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% bajo condiciones reductoras, según metodología descrita por Laemmli (Laemmli, 1970)

En resumen, se mezclaron 10 μ g de proteínas en un volumen de 10 μ l con 5 μ l de buffer de carga para proteínas denaturantes 3X (Winkler) y se agregó 1 μ l de 2-mercaptoetanol (Sigma), las muestras fueron hervidas durante 5 minutos, enfriadas y cargadas en los pocillos del gel.

Las masas moleculares de los polipéptidos se estimaron respecto del estándar proteico. La corrida electroforética se realizó en buffer Tris 0.02M, Glicina 0,05M y SDS 0,1%. La separación de las proteínas se realizó a 100 volts durante 2 horas.

Luego de la electroforesis los geles se tiñeron con azul de Comassie G-250 (azul de Comassie 0,5%, metanol 50% y ácido acético 10%) durante 1hr, y se destiñeron con solución de etanol y ácido acético 10% hasta observar claramente las bandas. El resultado de la electroforesis muestra que se obtuvieron fracciones de proteínas entre 15 y 42 kDa

3.4.1.c Western Blot para evaluar diversidad y especificidad de los anticuerpos

Para evaluar la diversidad y especificidad de los anticuerpos detectados se realizaron reacciones de western blot tanto a las muestras de suero como a los extractos de yema de huevo. Esta técnica se realizó según lo descrito previamente en la literatura (Towbin H, 1979) que en resumen consiste en lo siguiente:

- Realizar una electroforesis SDS-PAGE al 10% de las proteínas a transferir
- Cortar y Activar la membrana de Nitrocelulosa (NC)
- Transferir las proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa
- Bloquear la membrana de NC
- Cortar tiras de 0,4 mm
- Incubar con el suero problema 12 horas (toda la noche)
- Lavar 5 veces con solución de lavado. Incubar 30 minutos con conjugado anti IgA/IgM/IgY según corresponda (Goat Ab to Chicken IgY/ IgM/ IgA (Abcam)
- Agregar sustrato, incubar hasta que las manchas sean visibles.
- Detener la reacción con agua destilada

3.4.1.d Inmuno-dot para detección cualitativa de anticuerpos específicos anti *Salmonella* enteritidis en yemas de huevos

Se cortaron y activaron las membranas de nitrocelulosa con metanol por 30 minutos y se dejó secar a 37°C. Se procedió a marcar cuadros de 0,8 x 0,8 mm en la membrana de nitrocelulosa y se marcaron respectivamente según la muestra analizada.

Se añadieron 3 µL de antígeno proteico de *Salmonella* enteritidis en cada cuadro y se dejó secar a temperatura ambiente. Se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en TBS 1X y Tween 20 al 0,05 % por una hora a 37°C.

Luego, se diluyeron las IgY de yema de huevo con solución de bloqueo y se incubó el antígeno con las diferentes diluciones de los sueros durante 24 horas a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con TBS -Tween 20 0,05% por 5 minutos, se incubó con el conjugado diluido 1:5000 por una hora a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 3 lavados, como los descritos anteriormente y finalmente se dejó reaccionar con el sustrato TMB, Finalmente se detiene la reacción con agua destilada.

3.5 ASPECTOS METODOLOGICOS ASOCIADOS AL OBJETIVO 5

3.5.1. Validar la inmunización a través de pruebas en terreno

Este objetivo tenía entre metas inmunizar aves con protocolos seleccionados con el objeto de evaluar si el proceso de inmunización en terreno era capaz de protegerlas de la infección intencional (Pruebas de desafío)

Los protocolos seleccionados fueron aquellos procedimientos en los cuales las preparaciones antigénicas preliminares demostraron mayor efecto en la producción de anticuerpos (NT, PP y SE)

Problemas enfrentados:

El proyecto consideraba realizar este procedimiento en la avícola Huichahue, pero por razones de bioseguridad y para evitar todo riesgo de producir la infección casual de las aves productoras de la avícola (manipulación e infección de pollitas con salmonellas viables) debió ser desarrollado en un lugar diferente especialmente acondicionado para este fin.

Modificaciones introducidas:

Las pollitas fueron alojadas en un galpón acondicionado e implementado en la Universidad Santo Tomás y contó equipamiento adecuado de jaulas, agua, luz y temperatura termostática para la crianza de las aves, la temperatura, ventilación y humedad fueron controladas y adecuadas para las edades correspondientes. Alimentación *ad libitum*.

Se tuvieron en cuenta las normas de bienestar animal propuestos por el comité asesor de bioética FONDECYT – CONICYT; Aspectos bioéticos de la experimentación animal, Ley 20.380 sobre protección de animales, densidad en jaula, alimentación y manejo de dichas aves

Descripción de las actividades: para el objetivo 5.

3.5.1. Organización de Grupos e Inmunizaciones

70 pollitas fueron distribuidas al azar en 7 grupos de 10 aves cada uno, quedando divididos de la siguiente manera:

Grupos 1 Grupo Control negativo: recibió concentrado inicial sin antígeno. **(C)**

Grupo 2: fueron inmunizadas con Salmonella Enteritidis inactivada y adyuvante de extracto vegetal de *Glycine max* microencapsulado. **(NT-M)**

Grupo 3: fueron inmunizadas con Salmonella Enteritidis inactivada y adyuvante de extracto vegetal de *Phaseolus vulgaris* microencapsulado **(PP-M)**

Grupo 4: fueron inmunizadas con Salmonella Enteritidis microencapsulado **(SE-M)**

Grupo 5 o NT-L: fueron inmunizadas con derivado proteico de Salmonella Enteritidis y adyuvante de extracto vegetal de *Glycine max* liofilizado **(NT-L)**

Grupo 6 o PP-L: fueron inmunizadas con derivado proteico de Salmonella Enteritidis y adyuvante de extracto vegetal de *Phaseolus vulgaris* liofilizado **(PP-L)**

Grupo 7 fueron inmunizadas con derivado proteico de Salmonella Enteritidis no liofilizado. **(SE-M)**

Se administraron por vía oral los complejos antígeno –adyuvante de acuerdo a los protocolos ya descritos anteriormente para la inmunización por vía oral y se esperó que las pollitas de menos de 1 mes cumplieran 6 meses e iniciaran la etapa de postura de huevos. A los 6 meses fueron reinmunizadas y se preparó el desafío experimental.

3.5.2 Desafío

El día catorce posterior al desafío fue realizada la necropsia de las aves al grupo control negativo y al grupo desafiado (NT-M). Para el sacrificio de las mismas se utilizó una sobredosis de pentobarbital sódico 100 mg/Kg de peso, inyectado por vía intra cardíaca conforme a las indicaciones de la Canadian Council para animales de experimentación.

Durante este procedimiento de necropsia fueron extraídas las muestras de órganos, las cuales fueron cultivadas directamente en placas con medios de cultivo para salmonela (XLD y SS, por 24 horas a 37 °C.

El desafío se realizó 10 días posteriores a la segunda inmunización. Las gallinas fueron desafiadas oralmente con 5×10^8 UFC de Salmonella Enteritidis, diluidas en 1 ml de NaCl 0,9%, contenidas en una jeringa e ingresadas directamente al esófago..

El día 14 posterior al desafío fue realizada la necropsia de las aves pertenecientes al grupo control negativo y grupos desafiados. Durante este procedimiento fueron extraídas muestras de sangre, heces y órganos. Las muestras de sangre y heces fueron trasladadas al laboratorio de inmediato para su análisis. las muestras de órganos fueron depositadas en formalina hasta su procesamiento.

Métodos Histológicos para evaluar la infección después del Desafío

Se tomaron muestras de órganos para el examen histopatológico, simultáneamente a la toma de muestras para aislamiento bacteriológico,



Necropsia para toma de
muestras bacteriológicas
e histopatológicas

Las muestras de intestino delgado y grueso, hígado, bazo, oviducto, se fijaron en formalina 10%, amortiguada, pH 7.2 para su procesamiento según técnicas convencionales. Las muestras se cortaron con micrótopo a un espesor de 2 a 4 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E).

Para cuantificar las lesiones se dieron grados; se consideró un grado de lesión leve cuando los cambios patológicos en los órganos hasta 25%, moderado del 25% a 50%, y grado severo de lesión, del 50% a 100%

3.5.3 Extracción y purificación de anticuerpos IgY desde la yema de los huevos.

Extracción de anticuerpos IgY anti-*Salmonella* Enteritidis a partir de la yema de huevos de gallinas inmunizadas. Evaluación de la presencia y pureza de los anticuerpos por electroforesis en gel de poliacrilamida. (SDS-PAGE)

Se procedió a extraer la IgY de los huevos recolectados de los 3 grupos inmunizados, utilizando el kit comercial Pierce® Chicken IgY Purification. A los huevos obtenidos en la recolección se les separó la yema de la clara, lavándolos con agua destilada y posteriormente se realizaron pooles según el grupo al cual pertenecía.

En resumen, de cada pool realizado se tomaron 10 ml, sometiendo cada uno de ellos a las fases de deslipidación y precipitación. El precipitado obtenido se resuspendió en PBS, llevándolo a volumen inicial de yema de huevo. Finalmente se cuantificaron las concentraciones de cada extracción mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 280 nm en cubeta de cuarzo.

Se realizó un análisis posterior de la pureza de la IgY mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones denaturantes (SDS-PAGE).

Se obtuvieron diferentes concentraciones de anticuerpos IgY desde los huevos de gallinas inmunizadas (8,2 mg/ml de yema promedio). La electroforesis (Fig. 3.5.3) permitió evaluar el nivel de pureza del método de extracción de IgY pudiéndose observar las bandas de la cadena pesada 67,5 kDa y la cadena liviana de 22 kDa en ambos casos. Se observan varias bandas tenues de proteínas contaminantes entre los 35 y los 48 kDa.

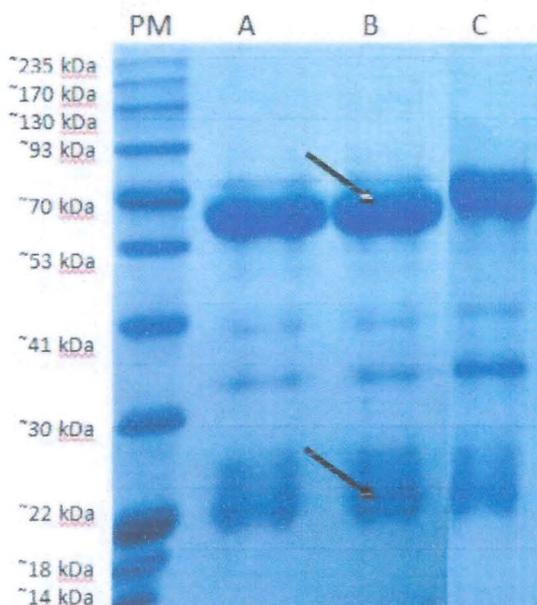


Fig. 3.5.3: Resultados de SDS-PAGE 12% de la extracción de IgY de yema de huevo. Costado izquierdo Pm = Peso molecular, A, B y C = Anticuerpos IgY obtenidos de huevos. Las flechas muestran las cadenas pesadas (70 Kd) y las cadenas livianas (22 kDa) de los anticuerpos extraídos

4. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias.

4.1 Objetivo específico 1. Aislar y caracterizar bacteriológicamente y molecularmente las cepas de *Salmonella* nativas de la zona de Cunco.

El resultado esperado (1.1) para este punto era el aislamiento y caracterización de a lo menos 2 cepas bacterianas nativas.

En este estudio se obtuvo el aislamiento e identificación de 1 cepa bacteriana de *Salmonella* Enteritidis, proveniente de una muestra de hisopado cloacal de un predio de la comuna de Vilcún.

Se analizaron 2413 muestras obtenidas de las avícolas antes mencionadas, cuyo detalle fue de 901 muestras de huevos, 741 muestras de heces y 771 de hisopados cloacales, correspondientes a un 37% de huevos, 32% cloacas y 31% heces,

Comentarios y razones de discrepancias.

En el proyecto se había considerado obtener a los menos 2 cepas bacterianas de *Salmonellas*. La baja frecuencia de *Salmonella* Enteritidis en las muestras analizadas, se puede deber a varios factores, siendo una de estas la variación en los cambios climáticos ocurrido en los últimos años en la Región de La Araucanía, que ha provocado una disminución de -0.9°C de temperatura. La envergadura de las avícolas o predios testeados, cuya producción los categoriza en pequeños productores, ha condicionado un mejor manejo de las aves y sus residuos. Además desde el año 2008 el SAG (ISO 6579:2002) realiza un control periódico, pesquisando la presencia de *Salmonella*, generando en los pequeños productores mejoras en el manejo y

mantención de las aves. Sumado a lo anterior, es importante mencionar que las muestras de huevos analizadas correspondían a huevos frescos, lo que condiciona una limitada multiplicación de bacterias al interior de este, debido principalmente a los mecanismos protectores propios del huevo, que restringen la multiplicación bacteriana, cuya efectividad disminuye a través de los días cuando no son almacenados a temperatura de refrigeración.

Por último uno de los factores a considerar es la metodología utilizada para la búsqueda de este patógeno, el cuál involucra un aislamiento e identificación con métodos microbiológicos tradicionales. En el año 1998 Alexandre y col., realizaron un estudio en la región metropolitana, en la cual se testearon 1081 muestras de huevos en venta, *Salmonella* Enteritidis fue detectada en una de las muestras, en la fracción correspondiente a la yema del huevo, determinando una frecuencia de contaminación de 0,09%. El aislamiento fue pesquisado bajo la técnica de Inmunodetección pero no por la técnica de cultivo tradicional.

Por último cabe mencionar las dificultades propias del aislamiento microbiológico por métodos tradicionales, los cuáles han demostrado menor efectividad que métodos de inmunodetección.

Además de la caracterización bioquímica y molecular por PCR múltiple (realizada) para identificar el género y serotipos de salmonella aisladas, se había planteado realizar el estudio de clonalidad (caracterización molecular por Electroforesis en Campo Pulsado) con la finalidad de evidenciar relaciones entre las cepas aisladas (clones circulantes), esto no se realizó debido a que sólo se aisló una cepa la que actualmente se guarda en el cepario de nuestro laboratorio..

4.2 Objetivo específico 2. Preparar el antígeno para inmunizar las aves (laboratorio). El resultado esperado para este punto (2.1) era la preparación del antígeno al menos en 2 formulaciones específicos para Salmonellas.

Este objetivo se cumplió en su totalidad. La formulación antigénica implica el uso de diferentes preparaciones de coadyuvantes, respecto a lo cual se prepararon y evaluaron más de 10 fórmulas de las cuales 7 se encuentran descritas en el punto 3 de este informe y luego 3 de ellas en el punto 5 referente a resultados del proyecto.

Lo anterior implicó realizar cultivos bacterianos, inactivarlos, buscar en la literatura, preparar y evaluar potenciales coadyuvantes que funcionen a nivel de mucosa digestiva

No hay discrepancias con la metodología propuesta en el proyecto.

4.3 Objetivo específico 3. Realizar la inmunización de las aves vía oral en Laboratorio. El resultado esperado para este punto (3.1) era la obtención de sueros inmunes para lo cual se formaron numerosos grupos de trabajo para evaluar múltiples potenciales procedimientos de inmunización. Se hizo seguimiento de estos grupos midiendo anticuerpos en sangre y huevos. Se evaluó la pureza por western blot.

Para esto se formaron diferentes grupos experimentales de entre 10 a 15 pollitas por grupo experimental. Estos grupos fueron inmunizados con las preparaciones antigénicas desarrolladas y mencionadas en el punto 3 de este informe.

Antes de inmunizar a las aves, se les extrajo una muestra de sangre para conocer el

nivel basal de anticuerpos. Posteriormente fueron inmunizadas administrando el antígeno por vía oral junto con el alimento tal como se había propuesto (y que constituye el principal desafío de este proyecto).

Posteriormente se hizo un seguimiento de las pollitas inmunizadas con tomas de muestras periódicas para analizar el nivel de anticuerpos. También fue necesario esperar el cumplimiento de los 6 meses edad en la cual se inicia la postura de huevos, los que también fueron evaluados para asegurar la presencia de anticuerpos específicos en la yema

Para evaluar la presencia de estos anticuerpos y para caracterizarlos fue necesario diseñar e implementar un test de ELISA entre otras pruebas como inmunodot y western blot todas las cuales se encuentran descritas con más detalles en el punto 3 que se refiere a los aspectos metodológicos del proyecto.



Entre los resultados esperados en este punto pudimos demostrar que –con distinta intensidad- sobre el 90 % de las aves y el 100 % de los huevos presentaron anticuerpos circulantes contra salmonella. Debe quedar claro sí, que la presencia de Anticuerpos por sí solos no es necesariamente garantía de protección total contra salmonella.

Los mejores resultados se observan con 3 preparaciones. NT, PP y SE las cuales fueron seleccionadas para las pruebas de validación en terreno.

Se considera que en este punto no hay discrepancias con lo propuesto en el proyecto.

4.4 Objetivo específico 4. Inmunización de Aves y Huevos – Evaluación en Laboratorio.

El resultado esperado para este punto (4.1) era la Caracterización de los anticuerpos y Evaluación de pureza de los Anticuerpos Específicos obtenidos.

Desafío experimental.

Se caracterizaron los anticuerpos detectando y midiendo los diferentes tipos de anticuerpos producidos en la sangre de las pollitas (anticuerpos de clase IgM, IgY e IgA) con el objeto de conocer el tipo de respuesta inmune predominante en cada caso.

Lo mismo se hizo con los anticuerpos extraídos de los huevos.

Se realizaron experimentos pilotos de desafío experimental infectando pollitas con el objeto de establecer las dosis óptimas (número de UFC infectantes) y condiciones para el desafío de la última etapa.

Se considera que en este punto no hay discrepancias con lo propuesto en el proyecto

4.5 Objetivo específico 5. Validar la inmunización a través de la pruebas en terreno en la avícola Huichahue.

El resultado esperado para este punto (5.1) era la validación de la inmunización

El objetivo de validación de la inmunización era obtener huevos inmunizados. Se realizaron pruebas de desafío infectando intencionalmente pollitas de 6 meses inmunizadas en base a 3 de los mejores coadyuvantes sometidos a evaluación



anteriormente. Se analizaron los huevos de estas pollitas y en seguida se sacrificaron para evaluación histológica de sus tejidos.

Discrepancias

La principal discrepancia como se menciona en el punto 3.5.1 de este informe es que dado el riesgo de realizar este tipo de pruebas en la avícola fue necesario adaptar un galpón especial en la universidad donde fue posible una vigilancia más rigurosa del cumplimiento de las condiciones de bioseguridad.

Debido a lo extenso del período de estos experimentos (se debe esperar 6 meses para el crecimiento de las pollitas, hasta que alcanzan el período de postura de huevos) no fue posible reproducirlo durante el proyecto.

Mantener a las pollitas infectadas durante 14 días antes de sacrificarlas (necropsia) podría ser un período insuficiente, a pesar que el estudio bacteriológico no detectó bacterias en estas aves durante el período estudiado.

El proyecto consideraba realizar este procedimiento en la avícola Huichahue, pero por razones de bioseguridad y para evitar todo riesgo de producir la infección casual de las aves productoras de la avícola (manipulación e infección de pollitas con salmonellas viables) debió ser desarrollado en un lugar diferente especialmente acondicionado para este fin

Seminario de Difusión de resultados:

Otra actividad propuesta aquí es la realización de un seminario de difusión. Este se realizó el 20 de Agosto de 2015 con un auditorio pleno. Con asistentes interesados en el tema (avicultores, veterinarios, empresas como Veterquímica, etc.) Se adjunta programa en el punto 8 de este informe.

5. Resultados del proyecto: descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.

5.1 Introducción

Desde mucho tiempo se sabe que la inmunización por vía oral con antígenos inactivados* conduce al desarrollo de tolerancia inmunológica (estado permanente de no respuesta) en la mayoría de los modelos experimentales conocidos (Challacombe S.J., 1980.; Weiner 2000). Por otro lado hay consenso en que la inmunización por vía oral presenta numerosas ventajas y ha sido propuesta como una vía ideal no solo para animales sino también en humanos (Mestecky, *et al* 2008).

La inducción de tolerancia o de respuesta inmune depende de señales intracelulares desencadenadas por el antígeno sobre las células que participan en la respuesta inmune. Aun cuando el sistema digestivo está particularmente programado para generar tolerancia y así evitar falsas respuestas inmunes a los alimentos también tiene la capacidad de reconocer elementos extraños que pueden ser potencialmente nocivos o patológicos.

* **Inactivados** significa con microorganismos **no** vivos. Actualmente existen en el mercado numerosos sistemas de inmunización por vía oral pero que utilizan virus o bacterias vivas atenuadas, lo cual representa numerosos riesgos, inconvenientes de conservación, costos de almacenamiento por cadenas frías y otros aspectos que no se discuten en este informe.

Si bien se han descrito señales que desencadenan respuestas inflamatorias e inmunológicas en la mucosa intestinal, las señales naturales que podrían contribuir a la homeostasis o a la respuesta frente a patógenos en este lugar no han sido caracterizadas completamente. (Porporatto *et al*, 2007). Pese a ello ha surgido la idea de producir vacunas mucosales administradas por vía oral que puedan forzar el estímulo de señales que gatillen respuestas inmunes.

Las inmunoglobulinas secretadas por las células plasmáticas en respuesta a la exposición frente a diversos antígenos, son un producto efector principal utilizados para evaluar la respuesta inmune humoral y mucosal. (Silveira *et al*, 2014)

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Respuesta de anticuerpos de isotipo IgM en pollitas inmunizadas con *Salmonella* y diferentes adyuvantes (NT-M, PP-M, SE-M, NT-L, PP-L, SE-L)

Se analizó la presencia de anticuerpos IgM anti *Salmonella* Enteritidis mediante test de ELISA en el suero de las pollitas inmunizadas por vía oral con el antígeno inactivado acompañado de los coadyuvantes previamente mejor evaluados). Los niveles de anticuerpos se expresan en unidades de absorbancia (A) y se muestran en la fig.5.1

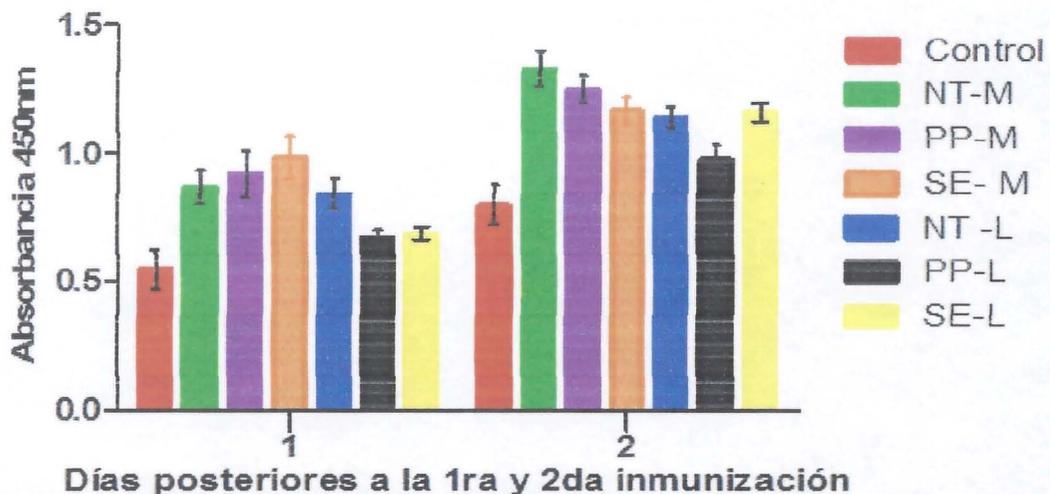


Fig.5.1. Respuesta de anticuerpos IgM de pollitas (n=10 por grupo) inmunizadas por vía oral con *Salmonella* Enteritidis más diversos coadyuvantes a los 26 días de edad y reinmunizadas 6 meses después. La gráfica muestra los niveles de anticuerpos IgM de muestras de suero tomadas a los 15 días posteriores a cada inmunización.

La barra color rojo corresponde a un grupo control no inmunizado y es el punto de comparación para las respuestas de los grupos experimentales.

Los niveles de anticuerpos de los grupos experimentales NT-M, PP-M, SE-M presentan diferencias con relación al grupo control negativo respectivo después de la segunda inmunización ($p < 0.001$). PP-M también es diferente ($p < 0.05$)

Solo el grupo PP-L no es diferente ($p > 0.05$)

Dilución del suero problema 1:100

La producción de IgM es siempre la primera clase de anticuerpo producido en una respuesta inmune. Corresponde a una respuesta principalmente de tipo primaria y que normalmente no deja memoria. Los anticuerpos de clase IgM representan también una parte importante de los anticuerpos naturales. Tienen gran importancia ya que se estima que la presencia de anticuerpos naturales de tipo IgM puede conferir protección y resistencia natural a los patógenos (Kimbrell DA, 2001; Baumgarth N. 2005)

Por otra parte los anticuerpos IgM son inducidos por antígenos polisacáridos como los presentes en bacterias Gram negativas como las salmonellas.

La presencia persistente de anticuerpos naturales contra esta bacteria en la sangre de las pollitas controles negativos es un hallazgo interesante y fue una constante en todos los experimentos realizados, a veces con mayor o menor título pero siempre presentes. La presencia de estos anticuerpos podría representar una ventaja para este modelo de inmunización. Desde este punto de vista nuestros resultados concuerdan con publicaciones recientes que se refieren a esta clase de anticuerpos (Saswati P. 2015; Coutinho 1995) y también resaltan su importancia por lo que Independientemente de este proyecto hemos iniciado algunos estudios para obtener más información sobre su rol biológico.

La única pero importante interpretación que podemos dar a estas barras son la constatación o evidencia que se ha producido respuesta inmune inmunizando por vía oral con antígenos inactivados.

No profundizaremos la discusión sobre esta clase de anticuerpos (IgM) ya que su importancia es menor en términos de la memoria inmunológica que la IgG y tiene un rol secundario a nivel de mucosa comparada con la IgA. Finalmente, IgM no se encuentra en la yema de los huevos.

5.2.2 Respuesta de anticuerpos de isotipo IgY en pollitas inmunizadas con *Salmonella* y diferentes adyuvantes (NT-M, PP-M, SE-M, NT-L, PP-L, SE-L)

Se analizó la presencia de anticuerpos IgY anti *Salmonella* Enteritidis mediante test de ELISA en el suero de las pollitas inmunizadas por vía oral con el antígeno inactivado acompañado de los coadyuvantes previamente mejor evaluados). Los niveles de anticuerpos se expresan en unidades de absorbancia (A) y se muestran en la fig.5.2

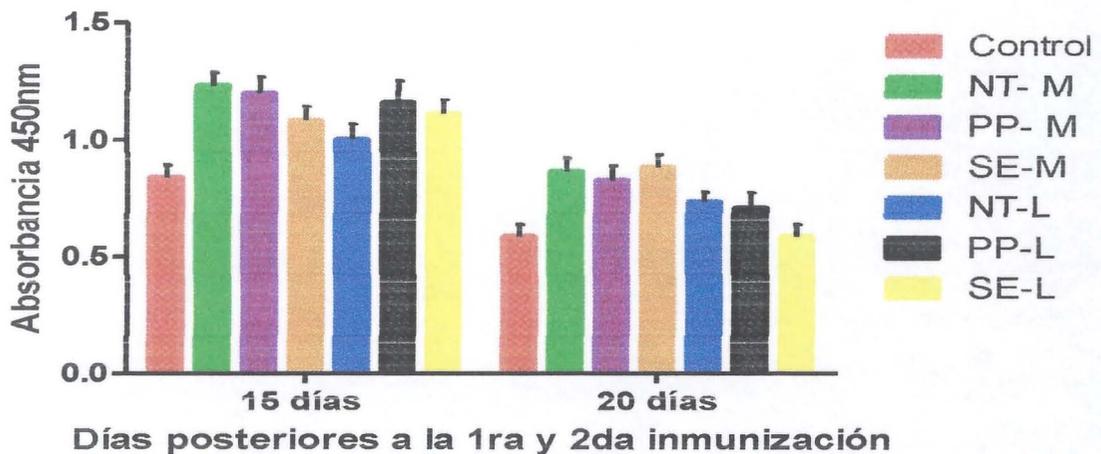


Fig.5.2. Respuesta de anticuerpos IgY de pollitas (n=10 por grupo) inmunizadas por vía oral con *Salmonella* Enteritidis más diversos coadyuvantes a los 26 días de edad y reinmunizadas 6 meses después. La gráfica muestra los niveles de anticuerpos IgY de muestras de suero tomadas a los 15 días posteriores a cada inmunización.

La barra color rojo corresponde a un grupo control no inmunizado y es el punto de comparación para las respuestas de los grupos experimentales.

Después de la segunda inmunización los niveles de anticuerpos de los grupos experimentales NT-M, SE-M presentan diferencias significativas con relación al grupo control negativo respectivo ($p < 0.01$) lo mismo que el grupo PP-M ($p < 0.05$). Por otra parte en el caso de NT-L, PP-L y SE-L las respuestas no difieren del control ($p > 0.05$)

Dilución del suero problema 1:100

Los anticuerpos de clase IgY (IgG en los mamíferos) son los más abundantes y sistémicos circulando principalmente en los líquidos biológicos y en el caso del pollo tienen la propiedad de ingresar también al huevo y concentrarse en la yema (de allí el nombre IgY, de “York”) cumpliendo la función de proteger a las crías en el momento de nacer y durante los primeros días de vida. Desde ese punto de vista la presencia de anticuerpos específicos en el huevo será de importancia también en la protección de éste contra la bacteria salmonella, objeto de este proyecto.

La fig.5.2 nos indica que después de la segunda inmunización dos de los preparados antigénicos (NT-M y SE-M) provocan la mayor producción de anticuerpos en concentraciones significativamente más elevadas que en el control ($p < 0.01$). en los grupos NT-L, PP-L y SE-L no se observa diferencias en la concentración con relación a los controles.

No obstante lo anterior, no solo es importante tener en cuenta la cantidad de anticuerpos, sino también la calidad y especificidad de ellos. Nos referimos al hecho que aunque los grupos inmunizados con NT-L, PP-L y SE-L no presentan diferencias con el control tienen anticuerpos en niveles semejantes al control, ello no significa que las especificidades sean exactamente las mismas. De hecho, una reacción de western blot realizada para este grupo (ver fig. 5.6) nos sugiere que aunque los anticuerpos de algunos grupos experimentales puedan estar en concentraciones semejantes a la de los controles, están dirigidos contra diferentes epítopes (diferentes segmentos de las proteínas bacterianas) aunque no podemos afirmar si necesariamente ello les confiere mayor efectividad protectora. No es este un aspecto que vamos a discutir en este informe porque no tenemos más evidencias y porque es un aspecto que continuaremos investigando. Lo destacable para fines prácticos por ahora es la selección de las formulaciones NT-M y SE-M como las mejores

productoras de IgY. Estos grupos también presentaron elevados títulos de IgY específica en los huevos.

Hay otro aspecto a discutir **que es de la mayor relevancia**. Los anticuerpos IgY circulando en la sangre de estas pollitas, **son producto de un proceso de inmunización hecha por vía oral con antígenos inactivados**. Esto se debe tener presente primero como un elemento discrepante con la literatura donde se ha establecido que esta vía de inmunización provoca principalmente tolerancia (Challacombe S.J., 1980 y Weiner H. 2000 entre muchos otros) y segundo porque la inducción de anticuerpos entregando un antígeno inactivado por vía oral es uno de los objetivos principales del proyecto. Una explicación a esta aparente contradicción con la literatura es el hecho que este trabajo se ha hecho en aves (*Gallus gallus domesticus*) y la información obtenida y publicada por otros autores mayoritariamente se ha realizado en mamíferos (ratones, ratas, conejos, etc.). Entre ambos (aves y mamíferos) hay una distancia evolutiva de más de 310 millones de años (Hedges, S. B. 2002; Reisz, R. 2004). En efecto, la literatura nos muestra que el sistema inmune de las aves tiene aspectos muy particulares (Befus, A.D. et al. 1989 y Jacob J. et al. 2011) que aunque no comprendemos completamente sin duda es diferente y funciona diferente. Por ejemplo las gallinas solo tienen 3 clases de anticuerpos, los mamíferos en general 5 clases, las aves tienen estructuras de órganos secundarios que nosotros no tenemos como la tonsila esofágica (O'La' H, I. 2003), las aves evolucionaron comiendo siempre directamente de la tierra los mamíferos no.

Esta lata comparación es para afirmar que si los mamíferos generamos tolerancia a la inmunización por vía oral, en las aves no tiene por qué ser igual. Al parecer no lo es. Si no tenemos una explicación fisiológica definitiva (lo que ahora constituye una de nuestras líneas de investigación) a lo menos tenemos la evidencia experimental.

Si se comparan las respuestas primarias después de la inmunización inicial con las respuestas secundarias de los mismos grupos llama la atención una aparente menor concentración de anticuerpos. Se sabe que las respuestas secundarias son siempre

de mayor nivel de concentración que las respuestas primarias –otra aparente contradicción con la literatura- y una vez más debemos recordar que a pesar de las muchas semejanzas con los mamíferos el comportamiento de las aves es diferente. En primer lugar los anticuerpos iniciales están medidos en pollitas de pocos días de vida y podrían estar influenciados todavía por anticuerpos de origen materno. Pero más relevante que ello, es el hecho que la segunda inmunización y toma de muestra se hizo cuando las pollitas ya estaban en época de postura. Estas aves ponen un huevo diario y en cada huevo invierten 80 a 100 mg de anticuerpos IgY. Es decir hay una eliminación permanente de anticuerpos y es razonable a pesar de la activa síntesis que esta no se refleje en una figura como la que se presenta en la Fig. 5.2.

Finalmente, No deja de ser relevante que aunque en este caso, la inmunización se hizo a nivel de mucosa digestiva (por vía oral) ello generó anticuerpos IgY que no solo circulan en la sangre (ver fig. 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4) sino que además se encuentran presentes en el huevo según pudimos verificar mediante Elisa todos los cuales (100 %) presentaron diferentes niveles de anticuerpos anti salmonellas.

Atendiendo una vez más a lo mencionado en el punto anterior, entonces es pertinente suponer que también debe haber anticuerpos circulantes de clase IgA en sangre y con mayor razón a nivel de la mucosa digestiva, por cuanto es ampliamente conocido que la IgA es la principal inmunoglobulina de las mucosas. En el próximo punto abordamos este tema.

5.2.3 Respuesta de anticuerpos de isotipo IgA en pollitas inmunizadas con *Salmonella* y diferentes adyuvantes (NT-M, PP-M, SE-M, NT-L, PP-L, SE-L)

Se analizó la presencia de anticuerpos IgA anti *Salmonella* Enteritidis mediante test de ELISA en el suero de las pollitas inmunizadas por vía oral con el antígeno inactivado acompañado de los coadyuvantes previamente mejor evaluados). Los niveles de anticuerpos se expresan en unidades de absorbancia (A) y se muestran en la fig.5.3

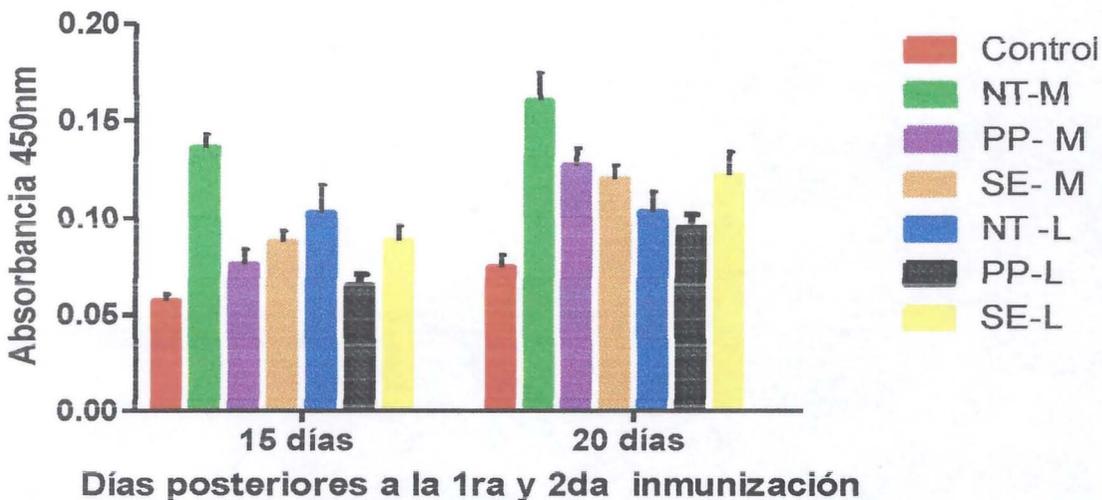


Fig.5.3. Respuesta de anticuerpos IgA de pollitas (n=10 por grupo) inmunizadas por vía oral con *Salmonella* Enteritidis más diversos coadyuvantes a los 26 días de edad y reinmunizadas 6 meses después. La gráfica muestra los niveles de anticuerpos IgA de muestras de suero tomadas a los 15 días posteriores a cada inmunización.

La barra color rojo corresponde a un grupo control no inmunizado y es el punto de comparación para las respuestas de los grupos experimentales.

Se observa que después de la segunda inmunización NT-M, PP-M y SE-L presentan mayores niveles de IgA que el grupo control negativo ($p < 0.001$). SE-M también es diferente ($p < 0.01$). Por otra parte, NT-L y PP-L son estadísticamente semejantes al control ($p > 0.05$)

Dilución del suero problema 1:10

Entre las inmunoglobulinas la IgA en sangre suele ser la que tiene menor concentración, entre diez a veinte veces menos que IgM e IgY según se reportó tempranamente en la literatura (Lebacqz AM. et als. 1974). Esta menor concentración está en concordancia con nuestros resultados, no obstante debe tenerse presente que por razones técnicas los sueros fueron diluidos 10 veces antes de analizarlos por Elisa.

Los resultados (Fig.5.3) nos muestran que la inmunización generada con NT-M, PP-M y SE-L generaron respuestas de anticuerpos IgA en suero en concentraciones mayores al control ($p < 0.001$), aunque la impresión es que entre ellas NT-M se comporta como la mejor fórmula coadyuvante.

Resulta lógico pensar a la luz del conocimiento actual de la respuesta inmune, que la menor concentración natural de IgA en suero se debe a que la mayor parte de la IgA producida se encuentra en las mucosas (respiratoria, digestiva, ocular, etc) que es el lugar donde IgA es la principal inmunoglobulina tanto cuantitativa como funcionalmente (Goldblum RM. 1990; Lamm ME. 1995)

Ello nos permite inferir que si el efecto de nuestra inmunización hecho a nivel mucosal (vía oral) se expresa en un nivel significativamente positivo a nivel sanguíneo, con mayor razón se puede esperar que lo sea a nivel de mucosas. Por razones técnicas no medimos la IgA a nivel de intestino en este experimento, pero en otros similares podemos mostrar mediciones de IgA en la deposiciones de las pollitas (ver Fig..5.4 y Fig.5.5) en los cuales los niveles de IgA encontrados superan en 300% a 400% los niveles de IgA conseguidos por los controles negativos y positivos. Como control positivo nos referimos a la IgA inducida mediante inmunización parenteral (inyección intramuscular). Lo anterior nos permite afirmar que la inmunización a nivel de mucosas induce una fuerte respuesta en este lugar. Esto es de la mayor relevancia, tanto más que conseguir anticuerpos en el huevo (que son de clase IgY) por cuanto la protección del huevo debiese ser mucho más eficaz si además los

anticuerpos IgA de mucosa estuviesen impidiendo el ingreso de patógenos como Salmonella.

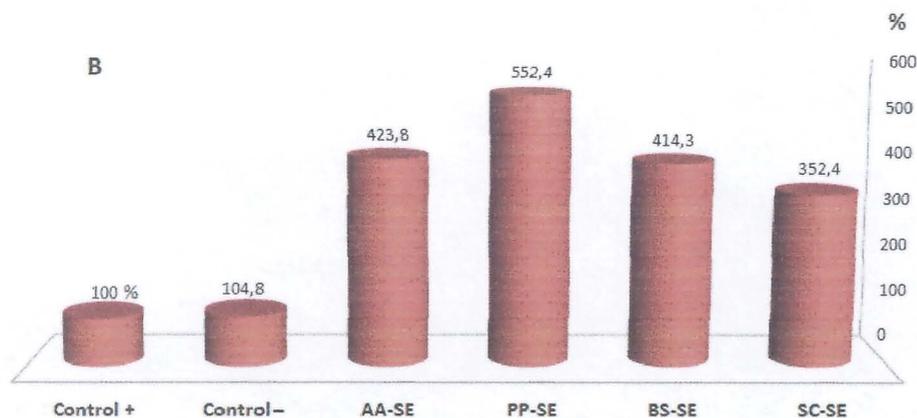
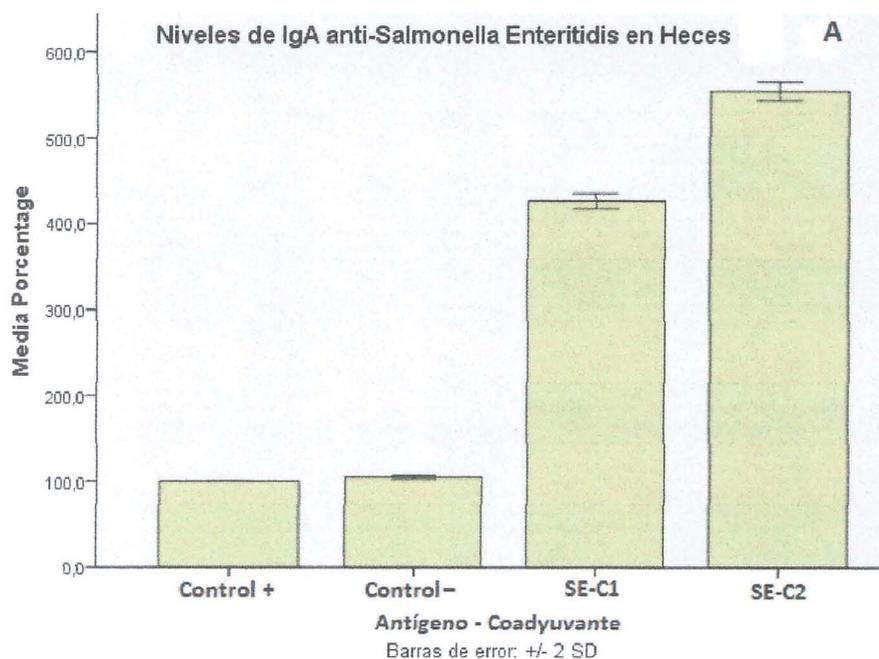


Fig. 5.5 (A y B) Porcentajes relativos de la concentración de IgA en heces de pollitas Inmunizadas por vía oral con Salmonella Enteritidis inactivada más diversos Potenciales coadyuvantes a los 28 días post inmunización.

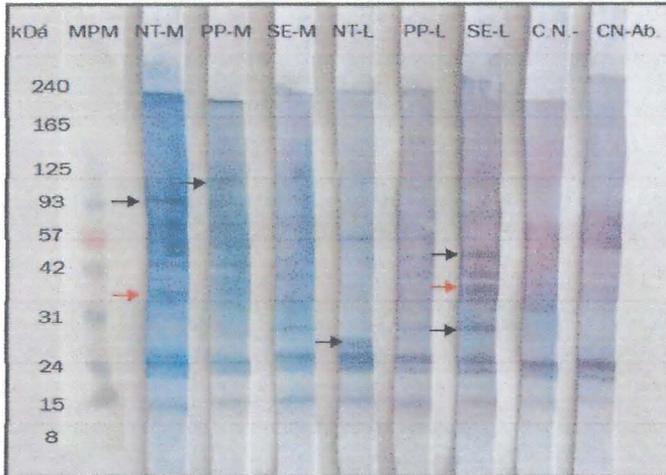


Fig. 5.6 Respuesta de anticuerpos IgY de pollitas ($n=10$) inmunizadas por vía oral con *Salmonella* Enteritidis más diversos coadyuvantes reinmunizadas a los 6 meses. La gráfica muestra los niveles de anticuerpos IgY de muestras de un pool de suero de cada grupo tomado a los 15 días post inmunización.

Se observan algunas bandas que son específicas (exclusivas) de las respuesta contra el antígeno (\rightarrow) y otras que se encuentran también en el control negativo pero también con mayor intensidad en los grupos experimentales (\rightarrow) los que corresponderían a anticuerpos naturales.

5.2.4 Desafío, diagnóstico de salmonella enteritidis en muestras clínicas (heces) y de órganos (hígado, bazo, intestino delgado, intestino grueso, oviducto y ovario) posterior al desafío de pollitas previamente inmunizadas con *Salmonella* Enteritidis y NT como coadyuvante.

El desafío de aves inmunizadas es la mejor manera de corroborar si la producción de anticuerpos es capaz de proteger a un animal, pero los resultados microbiológicos muchas veces son controversiales y se encuentran en la literatura trabajos con distintas dosis infectantes y distintas vías de inoculación de *Salmonella* Enteritidis vivas (Ordóñez *et al.*, 2008; Desin T. *et al.*, 2011; Mantulova *et al.*, 2013).

5.2.4.1 Evaluación de la producción de Anticuerpos en el grupo de desafío

Se desafió con Salmonellas a un grupo seleccionado previamente inmunizado con Salmonella más NT-M como coadyuvante, reforzado con una dosis previa al desafío. Los niveles de anticuerpos de este grupo se presentan en la fig.5.7

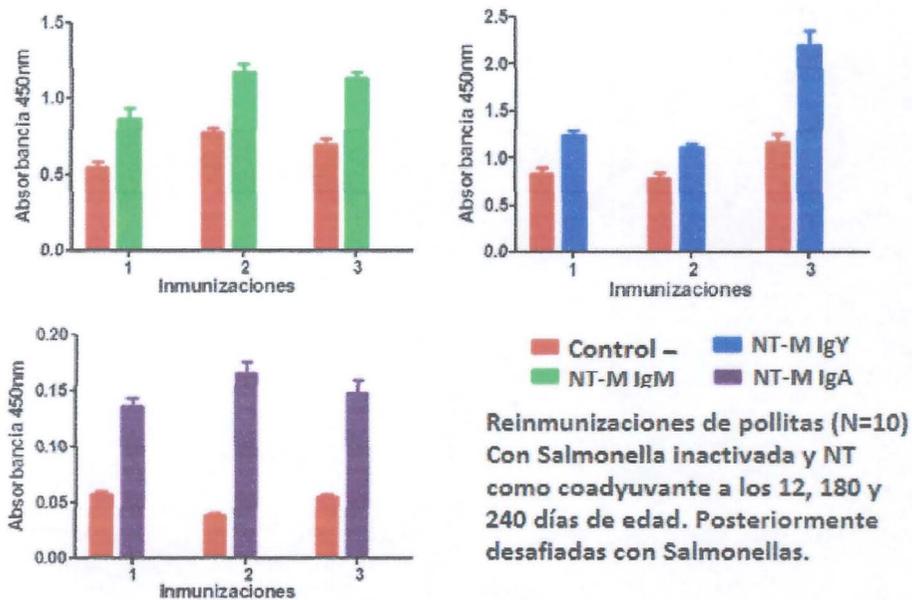


Fig.5.7. Respuesta de anticuerpos IgM, IgY e IgA de pollitas (n=10 por grupo) inmunizadas por vía oral con Salmonella Enteritidis inactivada más NT-M y reinmunizadas por vía oral en 3 períodos diferentes. La gráfica muestra los niveles de anticuerpos de muestras de suero tomadas a los 15 días posteriores a cada inmunización.

El día catorce posterior al desafío fue realizada la necropsia de las aves pertenecientes al grupo control negativo y al grupo desafiado (NT-M) de acuerdo a lo descrito en la sección 3.5.1b.

Durante este procedimiento de necropsia fueron extraídas muestras de órganos, las cuales fueron cultivadas en Caldo Selenito por 18 horas a 35°C y en agar Rambach®, agar XLD y agar SS, por 24 horas a 35°C.

5.2.4.2 Análisis y Hallazgos Macroscópicos

En los grupos controles se observaron principalmente deformaciones a nivel ovárico (Fig. 5.7) notándose una clara diferencia con las gallinas del grupo inmunizado con NT-M (Fig.5.8).



Fig.5.7. Ovarios, intestino delgado y grueso de gallinas del grupo Control.

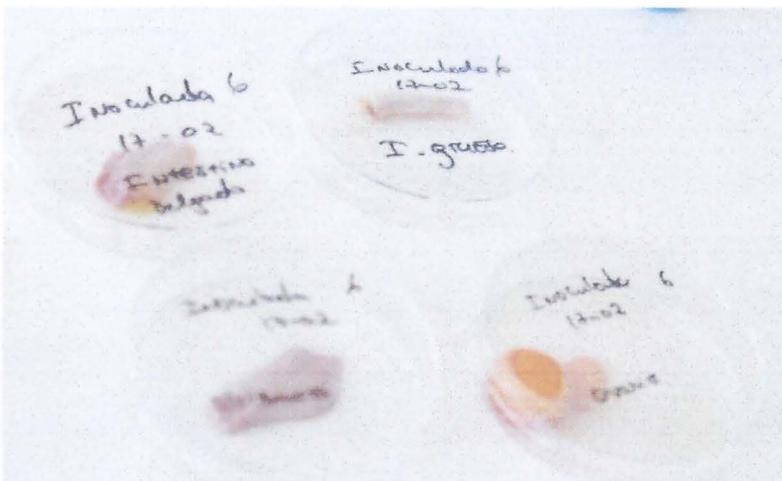


Fig. 5.8 Ovario intestino delgado y grueso de gallina inmunizada con NT-M

5.2.4.3 Hallazgos microscópicos

Dentro de los hallazgos de relevancia en el grupo control no protegido (sin inmunizar) se observan evidencias de infiltrado inflamatorios a nivel de intestino, páncreas, hígado y oviducto, siendo más intensos en este grupo, hallazgos que en su conjunto se pueden asociar a un proceso de naturaleza infecciosa en curso. A nivel de hígado (grupo control) los cuadros inflamatorios (imagen 1) son característicos a una infección por *Salmonella sp.* Imagen 5.9

A nivel de folículos ováricos (Fig. 5.11) siempre en el grupo control no protegido, se observa coagulación de proteínas de vitelo de ovocitos, cuyo hallazgo histológico sugiere un proceso infeccioso en curso.

A nivel de intestino se pueden identificar cuadros inflamatorios y posiblemente capas diftéricas en superficie de mucosa, siendo esta última asociada a infecciones intestinales por *Salmonella sp.*

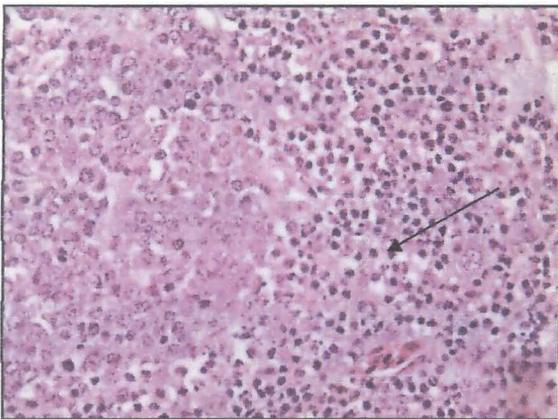


Fig. 5.9. Hígado (tinción H&E). Grupo Control. Se observa infiltrado inflamatorio moderado en parénquima hepático (flecha).

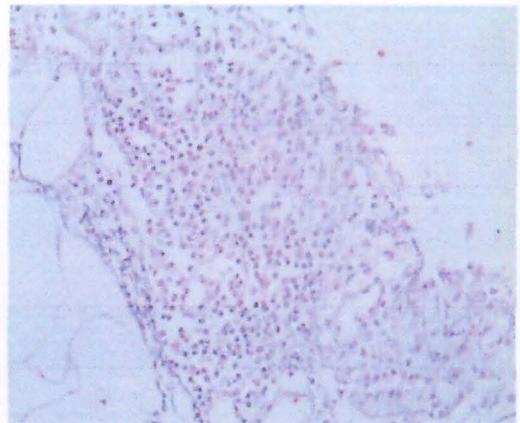


Fig. 5.10 .Oviducto. H&E. Grupo Control. Se observa un infiltrado inflamatorio en serosa de oviducto

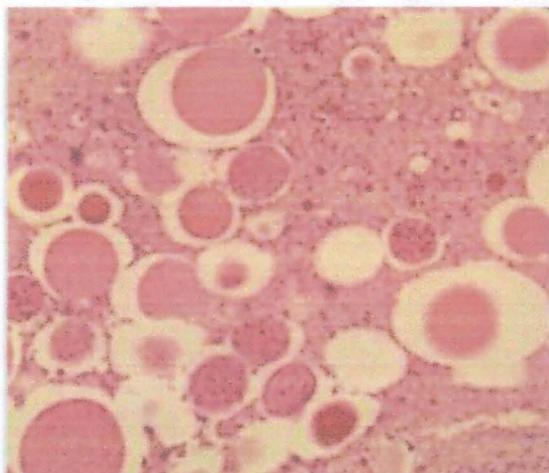


Fig. 5.11. (H&E) Grupo de gallinas no inmunizadas. Se observa coagulación de proteínas de vitelo en ovocito



Fig. 5.12 Toma de muestras para cultivo bacteriológico distintos órganos

ÓRGANOS	GALLINAS CONTROLES NO INMUNIZADAS	GALLINAS INMUNIZADAS CON NT-M
INTESTINO DELGADO		
INTESTINO GRUESO	Enteritis mononuclear leve multifocal	Enteritis mononuclear leve multifocal
OVIDUCTO	Enteritis mononuclear	Enteritis mononuclear leve
OVARIO / FOLÍCULOS	Ovocitos con coagulación de proteínas	Sin hallazgos significativos
HÍGADO	Hemorragia multifocal	Hepatitis focal leve
BAZO	Depleción linfoide en t	Depleción linfoide leve

Tabla 1. Comparación de hallazgos histopatológicos de gallinas no inmunizadas e inmunizadas con Salmonellas inactivadas y NT-M. Resultados post desafío (Histología: Laboratorio de histopatología de Veterquímica)

El presente ensayo de desafío se realizó inyectando directamente al esófago 5×10^8 UFC de salmonellas y se compararon los hallazgos bacteriológicos con los histopatológicos.

Por las lesiones histopatológicas macro y microscópicas encontradas en las aves no inmunizadas se puede establecer que dichas lesiones encontradas en las no protegidas son atribuibles a *Salmonella* Enteritidis.

Diversos autores han reportado que en la patogenia de la infección por *Salmonella* Enteritidis, luego de la inoculación por vía oral, *Salmonella* Enteritidis coloniza el intestino delgado, penetra a las células epiteliales y migra hacia la lámina propia de la región ileocecal donde se multiplica en los folículos de la región linfoide. Los polimorfonucleares (heterófilos) son estimulados y la infección se limita al tracto gastrointestinal (Sanchez y Carmona , 2003) .

Los serotipos productores de fiebre entérica, no son retenidas a este nivel, sino que migran al hígado y bazo por circulación hemática.²² Asimismo, las aves recién eclosionadas que carecen de microflora intestinal protectora son muy susceptibles a la colonización intestinal por *Salmonella* spp u otras bacterias patógenas. Las células blanco (células M, enterocitos y células caliciformes) para la invasión por bacterias patógenas revisten el último tramo del intestino delgado y el primer tramo del intestino grueso (íleon–ciego). Si la célula blanco no captura ni presenta salmonelas al sistema inmune, es posible que se produzca la infección (Salves y Whitt, 1994; Cox y Berrang, 1996 ; Hirsh y Chung , 1999)

Las enteritis observadas por nosotros en el intestino con infiltración de heterófilos también son compatibles por lo observado por Desmidt *et al.* (1997) al igual que la depleción linfoidea observada en el bazo. Microscópicamente muchos patógenos desencadenan patrones de reacción idénticos y son escasos los datos exclusivos o patognomónicos de cada agente.

La coagulación de folículos (Fig. 5.11) y la hemorragia en el hígado (Fig. 5.9) en aves no inmunizadas son indicadores de infección por *Salmonella enteritidis* (Flores et,al,2008).

Analizados estos antecedentes, estimamos que la formulación propuesta protege de la infección a pesar del elevado número de bacterias inoculadas.

5.2.4.4 Hallazgos bacteriológicos.

Muestras	Grupo Control	Grupo Experimental
	Negativo	NT-M
Heces	DSE	NHDS E
Hígado	NHDSE	NHDSE
Bazo	NHDSE	NHDSE
Intestino Delgado	NHDSE	NHDSE
Intestino Grueso	NHDSE	NHDSE
Oviducto	NHDSE	NHDSE
Ovario	NHDSE	NHDSE

NHDSE: No Hubo Desarrollo de *Salmonella* Enteritidis, **DSE:** Desarrollo de *Salmonella* Enteritidis.

Los hallazgos bacteriológicos son a veces insuficientes para determinar la presencia de salmonella enteritidis post inoculación, se sugiere que esto puede deberse a una baja colonización y multiplicación en los tejidos de dicha bacteria, ya que al inicio de la infección bacteriana, la bacteria experimenta severos cambios ambientales en el organismo del portador al ingresar por vía oral y enfrentarse con mecanismos de defensa inespecíficos de éste, como el pH ácido del estómago, bajas tensiones de oxígeno, motilidad intestinal, flora microbiana y también con los mecanismos de

defensa específicos, regulada por la presencia de leucocitos (Santos *et al.*, 2003; Cox 1996). Se estima que hubiese sido deseable una prolongación de conservación en el tiempo de las gallinas infectadas para mejorar las evidencias bacteriológicas.



6. Fichas técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto.

7. Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

No hubo problemas de relevancia que atentaran a la ejecución del proyecto.

La principal dificultad estuvo en la capacidad de microencapsular las fórmulas inmunogénicas utilizadas. Lo mismo al carecer de un liofilizador debimos recurrir a laboratorios externos.

No obstante lo anterior es importante destacar que pudimos contar con los preparados microencapsulados y liofilizados en los tiempos oportunos para su utilización dentro de los tiempos establecidos en la Carta Gantt.

Un último aspecto que sí hubiese sido deseable, es el tiempo de duración del proyecto.

Solo durante su ejecución pudimos establecer que **el tiempo ideal de inmunización de las pollitas era durante los primeros días de edad y el tiempo ideal de evaluación es a los 6 meses** cuando se inicia la postura de huevos. Aquello nos obligó a solicitar extensión del proyecto y nos limitó en la necesidad de haber realizado pruebas adicionales, varias de las cuales se están realizando por nuestra cuenta para ajustar algunos aspectos (ejemplo: dosis – respuesta del inmunógeno) que pueden optimizar el proceso con vista a fortalecer el estudio de factibilidad de una patente con aplicación industrial actualmente en curso.

8. Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

Seminario de cierre realizado 20 de Agosto 2015.



Fotos: Muestra a los 3 expositores y público asistente.

1 Invitado Nacional 1 invitado internacional. Ver Programa

También se destacan 2 presentaciones a Congresos internacionales (Congreso Internacional de Inmunología Lima Perú 2014 y Congreso Internacional de Avicultura 2015. Guayaquil. Ecuador) y 2 presentaciones a Congresos Nacionales.

Varias actividades de difusión en revistas (America Economía, Junio 2014, pg 21, revista Indualimento V.17 junio 2014, pg 52 a 54 y otras en diarios y revistas)

1 Publicación científica en preparación.

9. Impactos del proyecto: descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias

El principal impacto obtenido ha sido generar la posibilidad de producir Huevos libres de Salmonella sp. a bajo costo, de lo cual no existe antecedentes en Chile, que se hayan obtenido previamente.

El desarrollo de un Sistema Tecnológico de producción de un Antígeno específico aplicado en forma natural a las gallinas ponedoras, por vía oral, permitió la inmunización de las gallinas y producción de Huevos libres de Salmonella

El segundo impacto principal conseguido, es la innovación tecnológica del proceso productivo ovo-cárnica para producir alimentos más seguros para los consumidores y la reducción de toxiinfecciones presentadas por este patógeno en la zona y en otras regiones del país.

La implementación productiva de esta innovación, no eleva mayormente los costos de producción, por lo que su implementación se hace rentable.

Otro impacto importante de hacer mención, es a nivel Institucional. La adjudicación y ejecución del proyecto ha permitido a la Universidad Santo Tomas, crear e implementar un laboratorio de investigación aplicada en biotecnología aviar. Esta infraestructura ha estimulado la generación de nuevos proyectos de investigación aplicada en este campo, los que están actualmente en preparación.

- **Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:**

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Generar un negocio tecnológico por la venta del inmunógeno	No existía	Opción de implementar a escala comercial	Unidad en estudio
Otorgar valor agregado al negocio de los huevos, generando una condición más inocua y sanitariamente más seguros a los huevos.	0	15-35 \$/huevo	15-35 \$/huevo

Impactos Sociales

El Impacto Social más importante de la aplicación de la tecnología, es la prevención de brotes de Enfermedades Trasmitidas por Alimentos como es la salmonelosis transmitida por huevos y carne de aves contaminadas. La inmunización de las gallinas ponedoras, permitirán la obtención de huevos microbiológicamente más seguros y saludables a los consumidores.

Desde el punto de vista de las políticas públicas, es posible que los resultados motiven al gobierno de Chile revisar los programas sanitarios, ya que no existe un programa de vacunas ni de inmuno-protección contra salmonellas en aves productoras de huevos. En otros países las normativas para evitar las infecciones de huevos por salmonellas son rigurosas y obligatorias, pero actualmente no son aplicables a nuestro país.

Una política preventiva para enfrentar la salmonelosis, no solo salvará vidas si no evitará importantes costos para la Salud Pública y la industria Avícola.

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Sistema Tecnológico de producción de un Antígeno específico de aplicación oral	X			Se habilita una nueva actividad productiva para el que adapte la tecnología, de producción y venta del antígeno.
Innova el proceso productivo ovo-cárnica para producir alimentos más seguros	X	X		Se valida a escala piloto la viabilidad técnica y económica de tratar las gallinas para tener huevos libres de salmonella.

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente		
Intención de patentar	1	La Universidad UST a través de la Dirección de Investigación está evaluando la factibilidad de patentar.
Secreto industrial		
Resultado no patentable		
Resultado interés público		

La Universidad Santo Tomas a través de la Dirección de Investigación está evaluando la presentación de una patente para proteger la propiedad intelectual de los resultados del proyecto. Revisando el cumplimiento de los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial. En paralelo se está realizando un market assessment en el cual se situará el proyecto en un contexto comercial actual para identificar los beneficios, oportunidades y debilidades que puedan surgir de la comparación de este desarrollo con otros semejantes.

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	1	SE HA ESTABLECIDO REDES DE INTERCAMBIO TECNOLÓGICO CON EL INTA (INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA) DE BUENOS AIRES.
Generación nuevos proyectos	1	PRODUCCION DE ANTICUERPOS IgY CONTRA PATOGENOS QUE PRODUCEN CUADROS DIARREICOS EN CERDOS: USO POTENCIAL COMO AGENTE INMUNOPROFILACTICO E INMUNOTERAPEUTICO

Gracias a la ejecución del proyecto se han establecido redes de intercambio tecnológico con el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) de Buenos Aires. Esto potenciará al equipo humano y facilitará la generación de nuevos proyectos de investigación aplicada.

Para el 2016, y siguiendo la misma línea de trabajo, se ha presentado un nuevo proyecto para prevenir cuadros diarreicos en cerdos. En esta misma temática se está trabajando paralelamente con Investigadores del INTA de Buenos Aires para hacer una presentación conjunta a INNOVA Corfo.

Se tiene también conversaciones con VETERQUIMICA para replicar los resultados de la inmunización por Salmonella en Broilers.

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones	0	No se harán publicaciones hasta después de iniciado el proceso de patentamiento
Eventos de divulgación científica	2	Presentaciones en congresos internacionales: Año 2014 Congreso Internacional de Inmunología Lima, Perú. Año 2015 Congreso de avicultura Guayaquil Ecuador.
Integración a redes de investigación		

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Tesis pregrado	12	5 TESIS DE PREGRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO 7 TESIS PARA OPTAR AL GRADO LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA Anexo 3: Tesis
Tesis postgrado	X	
Pasantías	X	
Cursos de capacitación	X	

10. Conclusiones

El proyecto logró desarrollar un sistema tecnológico científicamente diseñado viable de producir, que permitiría disminuir significativamente el riesgo de incidencias de enfermedades producidas por productos derivados del huevo. En este caso *Salmonella Enteritidis*, uno de los principales agentes bacterianos responsable de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

En las conclusiones no redundaremos en describir las ventajas de este sistema ya mencionadas sobre otros sistemas disponibles en el mercado, pero sí destacamos que es un producto viable de producir y en consecuencia si se aplicara industrialmente no debiese significar un aumento importante de los costos.

Otro aspecto destacable tiene relación con haber facilitado la consolidación de un equipo de trabajo que continuará realizando investigación aplicada en un tema de gran impacto en la salud animal y humana explotando la tecnología de las inmunoglobulinas aviares.

Una última derivada del proyecto que no se ve con facilidad tiene relación con el medio ambiente. Mientras menos infecciones tengamos en la población aviar y en otros animales menos toneladas de antibióticos dejarán de diseminarse por el medio ambiente generando menos resistencia bacteriana, siendo este aspecto otra motivación para continuar desarrollando esta tecnología.

11. Recomendaciones

Estimamos recomendable la realización de pruebas piloto diseñadas para identificar costos a escala industrial.

12. Otros aspectos de interés

Muchos aspectos nos llamaron la atención que no están cubiertos o están insuficientemente reportados en la literatura. Uno de ellos tiene que ver con la capacidad de evaluar la respuesta inmune de las aves. Se suele utilizar el examen de sangre para buscar anticuerpos, pero ¿Es esa evaluación realmente representativa de lo que ocurre a nivel de mucosas? ¿Cuán confiable es?

Si los patógenos ingresan mayoritariamente por las mucosas por qué medimos en la sangre? ¿Podremos disponer de métodos no invasivos capaces de reflejar el real estado inmune de las mucosas antes que el animal se enfrente al patógeno? ¿Podría ser la medición de IgA específica de deposiciones uno de estos marcadores?

13. Anexos

Anexo 1. Estudio de mercado del huevo

Anexo 2. Reactivos

Anexo 3. Tesis

Anexo 4. Método de determinación de proteínas utilizado en este proyecto

Anexo 5. Algunas fotos

14. Bibliografía Consultada

Akira Y. Byung. Immune modulation of Aloe Vera: Acemannan and gut microbiota modulator. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research* 4(8):1707 – 1721. 2015.

Alexandre M, Pozo C , González V , Martínez M C, Prat S, Fernández A, Fica A, Fernández J, Heitmann I. (2000). *Rev. méd. Chile* v.128 n.10 Santiago.

Amar Surjushe, Resham Vasani, and D G Saple. Aloe Vera: A Short Review. *Indian J Dermatol.* 53(4): 163–166. 2008.

Andarwulan N, Fardiaz D., Wattimena GA., and Shetty K. “Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization. during seed germination of *Pangium edule Reinw.*,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 3158–3163, 1999.

Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunol* 26: 347–362. 2005

Befus, AD., Johnston N, Leslie GA, Gut associated lymphoid tissue in the chicken. I Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer’s patches. *J Immunology.* 25, 2626-2632, 1980

Catellanos P. Edilis; Mc Cook N. Leysis; et Als. Influencia del *Aloe Vera* L. sobre la respuesta inmune humoral de ratones Balb/c inmunizados contra el virus de la hepatitis B. *Rev Cubana Plant Med* 11 (3-4) 2006

Challacombe SJ., Tomasi TB., 1980. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. *J. Exp. Med.* 152: 1459-1472. 1980

Coutinho A.; Kazatchkine MD.; Avrameas S. Natural autoantibodies. Volume 7, Issue 6, December 1995, Pages 812–818

Cox J, Berrang M.. Alternative routes for *Salmonella* intestinal tract colonization of chicks. *Appl Poultr Sci.* 282-288. 1996

Duc, L.H. Hong H.A.; Fairweather N. Ricca E and Cutting S.M.. Bacterial Spores as Vaccine Vehicles. *Infect Immun.* 2003 May; 71(5): 2810–2818

Desin, T., Wisner, A., Lam, P., Berberov, E., Mickael, C., Potter, A., Koster, W. 2011. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island-1 proteins as vaccine candidates against *S. Enteritidis* challenge in chickens. *Veterinary Microbiology* 148: 298–307

Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* phage type two after experimental infection of young chickens. *Vet Microbiol*; 56: 99-109. 1997.

De Azevedo R. and Consani J. Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology*, May 1977 vol. 59 no. 5 783-787

Goldblum RM. The role of IgA in local immune protection. *J Clin Immunol.*;10(6 Suppl):64S-70S; discussion 70S-71S. 1990

Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev.* 230(1):38-50. 2009

Guard-Petter Jean. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental Microbiology* (2001) 3(7), 421±430 .Procedimiento Detección de *Salmonella* en Alimentos por Método Convencional PRT-712.03-012. Instituto Salud Pública.

Harbans L. Bhardwaj and Anwar A. Hamama. Cultivar and Growing Location Effects on Fatty Acids and Minerals in White Lupin Sprouts. *International Scholarly Research Network. ISRN Agronomy*. Pg.1-5. 2012
(<http://www.iourlib.org/paper/3085856#.Vq0s2mdRHIU>)

Hedges, S. B. The origin and evolution of model organisms. *Nature Rev. Genet.* 3, 838–849 2002

Hirsh DC, Chung ZY. *Salmonella*. In: Hirsh D, Chun ZY, editors. *Veterinary Microbiology*. Iowa State, Blackwell Science Inc, 75-80. 1999.

Hughes R. C. and Thurman P. F. Cross-Linking of Bacterial Cell Walls with Glutaraldehyde. *Biochem. J.* 119, 925-926. 1970

Hunter, K.W., Gault, R.A., Berner, M.D. 2002. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Applied Microbiology*. 126(35): 267-271.

- JACOB J, Pescatore T. and Cantor A. Avian digestive system. Cooperative extension service, University of Kentucky, College of agricultura, Lexington. Emitido 02-2011.
- Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2: 256–267. 2001
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* **227** (5259): 680–685.
- Lamm ME, Nedrud JG, Kaetzel CS, Mazanec MB. IgA and mucosal defense. *APMIS*. 103(4):241-6. 1995
- Lavelle, E.C.; Grant,G.; Puzstai A.; Pfüller U.; and O'hagan D.T. The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity *Immunology*. Jan; 102(1): 77–86. 2001
- Lebacqz AM.; Verheyden J.; Vaerman P. and Heremans JF. Quantification and Distribution of Chicken Immunoglobulins IgA, IgM and IgG in Serum and Secretions. *Immunology*, 27: 683-692. 1974
- Maharjan H. Radha; Nampoothiri P Laxmipriya. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of *Aloe vera*: A systematic review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. Vol.5 (1): 21- 26. 2015
- Maripandi A. and Ali A. Al-Salamah Analysis of Salmonella enteritidis Outer Membrane Proteins and Lipopolysaccharide Profiles with the Detection of Immune Dominant Proteins *American Journal of Immunology* 6(1):1-6, 2010
- Mantulova, M., Havlickova, H., Sisak, F., Babak, V., Rychlik, I. 2013. SPI1 defective mutants of Salmonella enterica induce cross-protective immunity in chickens against challenge with serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine*, 31: 3156– 3162
- Matar C.; Goulet J.; Bernier RL.; Brochu E. Bioactive Peptides from Fermented Foods: Their Role in the Immune System. Chapter Probiotics 3 pp 193-212 en: "Immunomodulation by the gut microflora and probiotics" Ed. Springer. 1ª Ed. 2000
- Mestecky J., Nguyen H., Czerkinsky C., Kiyono, H. Oral immunization: an update. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(6) 713-719. 2008
- Nandre R., Chaudhari A., Matsuda K., Lee J. Immunogenicity of a Salmonella Enteritidis mutant as vaccine candidate and its protective efficacy against

salmonellosis in chickens. *Veterinary immunology and immunopathology* 144: 299–311. 2011

Neil A. R. Gow, Mihai G. Netea, Carol A. Munro, Gerben Ferwerda, et als. Immune Recognition of *Candida albicans* β -glucan by Dectin-1. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol 196 (10): 1565-1571. 2010

OLA´H, I. Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. *Poultry Sci.* 82, 767-770. 2003

Ordóñez, G., Llopis, N., Peñalver, P. Efficacy of Eugenol Against a Salmonella entérica serovar Enteritidis Experimental Infection in Commercial Layers in Production. *The Journal of Applied Poultry Research*: 17:376–382. 2008

Paião F.G., Arisitides L.G.A, Murate L.S., Vilas-Bôas G.T., Vilas-Boas L.A., Shimokomaki M. (2010) "Detection of Salmonella spp, Salmonella Enteritidis and Typhimurium". *Brazilian Journal of Microbiology* (2013).

Petrovsky N. Aguilar J.C., Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology* (2004) 82, 488–496

Pizarro, S., Ronco, A., Gotteland, R. 2014. β -glucanos: ¿Qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud?. *Rev Chilena Nutrición*. 41(3): 439-446.

Planchuelo, Ana M. Evaluación de los usos medicinales de las semillas de lupino blanco (*Lupinus albus L.*). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Santiago, Chile. 6(5): 203-214. 2007

Porporatto, C., Bianco, D., Correa, S. La modulación del sistema inmune de mucosas con polisacáridos. *Bases para una atractiva alternativa en terapia*. 41(2): 203-211. 2007

Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Phaseolus vulgaris* Azevedo R.M. and Consani J. *Plant Physiol* 59: 783-787, 1977

Rajeswari R.; Umadevi M.; Sharmila C., et als. *Aloe vera*: The Miracle Plant Its Medicinal and Traditional Uses in India. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* Vol. 1(4) 118. 2012

Reisz, R. R. & Muller, J. Molecular timescales and the fossil record: a paleontological perspective. *Trends Genet.* 20, 237–241. 2004

Salyers A A, Whitt DP. *Salmonella* infections. In: Salyers AA, Whitt DP, editors. Bacterial Pathogenesis: A molecular approach. American Society for Microbiology Press. Washington DC: Ed. ASM press, 229-243. 1994.

Sánchez JM, Cardona CN. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Asoc Colomb. Infect*, 7: 22-29. 2003

Santos RL, Tsohis RM, Bäumlér AJ, Adams LG. 2003. Pathogenesis of *Salmonella* induced enteritis. *Braz J Med Biol Res*. 36:3-12. 2003.

Saswati P. and Jeak L. Ding. Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* 194 (1): 13-20 2015

Sellier, N., Velge, P., Beaumont, C., Menanteau, P., Dubos, F., Basso, B., Marie, C. 2008. Sensibilité au portage asymptomatique de *Salmonella* Enteritidis chez le canard mulard: Modèle d'infection expérimentale et paramètres génétiques. *Les Journées de la Recherche*. 8: 1-4

Sharon N, Lis H. Legume lectins — a large family of homologous proteins. *FASEB J*. 4:3198–3208.1990

Silveira, L., D'Ávila, G., Fischer, G., Augusto, P. 2014. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. *Ciência Rural*, Santa Maria. 44(1): 153-160.

Sumner JB, Howell SF The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A *J Bacteriol* 32 : 227-237. 1936

Sun P.; Wang JQ, Zhang HT., Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and immune function of preweaning calves. 93 (12): 5851–5855. 2010.

Sydiskis, R J. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother*. 35 (12): 2463-2466. 1991

Torres J., Lyerly D., Hill, J., Monath T. Evaluation of Formalin-Inactivated *Clostridium difficile* Vaccines Administered by Parenteral and Mucosal Routes of Immunization in Hamsters. *Infection and immunity*. 63(12): 4619–4627. 1995

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.». *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76 (9): 4350–4354. 1979

Vergis, J.M.; Cote C.K.; Bozue,J.; Alem F. Ventura; C.L. Welkos S.L. and O'Brien A.D.. Immunization of Mice with Formalin-Inactivated Spores from Avirulent *Bacillus cereus* Strains Provides Significant Protection from Challenge with *Bacillus anthracis* Ames. *Clinical and Vaccine immunology*. 20 (1):. 56-65

Yachnin S, Svenson RH. The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology*. 22:871–883. 1972

Yamamoto H.. Watanabe H. Sato G. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Jap. J. vet. Res.* 23:131-140, 1975

Zandi, Keivan. Antiviral activity of *Aloe vera* against herpes simplex virus type 2: an in vitro study. *African Journal of Biotechnology*. 6 (15): 1770-1773. 2007

Weiner, Howard. Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms. *The Journal of clinical investigation*. 106 (8): 935 – 937. 2000

ANEXO:1

ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MERCADO DE HUEVOS EN CHILE

PROYECTO PYT-2013-0048 INMUNOPROTECCIÓN DE
HUEVOS CONTRA BACTERIAS DEL GENERO SALMONELLA

TABLA DE CONTENIDOS

Presentación..... 4

1. Mercado mundial..... 5

 1.1 Tamaño del mercado 5

 1.2 Comercialización 11

 1.3 Consumo 14

2. Situación nacional 18

3. Análisis del mercado nacional..... 24

 3.1 Oferta..... 25

 3.2 Canales..... 27

 3.2.1 Retail..... 27

 3.2.2 Minoristas 28

 3.3 Precios 28

4 Producto..... 33

 4.1 Problema..... 33

 4.2 Oportunidad 34

 4.3 Solución 34

 4.4 Innovación en la cadena de valor..... 34

5 CONSUMIDORES 37

6 Estrategia de ingreso al mercado..... 38

 6.2 Identificación de grupos de interés..... 38

7 Conclusiones..... 40

Bibliografía..... 42

Ilustración 1 Producción de huevo en las ultimas 3 décadas Fuente FAO	6
Ilustración 2 Los 10 principales productores de huevo Fuente: FAO 2013.....	10
Ilustración 3 Volumen de exportación a nivel mundial Fuente: FAO 2011.....	13
Ilustración 4 Formatos Huevos Gallina Feliz	25
Ilustración 5 Productos que apuntan a la economía de escala	26
Ilustración 6 Huevos con Omega 3	27
Ilustración 7 Empresa de Retail	28
Tabla 1 Precios de huevo por unidad en Supermercado Tottus	29
Tabla 2 Precios de huevo por unidad en supermercado Lider	30
Tabla 3 Precios del huevo por unidad en supermercado Jumbo	31
Grafica 1 Producción mundial de huevos.....	7
Grafica 3 Principales países productores del huevo del 2013	8
Grafica 3 Población país	9
Grafica 5 Tendencia en la producción mundial de huevo y América del Sur.....	11
Grafica 6 Principales países importadores de huevos	12
Grafica 7 Porcentaje del aporte calórico a la dieta promedio.....	16
Grafica 8 Ingreso promedio per cápita	17
Grafica 9 Porcentaje de producción de huevos por región	19
Gráfica 10 Evolución del número de gallinas productoras de huevo.....	20
Grafica 11 Evolución en la producción de huevos de consumo	21
Grafica 12 Precios reales de huevo blanco en mercado mayoristas.....	22

PRESENTACIÓN

El objetivo principal del estudio solicitado consiste en describir y analizar, cualitativa y cuantitativamente, la situación actual y potencial del mercado del huevo en Chile, orientado a la identificación de oportunidades para la comercialización de un producto libre de Salmonella además del propio sistema de inmunoprotección, para cuyo logro se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Conocer y caracterizar la oferta y demanda actual y potencial de huevos en nuestro país;
2. Conocer y caracterizar las potencialidades y debilidades del mercado nacional de huevos;
3. Elaborar propuestas de actividades concretas para el ingreso al mercado de un producto 100% libre de Salmonella;
4. Generar un modelo de negocios asociado a la comercialización de huevos libres de Salmonella;

Cabe destacar que en este estudio se profundizará con prioridad la identificación de las variables claves para el ingreso de un producto libre de salmonella al mercado nacional del huevo, además de presentar una detallada caracterización del funcionamiento de este mismo, con esto se espera lograr una comprensión adecuada del mercado y sus proyecciones, además se analizarán casos similares de ingreso al mercado de productos con valor agregado, principalmente huevos con Omega 3 y Huevos Free Range, lo que nos permitirá identificar variables importantes que se deben considerar al momento de decidir estratégicamente como ingresar al mercado con un producto como este.

1. MERCADO MUNDIAL

1.1 TAMAÑO DEL MERCADO

El mercado mundial de huevo está directamente relacionado con variables macroeconómicas como el crecimiento de la población y los índices de ingreso per cápita, pobreza y nutrición. El huevo ha sido históricamente una de las proteínas de más fácil acceso para la población por su facilidad en términos de producción y comercialización, además de presentar un precio conveniente frente a sus pares más elaborados como las carnes, quesos y lácteos, por otro lado, para tener una visión más elaborada acerca del comportamiento del consumo de huevo es importante analizar cómo se ha comportado el mercado del huevo en los países líderes en producción y como se relaciona con la historia que estos países han vivido a lo largo de la última década.

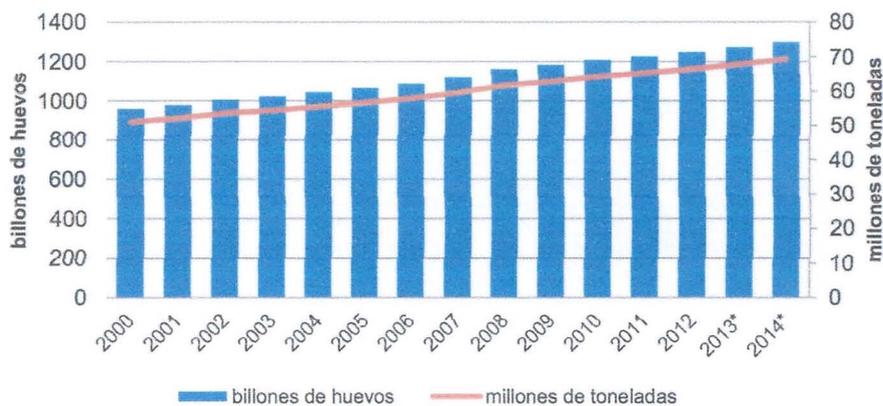
Si analizamos las cifras del crecimiento de la producción a nivel mundial, nos encontraremos que han sido los asiáticos quienes han impulsado este crecimiento con un aumento del 388% en la producción durante las últimas 3 décadas, muy por sobre el 152% que presenta el mundo en el aumento de las toneladas producidas.



Ilustración 1 Producción de huevo en las últimas 3 décadas Fuente FAO

La producción mundial de huevos entre el año 2000 y 2013 se ha incrementado en 32,8%, a una tasa anual promedio de 2,2%. De acuerdo a información proporcionada por FAO, en la gráfica 1 se observa que mientras en el año 2000 se produjeron alrededor de 51 millones de toneladas a nivel mundial, el volumen global de huevo producido superó los 67 millones de toneladas el 2013. Esta evolución también se aprecia a escala continental, en donde Asia contribuía con el 56,5% del total al comienzo del período mencionado, América con 20,5%, Europa con 18,6%, África 3,7% y Oceanía con 0,4% de la producción total. Sin embargo, el año 2013, Asia aumento su participación a casi el 60%, con algo más de 39,2 millones de toneladas, Europa a 16% con cerca de 11 millones de toneladas, Norteamérica contribuyó con alrededor de 9% con un volumen de 5,8 millones; Sudamérica aportó alrededor del 6,5% del total, con 4,4 millones de toneladas; y África también incrementó su aporte a 4,5% del total, con 3 millones de toneladas

. (Ministerio de Agricultura)



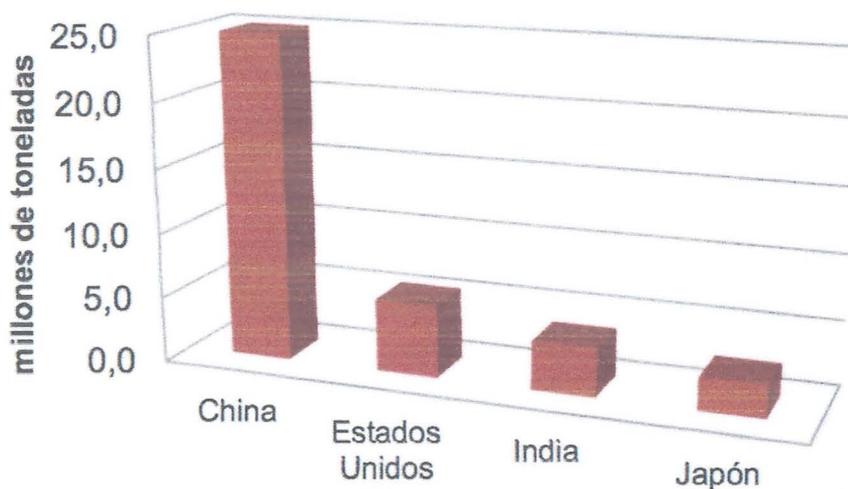
Fuente: Odepa con datos de FAO
*: datos estimados

Grafica 1 Producción mundial de huevos

Dentro de los principales países productores, China sigue ocupando el primer lugar por un amplio margen, con una producción de alrededor de 25 millones de toneladas de huevo de gallina para consumo en 2013, seguido por Estados Unidos de Norteamérica, India y Japón, tal como se observa en la gráfica 2. En Europa se produjeron 11 millones de toneladas, considerando el aporte de todos los países del conglomerado. La producción de huevo en esta región se concentra básicamente en siete países que aportan el 75% del total; entre los productores europeos más relevantes están: Francia, España, Alemania y el Reino Unido. De acuerdo a la International Egg Commission, en su estudio del 2014 sobre el desarrollo del mercado del huevo en Europa, mientras la producción mundial creció sobre 28% la última década, los productores europeos lograron un incremento de 11,5%. De acuerdo al Departamento de Agricultura de Estados Unidos, la producción de huevo de mesa para ese país en 2013 alcanzó 83,6 billones de unidades y se espera que para 2014 la cifra alcance a 85,8 billones, lo que representaría un incremento de 2,6%. En tercer lugar en importancia en cuanto a volumen, se encuentra India, cuya producción se estima crecerá en torno a 4%, llegando a 4 millones de toneladas en 2014. Por su parte, Japón mantendría

sus niveles productivos con respecto al año anterior alcanzando a 2,5 millones de toneladas.

(Ministerio de Agricultura)

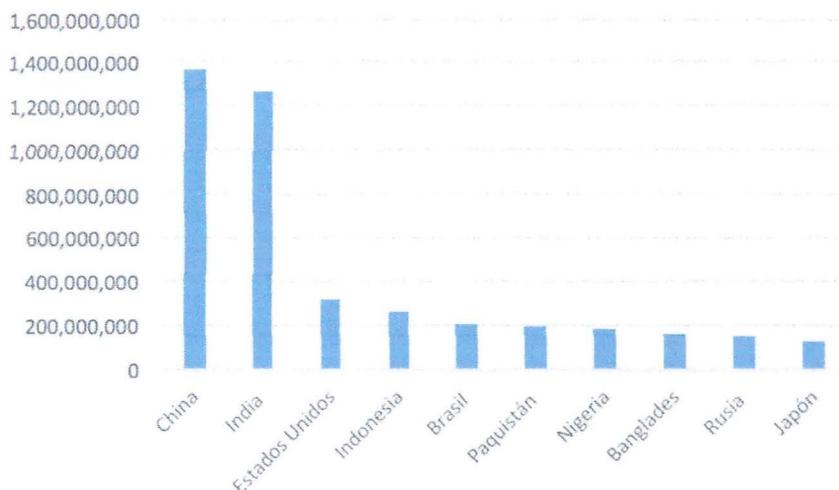


Fuente: Odepa con datos FAO y estimaciones

Grafica 2 Principales países productores del huevo del 2013

Comparando los datos presentados por la Odepa con los datos correspondientes a la población de los países con las tasas más altas de población, nos es ninguna sorpresa encontrarnos con China, India y Estados Unidos liderando este ranking, es así como podemos observar que efectivamente los países que más producen huevos son también los países más poblados del mundo (Japón se encuentra en el lugar número 10 del ranking de población). Esto es de esperarse ya que la industria del huevo por las particulares características del producto, en sus inicios poseía complicados procesos de almacenamiento, transporte y refrigeración por lo cual los mercados más desarrollados son los que efectivamente poseen una demanda interna elevada Otro dato importante para nuestro análisis será identificar por que China se ha alzado como el máximo productor de huevos del

mundo y a que se debe el gran crecimiento que presenta la industria de huevos en el país asiático.



FUENTE: Banco Mundial 2014

Grafica 3 Población país

Por otro lado Indonesia, Brasil y Rusia también se encuentran dentro de los grandes productores de huevos a nivel mundial, solo Turquía, Ucrania y México no se encuentran en la lista de países con mayor población, lo sorprendente de este último es que participa en cerca de un 3% de la producción mundial (Ilustración 1).

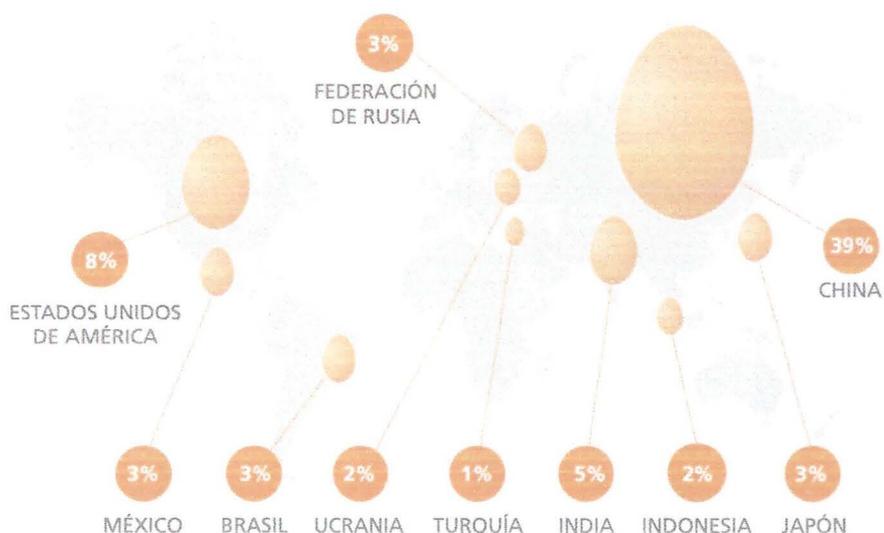
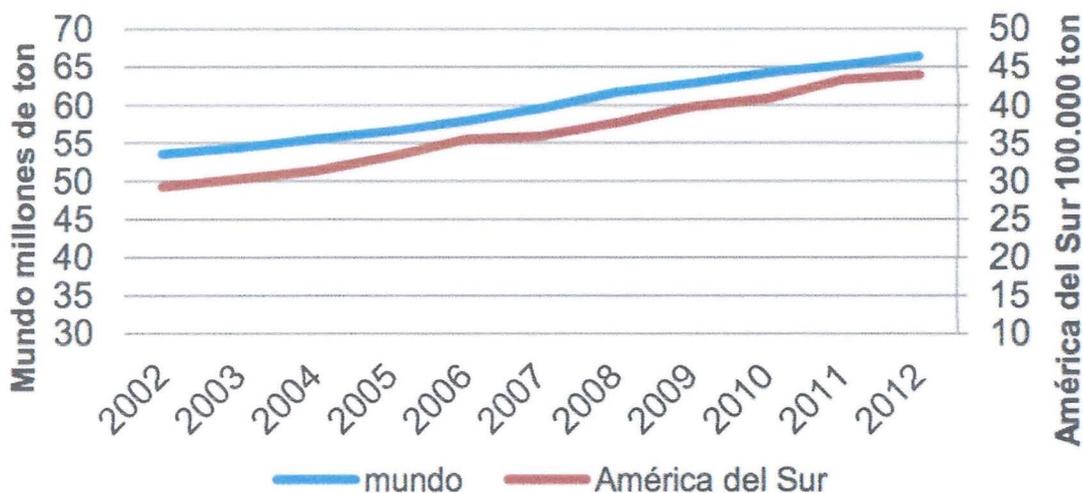


Ilustración 2 Los 10 principales productores de huevo Fuente: FAO 2013

En lo que respecta a América del Sur, la evolución de la producción durante la última década ha mostrado una tendencia al alza durante todo el período gráfica 4, pasando de 2,9 millones de toneladas en 2002 a cerca de 4,5 millones en 2013, lo que representa un incremento de 51%, con una tasa de crecimiento promedio anual de 4,2%. Como se señala en el gráfico 4, al comparar la evolución de la producción mundial y de América del Sur, se observa que la pendiente de la recta correspondiente a Sudamérica es más pronunciada que la que representa la producción global en los últimos años. Esto demuestra el protagonismo que están adquiriendo los países de la región tanto en eficiencia productiva como en el desarrollo del consumo. Brasil lidera ampliamente la producción sudamericana, con 1,9 millones de toneladas en 2013, con cerca del 48% de participación en la región, según la Asociación Brasileña de Proteína Animal (ABPA). Le siguen Colombia, Argentina, Perú y Chile, aunque todos con producciones inferiores a 600 mil toneladas anuales

. (Ministerio de Agricultura)



Fuente: Odepa con datos FAO

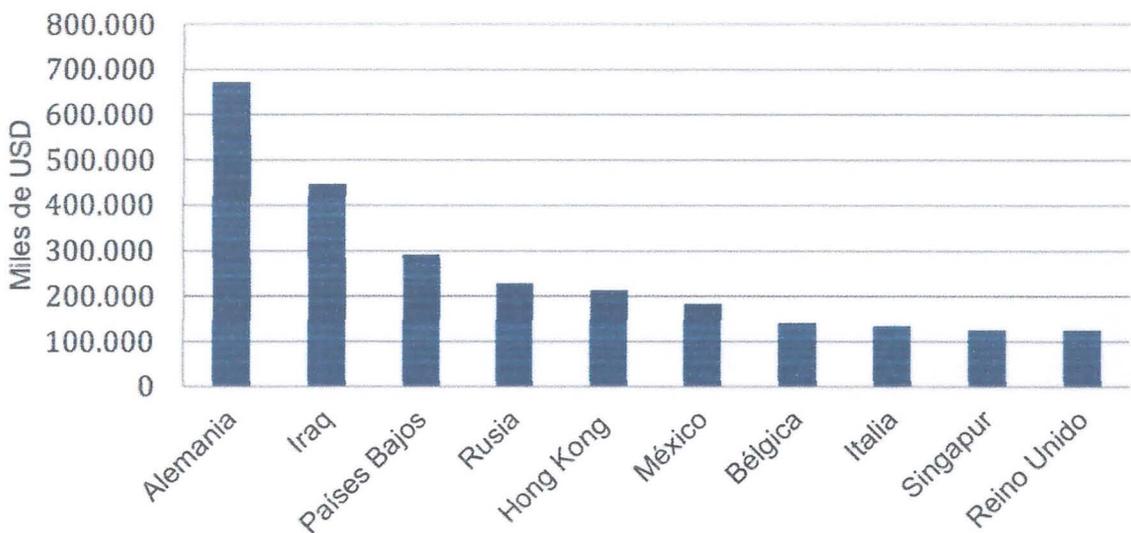
Grafica 4 Tendencia en la producción mundial de huevo y América del Sur

1.2 COMERCIALIZACIÓN

El mayor flujo comercial de huevos con cáscara se produce en Europa, con una participación de 58% de las exportaciones mundiales del producto. Dentro de los principales países exportadores de la Unión Europea destacan los Países Bajos, con una participación de 20,4% del total mundial y 1,2 millones de toneladas exportadas en 2013. Lo sigue de lejos Polonia, con 215 mil toneladas. Un aspecto notable del comercio europeo ha sido la rápida expansión de las exportaciones de Turquía, ya que las ventas anuales han aumentado de menos de 4.000 toneladas (1,7 por ciento del total regional) en el año 2000, hasta superar las 281.300 toneladas en 2013, con un crecimiento anual de 34% entre 2009 y 2013. En cuanto a la demanda de huevos en Europa, la lista es liderada por Alemania, que en 2013 importó poco más de 373 mil toneladas, siendo también el primer importador mundial. La siguen los Países Bajos e Italia, con 317.103 y 93.976 toneladas, respectivamente. Esta dinámica de comercialización ocurre gracias a que todos los productos se mueven entre los países de la Comunidad Europea sin aranceles, sumado a que las distancias entre los mercados son cortas; sin

embargo, durante los últimos años se ha evidenciado un retroceso en las ventas, debido posiblemente a la entrada en vigencia de la nueva legislación sobre bienestar animal, que implica que los alojamientos de las aves deben cumplir ciertos requisitos de espacio y diseño, lo que ha impactado de manera importante la producción local. A causa del aumento de los costos de producción, los países con recursos laborales y de alimentos balanceados más baratos continuarán aumentando su participación en el mercado de la UE

. (Ministerio de Agricultura)



Fuente: Odepa a partir de información de Trade Map.

Grafica 5 Principales países importadores de huevos

El total de exportaciones de huevo el año 2011 alcanzó las 2,2 millones de toneladas, la cuales se dividen en 3 variedades de productos, huevos enteros de gallina, huevo deshidratado y huevo líquido, estos últimos corresponden a procesos de roturado y pasteurizado y están orientados a generar productos más fáciles de almacenar y con menores riesgos de transmisión de gérmenes patógenos y microorganismos a los consumidores, son más económicos que los huevos con cáscara y poseen una duración aproximada de 12 meses, se utilizan

principalmente como insumos para productos derivados del huevo como la mayonesa, entre otros.

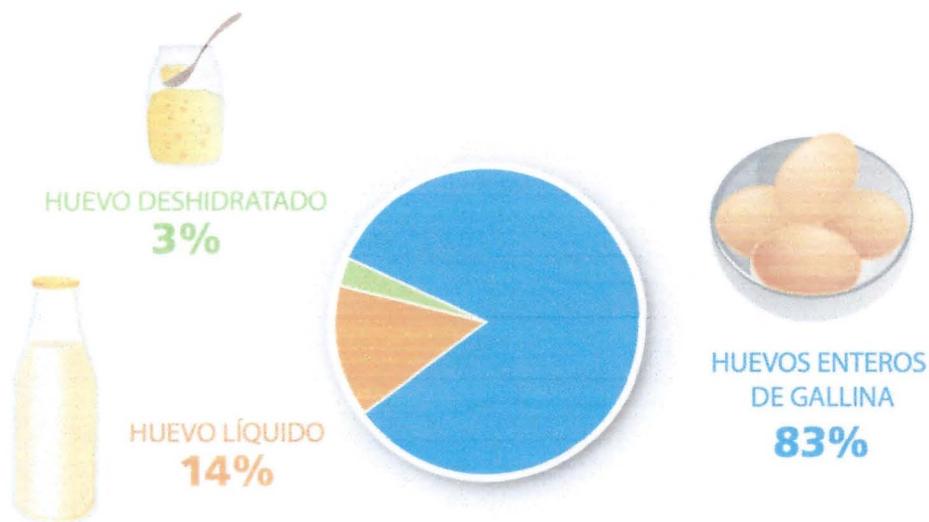


Ilustración 3 Volumen de exportación a nivel mundial Fuente: FAO 2011

América Latina produce casi 11 por ciento de los huevos del mundo y alrededor de un tercio de la producción de esta zona se da en México. Argentina y Colombia también se encuentran dentro de los veinticinco primeros mercados mundiales. La demanda del producto en la región está liderada por México, que para el año 2013 importó 70.018 toneladas (incluye huevos frescos, conservados o cocidos), por un valor de US\$ 183 millones. Este país es el primer consumidor per cápita de este producto y el sexto productor mundial, después de China, Estados Unidos, Rusia, India y Japón. El mercado mexicano sufrió en 2012 un brote de influenza aviar H7N3 que afectó la región de Los Altos de Jalisco, la más importante del país, tanto en producción como en exportaciones de huevos, lo que provocó la muerte de casi 23 millones de gallinas, evento que podría explicar el aumento explosivo de las importaciones durante 2013, cuando se registró un alza de 271%

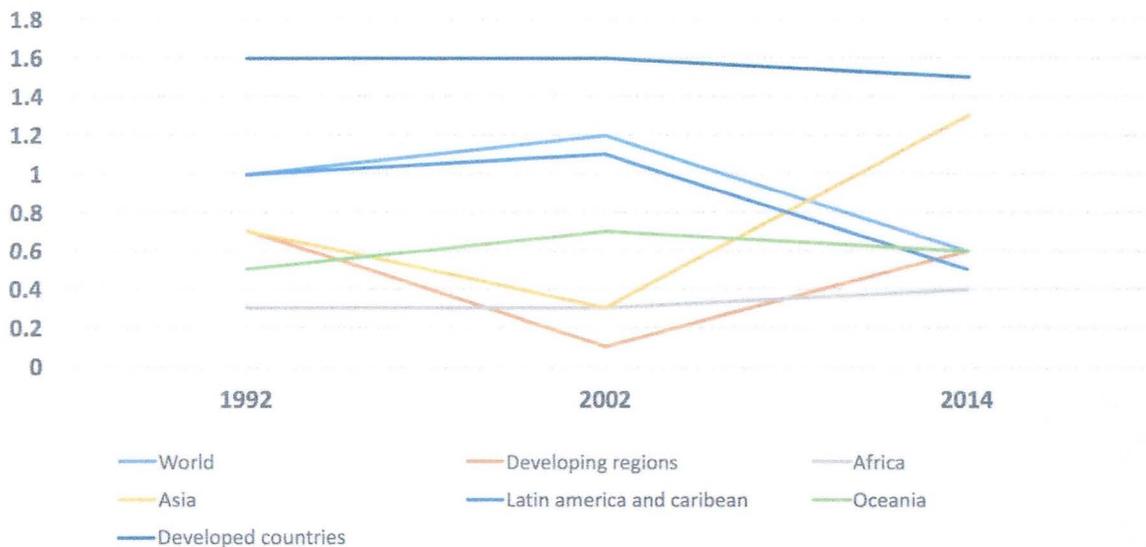
(Ministerio de Agricultura)

1.3 CONSUMO

El consumo mundial se ha triplicado en los últimos cuarenta años. En 2015 la producción de huevos deberá ser de 70,9 millones de toneladas para satisfacer la demanda mundial. La producción y el consumo continúan aumentando en la mayoría de países en todo el mundo. Globalmente, según los datos disponibles de FAO, el promedio ha aumentado de un estimado 8,1 kg/persona al año en 2000, a 8,9 kg en 2008, manteniéndose estable en ese nivel en 2009. Estas cifras son cálculos de suministros disponibles divididos entre las estimaciones de población humana, por lo que pueden utilizarse como guía de la tendencia, pero no se debe prestar demasiada atención a los niveles absolutos y particularmente a los pequeños cambios que ocurren año a año. Puede existir un alto grado de variabilidad en las estimaciones del número de ponedoras (especialmente en zonas donde las aves de traspatio contribuyen de manera significativa a la producción), en los rendimientos promedio, en el peso promedio de un huevo (cuando el consumo se expresa en kilogramos por persona), así como en las estimaciones de la población humana. Con base en los datos de FAO de consumo promedio global de huevos, en América el consumo aumentó 0,8 kg/persona al año entre 2000 y 2009, año en que se llegó a la cifra de 11,4 kg por persona, que es mayor que el consumo promedio registrado a nivel mundial. Sin embargo, la diferencia en el consumo promedio entre los países es enorme, abarcando un rango que va desde menos de un kilo en algunos países a más de 22 kilos en México, lo que sugiere un gran potencial de crecimiento en el futuro para muchos países de la región. Según las proyecciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), el volumen total de huevos consumido en ese país muy probablemente aumentará de 6,5 millones de docenas a casi 6,8 millones de docenas para el año 2021, debido al crecimiento de la población y sobre la base del consumo por persona, que en promedio se situará en torno a 239 huevos por habitante.

(Ministerio de Agricultura)

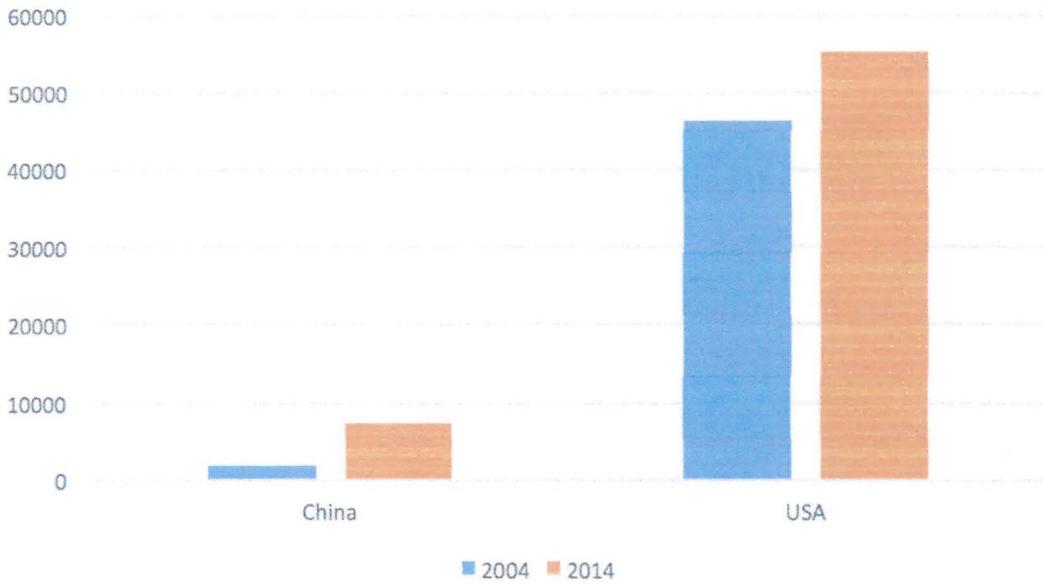
Por otro lado al analizar los datos relacionados con el aporte calórico del huevo a la dieta a lo largo del mundo podemos observar como el huevo ha aumentado en su aporte calórico en la región de Asia (1,3%) casi alcanzando a los países desarrollados, el cual se ha mantenido alto cercano al (1.6%), mientras que en América Latina, África, Oceanía y los países en desarrollo, aún existe un gran potencial para el crecimiento tanto en el consumo, como en el aporte calórico a la dieta, esto se debe en parte al acceso a los alimentos que tienen los países menos desarrollados y al ingreso promedio que presenta su población, es así como en un mercado dependiente de tasas de crecimiento económico y expansión demográfica el huevo se convierte en una de las principales fuentes de aporte proteico en países con economías emergentes y clases sociales que recientemente han escalado de la pobreza, una de las explicaciones del acelerado crecimiento que ha vivido el consumo de huevo en la región asiática tiene que ver directamente con el fenómeno anteriormente mencionado y que hace relación a las nuevas políticas laborales impuestas por el gigante asiático, las cuales han mejorado las condiciones de trabajo, aumentando los costos de producción para muchas empresas manufactureras en un país que ha contado históricamente con la mano de obra más económica a nivel mundial, y que hoy en día ha optado por diferenciarse en otros aspectos de la cadena de valor.



Fuente: Food and nutrition in numbers 2014
 FAO

Grafica 6 Porcentaje del aporte calórico a la dieta promedio

Cabe señalar la importancia que tiene el huevo como aporte calórico en la dieta de los países desarrollados, si bien el huevo es una proteína económica y de acceso masivo, los países desarrollados la consumen en promedio un 300% más que los países en desarrollo, África, América Latina. Sin embargo estos mismos cuentan con una amplia gama de productos asociados al mercado del huevo, desde productos envasados en lata, hasta solo claras de huevo, las cuales pueden ser encontradas en la mayoría de los distribuidores, específicamente los supermercados en los países desarrollados.



FUENTE: **BANCO MUNDIAL**

Grafica 7 Ingreso promedio per cápita

Por otro lado es importante realizar una comparación entre el ingreso promedio per cápita, entre China, que cuenta con la mayor población de los países asiáticos, y EE.UU, que tiene la mayor población de los países desarrollados, la diferencia es de un 700%, sin embargo el país asiático a aumentado porcentualmente su ingreso promedio más que el país norteamericano, lo que le ha dado más acceso a la población a bienes que con anterioridad eran menos consumidos en el gigante asiático, entre ellos el huevo.

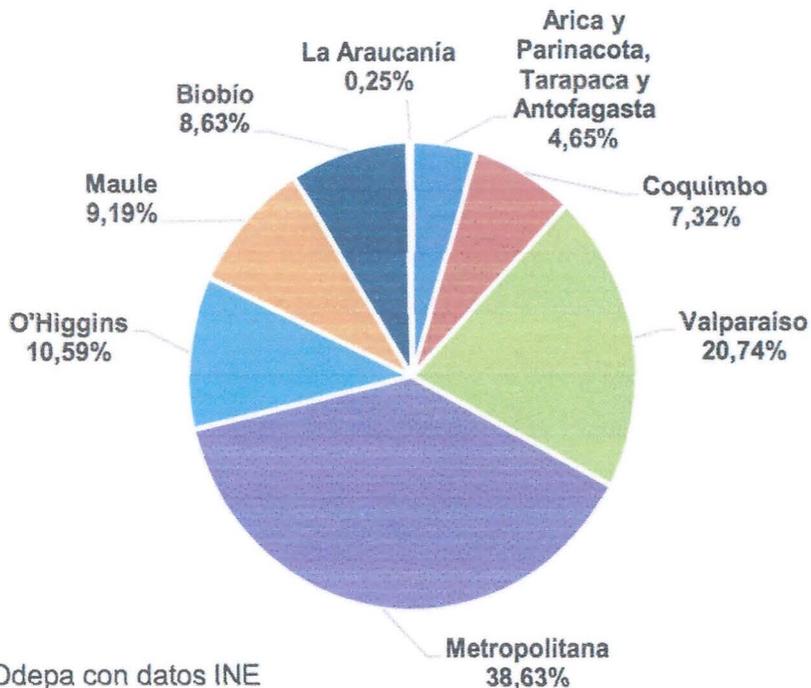
2. SITUACIÓN NACIONAL

En el siguiente apartado se dirigirá la atención hacia el mercado nacional y sus características específicas con el objetivo de alcanzar un entendimiento más amplio de cómo opera y como se relaciona con las variables macroeconómicas mencionadas anteriormente en el estudio, además de obtener un catastro de los productos presentes en este mismo.

De acuerdo con la información que entrega la Asociación de Productores de Huevo (Asohuevo), la producción industrial alcanzó 3,21 billones de unidades en 2013, proyectándose un incremento de 5,9% para 2014, y así alcanzar a 3,4 billones de unidades.

Con respecto a la venta de pollitas de un día, la asociación reporta un incremento de 3,3% en el período enero-octubre de 2014, en comparación al año anterior, esto a pesar de la baja en 3,4% registrada en octubre con respecto del mismo mes de 2013.

Según la última Encuesta de Criaderos de Aves que realiza el Instituto Nacional de Estadísticas (INE), correspondiente al primer semestre 2014, la producción de huevo se concentró principalmente en las regiones Metropolitana, de Valparaíso y O'Higgins, originando en conjunto el 70% de la producción nacional, tal como se indica en la gráfica 8. Del total producido, 89% fue destinado a huevo para consumo (1,56 billones de unidades) y 11% para incubación (194 millones de unidades).

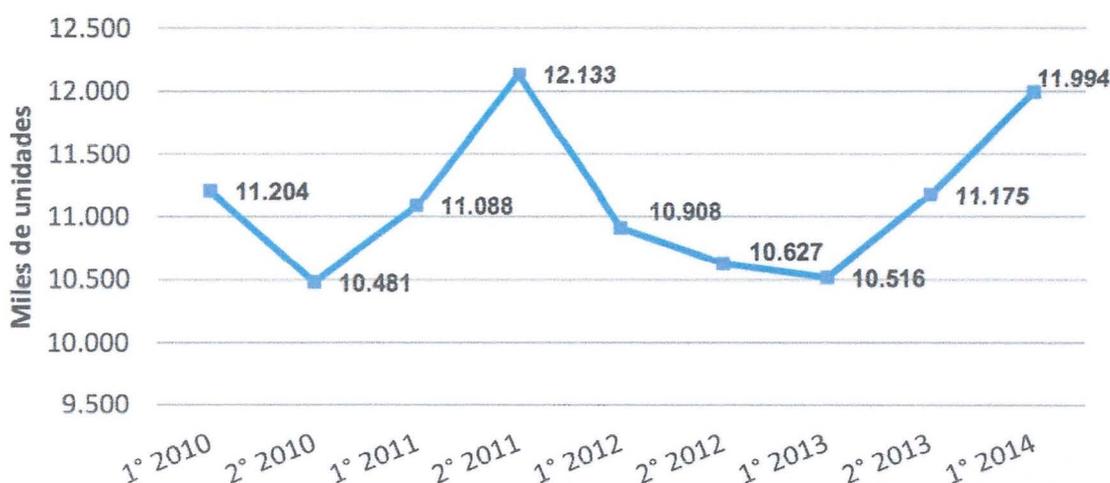


Grafica 8 Porcentaje de producción de huevos por región

Con los datos presentados por la ODEPA, claramente la zona central destaca como el mercado de mayor tamaño (donde se produce una mayor cantidad de huevos), además es también donde se concentran la mayor cantidad de productores de huevos, de acuerdo a datos de la ASOHUEVO, un 68,57% de sus miembros se encuentran ubicados en esta zona, es por esto que el estudio se enfocará en atacar estos mercados meta (V y Región metropolitana), los cuales en su conjunto presentan un 59,37% del total de la producción de huevo a nivel nacional.

Las aves de postura (incluyen a las aves adultas y de crianza) totalizaron 14,31 millones a fines del primer semestre de 2014, lo que significó a un aumento de 12,3% con respecto a igual período del año pasado. Del total de ponedoras, 84% correspondió a aves adultas, lo que representó un incremento de 14,1% con respecto al primer semestre de 2013. En el gráfico 5 se puede apreciar la evolución de las existencias de aves ponedoras. Al 30 de junio de 2014 se informó

la existencia de casi 12 millones de gallinas, de las cuales 9 millones eran productores de huevos blancos y cerca de 3 millones correspondían a productoras de huevos de color, tal como se observa en el cuadro 1. En la información presentada se visualiza un aumento del número de aves alojadas a partir del primer semestre de 2013, luego de un año 2012 con bajas existencias debido a la menor compra de pollitas de un día por parte de la industria durante ese período, la cual cayó 4,5% con respecto al año anterior. Asimismo se observa que la tendencia en la reposición de las aves continúa al alza, por lo que se espera que el segundo semestre del año finalice en esa misma dinámica. (Ministerio de Agricultura)

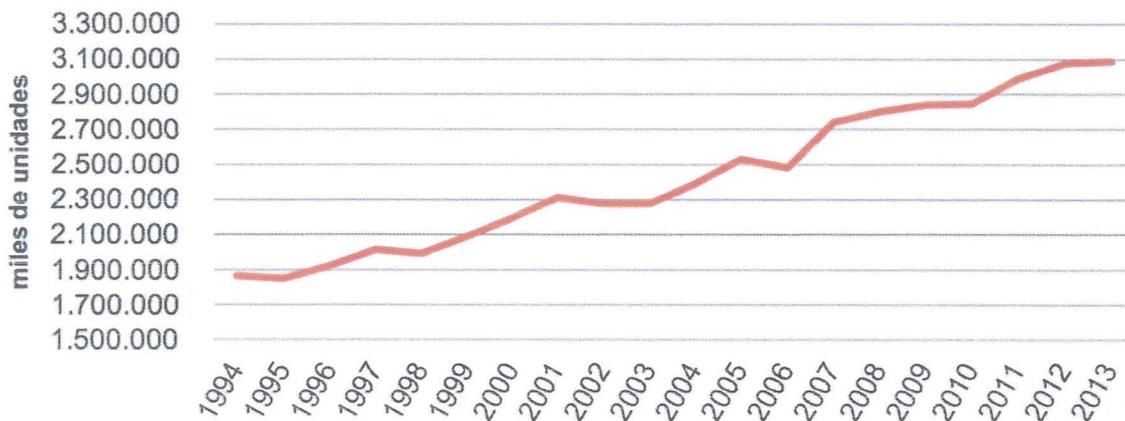


Fuente: Odepa con datos INE

Gráfica 9 Evolución del número de gallinas productoras de huevo

Al observar la evolución de la producción durante los últimos años en la gráfica 10, destaca el alza de 10,5% ocurrida en 2007 luego de una baja de 2% el año anterior. El crecimiento en la producción en el período 2002 - 2013 registró una variación de 35,7%, lo que significa una tasa de crecimiento promedio de 2,8% anual. Los factores que explicarían este crecimiento son la incorporación de nuevas tecnologías, una genética cada vez más especializada en la productividad

por ave y la mejor conversión de alimento, inversiones en infraestructura, así como el mejoramiento continuo de la sanidad de las aves. Por otro lado, una demanda robusta y creciente por proteína animal de alta calidad a bajo costo en el país, ha contribuido al desarrollo sostenido del sector a lo largo de los años. (Ministerio de Agricultura)



Fuente: Odepa con datos INE

Grafica 10 Evolución en la producción de huevos de consumo

En el gráfico 7 se observa los precios medios mayoristas de huevo blanco. Actualmente, el precio real promedio a nivel país (período enero-octubre) ha caído 2,9% si se compara con igual período del año 2013. Puntualmente el precio registrado en octubre fue 2,6% inferior al mismo mes del año pasado y 10% bajo el de septiembre de este año. Los menores costos de alimentación, sumado a la mayor oferta de huevo durante este año, podrían explicar en parte este comportamiento. Por otro lado, la evolución natural del precio del huevo es a decaer en los meses de primavera-verano debido al aumento de la oferta proveniente de aves de traspatio, las que debido a condiciones naturales, como la mayor luminosidad, tienden a elevar su producción en forma considerable en este período. Luego de los altos precios registrados en 2013, este año los niveles promedio se han mantenido por debajo de los vistos el año pasado, siendo relativamente estables los primeros cinco meses del año, rondando los \$6.000 la caja de cien unidades. Sin embargo, en junio comenzó una tendencia al alza

alcanzando su máximo en septiembre, para luego decaer en cerca de 10% en octubre, ubicándose por debajo del precio del mismo mes del año pasado. (Ministerio de Agricultura)



Fuente: Odepa

Grafica 11 Precios reales de huevo blanco en mercado mayoristas

La industria chilena del huevo es poco competitiva en el mercado mundial, logrando hasta el momento participaciones muy marginales. Las importaciones de huevo deshidratado (códigos SACH: 4089100 y 4081100) alcanzaron a 106,4 toneladas durante 2013, provenientes principalmente de Perú y Argentina. Este volumen significó un alza de 43,3% con respecto al año 2012. En el período enero-noviembre de 2014 se han importado 138.123 kilos, es decir cerca de 30% más que todo el volumen ingresado en 2013, restando aún un mes de importaciones. Los principales orígenes fueron Alemania (10.000 kilos), Argentina (18.000 kilos) y Perú (108.800 kilos). Las importaciones de huevo sin cáscara frescos, cocidos, moldeados, congelados o conservados (códigos: 04081900 y 04089900) han anotado también significativos aumentos en volumen, aun si bien siguen siendo participaciones menores. Durante 2013 se importó 253.000 kilos de estos productos, mientras que el año anterior ingresaron 63,7 mil kilos, lo que refleja un alza de 297,2%. Una situación similar es la que se observa en el monto

acumulado a noviembre de 2014, donde han ingresado 300 mil kilos, lo que señala 27% de aumento con respecto al mismo período de del año pasado. A casi finales de 2014, se han exportado al Reino Unido cantidades menores de huevo fecundado para incubación (9.045 kilos), y 3.400 kilos de huevo fresco a su territorio insular en América.

3. ANÁLISIS DEL MERCADO NACIONAL

A partir del análisis realizado en el apartado 1 y 2, en el cual se presentaron principalmente datos presentados por la ODEPA relacionados con el mercado tanto nacional como internacional del huevo, podemos resumir que nos encontramos con un mercado saludable con un crecimiento anual cercano al 3%, los factores que explican el crecimiento de este mercado son principalmente un crecimiento en la demanda del producto, tanto en cantidad de consumidores como en cantidad por consumidor, en el siguiente apartado exploraremos los productos existentes en el mercado además de sus respectivos precios y como son distribuidos.

En Chile existen alrededor de 47,7 millones de aves con fines productivos. Del total de aves, 26,7% corresponden a productoras de huevos para consumo (12,7 millones de gallinas). La industria del huevo en Chile está en manos de aproximadamente 300 productores, donde 57 de ellas concentran el 90% de la producción y se ubican principalmente en la zona central del país. La producción nacional de huevos está conformada por un gran sector industrial que aporta alrededor de 3.200 millones de huevos al año y la producción de traspatio (pequeños productores), cuya producción es menos relevante para la economía nacional, pero cumple un rol socioeconómico importante en la economía doméstica. (Ministerio de Agricultura)

En cuanto al consumidor nacional, en Chile existe un amplio y variado mercado, marcado por un crecimiento en el consumo y en la variedad de los productos que podemos encontrar, los cuales han ido evolucionando a lo largo de los años de la mano de la innovación en distintos eslabones de la cadena de valor es importante identificar la innovación como uno de los atributos diferenciadores en el mercado actual, el cual ha impulsado el desarrollo y la diversificación de la oferta en el mercado actual de huevos, tanto a nivel nacional como internacional, hoy en día la

innovación es propuesta como alternativa para la diferenciación dentro de una empresa.

3.1 OFERTA

En este apartado estudiaremos la oferta desde el punto de vista del consumidor final, así podremos identificar cuál o cuáles son los canales más comunes para la distribución de huevo, cuales son los tipos de productos que se ofrecen en el mercado y que es lo que está influenciando más a los clientes a la hora de tomar una decisión de que producto elegir.

A nivel nacional la oferta puede separarse en dos tipos de productos, para todas las categorías de huevo, envasados y a granel, la oferta a granel se encuentra concentrada en comercios minoristas, en los cuales los consumidores pueden encontrar el producto que buscan en la cantidad que necesitan, en este caso particular no existe un agregado de valor más allá del color y tamaño del huevo, lo cual para el caso de estudio no es de utilidad para el análisis ya que no abarca los clientes a los que apunta el producto que se pretende desarrollar.

Por otro lado nos encontramos con los productos envasados, para los cuales existe una gran variedad de marcas, precios y empaques.



Ilustración 4 Formatos Huevos Gallina Feliz

Por ejemplo en el caso de la marca de huevos gallina feliz, nos encontramos con un producto que ha decidido diferenciarse con la procedencia de su producto debido al auge que ha tenido el tema del maltrato animal en la producción de

huevo, aprovechando la información que es entregada a través de los medios e identificando un nicho de mercado correspondiente a consumidores que no son vulnerables al precio, la marca gallina feliz ha decidido apuntar a un segmento más pequeño y su producto tiene un valor entre un casi 90% superior a sus pares genéricos envasados.



Ilustración 5 Productos que apuntan a la economía de escala

Por otro lado podemos encontrar productos que apuntan a consumidores que valoran el hecho de realizar menos compras en el mes y que buscan alcanzar un precio más económico, este tipo de producto no apunta a diferenciarse por un atributo de valor específico, sino más bien se concentra en un segmento específico sin un mayor grado de innovación y corresponde a una de las corrientes más tradicionales en la venta de huevos, en un empaque más tradicional (imagen de la derecha) y un empaque más innovador que busca diferenciarse de su competencia agregando valor a través del packaging en un segmento que si bien se caracteriza por ser más conservador al momento de comprar también valora de manera positiva los esfuerzos que realizan la marcas por diferenciarse de su competencia.

Finalmente nos encontramos con un producto que se ha diferenciado a través de la integración de la tecnología en su línea productiva y que corresponde a los huevos con Omega 3.



Ilustración 6 Huevos con Omega 3

Los huevos con Omega 3, han comentado a hacerse más populares entre los productores de huevo a nivel nacional, y apuntan a un segmento de cliente que valora la salud y es menos sensible al precio, este producto puede ser encontrado en modalidades de 6 y 12 unidades al igual que los huevos Gallina Feliz.

3.2 CANALES

3.2.1 RETAIL

Corresponde al canal donde los clientes pueden encontrar una amplia gama de productos y es el canal principal para la comercialización de un producto diferenciado en el mercado del huevo, es en este lugar donde se puede encontrar una mayor variedad de productos, y es en el cual las marcas compiten por posicionarse, dentro de este canal, la empresa Jumbo es la que se ha diferenciado por ofrecer una mayor variedad y calidad en sus productos, mientras que su competencia líder apunta a liderar en cuanto a precios.

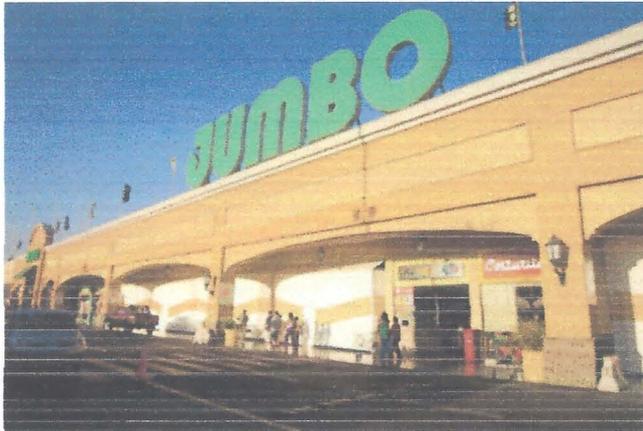


Ilustración 7 Empresa de Retail

3.2.2 MINORISTAS

Por otro lado el mercado de los minoristas corresponde a almacenes de barrio, y medianas empresas, las cuales cuentan con una limitada variedad de productos.

Se estimó que la el canal de ventas a través de la web no se considerará para motivos del estudio, ya que el mercado no cuenta con un volumen atractivo por el momento.

3.3 PRECIOS

Uno de los factores más importantes para entender si un producto de las características que se pretende desarrollar podrá tener éxito o no en el mercado nacional es comprender cuales son los precios a los que está sometido el consumidor final y los márgenes que manejan los distribuidores de estos productos.

Para esto nos concentraremos en la oferta que se presenta en tres grandes marcas del retail nacional como lo son Jumbo, Líder, y Tottus que son los canales más comunes para la compra de huevos que apuntan a diferenciarse por un agregado de valor en su propuesta, como es el caso de los mencionados anteriormente

Tabla 1 Precios de huevo por unidad en Supermercado Tottus

Marca	Tipo de huevo	descripción		Precio
Tottus	Blanco	grande	un	138
Huevos de hoy	Blanco	primera	un	133
Huevos de hoy	Blanco	primera	un	142
Omega 3 Plus	Color	omega 3 plus	un	250
Omega 3	Color	omega 3	un	230
Tottus	Blanco	grande	un	179
Yemita	Blanco	extra	un	165
Tottus	Color	extra	un	145
Yemita	Blanco	extra	un	165
Omega 3	Color	grande omega 3	un	205
Cintazul	Blanco	extra	un	162
Cintazul	Blanco	grande	un	157
Cintazul	Color	grande	un	160
Tottus	Blanco	grande	un	148
Yemita	Blanco	grande	un	150
Huevos de hoy	Blanco	extra	un	150
Huevos de hoy	Blanco	primera	un	145
Yemita	Color	grande	un	174
Omega 3 Plus	Color	omega 3	un	267

La empresa Tottus cuenta con una gama media de marcas, y sus precios varían desde los \$133 hasta los \$267.

Tabla 2 Precios de huevo por unidad en supermercado Líder

Marca	Tipo de huevo	descripción		Precio
Líder	Blanco	grande	un	126
Yemita	Blanco	extra grande	un	148
Cintazul	Blanco	grande	un	157
Líder	Blanco	grande	un	115
Líder	Color	grande	un	124
Yemita	Blanco	grande	un	132
Líder	Blanco	extra	un	140
Yemita	Color	grande	un	140
Cintazul	Blanco	grande	un	140
Yemita	Blanco	extra	un	149
Cintazul	Blanco	extra grande	un	154
Cintazul	Color	grande	un	157
Cintazul	Blanco	extra grande	un	162
Cintazul	Color	extra grande	un	162
Omega 3	Color	omega 3	un	190
Líder	Blanco	grande	un	129
Cintazul	Blanco	extra	un	144
Yemita	Blanco	extra	un	159

Líder	Blanco	mediano	un	109
Yemita	Blanco	mediano	un	123
Cintazul	Blanco	mediano	un	126

La empresa Líder, lidera en cuanto a precios bajos, los cuales van desde los \$109 por unidad, pero cuenta con una baja variedad de productos en su oferta como canal, la cual está dominada por su marca propia y dos competidores, sin embargo podemos encontrar una menor variación en el rango de precios,

Finalmente el supermercado Jumbo es quien presenta la mayor variedad en cuanto a su oferta y se pueden encontrar 8 marcas distintas entre sus góndolas, Jumbo se alza claramente como el canal preferido por las marcas que buscan diferenciarse agregando valor en sus productos, también cuenta con la marca con el precio más alto con un valor de \$285 la unidad, es así como Jumbo se presenta como la mejor propuesta para ingresar al mercado y competir directamente con otras marcas que apuntan a la diferenciación como un atributo de valor que les permite segmentar a sus clientes menos venerables al precio y aumentar los ingresos percibidos por sus productos.

Tabla 3 Precios del huevo por unidad en supermercado Jumbo

Marca	Tipo de huevo	Descripción		Precio
Gallina feliz	Color	gallinas libres	un	316
Gallina feliz	Color	gallinas libres	un	322
Prado Alto	blanco	Premium King size	un	230
Ecoterra	blanco	gallinas libres	un	283
Prado Alto	Color	Premium King size	un	242

Ecoterra	Color	gallinas libres	un	285
Cintazul	blanco	extra	un	162
Santa Marta	blanco	extra	un	161
Santa Marta	Color	extra	un	171
Cintazul	blanco	extra	un	165
Jumbo	blanco	extra	un	150
Las Rastras	Color	de campo	un	232
Cintazul	blanco	grande	un	158
Jumbo	blanco	grande	un	142
Santa Marta	blanco	grande	un	157
Cintazul	blanco	grande	un	150
Santa Marta	blanco	grande	un	150
Cintazul	blanco	grande	un	167
Santa Marta	blanco	grande	un	158
Cintazul	Color	grande	un	162
Jumbo	Color	grande	un	152
Omega 3	Color	grande omega 3	un	208
Santa Marta	Color	grande	un	162
Cintazul	Color	grande	un	154
Santa Marta	Color	grande	un	153
Omega 3	Color	grande omega 3	un	233
Omega 3	Color	grande omega 3 plus	un	258

Cintazul	Color	grande	un	192
Omega 3	Color	grande omega 3 plus	un	270
Prado Alto	blanco	Premium	un	183
Prado Alto	Color	Premium	un	202
Cintazul	blanco	súper extra	un	183
Santa Marta	Color	omega 3	un	192

4 PRODUCTO

4.1 PROBLEMA

La salmonelosis transmitida por huevos y carne de aves es considerada como uno de los principales brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, produciendo importantes costos para la Salud Pública y la industria Avícola. La prevención de la transmisión radica principalmente en la implementación de técnicas de higiene en los productores y la educación del consumidor, sin embargo los índices de enfermedades siguen siendo altos en nuestro país generando en algunos casos la muerte. Las contaminaciones de huevos con salmonella se convierten en un problema significativo por el habitual consumo de productos crudos o mal cocidos por el común de la población. El problema radica en que los productores avícolas no cuentan con sistema que asegure la calidad microbiológica de sus productos y los sistemas de control e inmunización desarrollados y utilizados en otros países no son aplicables a nuestro país.

4.2 OPORTUNIDAD

La generación de una vacuna de las características mencionadas genera numerosas oportunidades de negocio para el desarrollo de soluciones innovadoras que implementen esta tecnología, en este estudio nos enfocaremos en la generación de un modelo vinculado a la comercialización de dichas vacunas y como la implementación de esta vacuna por los usuarios finales podría impactar el mercado del huevo a nivel nacional.

4.3 SOLUCIÓN

Desarrollar una Tecnología de Inmunización por vía oral contra la bacteria *Salmonella sp* en Aves y huevos para el mejoramiento de la producción avícola, entregando así, productos microbiológicamente más seguros para la comunidad y con la posibilidad de desarrollarla tecnología en otras zonas del país. Además se pretende tener un mayor impacto mejorando las técnicas de manejo aplicadas actualmente con miras a la reducción de contaminación cruzada.

4.4 INNOVACIÓN EN LA CADENA DE VALOR

A nivel nacional, la innovación ha tenido un amplio enfoque hacia los procesos, los cuales a lo largo de los años han ido tomando un mayor protagonismo en la innovación nacional en variados sectores, lo cual se ha visto reflejado en la literatura.

En particular, para casi todas las especificaciones se encuentran un efecto contemporáneo de la innovación en procesos sobre la productividad, pero no así para la innovación en productos. Este efecto menos robusto de la innovación en productos contrasta con la evidencia obtenida en estudios realizados en otros países. Los resultados de este trabajo también revelan la presencia de efectos diferidos de la innovación en procesos sobre la productividad y, nuevamente, efectos menos robustos de la innovación en productos. (Roberto Álvarez, 2011)

Por otro lado, otros estudios reflejan cómo se asocia la innovación nacional en las distintas regiones y que roles juegan el estado, las universidades y la industria, en la creación de un mercado más competitivo a partir de la innovación en la industria.

En consecuencia, el número de empresas que realizan innovaciones de proceso y de producto en cada región se ve determinado, en primera instancia, por el porcentaje de gasto en investigación y desarrollo que es ejecutado por las instituciones de educación superior. Por tanto, las universidades juegan un importante papel no solo en la formación de capital humano, sino que también en la producción de conocimiento, los que al ser transferidos al medio van generando sinergias en el sistema regional de innovación, incrementando así el número de empresas dedicadas a la realización de innovaciones, fundamentales por lo demás para lograr el crecimiento económico del territorio (Araneda-Guirrman, Pedraja-Rejas, & Ponce, 2014)

La industria del huevo ha estado marcada por el desarrollo de productos más nutritivos para los consumidores, así lo reflejan los estudios realizados por la Universidad de Chile En la Facultad de Ciencias Veterinarias, quienes han trabajado desde hace ya varios años en este campo, realizando estudios con la incorporación de diferentes productos en dietas de gallinas ponedoras, tales como ácidos grasos omega-3, vitamina E, carotenoides, polifenoles y fitosteroles, midiendo respuesta productiva de las aves, sus respuestas inmunes, características organolépticas del huevo y calidad externa e interna del huevo. (Cassus & Cornejo, 2006)

Del trabajo realizado hasta la fecha, se desprende que aún se necesita mayor información experimental para continuar con los avances descritos, así como para aportar mayor información sobre el efecto de algunos compuestos sobre la productividad de las gallinas y sobre las características organolépticas del huevo (Cassus & Cornejo, 2006)

El proyecto propone la innovación en dos eslabones de la cadena de valor, una de ellas tiene relación con la salud y está directamente relacionada con una enfermedad causada por los productos ovo cárnicos, la cual hasta el momento es tratada en base a la prevención y medidas presentes en el acuerdo de producción limpia, el cual impulsado por la ASOHUEVO tiene por objetivo implementar buenas prácticas agropecuarias en sus instalaciones, para así lograr una producción de huevos con estándares ambientales superiores, mejorando los niveles de competitividad del sector y protegiendo al medio ambiental asociado. (Consejo Nacional De Producción Limpia, 2011). Por otro lado se propone una innovación desde el punto de vista del marketing al innovar en cuanto al packaging del producto generando un envase con 7 unidades bajo la premisa de un huevo al día, sin embargo en una encuesta realizada en el gran Santiago en el año 2006 los encuestados asocian a mejor calidad del huevo, en orden decreciente, los siguientes factores externos: tamaño, estado de la cáscara, color de la cáscara, precio, limpieza de la cáscara, marca, por último la refrigeración y el tipo de envase y además las siguientes características internas del huevo: Olor, color de la yema, consistencia de la clara, manchas en yema y clara y la dureza de la cáscara. (Uson, 2006). Esta misma encuesta reveló que los Chilenos no cuentan con una cultura en cuanto a los requerimientos de refrigeración del huevo y como conservar sus propiedades organolépticas.

5 CONSUMIDORES

Según una encuesta realizada el año 2009 el tipo de envase, en general es un atributo poco relevante, sin embargo, entre ambos estratos la diferencia se debe a que el estrato B (segmentos socioeconómicos C y D) considera que es de poca importancia (35,8%), en cambio el estrato A (segmento ABC1) de mediana importancia (47,9%).

Los atributos refrigeración, precio, tipo de envase y marca presentan diferencias significativas y éstas se dan por que el estrato B es el que le otorga menor importancia a estos atributos y al analizar el caso de la refrigeración, ambos estratos (A y B) coinciden en otorgarle la mayor ponderación a poca importancia, con un 64,6% y 63,9%, respectivamente.

Por otro lado aún no se ha generado en los clientes la necesidad de un producto libre de salmonelosis, ya que los casos se han mantenido aislados y el consumidor se encuentra poco informado, por otro lado atributos como el bienestar animal y la contribución nutricional de los productos son más valorados por los consumidores.

Es por esto que el producto debe apuntar al segmento ABC1, el cual es menos sensible a variaciones en el precio, además asocia el empaque a la calidad del producto, con lo cual se podría obtener resultados positivos apuntando hacia una innovación en ese ámbito.

La región metropolitana de Santiago corresponde al mercado de mayor tamaño para introducir un producto de las características que sé que se busca generar, además cuenta con una variada oferta de canales para la distribución y comercialización del producto.

6 ESTRATEGIA DE INGRESO AL MERCADO

6.2 IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE INTERÉS

En este apartado estudiaremos todas las partes interesadas en el desarrollo de esta tecnología y como esta podría impactar directamente a cada uno de ellos, enfocando nuestro análisis en la oportunidad que genera el ingreso al mercado de un producto libre de salmonella que no reduce la productividad de los planteles.

- **CLIENTE**

Empresas del rubro médico veterinario y farmacéutico que producen y comercializan sus productos, tales como Bayer División Animal, DSM Nutritional Products SA o Veterquímica por mencionar algunas. Estas producen y/o comercializan el concentrado inmunogénico.

- **USUARIOS**

Productores avícolas nacionales que producen huevos de gallina, que compran el producto inmunogénico para obtener huevos libre de salmonellas y comercializan sus huevos a través de las cadenas de comercialización existentes

- **CONSUMIDORES FINALES**

Consumidores de huevos que valoran la seguridad por sobre el precio, que consumen regularmente el producto.

Para lograr un ingreso positivo al mercado es importante realizar un proceso de diseño que se base en la necesidades reales del cliente, es por esto que es de vital importancia generar mayor información en el mercado en cuanto a la salmonelosis, ya que actualmente el mercado se ha diferenciado principalmente en base a la necesidades detectadas por parte de los consumidores finales, quienes a lo largo de la última década han aumentado su preocupación e interés en conocer la procedencia, calidad e información nutricional de los alimentos que

consumen, lo cual ha quedado demostrado en la literatura, tanto a nivel nacional, como internacional. Actualmente los mercados más desarrollados buscan en sus productos no solo condiciones organolépticas óptimas, sino que otras variables que han llevado a los productores de una variedad de mercados a mejorar tanto sus condiciones de producción como los sueldos de sus trabajadores y otras variables importantes, como por ejemplo el bienestar animal. La experiencia de productores de huevos, lácteos y cecinas en Europa, donde la creación de valor en estos productos para el mercado, ha llevado a las empresas a considerar el bienestar de los animales como fundamental y a las autoridades a regular la información que se entrega al público sobre el tipo de producción, para asegurar una elección informada.

De esta manera, por ejemplo, actualmente un 37% de los huevos comercializados en Francia son producidos en modalidad *free range* o con gallinas criadas con espacio para moverse, al contrario de lo que ocurre en la producción masiva de huevos, factor que incluso ha hecho que en países como Nueva Zelanda estos productos sean certificados como “libres de crueldad”. En el mismo sentido, el centro Wageningen de Dinamarca creó el sistema Randeel para producción de huevos, consistente en un área circular que permite la circulación de las gallinas y el desarrollo de la actividad recolectora de manera más cómoda para los operarios, y que además contempla instalaciones para el desarrollo de visitas guiadas que le permitan a la comunidad conocer el método empleado y asegurar al público cierta trazabilidad en los huevos, lo que en sí ya constituye una estrategia de marketing. (Lensink)

Por lo cual es importante en primera instancia validar el producto con el segmento objetivo al cual se desea apuntar, para posteriormente buscar un acuerdo de comercialización con el canal elegido.

7 CONCLUSIONES

El mercado interno continúa siendo el principal destino de la producción nacional.

Una demanda interna robusta y la menor competitividad de la cadena productiva nacional, para llegar a mercados externos en comparación con otros países de la región, marcan esta tendencia.

La innovación en el sector del huevo ha estado marcada por mejoras en la producción mediante la implementación de nuevas tecnologías que mejoran la productividad de los planteles, por otro lado la innovación del producto está marcada por la integración de diferentes tipos de aditivos a la alimentación de los planteles que se traducen en productos con distintas características organolépticas, entre ellas el Omega 3 y que ha probado ser un caso de estudio interesante para considerar.

La innovación en cuanto al packaging no se ha considerado como una alternativa para la diferenciación de ninguna marca actualmente pero podría considerarse como una alternativa válida para ingresar al mercado y podría traer consecuencias positivas en cuanto a la rentabilidad de la venta de un producto segmentado por precio, es importante considerar la optimización en cuanto al transporte como una de las variables primordiales para la elección de una configuración para 7 huevos, la cual al no ser considerada podría traer consecuencias en cuanto al costo de transporte y la escalabilidad del producto.

El desconocimiento general de los consumidores en cuanto a la salmonella hacen que este atributo sea de poco interés en el mercado, es por esto que una estrategia para abarcar esta problemática es generar una certificación que se relacione con el método de inoculación investigado, la cual puede no solo ser implementada por el producto que buscamos generar, sino también por otras marcas que apuntan a un segmento más alto y se diferencian por precio y otros atributos organolépticos, que implementen la inoculación vía oral.

Es importante señalar que el mercado del huevo ha desarrollado un alto grado de dinamismo en la última década, lo cual podría significar que más productos busquen diferenciarse en cuanto a tecnología y packaging por lo cual es importante considerar como se levantarán barreras de entrada para proteger la cuota de mercado a la cual se busca apuntar.

BIBLIOGRAFÍA

Ministerio de Agricultura. (s.f.). *Odepa*. Obtenido de Oficina de estudios y políticas agrarias:
<http://www.odepa.cl/rubro/huevos/>

Uson, R. P. (2006). *Percepción de calidad de huevo vista por un grupo de consumidores del gran santiago*. Santiago.

Araneda-Guirriman, C., Pedraja-Rejas, L., & Ponce, E. R. (2014). *Innovación en las regiones de Chile: una aproximación desde el análisis de sus empresas*. Arica.

Consejo Nacional De Producción Limpia. (Agosto de 2011). *Producción limpia*. Obtenido de [cpl.cl](http://www.cpl.cl/):
<http://www.cpl.cl/Noticias/537-produciendo-huevos-con-compromiso-ambiental>

Roberto Álvarez, C. B.-O. (Agosto de 2011). Innovación, investigación y desarrollo, y productividad en Chile. *Revista CEPAL* .

Cassus, D. G., & Cornejo, D. S. (2006). HUEVOS NUTRACÉUTICOS: EN LA BÚSQUEDA DEL "SÚPER HUEVO".

Lensink, J. (s.f.). *Centro de innovación Anacleto Angelini*. Obtenido de Novedades Actividades Noticias Newsletters : <http://centrodeinnovacion.uc.cl/bienestar-animal-pecuaria/>

Anexo 4

Medición proteínas por método BCA

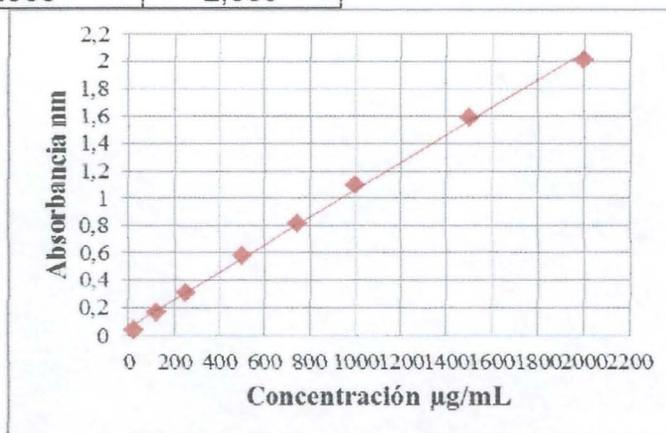
Mezclar reactivos 1 y 2 en proporción 50:1.

Utilizar 1 ml de reactivo más 50 μ L de muestra.

Leer a 562 nm en espectrofotómetro.

Curva de proteínas hecha con método BCA

Tubo	Concentración μ g/mL	Absorbancia nm
A	25	0,038
B	125	0,168
C	250	0,309
D	500	0,581
E	750	0,814
F	1000	1,096
G	1500	1,589
H	2000	2,009



Curva de proteínas hecha con método BCA

Anexo 2

Buffer de Lisis para sonicado

0.1% tritón x-100, glicerol 10%, Tris 50mM pH 8.0

PAGE. Gel concentrador 5%

6 mL de agua destilada

1,3 mL de solución Acrilamida/Bisacrilamida

2,5 mL Buffer Tris-HCl 0,5 pH 6,8

100 μ L de SDS 10%

100 μ L de Persulfato de amonio 10%

10 μ L de TEMED

PAGE. Gel separador 10%

8 mL de agua destilada

6,6 mL de solución Acrilamida/Bisacrilamida

5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8

20 μ L de SDS 10%

200 μ L de Persulfato de amonio

20 μ L de TEMED

PAGE. Solución de tñido (500 mL)

2,5 g de azul de coomasie 0,5%

250 mL de metanol 50%

50 mL de ácido acético 10%

Aforar con agua destilada hasta completar 500 mL

PAGE. Solución de desteñido (1 Litro)

100 mL de etanol 10%

100 mL de ácido acético 10%

800 mL de agua destilada

Test de Hemaglutinación

Se realizaron diluciones seriadas de acuerdo al siguiente; en cada pocillo de la placa de microaglutinación se agregaron 50 uL de solución salina al 0,9%. En el pocillo 2 se agregaron 50 uL de muestra diluida 1/10 y se continuo haciendo diluciones seriadas (1/20; 1/40; 1/80; 1/160; 1/320; 1/640; 1/1080; etc). Luego se agregaron a todos los pocillos 50 uL de glóbulos rojos de grupo O lavados al 2%. También se realizó un control con sueros tipificadores anti-B. Se incubó la placa a temperatura ambiente 1 hora. Luego se observó la capacidad aglutinadora de la suspensión.

Llegando a obtener una aglutinación visible en la dilución 1/512



**SANTO
TOMÁS**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**RESPUESTA INMUNE DE POLLITAS LOHMAN
INMUNIZADAS POR VÍA ORAL CON
SALMONELLA ENTERITIDIS INACTIVADA:
EVALUACIÓN DE 4 POTENCIALES ADYUVANTES
MUCOSALES.**

**TESIS PARA OPTAR AL
TÍTULO PROFESIONAL DE
TECNOLÓGO MÉDICO**

MARÍA CONSTANZA PARDO CISTERNA

	Nota	Firma
Profesor Guía: T.M. Carlos Cisternas Arapio	_____	_____
Profesor Informante: T.M. Karen Villagrán Andrade	_____	_____

**Temuco, Chile
Abril 2014**

UST

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

INMUNIZACIÓN POR VÍA ORAL DE GALLINAS LOHMANN CONTRA BACTERIAS DEL GÉNERO *SALMONELLA ENTERITIDIS*. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE 3 PROTOCOLOS DIFERENTES.

TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA

DANNSY BELÉN VARELA GODOY

Profesor Guía Carlos Roberto Cisternas Arapio
Temuco, Chile
Enero, 2014



**SANTO
TOMÁS**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

Inducción de Respuesta Inmune en pollitas Lohman White,
frente a antígenos de *Salmonella* Enteritidis inactivados y
asociados a diferentes potenciales coadyuvantes de mucosas.

**TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA**

LUIS ADELFO COLIHUINCA LLANCAPÁN

Profesor Guía: T.M. Carlos Roberto Cisternas Arapio

**Temuco, Chile
Noviembre, 2014.**



**SANTO
TOMÁS**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

Evaluación del efecto adyuvante de 4 extractos naturales sobre la respuesta inmune inducida por inmunización oral contra *Salmonella* Enteritidis en gallinas de la línea Lohman Lite

**TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA**

ERIC LEANDRO ORMEÑO PAILLALEF

Profesor Guía: T.M. Carlos Roberto Cisternas Arapio

**Temuco, Chile
Julio, 2015**

UST

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**CURVA DE ANTICUERPOS MATERNOS EN POLLITAS DE LA LINEA
LOHMANN LITE A PARTIR DE LA ECLOSIÓN**

Tesis para optar al
Grado Licenciado de
Tecnólogo Médico

CRISTIAN MARCELO CANDIA CASTRO

**Profesor Guía T.M. Karen Lorena Villagrán Andrades
Temuco, Chile
Noviembre, 2014**



UST

**ESCUELA DE
TECNOLOGÍA MÉDICA**

**PREVALENCIA DE SALMONELLA SPP. EN
MUESTRAS OBTENIDAS DE ORIGEN AVIAR EN
AVÍCOLAS DE LA
DE LA REGIÓN DE LA ARAUCANÍA.**

**Tesis para optar al
grado académico
de licenciado en
Tecnología Médica.**

Alumno: Vanina Macarena Cuevas Morales

Profesor guía: T.M. Karen Villagrán Andrade, Lic.

Temuco, 2015



**SANTO
TOMÁS**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

Inducción De Respuesta Inmune Secundaria En Gallinas
Inmunizadas Por Vía Oral Con *Salmonella Enteritidis* Y
Diferentes Coadyuvantes:
Respuesta De Anticuerpos IgM, IgY e IgA

**TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA**

**Katherine Lissette Ortega Escobar
Profesor Guía: T.M. Carlos Roberto Cisternas Arapio**

**Temuco, Chile
Enero, 2015.**

UST

UNIVERSIDAD DEL DIFUS

Escuela de Tecnología Médica

ESTANDARIZACIÓN DE PCR MÚLTIPLE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* ENTERITIDIS Y *Salmonella* TYPHIMURIUM.

**Tesis de Título para optar
al Grado de Licenciado en
Tecnología Médica**

YASNA KARINA MONTERO VASQUEZ
Profesor Guía TM. Karen Lorena Villagrán Andrade.
Temuco, Chile
Marzo, 2014

**UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES Y
MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

**EVALUACION DE LA INMUNIZACION ORAL DE
POLLITAS LOHMAN LITE CON DERIVADOS
PROTEICOS DE SALMONELLA ENTERITIDIS Y
DISTINTOS COADYUVANTES DE ORIGEN
VEGETAL MICROENCAPSULADOS Y NO
MICROENCAPSULADOS.**

**MEMORIA PARA OPTAR
AL TITULO
DE MÉDICO VETERINARIO**

YENNIFER NATALIA COLIN SANHUEZA

**DOCENTE GUÍA: Nancy Ruiz Diaz Riquelme MV.M.Sc
INFORMANTE INTERNO: Carlos Cisternas T.M M.Sc**

**TEMUCO – CHILE
2014**

UST[®]

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

**UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES Y
MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

“EVALUACIÓN DE IgY DE GALLINAS ANTI SALMONELLA ENTERITIDIS, DESAFIADAS EXPERIMENTALMENTE CON SALMONELLA ENTERITIDIS A GALLINAS PONEDORAS EN PRODUCCIÓN”

MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO

KARINA SOLEDAD ORTIZ CARRASCO

**DOCENTE GUÍA: Nancy Ruiz Diaz Riquelme MV.M.Sc
INFORMANTE INTERNO: Carlos Cisternas T.M M.Sc**

TEMUCO
2013

UST[®]

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

**UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES Y
MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

EVALUACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN ORAL DE POLLITAS LOHMANN BROWN UTILIZANDO ANTIGENO DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* MICROENCAPSULADO.

MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO

RICHARD MARCELO DUBREUIL NAVARRETE

**DOCENTE GUÍA: Nancy Ruiz Diaz Riquelme MV.M.Sc
INFORMANTE INTERNO: Carlos Cisternas T.M M.Sc**

TEMUCO, CILE
2013

UST[®]

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

**UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES Y
MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

“CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE IgA, IgY E IgM EN SANGRE DE GALLINAS PONEDORAS INOCULADAS CON ANTÍGENOS DE SALMONELLA ENTERITIDIS”

**MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO**

LUISA ELVIRA JARA SEPULVEDA

**DOCENTE GUÍA: Nancy Ruiz Diaz Riquelme MV.M.Sc
INFORMANTE INTERNO: Karen Villagran T.M
INFORMANTE EXTERNO: Carlos Cisternas T.M M.Sc**

**TEMUCO – CHILE
2013**

UST[®]

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS

**UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES Y
MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

“DETECCIÓN DE CEPAS DE *SALMONELLA SPP.* EN HECES, HISOPOS CLOACALES Y CÁSCARA DE HUEVO, EN GALLINAS PONEDORAS BAJO DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN”.

MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO

ALUMNA: Claudia Andrea González Salgado

**DOCENTE GUÍA: Nancy Ruiz Diaz Riquelme MV.M.Sc
INFORMANTE INTERNO: Karen Villagran T.M
INFORMANTE EXTERNO: Carlos Cisternas T.M M.Sc**

TEMUCO – CHILE

2013

ANEXO FICHAS TECNICAS

PROYECTO PYT 2013-0048

6. Fichas técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto.

FICHAS TECNICAS

El desarrollo del proyecto para la obtención de un inmunógeno que otorga protección a las gallinas ponedoras para producir huevos libres de salmonella, da origen a dos tipos de negocios:

- I. Negocio tecnológico: Definido por aquel que produce el inmunógeno y lo comercializa a las empresas productoras de huevos.
- II. Negocio Productivo: Definido como aquel que compra el inmunógeno para producir huevos protegidos de salmonella y los vende en el mercado de mayorista con un sobreprecio por tener este atributo.

A continuación se elaboran dos fichas técnicas y análisis financiero para cada tipo de negocio:

I: NEGOCIO TECNOLÓGICO : El negocio tecnológico es desarrollado por la universidad, quien generará el inmunógeno, para lo cual creará un laboratorio a escala productiva, para que en su primera etapa produzca cantidad para inmunizar 1.000.000 gallinas al año.

Mercado	Empresas productoras de huevos.
Tamaño Global del Mercado	Se estima en cerca de 12 millones de gallinas ponedoras en Chile (ver anexo 1 : Estudio y Caracterización de Mercado de Huevos en Chile)
Cantidad de gallinas inmunizadas	Se considera iniciar el proceso en uno o más planteles con el objetivo de lograr un universo de gallinas inmunizadas de 100.000 gallinas. Este tamaño es suficiente considerando que la estrategia comercial demanda un proceso de sensibilización del consumidor para adquirir este beneficio protector para la salud. Pero dependerá de cada empresa avícola el tamaño que está dispuesto considerar, y su estrategia comercial para lograrlo.
Costo del inmunógeno	El costo variable ha sido expresado por unidad de huevo protegido contra la salmonella. Este es de 0,75 pesos por huevo.
Valor de venta del inmunógeno	El precio del inmunógeno ha sido expresado por unidad de huevo, para facilitar el análisis. Este

	valor es de 5 pesos por huevo.
Horizonte de la evaluación	10 años
Tipo de evaluación	Pura
Crecimiento del negocio	10% anual. Se considera un escenario austero, ya que el beneficio es directo, y se estima que debido a que el aumento en el precio del huevo a consumidor no es significativo, el consumidor lo preferirá, por lo que más empresas desearan implementar la tecnología.
Tasa de crecimiento precio venta del inmunógeno	Se consideró que el precio de venta en la medida que productor detecte claramente su beneficio, y considerando un aumento en las materias primas para la fabricación del inmunógeno, subirá un 3% anual.

SENSIBILIZACION POR VOLUMEN DE GALLINAS INMUNIZADAS		
N° Huevos por día	TIR (%)	VAN (MM)
100.000	38,6	440
300.000	178,2	2550
1.000.000	503,0	10.371

II: NEGOCIO PRODUCTIVO : El negocio productivo corresponde a las empresas avícolas que han adquirido el inmunógeno de maneras que sus gallinas están protegidas , y así puede comercializar huevos protegidos contra la salmonella.

En este caso la empresa avícola tiene como único costo el costo del inmunógeno, porque se trata de un producto de muy bajo volumen que se agrega junto con el alimento y no requiere ni de infraestructura, ni aumento de personal. Si requerirá de un aumento en el costo de marketing y los diseños y tipos de envases necesarios para generar un efecto diferenciador en el consumidor final

Mercado	Empresas del rubro retail, especialmente supermercado y cadenas de restaurant y hoteles, que comercializan o consumen huevos.
Tamaño Global del Mercado Chileno	Se estima un consumo de cerca de 8 millones de huevos diarios (ver anexo XX : Estudio y Caracterización de Mercado de Huevos en Chile)
Cantidad de gallinas inmunizadas	Para fines de este análisis se ha considerado una plantel pequeño de 300.000 gallinas y que se inmuniza el 50% de ellas. Por lo que el universo de gallinas inmunizadas es de 150.000 unidades. Este tamaño es conservador ya que equivales al 1,25 % del universo total.
Precio de compra del inmunógeno	El costo para la empresa avícola es de 5 pesos por huevo, equivale a aproximadamente \$1.800 por gallina.
Precio de venta del huevo a mayorista	Se ha considerado para fines de análisis el aumento en el precio del huevo producto de este atributo. Este valor es el precio del inmunógeno, y ha sido expresado por unidad de huevo, para facilitar el análisis. Este valor es de 20 pesos por huevo.
Otros costos	Se tienen considerados costos de marketing, ya que será necesario desarrollar una estrategia para penetrar este producto en el mercado, entre las cuales se ha considerado un envase que genere una diferencia, una etiqueta que la

	identifique e incluso en una primera etapa una "lengüeta" explicativa sobre las características beneficiosas de un huevo libre de salmonella.
Horizonte de la evaluación	10 años
Tipo de evaluación	Pura
Crecimiento del negocio	10% anual.
Tasa de crecimiento precio venta del huevo libre de salmonella	El precio diferencial de venta del huevo libre de salmonella, en la medida que más productores adopten la tecnología, irá perdiendo capacidad de aumento de valor, por lo que el porcentaje de crecimiento fue considerado en 1%.
TIR (%)	318 %
VAN (MILES \$)	2.961.366

ANEXO 3: RESUMEN DE TESIS DE GRADO

TITULO	GRADO	LUGAR	INSTITUCION
EVALUACIÓN DE IgY ANTI-SALMONELLA ENTERITIDIS EN GALLINAS PONEDORAS EN PRODUCCIÓN, DESAFIADAS EXPERIMENTALMENTE CON SALMONELLA ENTERITIDIS TESISTA: KARINASOLE DORTIZ CARRASCO	MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL MEDICO VETERINARIO Año 2013	TEMUCO, CHILE	UNIVERSIDAD SANTO TOMAS ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
INMUNIZACIÓN POR VÍA ORAL DE GALLINAS LOHMANN CONTRA BACTERIAS DEL GÉNERO SALMONELLA ENTERITIDIS. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE 3 PROTOCOLOS DIFERENTES. TESISTA: DANNSY BELÉN VARELA GODOY	TESIS PARA OPTAR AL GRADO LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA Enero 2014	TEMUCO, CHILE	UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
RESPUESTA INMUNE DE POLLITAS LOHMAN INMUNIZADAS POR VÍA ORAL CON SALMONELLA ENTERITIDIS INACTIVADA: EVALUACIÓN DE 4 POTENCIALES ADYUVANTES MUCOSALES. TESISTA: MARÍA CONSTANZA PARDO CISTERNA	TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL TECNÓLOGO MÉDICO Abril 2014	TEMUCO, CHILE	UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
CURVA DE IGY DE ORIGEN MATERNO EN POLLITAS DE LA LINEA LOHMANN LITE A PARTIR DE LA ECLOSIÓN TESISTA: CRISTIAN MARCELO CANDIA CASTRO	TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL TECNÓLOGO MÉDICO Noviembre 2014	TEMUCO, CHILE	UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
INDUCCIÓN DE RESPUESTA INMUNE EN POLLITAS LOHMAN WHITE, FRENTE A ANTÍGENOS DE SALMONELLA ENTERITIDIS INACTIVADOS ASOCIADOS A DIFERENTES POTENCIALES COADYUVANTES DE MUCOSAS. TESISTA: LUIS ADELFO COLIHUINCA LLANCAPÁN	TESIS PARA OPTAR AL GRADO LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA Noviembre 2014	TEMUCO, CHILE	UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
EVALUACIÓN DE LA INMUNIZACIÓN ORAL DE POLLITAS LOHMANN BROWN UTILIZANDO ANTIGENO DE SALMONELLA ENTERITIDIS MICROENCAPSULADO CON DISTINTOS COADYUVANTES. TESISTA: RICHARD MARCELO DUBREUIL NAVARRETE	MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL MEDICO VETERINARIO Año 2014	TEMUCO, CHILE	UNIVERSIDAD SANTO TOMAS ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
DETECCIÓN DE CEPAS DE SALMONELLA spp., EN HECES, HISOPADOS CLOACALES Y CÁSCARA DE HUEVO, EN GALLINAS PONEDORAS BAJO DOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN TESISTA: CLAUDIA ANDREA GONZÁLEZ SALGADO	MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL MEDICO VETERINARIO Año 2014	TEMUCO, CHILE	UNIVERSIDAD SANTO TOMAS ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA