

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE DE ATENAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA

EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE *BRUCELLA ABORTUS* Y *BRUCELLA CANIS* EN LOS TEJIDOS DE UN MODELO DE HUEVO EMBRIONADO DE POLLO

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA

MELISSA ROJAS NARANJO

ATENAS, COSTA RICA

2025

Dedicatoria

En primer lugar, dedicar este proyecto a mis padres Argerie Naranjo Calvo y Minor Rojas Gómez por ser las dos personas que más me inspiran a seguir estudiando y aprendiendo sin darme por vencida, además de siempre apoyarme a lo largo de toda mi carrera universitaria y en mi vida personal, sin ellos este trabajo hubiera sido imposible. También dedicárselo a mi hermana Yulissa Rojas Naranjo que cuento con su apoyo en todo lo que me proponga y elija para mi vida. También de manera muy especial se lo dedico a mí abuelito, José Cruz Naranjo que desde el cielo sigue todos mis pasos y de manera espiritual me apoya para ser una gran doctora, fue una persona que en mis momentos más difíciles de mi carrera fue un pilar y apoyo fundamental, nunca se me olvida sus palabras cuando me decía que siguiera adelante a pesar de los obstáculos que tuviera ante la vida y a mí abuelita también por estar siempre pendiente de mis estudios y ser un pilar importante en mi vida.

Agradecimientos

Agradecer primeramente a Dios por permitirme recibir sus bendiciones, por mantenerme fuerte y con buena salud a pesar de las adversidades y agradecida por cuidarme siempre de camino a casa.

También agradecer enormemente a mis tutores Carlos Chacón y Ana Mariel Zúñiga por todo su apoyo y liderazgo dentro del laboratorio y por aportarme conocimientos valiosos. También a todos sus integrantes dentro del laboratorio ya que me hicieron sentir bienvenida en todo momento. También agradecer a mi profesora y líder en esta aventura a Daisy Fallas, porque fue de gran motivación que me eligiera para realizar este trabajo y sembrar confianza en mí misma.

Por último, agradecer a mí grupo de amigos y futuros colegas, Beatriz Cano, Pablo Solís, Carlos Fernández y Kevin Méndez por ser una parte importante en mis estudios y porque a pesar de que nuestros caminos se separarán a lo largo de la carrera, siempre mantuvieron el contacto y estuvieron siempre apoyándome en el estudio y haciéndome reír en momentos difíciles.

HOJA DE APROBACIÓN

Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría.



Josué Rivera Castillo

Director de Carrera



Carlos Chacón Díaz

Tutor del TFG



Ana Mariel Zúñiga Pereira

Lector TFG



Daisy Elena Fallas Elizondo

Lector TFG

DECLARACIÓN JURADA

Yo Melissa Rojas Naranjo portadora de la cédula de identidad número 1-1739-0771 estudiante de la Universidad Técnica Nacional, UTN en la carrera de Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría, conocedora (s) de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el (la) Director (a) de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, así como con los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, a los 9 días del mes de mayo del año 2025.



Melissa Rojas Naranjo
1-1739-0771

Resumen

La estudiante Melissa Rojas Naranjo llevó a cabo una investigación sobre la brucelosis, se trata de una enfermedad zoonótica de alta importancia para la salud pública y salud animal. Las bacterias del género *Brucella* sp. se caracterizan, entre sus principales efectos, por inducir abortos en los mamíferos infectados. La bacteria se transmite por contacto directo o indirecto a través de fluidos y secreciones como orina, heces, sangre, aerosoles, fluidos vaginales, secreciones nasales, leche, membranas placentarias, fetos abortados o semen. El objetivo de este estudio fue evaluar la virulencia de *B. abortus* y *B. canis* en un modelo de huevo embrionado. *Brucella canis* o *abortus* se inoculó en la membrana corioalantoidea, un tejido de origen embrionario. Se usaron diferentes dosis de inoculación en embriones de entre 7 y 14 días de edad. Se confirmó que las concentraciones bacterianas superiores a 10^5 (UFC) representan la dosis más virulenta, ya que provocan altos niveles de infección en ambas especies de *Brucella* sp. Además, se analizaron los porcentajes de recuperación bacteriana en los diferentes tejidos embrionarios, obteniéndose resultados significativos con *B. abortus*, con más del 70% de recuperación bacteriana como indicador de infección, en comparación con *B. canis*, que presentó una menor recuperación de alrededor del 40%. Esto confirma, como en otros estudios, que *B. abortus* es más virulenta que *B. canis*. La capacidad de virulencia de este género bacteriano resalta la importancia de contar con un modelo de infección alternativo al modelo murino, que permita aislar y replicar la bacteria para su investigación, debido a su impacto negativo en la salud humana y animal. **Palabras claves:** *Brucella canis*, *Brucella abortus*, modelo de huevo embrionado de pollo, inoculación bacteriana, ubicación y distribución bacteriana, virulencia bacteriana, inmunofluorescencia directa.

Abstract

The student Melissa Rojas Naranjo conducted research on brucellosis, as it is a zoonotic disease of high importance to public and animal health. Bacteria of the genus *Brucella* sp. are characterized, among their main effects, by inducing abortions in infected mammals. The bacterium is transmitted by direct or indirect contact through fluids and secretions such as urine, feces, blood, aerosols, vaginal fluids, nasal secretions, milk, placental membranes, aborted fetuses, or semen. This study aimed to evaluate the virulence of *B. abortus* and *B. canis* in an embryonated egg model. *Brucella canis* or *abortus* was inoculated onto the chorioallantoic membrane, an embryonic tissue. Different inoculation doses were used in embryos aged between 7 and 14 days. It was confirmed that bacterial concentrations higher than 10^5 (CFU) represent the most virulent dose, as they caused high infection levels in both studied *Brucella* sp species. In addition, bacterial recovery percentages were analyzed in different embryonic tissues, with significant results for *B. abortus*, showing more than 70% bacterial recovery as an infection indicator, compared to *B. canis*, which presented a lower recovery of around 40%. This confirms, as in other studies, that *B. abortus* is more virulent than *B. canis*. The virulence capacity of this bacterial genus highlights the importance of having an infection model alternative to the murine model that allows for the isolation and replication of the bacteria for research, due to its negative impact on human and animal health.

Keywords: *Brucella canis*, *Brucella abortus*, embryonated chicken egg model, bacterial inoculation, bacterial localization and distribution, bacterial virulence, direct immunofluorescence.

Índice general

I. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Antecedentes.....	17
1.2 Problema de investigación.....	20
1.3 Justificación.....	22
1.4 Objetivos.....	23
1.4.1 Objetivo general.....	23
1.4.2 Objetivos específicos.....	23
1.5 Objeto de investigación.....	23
1.6 Hipótesis.....	24
II. MARCO TEÓRICO	25
2.1 Brucelosis.....	25
2.1.1 Etiología.....	25
2.1.2 Transmisión.....	25
2.1.3 Periodo de incubación.....	26
2.1.4 Signos clínicos de brucelosis.....	26
2.1.5 Patogénesis y vida intracelular.....	27
2.2 Características bacteriológicas de <i>B. canis</i> y <i>B. abortus</i>	28
2.2.1 Membrana externa de <i>B. canis</i> y <i>B. abortus</i>	28
2.3 Fisiopatología de los abortos e infección placentaria en brucelosis.....	29
2.4 Modelo de huevo embrionado para el estudio de agentes infecciosos.....	30
2.4.1 Importancia de la utilización del modelo de huevo embrionado.....	30
2.4.2 Anatomía del huevo embrionado.....	31
2.4.3 Etapas de crecimiento del embrión de pollo (7 y 14 días).....	33
2.4.4 Incubación del embrión.....	33
2.5. Opciones de eutanasia.....	34
III. METODOLOGÍA	36
3.1 Ubicación.....	36
3.2 Muestra.....	36
3.3 Métodos.....	36
3.3.1 Manipulación y crecimiento de cepas de <i>B. abortus</i> y <i>B. canis</i>	36

3.3.2	Determinación de la concentración bacteriana mediante la medición de la densidad óptica de la bacteria.....	37
3.3.3	Determinación de la concentración bacteriana del inóculo a utilizar en las infecciones de huevo embrionado mediante el método de dilución y cultivo en placa....	38
3.3.4	Inoculación de huevos embrionados con cepas silvestres y mutantes de <i>B. abortus</i> y <i>B. canis</i>	40
3.3.5	Viabilidad de los huevos	41
3.3.6	Determinación de la carga bacteriana en los órganos embrionados	42
3.3.7	Muestras patológicas para histopatología.....	43
3.4	Análisis de datos y métodos estadísticos.....	44
IV.	RESULTADOS	45
4.1	Optimización de los ensayos de huevos embrionados	45
4.2	Ensayos de letalidad.....	46
4.3	Evaluación de la capacidad infectiva de <i>B. canis</i> y <i>B. abortus</i> en el modelo de huevo embrionado.....	52
4.4	Citologías por Inmunofluorescencia directa.....	65
V.	DISCUSIÓN.....	73
VI.	CONCLUSIONES	76
VII.	RECOMENDACIONES.....	77
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
IX.	ANEXOS	84

Índice de Tablas

Tabla 1. Letalidad en el modelo de huevo embrionado inoculados con <i>B. canis</i> y <i>B. abortus</i> a diferentes dosis de infección, edad embrionaria y horas post-inoculación	49
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Índice de figuras

Figura 1. Membrana externa de la pared celular de <i>B. abortus</i>	29
Figura 2. Anatomía del huevo embrionado	32
Figura 3. Método de dilución bacteriana utilizada en cada inoculación.....	38
Figura 4. Método de recuento bacteriano y conteo manual de UFC/ml	40
Figura 5. Evaluación macroscópica de los embriones que se usaron como control	46
Figura 6. Resultados de letalidad y supervivencia embrionaria, utilizando dosis infectantes de <i>B. canis</i> y <i>B. abortus</i> en embriones de 7 días y 12-14 días de edad a 72 horas post inoculación.....	48
Figura 7. Evaluación macroscópica del huevo embrionario con presencia de signos patológicos y malformaciones embrionarias	51
Figura 8. Resultados de la recuperación bacteriana obtenida por <i>B. canis</i> en el SI, CAM e hígado, utilizando diferentes concentraciones bacterianas en embriones de 7 días de edad	53
Figura 9. Resultados de la recuperación bacteriana obtenida por <i>B. canis</i> en los diferentes tejidos embrionarios SI, CAM e hígado, utilizando concentraciones bacterianas de 10^5 en huevos embrionados de 7 y 14 días de edad.	54
Figura 10. Resultados de la recuperación bacteriana obtenida mediante la comparación de <i>B. canis</i> y <i>B. abortus</i> en los diferentes tejidos embrionarios utilizando concentraciones bacterianas de 10^5 en embriones de 12-14 días de edad	56
Figura 11. Porcentajes de recuperación bacteriana por <i>B. canis</i> obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) según el total de huevos embrionados inoculados vs inoculación bacteriana, mediante el uso de diferentes dosis de inoculación en embriones de 7 días de edad	58
Figura 12. Porcentajes de recuperación bacteriana por <i>B. canis</i> obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) según el total de huevos embrionados inoculados vs edad del embrión en huevos de 7 y 14 días de edad, utilizando una concentración de 10^5 UFC/ml60	
Figura 13. Porcentajes de recuperación bacteriana por <i>B. canis</i> y <i>B. abortus</i> obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) según el total de huevos embrionados inoculados vs cepa bacteriana, en huevos embrionados de 12 - 14 días de edad a una concentración de inoculación de 10^5 UFC/ml	62

- Figura 14.** Promedio de infección por *B. canis* y *B. abortus* obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) y porcentajes de recuperación bacteriana según el total de huevos inoculados en embriones de 9 - 14 días de edad en periodos de infección de 3-24 horas a concentraciones del inóculo de 10^5 UFC/ml.....64
- Figura 15.** Observación microscópica de tejido embrionario CAM e hígado, presencia de bacterias individuales dentro y fuera de la célula por *B. abortus* RFP y replicación bacteriana intracelular por *B. canis* GFP a un aumento de 600x66
- Figura 16.** Observación microscópica de tejido embrionario SI, CAM e hígado con presencia de bacterias de *B. abortus* GFP extracelular y replicación bacteriana intracelular por *B. abortus* RFP a un aumento de 600x68
- Figura 17.** Celularidad embrionaria en SI, CAM e hígado, bajo la infección activa por *B. abortus* RFP y el alcance intra y extracelular de la bacteria a órganos internos vistas a un aumento de 600x70
- Figura 18.** Celularidad embrionaria en SI y CAM con presencia de *B. abortus* intracelular, extracelular y replicación bacteriana en el transcurso de 24 horas post inoculación vistas a un aumento de 600x72

Índice de abreviaturas

UTN	Universidad Técnica Nacional
UNA	Universidad Nacional
UCR	Universidad de Costa Rica
CICUA	Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales
SENASA	Servicio Nacional de Salud Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
LPS	Lipopolisacáridos
LPS-R	Lipopolisacáridos rugosos
LPS-S	Lipopolisacáridos Lisos
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas
RBT	Prueba Rosa de Bengala
PIET	Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales
CIET	Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales
PI	Período de incubación
PSO	Polisacárido O.
AVMA	Asociación Americana de Medicina Veterinaria
CTS	Caldo Tripticasa de Soya

ATS	Agar Tripticasa de Soya
PBS	Phosphate Buffered Saline
SI	Sitio de inoculación
CAM	Membrana Corioalantoidea
UFC	Unidad Formadora de Colonia
GFP	Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein)
RFP	Proteína Fluorescente Roja (Red Fluorescent Protein)

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. *Fórmula para el cálculo de la densidad óptica de la bacteria*

.....37

Ecuación 2. *Fórmula para el cálculo de colonias en placa UFC/ml*

.....39

I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de origen animal, reconocida como tal por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y es conocida en los seres humanos como “fiebre de Malta”. Esta enfermedad se transmite principalmente mediante el consumo de productos contaminados de origen animal, así como a través de secreciones genitales, aerosoles y el contacto directo con animales infectados, incluyendo fetos abortados y crías recién nacidas (Álvarez, Rivera, & Zamora, 2015). *Brucella* spp. es capaz de evadir diversos mecanismos de defensa tanto celulares como humorales; la bacteria es fagocitada por células fagocíticas profesionales, como neutrófilos y macrófagos (Freer & Castro, 2001). Por tratarse de un patógeno intracelular facultativo, *Brucella* spp. puede multiplicarse dentro de macrófagos, neutrófilos y monocitos del hospedero (Freer & Castro, 2001; Álvarez et al., 2015).

El presente proyecto tuvo como objetivo implementar un modelo de huevo embrionado de pollo para evaluar ciertos rasgos de virulencia presentes durante una infección aguda por *Brucella* spp. Para ello, se inocularon cepas de *Brucella abortus* y *Brucella canis* en la membrana corioalantoidea de los embriones. El análisis de la infección *in vivo* permitió comprender cómo estas bacterias se dispersan por los tejidos y órganos del embrión.

1.1 Antecedentes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta la presencia de *Brucella* spp. en países mediterráneos tanto de Europa como de África, así como en Oriente Medio, América Central, América del Sur, Asia Central, India y México. Las regiones con menor desarrollo socioeconómico son, por lo general, las más afectadas. En la actualidad, la brucelosis es una de las zoonosis más frecuentes e importantes a nivel mundial (Álvarez, Rivera, & Zamora, 2015).

En Costa Rica se ha detectado un aumento considerable en la prevalencia de brucelosis, afectando principalmente a los hatos bovinos. La carga de *Brucella abortus* en algunas regiones del país es crítica. En un estudio epidemiológico realizado entre 2012 y 2016 en seis regiones del país, utilizando la prueba Rosa de Bengala (RBT) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), se reportó una prevalencia cercana al 12% en hatos bovinos (Hernández-Mora et al., 2017). Además de los casos en bovinos, se han reportado infecciones por *Brucella* en delfines, perros y humanos en el país.

El Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) presentó un informe sobre la situación sanitaria de la brucelosis en Costa Rica en el año 2020. En este documento se evidenció la presencia de *Brucella canis* mediante un estudio serológico realizado en 302 perros provenientes del Valle Central. Los resultados indicaron una prevalencia del 6.2% de *B. canis* y del 1.6% de *B. abortus* en perros de finca. En otro estudio realizado en ganado bovino, se analizaron 186,103 muestras, de las cuales el 13% provenía de fincas bajo control de brucelosis; de estas, el 4.2% fueron diagnosticadas con la enfermedad (SENASA, 2020).

En Costa Rica, la investigación sobre la brucelosis se ha enfocado principalmente en la fase de persistencia. Para ello, se han utilizado modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, los cuales han permitido analizar con detalle el papel de la comunicación bacteriana y el tránsito intracelular del patógeno. *Brucella* spp. cuenta con un sistema de dos componentes, BvrR/BvrS, que actúa como regulador de factores de virulencia, junto con otros elementos clave que contribuyen a su supervivencia en el hospedero (Grilló et al., 2012). Asimismo, se han descrito diversos mecanismos que permiten a la bacteria evadir la respuesta inmune innata, estableciéndose en los tejidos del hospedero y replicándose de manera eficiente (Barquero-Calvo et al., 2007).

Sin embargo, en el país aún no se han estudiado de forma sistemática los rasgos de virulencia de *B. abortus* y *B. canis* en modelos de huevo embrionado, lo que permitiría evaluar las bacterias durante la fase aguda de la infección (Gorvel & Moreno, 2002). La utilización del huevo embrionado como modelo experimental para el estudio de *Brucella* spp. no ha sido suficientemente explorada en Costa Rica. Existen antecedentes de su aplicación en virología; por ejemplo, entre 2012 y 2016 se realizaron ensayos mediante la inoculación del virus de la influenza canina en huevos embrionados. En dicho estudio se utilizaron seis casos de caninos con enfermedad respiratoria, y se logró detectar la presencia del antígeno viral en los tejidos embrionarios, demostrando por primera vez la presencia del virus de influenza H3 en perros en el país (Piche, 2018).

Respecto a la investigación sobre brucelosis en modelos de huevo embrionado, los antecedentes son escasos. Algunos reportes destacan la inoculación de muestras de leche bovina y cepas de *Brucella* spp. en embriones de pollo de entre 3 y 9 días de incubación, con el objetivo de evaluar la infección (Pulido, 2010; Pulido et al., 2011; Pulido et al., 2012).

En estos ensayos se utilizaron 235 huevos en tres experimentos distintos, con diversas dosis de inoculación de *B. abortus*, alcanzando concentraciones superiores a 100 unidades formadoras de colonias (UFC) y llegando a superar las 1000 UFC/g, inoculadas en el saco vitelino del embrión.

Se monitoreó la viabilidad embrionaria durante 72 horas, tras lo cual se extrajeron órganos para análisis histopatológicos. Se observaron alteraciones morfológicas significativas, como pérdida de la arquitectura hepática, presencia de tejido fibroso y degeneración vacuolar en el hígado. En la membrana corioalantoidea se evidenció degeneración, presencia de material amorfo hialino eosinofílico, pérdida de estructura vascular y fibrosis. Estos hallazgos permiten hipotetizar sobre el daño tisular que *B. abortus* podría generar en los embriones de vacas durante procesos abortivos. Además, en uno de los tres experimentos se consideró la viabilidad de los embriones tras la inoculación de 45 huevos, con un resultado de 12 embriones muertos (Pulido, 2010; Pulido et al., 2011; Pulido et al., 2012).

Experimentalmente, también se ha utilizado el modelo de huevo embrionado para el estudio de *Brucella microti*. En este caso, se realizaron inoculaciones tanto en el saco vitelino como en el saco alantoideo, utilizando una dosis de 0,2 ml con concentraciones de 1.6×10^3 UFC y 1.6×10^5 UFC, respectivamente. La viabilidad de los embriones fue monitoreada durante un periodo de 72 horas de incubación. Los resultados indicaron que la mortalidad variaba en función de la zona de inoculación y de la dosis administrada.

Se observó que el líquido amniótico presentaba turbidez, y que los embriones mostraban signos visibles de infección, tales como hemorragias de intensidad leve a

moderada en regiones como la piel, el cráneo y el abdomen, congestión de vasos sanguíneos, así como focos necróticos y hemorragias localizadas en el bazo y el hígado. Estos hallazgos permitieron concluir que los daños macroscópicos eran más prominentes en los embriones que recibieron la inoculación por el saco vitelino en comparación con aquellos inoculados por el saco alantoideo. Además, los análisis histopatológicos revelaron que los cambios microscópicos eran variables entre los diferentes tejidos, incluyendo muerte celular parenquimatosa, necrobiosis y necrosis tanto de células individuales como en grupos celulares (Wareth et al., 2015).

La mayoría de los embriones inoculados con *B. microti* fueron tratados a través del saco vitelino y el saco alantoideo. El dato más significativo relacionado con la mortalidad se presentó al tercer día posterior a la inoculación, con un total de 13 muertes, mientras que al cuarto día murieron todos los embriones restantes. Estos resultados evidencian que tanto la dosis bacteriana como la vía de inoculación pueden influir significativamente en el tiempo de muerte del embrión. Sin embargo, también se demostró que las diferencias en la vía de inoculación y la cantidad de dosis de *B. microti* no afectaron de manera significativa la capacidad replicativa de la bacteria (Wareth et al., 2015).

1.2 Problema de investigación

Brucella spp. es una bacteria capaz de localizarse en diversos órganos como el hígado, útero, bazo, riñón, glándula mamaria y placenta, provocando abortos en mamíferos (Martínez et al., 2008). Sin embargo, aún se desconoce con precisión la afinidad tisular, la distribución específica y la dosis infectante necesaria para que la bacteria se aloje en el tejido placentario y en otros órganos embrionarios. El modelo experimental *in vivo* más

ampliamente utilizado en la actualidad para el estudio de la brucelosis es el modelo murino. Este modelo reproduce eficazmente la fase de persistencia de la infección, pero no permite el estudio detallado de los eventos asociados a la gestación. Por esta razón, se han explorado modelos alternativos como el del huevo embrionado de pollo.

El modelo de huevo embrionado ofrece varias ventajas experimentales. En primer lugar, durante los primeros días de desarrollo, el sistema inmunológico del embrión no está completamente establecido, lo que facilita la infección por parte de patógenos intracelulares como *Brucella* spp. En segundo lugar, este modelo permite el análisis exclusivo de tejidos embrionarios, sin la interferencia de una respuesta inmunitaria madura, como ocurre en el modelo murino. Esta característica lo convierte en una herramienta útil para estudiar los mecanismos tempranos de infección, replicación y diseminación bacteriana en un entorno biológico controlado.

En Costa Rica, hasta el momento, no se ha implementado un modelo *in vivo* que permita estudiar y reproducir la brucelosis durante la fase aguda de la enfermedad. La utilización del modelo de huevo embrionado representa una alternativa valiosa para analizar la ubicación intracelular de la bacteria en tejidos en desarrollo y comprender su ruta de replicación, particularmente en presencia de estructuras análogas a la placenta, como la membrana corioalantoidea. Actualmente, existe una carencia significativa de información científica respecto al tropismo de *Brucella* spp., así como sobre los eventos celulares que ocurren en los tejidos placentarios durante la infección, los cuales están directamente implicados en la patogénesis de los abortos. El estudio de la carga bacteriana y su distribución en órganos como el hígado y la membrana corioalantoidea podría aportar datos

fundamentales sobre los factores que determinan la supervivencia o muerte embrionaria en el contexto de la brucelosis.

1.3 Justificación

Existen diversas especies del género *Brucella* que poseen gran relevancia epidemiológica, entre las que se incluyen *B. suis*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. canis*, *B. abortus* y *B. inopinata* (Freer & Castro, 2001; Álvarez et al., 2015). En este proyecto se trabajó específicamente con las especies zoonóticas *B. canis* y *B. abortus*, ambas documentadas en Costa Rica y responsables de afecciones significativas en la salud animal y humana. Estas dos especies presentan la capacidad de invadir, sobrevivir y multiplicarse dentro de un hospedero, con una particular predilección por organismos en estado de gestación, lo que puede culminar en abortos espontáneos. Por esta razón, resulta indispensable generar más evidencia científica sobre la afinidad tisular, distribución anatómica y dosis infectante que permiten a estas bacterias colonizar tejidos placentarios.

En este estudio se empleó un modelo experimental de huevo embrionado de pollo con el propósito de reproducir la fase aguda de la enfermedad, enfocándose en la inducción de abortos, una de las principales manifestaciones clínicas asociadas a la infección por *Brucella* spp. en animales. Esta aproximación experimental permitió el desarrollo de un procedimiento que puede ser utilizado como referencia metodológica para futuras investigaciones orientadas a comprender la patogénesis de esta bacteria en tejidos animales. Asimismo, el proyecto fortaleció la colaboración interuniversitaria, promovió la adquisición de nuevas competencias en técnicas de laboratorio y favoreció una comprensión más

profunda de los mecanismos de infección bacteriana provocada por *B. abortus* y *B. canis*, especies de particular relevancia tanto a nivel nacional como internacional.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el grado de virulencia de *B. abortus* y *B. canis* en los tejidos de un modelo de huevo embrionado de pollo para la determinación de las cargas bacterianas, dosis infectantes y ubicación intracelular de la bacteria *Brucella* sp.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar el índice de letalidad causado por *B. canis* y *B. abortus* mediante la evaluación de la supervivencia embrionaria del pollo ante la virulencia de estas bacterias para el establecimiento de la carga bacteriana y dosis infectante.
- Analizar la distribución de *B. canis* y *B. abortus* en los diferentes tejidos embrionarios mediante evaluación histopatológica de los cambios morfológicos causados por las bacterias para el establecimiento de la ubicación intracelular de la bacteria *Brucella* sp., por inmunofluorescencia.

1.5 Objeto de investigación

Conocer la letalidad, distribución, carga bacteriana y ubicación intracelular de la bacteria *Brucella* sp., en los tejidos embrionarios de pollo para comprender los rangos de virulencia existentes.

1.6 Hipótesis

La virulencia de la bacteria es determinada por la dosis infectante y carga bacteriana en los diferentes tejidos embrionarios. La tasa de letalidad y virulencia bacteriana en los tejidos embrionarios depende de la manipulación y la forma de inoculación del huevo embrionado según sea la distribución y ubicación intracelular de la bacteria *Brucella* sp.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Brucelosis

2.1.1 Etiología

Las bacterias del género *Brucella* se caracterizan por ser patógenos intracelulares facultativos, Gramnegativos, con forma cocobacilar y un tamaño aproximado de 0,4 a 3,0 μm (Olsen & Tatum, 2010). En seres humanos, la brucelosis puede ser causada, en orden descendente de virulencia, por *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* y, con menor frecuencia, por *B. canis* y *B. neotomae* (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2010). Asimismo, se ha identificado la especie *B. inopinata*, de la cual aún se desconoce cuál es su hospedero primario (Álvarez et al., 2015).

2.1.2 Transmisión

En los animales, la transmisión de *Brucella* ocurre principalmente a través de las mucosas por contacto directo con líquidos fetales, aerosoles, fluidos vaginales o con fetos infectados. Además, se ha documentado la transmisión vertical por medio de la leche materna y la vía transplacentaria (Olsen & Tatum, 2010). En los machos, la bacteria puede transmitirse por medio del semen durante toda la vida reproductiva (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2010).

En los seres humanos, la infección se produce fácilmente mediante el contacto con productos de origen animal, especialmente placentas, por contacto directo con piel o mucosas lesionadas, a través de la ingestión de alimentos no pasteurizados o carnes mal cocidas, la inhalación de aerosoles contaminados, la inoculación accidental de material infeccioso y por transmisión perinatal vía transplacentaria (Mora, 2013).

La supervivencia de la bacteria se prolonga significativamente en ambientes con bajas temperaturas, especialmente por debajo del punto de congelación, lo que facilita su transmisión (OIE, 2010).

2.1.3 Periodo de incubación

El periodo de incubación (PI) depende de la especie que logre infectar, en bovinos el PI se da entre las 2 primeras semanas y varios meses de gestación, en los bovinos se logra manifestar por la ocurrencia de abortos durante en el último tercio de la gestación, las muertes y abortos ocurren en un periodo entre 2 semanas a 5 meses. En perros es más común la mortalidad en un periodo de 7 a 9 semanas de gestación o muertes embrionarias después de 2 a 3 semanas (OIE, 2010).

2.1.4 Signos clínicos de brucelosis

En los seres humanos, la brucelosis se manifiesta mediante signos clínicos inespecíficos, lo que complica su diagnóstico. Entre los síntomas más comunes se incluyen fiebre ondulante, pérdida de peso, depresión, hepatomegalia, esplenomegalia, artritis, espondilitis, osteomielitis, epididimitis y orquitis. En casos más graves, pueden presentarse complicaciones como alteraciones neurológicas, abscesos hepáticos y endocarditis, lo que convierte a la enfermedad en una afección potencialmente severa si no es tratada a tiempo (Silva et al., 2011).

En los animales, la brucelosis se presenta clínicamente con abortos recurrentes, especialmente durante el tercer trimestre de la gestación, así como con el nacimiento de crías débiles e infertilidad. Estas manifestaciones son distintivas de las infecciones por *Brucella abortus* y *Brucella canis*. Las hembras infectadas pueden desarrollar mastitis,

aunque en algunos casos no presentan signos clínicos evidentes. En los machos, la enfermedad puede causar inflamación testicular, infertilidad, y en ocasiones, la formación de abscesos en los testículos y el epidídimo (Rivers et al., 2006).

2.1.5 Patogénesis y vida intracelular

La brucelosis presenta tres fases clínicas bien diferenciadas. La primera corresponde a la fase de incubación, en la cual no se manifiestan signos clínicos evidentes. Esta etapa puede durar desde días hasta semanas, dependiendo de la dosis infectante y del estado inmunológico del hospedero. Posteriormente, se desarrolla la fase aguda, caracterizada por la diseminación sistémica de la bacteria e invasión de distintos tejidos. En animales gestantes, esta fase puede desencadenar abortos como una de sus principales manifestaciones clínicas. Finalmente, se alcanza la fase crónica, en la cual se produce un daño tisular severo, afectación multiorgánica progresiva y, eventualmente, la muerte del hospedero (De Figueiredo et al., 2015).

Durante la infección, la bacteria induce alteraciones hormonales significativas. Se ha descrito un incremento en los niveles de prostaglandinas, estrógenos y cortisol, acompañado de una disminución de la progesterona. Esta desregulación endocrina genera una señal errónea en el organismo, simulando una señal de parto inminente, lo cual provoca la expulsión prematura del feto y, por ende, el aborto (Xavier et al., 2010).

Tanto *Brucella canis* como *Brucella abortus* son fagocitadas por células del sistema inmune innato y transportadas hacia los tejidos linfáticos. En muchos casos, este proceso da lugar a una bacteriemia, durante la cual las bacterias se diseminan a través del sistema fagocítico mononuclear y del sistema reticuloendotelial (Olsen & Tatum, 2010). Estas

especies de *Brucella* exhiben un marcado tropismo por células como macrófagos, células dendríticas y trofoblastos.

Las estrategias de evasión inmunológica de *B. canis* y *B. abortus* son diversas. Una vez fagocitadas por macrófagos, las bacterias logran establecerse dentro de vacuolas intracitoplasmáticas modificadas, conocidas como *Brucella-containing vacuoles* (BCV), donde evitan los mecanismos microbicidas intracelulares y pueden replicarse eficientemente. Además, inhiben la apoptosis de células mononucleares y suprimen la activación de células presentadoras de antígenos, dificultando así el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa eficaz (De Figueiredo et al., 2015).

2.2 Características bacteriológicas de *B. canis* y *B. abortus*

2.2.1 Membrana externa de *B. canis* y *B. abortus*

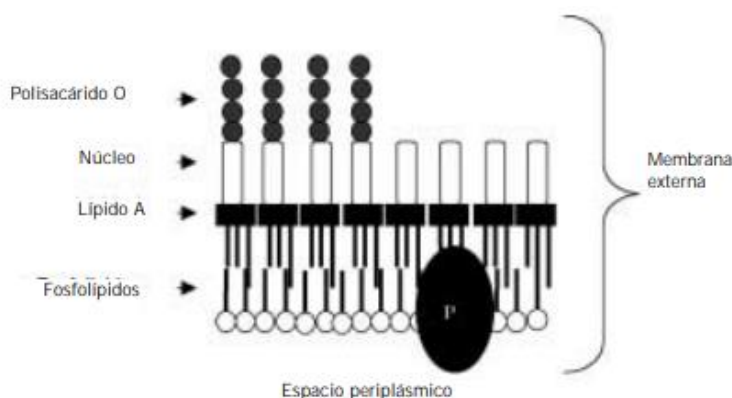
La membrana externa de *Brucella* spp. está compuesta, en un alto porcentaje, por lipopolisacáridos (LPS), los cuales constituyen un factor determinante en su virulencia y en la respuesta inmunológica del hospedero. La clasificación de *Brucella* se puede realizar en función de la estructura de su LPS, el cual está formado por tres componentes principales: (i) el lípido A, localizado en la región más interna de la membrana, que actúa como ancla hidrofóbica; (ii) el núcleo oligosacárido, situado en la parte intermedia, compuesto por azúcares específicos que conectan el lípido A con la parte más externa; y (iii) el polisacárido O (PSO) o cadena O, que se encuentra expuesto hacia el exterior de la membrana y cumple funciones clave en la evasión del sistema inmune (Castro, González & Prat, 2005).

Esta estructura permite clasificar a las especies de *Brucella* en dos grupos principales: lisas (LPS-S) y rugosas (LPS-R). *Brucella abortus* posee un LPS completo con

cadena O, por lo cual se clasifica como lisa. En contraste, *Brucella canis* carece del antígeno O, lo que le confiere una morfología rugosa (Castro et al., 2005). No obstante, a pesar de estas diferencias estructurales, ambas especies son capaces de inducir manifestaciones clínicas similares en los hospederos, tanto animales como humanos (Chacón-Díaz et al., 2015).

Figura 1

Membrana externa de la pared celular de Brucella sp



Nota. La figura representa la membrana externa de la bacteria dependiendo de su especie, con ausencia del polisacárido O es rugosa (*B. canis*) y si está presente es lisa (*B. abortus*). Adaptada de (Álvarez et al., 2015).

2.3 Fisiopatología de los abortos e infección placentaria en brucelosis

La transmisión vertical constituye uno de los principales mecanismos de inducción de abortos en animales infectados con *Brucella* spp. Esta ocurre principalmente a través de la deglución del líquido amniótico contaminado dentro del útero, lo que genera lesiones inflamatorias en el feto que culminan con su muerte intrauterina o, en algunos casos, con el nacimiento de crías débiles que fallecen posteriormente. Las especies *Brucella abortus* y *Brucella canis* presentan una alta afinidad por el tejido placentario, debido a factores como

la presencia de hormonas gestacionales, el tejido embrionario y la producción de eritritol, un azúcar abundante en el útero grávido y la glándula mamaria. Estos elementos actúan como atrayentes metabólicos para la bacteria, facilitando su multiplicación y la instauración del proceso infeccioso que culmina en el aborto (Querol, 2011).

Tras 72 horas de infección, la bacteria logra localizarse en los trofoblastos coriónicos de la placenta, donde provoca procesos necróticos. Durante el último tercio de la gestación, los niveles de eritritol aumentan significativamente, lo cual intensifica la migración bacteriana hacia el tejido vascular del útero. Esta migración masiva desencadena placentitis purulenta necrótica, así como vasculitis placentaria, causando destrucción de las vellosidades coriónicas. Como consecuencia, se produce un exudado fibrinoso y purulento que deteriora la conexión entre los cotiledones de la placenta fetal y materna. Esta interrupción en el intercambio de gases y nutrientes esenciales conlleva inevitablemente a la muerte fetal y la ocurrencia del aborto (Querol, 2011).

2.4 Modelo de huevo embrionado para el estudio de agentes infecciosos

2.4.1 Importancia de la utilización del modelo de huevo embrionado

Las aves han demostrado ser modelos experimentales indispensables en la investigación biomédica, especialmente para el estudio de diversas patologías, procedimientos quirúrgicos, fases del desarrollo embrionario y la inoculación de microorganismos, así como en el diseño y evaluación de vacunas. En este contexto, el huevo de ave representa una herramienta fundamental que permite examinar con detalle y facilidad el desarrollo embrionario, favoreciendo estudios ontogénicos y teratogénicos (Contreras et al., 2018).

En la actualidad, se emplean numerosas técnicas experimentales que utilizan el embrión de pollo como modelo de investigación. Un ejemplo de ello son los estudios de expresión génica, en los que se observan alteraciones morfológicas a través de técnicas como la histopatología o la inmunohistoquímica. La mayoría de los experimentos realizados *in vivo* tienen como objetivo identificar evidencias de los cambios inducidos por manipulaciones experimentales, enfocándose en la observación de los embriones en estadios específicos del desarrollo donde se analizan órganos o tejidos de interés (Contreras et al., 2018).

El modelo de huevo embrionado presenta múltiples ventajas que facilitan su uso en laboratorios de investigación. Entre estas se incluyen la disponibilidad de huevos fertilizados estériles a bajo costo, la posibilidad de conservarlos en incubadoras comerciales, su alta adaptabilidad a diferentes condiciones experimentales, y su mantenimiento económico. Asimismo, este modelo ofrece una manipulación sencilla, acceso directo a tejidos y células embrionarias de distintos tipos, y la ventaja significativa de carecer de una respuesta inmunitaria robusta en las primeras etapas del desarrollo, lo que permite una mayor eficiencia en estudios de patogénesis y manipulación genética (Contreras et al., 2018).

2.4.2 Anatomía del huevo embrionado

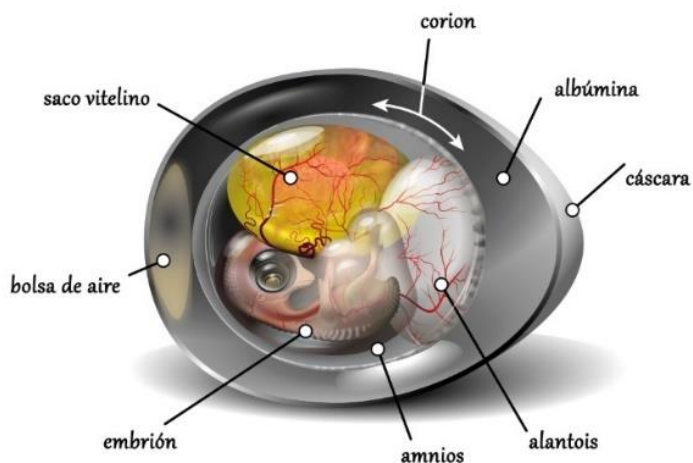
El huevo embrionado está conformado por varias membranas extraembrionarias que se desarrollan a partir del embrión y se extienden sobre el vitelo. La primera estructura en aparecer es el saco vitelino, el cual está formado por una red de pequeños vasos sanguíneos encargados de suministrar nutrientes esenciales al embrión en las etapas iniciales del desarrollo. A medida que el embrión crece, se forma el amnios, una membrana que lo

envuelve completamente y delimita la cavidad amniótica, cuya función principal es proteger al embrión mediante un medio líquido que amortigua los movimientos y las agresiones externas.

Otra membrana clave es el corion, que recubre la totalidad del contenido del huevo y que, con el desarrollo embrionario, se fusiona con el alantoides para formar la membrana corioalantoidea. Esta estructura combinada desempeña un papel fundamental en el intercambio gaseoso, ya que los vasos sanguíneos del alantoides se encargan de transportar el oxígeno y eliminar el dióxido de carbono. Además, el alantoides sirve como reservorio para los desechos metabólicos del embrión durante la incubación (Contreras et al., 2018).

Figura 2

Anatomía del huevo embrionado



Nota. En la figura se observa las partes más importantes que conforma un huevo embrionado de pollo como el corion, alantoides, amnios, bolsa de aire, saco vitelino. Adaptado de (Gerpe, 2019).

2.4.3 Etapas de crecimiento del embrión de pollo (7 y 14 días)

Es fundamental conocer la edad embrionaria en el momento de su utilización experimental, lo cual se determina mediante la observación de signos externos del desarrollo del embrión (Contreras et al., 2018). Para este proyecto se emplearán embriones de pollo con una edad estimada entre los 7 y los 14 días de incubación. En el séptimo día de desarrollo, ya es posible observar movimientos voluntarios del embrión, el inicio de la formación del pico, el desarrollo del diamante, así como el crecimiento de los ojos. Además, en esta etapa, la yema comienza a disminuir y se observan los esbozos de los dedos en las extremidades, así como el inicio de la formación del aparato reproductor.

Para el día 14 de incubación, el embrión se encuentra completamente cubierto de plumón, con los ojos formados pero aún cerrados. También se evidencian escamas en las extremidades y uñas ya desarrolladas, lo que indica un grado avanzado de diferenciación morfológica que puede ser aprovechado para diversos estudios biomédicos (Galindo & Lisette, 2005; Warin, 2018).

2.4.4 Incubación del embrión

Para el estudio del modelo de huevos embrionados en la investigación biomédica, se emplean comúnmente huevos de gallina fertilizados obtenidos de granjas productoras certificadas. La incubación adecuada de estos huevos requiere el uso de una incubadora equipada con una cámara térmica regulada por termostato, donde la temperatura óptima debe mantenerse entre los 37 y 38 °C. Además, para garantizar una hidratación adecuada de los embriones, se recomienda colocar un recipiente con agua en la base de la incubadora, de manera que la humedad relativa se mantenga entre el 50 % y el 60 % (Contreras et al., 2018).

Un componente esencial en este sistema es el mecanismo de volteo automático o manual, cuya función es evitar que el embrión se adhiera a las membranas testáceas o a la cáscara, lo que podría comprometer su viabilidad. Durante el proceso de incubación, es necesario realizar observaciones periódicas por medio de ovoscopia, técnica que permite evaluar la vitalidad embrionaria a través de la translucidez del cascarón.

En caso de que se registre la muerte embrionaria, se debe aplicar una técnica de embriodiagnos, que consiste en la apertura controlada del huevo para examinar las posibles causas del deceso. Es importante destacar que el primer pico crítico de mortalidad en embriones de pollo suele presentarse entre los días 7 y 10 de incubación. Esta información resulta crucial, ya que al ingresar los huevos al laboratorio, cualquier variación abrupta en la temperatura o la humedad podría aumentar significativamente la tasa de mortalidad embrionaria (Galindo & Lisette, 2005).

2.5. Opciones de eutanasia

La técnica de eutanasia en huevos embrionados debe realizarse considerando la edad gestacional del embrión, dado que el desarrollo neurológico determina su capacidad para percibir el dolor. En embriones que han alcanzado más del 80 % del período de incubación, ya se manifiesta una actividad cerebral considerable, lo cual sugiere un umbral suficiente para la percepción de estímulos nocivos. En estos casos, se requiere la aplicación de métodos de eutanasia similares a los empleados en neonatos aviares, tales como la administración de una sobredosis de anestésicos —que puede aplicarse a través de la cámara de aire del huevo—, la decapitación, la maceración (válida únicamente hasta las 72 horas

de edad post-incubación), y la exposición prolongada a dióxido de carbono (CO₂) por un periodo mínimo de 20 minutos (American Veterinary Medical Association [AVMA], 2020).

Por otro lado, en embriones con menos del 80 % de incubación, se consideran adecuados métodos de eutanasia como la exposición continua a CO₂ por más de 20 minutos, así como el enfriamiento sostenido a temperaturas inferiores a 4 °C durante al menos 4 horas o la congelación directa. Estas técnicas están alineadas con las recomendaciones éticas internacionales para el manejo humanitario de embriones aviares utilizados con fines científicos (AVMA, 2020).

III. METODOLOGÍA

3.1 Ubicación

El análisis experimental de los modelos de huevo embrionado se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Bacteriología Médica, Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

3.2 Muestra

Los huevos embrionados se obtuvieron mediante proveedores cercanos a la Universidad Técnica Nacional, así como mediante colaboración con el bioterio del Servicio Nacional de Salud Animal y proveedores externos como granjas o producción de huevo embrionado de traspatio. Los huevos embrionados al ingreso en el laboratorio se mantuvieron en incubación a una temperatura de 37-38°C y a una humedad relativa de 50-60%. Los huevos se mantuvieron en estas condiciones de incubación, temperatura y humedad antes y posterior a la inoculación con las cepas bacterianas de *B. abortus* y *B. canis*.

3.3 Métodos

3.3.1 Manipulación y crecimiento de cepas de *B. abortus* y *B. canis*

Se utilizaron cuatro cepas bacterianas: la cepa de referencia *Brucella abortus* 2308 y una variante modificada genéticamente que expresa la proteína roja fluorescente (*B. abortus* 2308-RFP). Para *Brucella canis*, se emplearon la cepa de referencia BcanCR12 y una cepa derivada de esta, BcanCR12-GFP, que expresa la proteína verde fluorescente. Todas las cepas están debidamente conservadas en la bacterioteca de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Las cepas bacterianas se mantuvieron bajo congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio caldo infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con un 20 % de glicerol, siguiendo protocolos estandarizados para la preservación a largo plazo. Para su cultivo, las bacterias se sembraron en placas con agar tripticasa soya o en caldo tripticasa soya, de acuerdo con el tipo de ensayo por realizar. Los cultivos se incubaron a una temperatura constante de $37\text{--}38\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 24 a 72 horas, y se sometieron a agitación orbital a 200 rpm cuando fue necesario, con el fin de asegurar una óptima oxigenación y crecimiento bacteriano.

3.3.2 Determinación de la concentración bacteriana mediante la medición de la densidad óptica de la bacteria

Para obtener la densidad óptica se preparó un medio de enriquecimiento para la bacteria que consistió en colocar 10 ml de CTS en un tubo cónico de 50ml y con ayuda de una asa bacteriológica, se realizó el raspado con la cepa a utilizar crecida previamente en ATS y se colocó dentro del medio CTS, se dejó crecer por el tiempo establecido bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Con ayuda de un espectrómetro se midió la densidad óptica a 420 nm, lo que permite definir las bacterias/ml en suspensión mediante la ecuación 1.

Ecuación 1

Fórmula para el cálculo de la densidad óptica de la bacteria

$$\frac{A(420nm) - (0.0635)}{8 \times 10^{-11}}$$

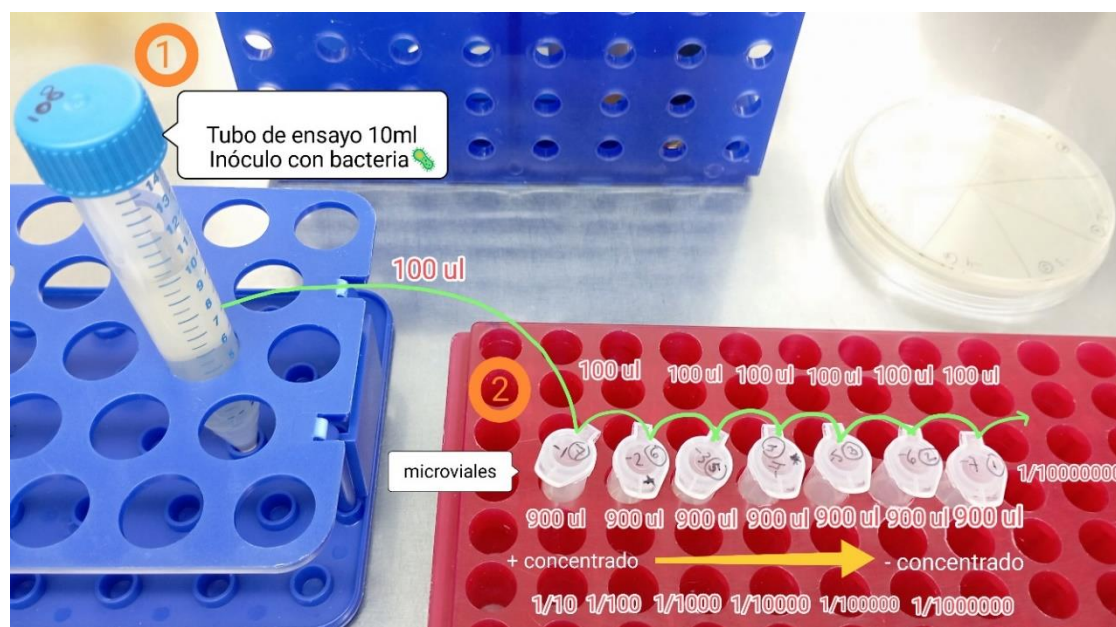
La fórmula dio como resultado la cantidad de UFC/ml de la solución madre en notación científica. La concentración definida mediante densidad óptica luego se confirma o se ajusta mediante la técnica de dilución y cultivo en placa.

3.3.3 *Determinación de la concentración bacteriana del inóculo a utilizar en las infecciones de huevo embrionado mediante el método de dilución y cultivo en placa*

A partir del inóculo madre se realizaron diluciones seriadas, las diluciones se realizaron de acuerdo como se muestra en la figura 3.

Figura 3

Método de dilución bacteriana utilizada en cada inoculación.



Nota. Elaboración propia.

Al terminar las diluciones bacterianas se realizaron recuentos bacterianos, que consistió en utilizar placas de cultivo ATS, dividiendo la placa en 8 secciones que será equivalente a cada dilución y la muestra del inóculo bacteriano inicial. Con ayuda de una

micropipeta se tomaron 10 ul de cada microvial y del inóculo bacteriano inicial, y se colocaron en cada una de las 8 secciones de la placa de cultivo correspondiente a cada dilución. Finalmente, se dejó crecer la bacteria en una incubadora a una temperatura de 37°C durante 3 días. Luego de 72 horas de crecimiento, se realizó el conteo de cada inóculo, eligiendo la dilución con menor concentración o un mínimo de 10 UFC para facilitar el conteo de forma manual (Figura 4). Luego, al realizar la suma de las colonias se realizó la siguiente fórmula (Ecuación 2), que permite constar cuál fue la concentración real de bacterias utilizado por cada inóculo en cada uno de los experimentos.

Ecuación 2.

Fórmula para el cálculo de colonias en placa UFC/ml.

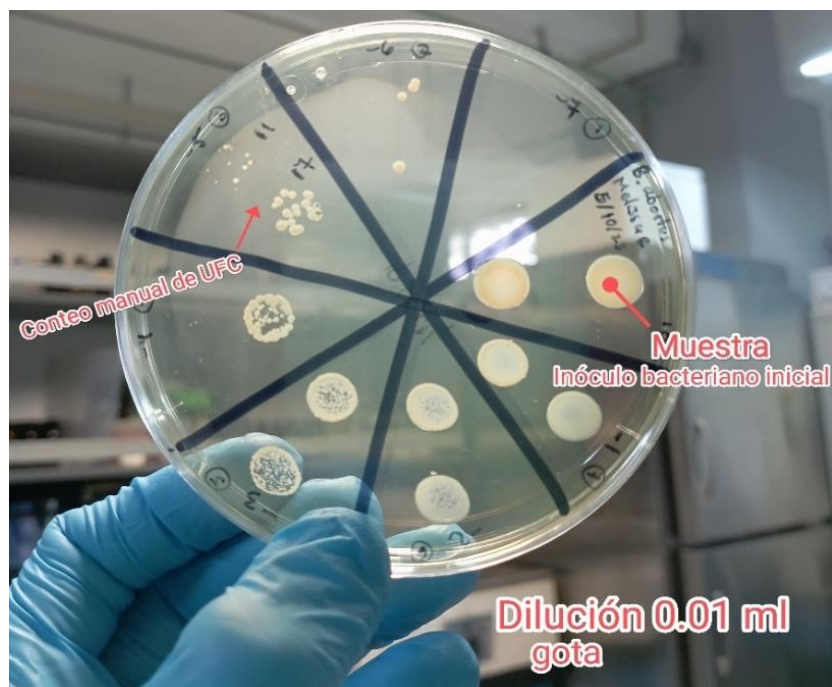
$$[] \text{ Recuento Inicial} = \frac{\text{Suma de } \frac{\text{UFC}}{\text{ml}}}{2} = \text{conteo final } \frac{\text{UFC}}{\text{ml}}$$

$$[] \text{ Inicial} = \frac{\text{Conteo final UFC}}{\text{cantidad de gota (ml)}} = \frac{\frac{\text{UFC}}{\text{ml}}}{\text{Dilución}} = \text{Número de Bacterias}$$

La fórmula dio como resultado la concentración bacteriana del inóculo en UFC/ml a partir del recuento bacteriano en notación científica.

Figura 4

Método de recuento bacteriano y conteo manual de UFC/ml.



Nota. Elaboración propia.

3.3.4 Inoculación de huevos embrionados con cepas silvestres y mutantes de *B. abortus* y *B. canis*

Antes del proceso de inoculación, los huevos embrionados fueron colocados con el polo mayor orientado hacia arriba, posición en la que se encuentra localizada la cámara de aire. Mediante una fuente de luz translúcida (ovoscopía), se identificaron y marcaron dos puntos clave: la ubicación exacta de la cámara de aire y la posición del embrión. A continuación, se realizaron dos orificios pequeños: uno en la cámara de aire y otro en la parte lateral del huevo. Con ayuda de una jeringa de 20 ml, se generó un vacío al retraer el émbolo en el orificio de la cámara de aire, lo que ocasionó el descenso de la membrana

corioalantoidea y la formación de una nueva cámara de aire. Esta maniobra permitió la exposición adecuada de la membrana para su posterior inoculación.

Se utilizaron huevos embrionados con edades comprendidas entre los 7 y 14 días de incubación, empleando entre 12 y 14 huevos por experimento. La cepa bacteriana inoculada se seleccionó según la viabilidad de los embriones y el objetivo experimental, enfocándose en la evaluación de tres parámetros principales: mortalidad embrionaria, carga bacteriana y replicación del agente infeccioso.

La inoculación se realizó en la membrana corioalantoidea con 100 µl de la solución correspondiente, utilizando distintas concentraciones bacterianas de *Brucella abortus* y *Brucella canis* (1×10^2 UFC/ml, 1×10^3 UFC/ml, 1×10^4 UFC/ml, 1×10^5 UFC/ml, 1×10^6 UFC/ml, así como inóculos madre). Las soluciones bacterianas fueron previamente cultivadas y estandarizadas para determinar la dosis mínima necesaria que permitiera valorar con precisión los distintos parámetros biológicos evaluados.

Como control negativo se utilizó un grupo de huevos inoculados únicamente con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS), los cuales fueron sometidos a los mismos procedimientos de manipulación que los grupos experimentales.

3.3.5 Viabilidad de los huevos

Se hizo un estudio de letalidad embrionaria, describiendo la cantidad de embriones vivos y muertos en el tiempo hasta que se cumplió las 3, 24 y 72 horas post inoculación.

3.3.6 Determinación de la carga bacteriana en los órganos embrionados

Se utilizaron embriones que permanecieron viables tras la inoculación, lo que permitió cuantificar la carga bacteriana en distintos tejidos, específicamente en la membrana corioalantoidea, el hígado y el sitio de inoculación. Una vez realizada la eutanasia del embrión mediante exposición a cámara de frío, se procedió a la apertura estéril del huevo. En una placa de Petri, se seleccionaron cuidadosamente los órganos de interés, los cuales fueron pesados individualmente en gramos utilizando una balanza analítica.

Posteriormente, cada órgano fue transferido a una bolsa estéril que contenía una cantidad proporcional de solución salina tamponada con fosfato (PBS), acorde con el peso del órgano. A continuación, se realizó la maceración del tejido, seguida de diluciones seriadas hasta una concentración de 10^{-5} , utilizando una placa de ELISA para facilitar el manejo y homogeneización de las muestras.

Las suspensiones resultantes fueron sembradas en placas de agar tripticosa soya, previamente divididas en seis secciones para optimizar el uso del medio de cultivo. Se aplicó el mismo procedimiento de dilución seriada y siembra descrito en los pasos anteriores para los recuentos bacterianos. Las placas inoculadas fueron incubadas a una temperatura de 37–38 °C durante un periodo de 72 horas.

Finalizado el periodo de incubación, se efectuó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) correspondiente a cada órgano, con el objetivo de determinar la distribución y replicación de las cepas de *Brucella* en los tejidos embrionarios.

3.3.7 Muestras patológicas para histopatología

Se examinaron tres tipos de muestras de tejido embrionario: el sitio de inoculación, la membrana corioalantoidea y el hígado, con el propósito de localizar *Brucella* sp. en diferentes tipos celulares embrionarios mediante observación microscópica. La técnica de laboratorio empleada fue la inmunofluorescencia directa, la cual consiste en el uso de bacterias modificadas genéticamente que expresan en su membrana un anticuerpo unido a fluorocromos, lo que permite su visualización en colores verde o rojo, según la longitud de onda de emisión y excitación correspondiente al fluorocromo utilizado.

Los órganos, previamente pesados y macerados, fueron extendidos cuidadosamente sobre portaobjetos de vidrio. Luego, las preparaciones se fijaron con una solución de metanol-acetona en cubetas tipo Coplin, con el objetivo de preservar la integridad estructural de las muestras. Posteriormente, se lavaron con solución salina con el fin de eliminar residuos y exceso de contenido celular o extracelular.

Acto seguido, se procedió a aplicar un método de tinción nuclear utilizando el colorante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), el cual tiene afinidad por el ADN y tiñe selectivamente los núcleos celulares y el material genético bacteriano. Para ello, se preparó una dilución 1:1000 del reactivo comercial de DAPI a una concentración inicial de 100 µg/ml en un microvial. Las muestras se incubaron con la solución durante 30 minutos, protegidas de la exposición a la luz para evitar la fotodegradación del fluoróforo.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los portaobjetos se enjuagaron nuevamente con solución salina para remover el exceso de colorante. Finalmente, se dejó secar completamente cada muestra antes de aplicar el medio de montaje Mowiol, el cual

favorece la preservación de la fluorescencia y permite una adecuada visualización de las estructuras bajo el microscopio de epifluorescencia.

3.4 Análisis de datos y métodos estadísticos

Los resultados obtenidos se reportaron como promedio \pm desviación estándar. Se realizaron al menos tres réplicas experimentales independientes para cada condición evaluada. La distribución de los datos fue analizada mediante pruebas estadísticas paramétricas. Para la comparación entre dos muestras independientes se aplicó la prueba *t* de Student. En los casos en que se compararon más de dos grupos, se utilizó un análisis de varianza (*ANOVA*) seguido de una prueba *post hoc* de Tukey, en aquellos casos donde se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuando las muestras no cumplieron con los supuestos de normalidad, se utilizó la prueba *t* de Welch como alternativa robusta. La evaluación de la normalidad de los datos se llevó a cabo mediante la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la homogeneidad de varianzas se determinó con la prueba de Levene. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R (versión más reciente disponible al momento del estudio).

Las dos variables independientes analizadas fueron el tipo de bacteria (*Brucella abortus* y *Brucella canis*) y las distintas concentraciones de inóculo utilizadas. A partir de estas variables se elaboró un modelo descriptivo para evaluar su impacto en los parámetros experimentales medidos.

IV. RESULTADOS

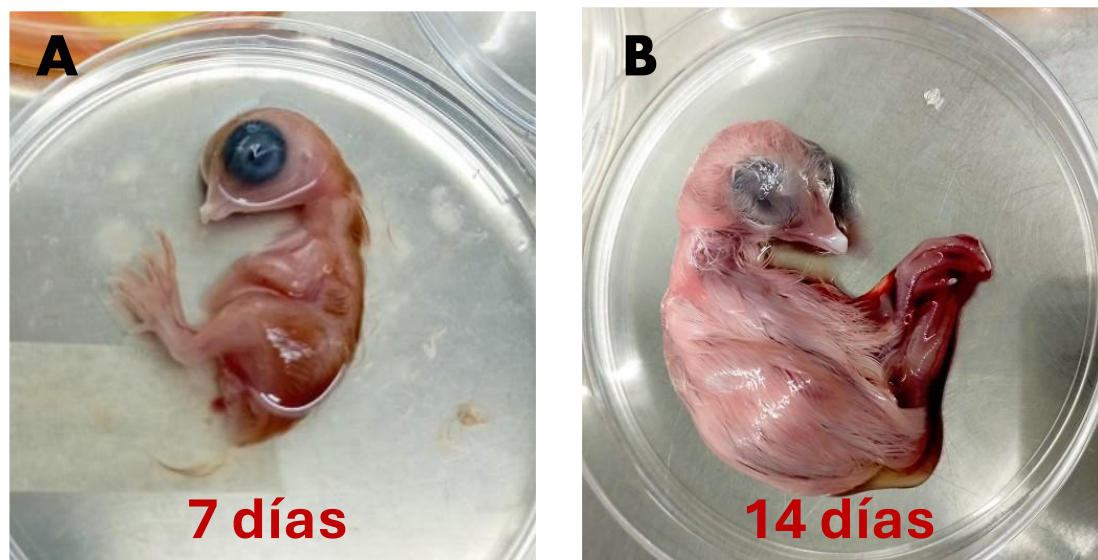
4.1 Optimización de los ensayos de huevos embrionados

El huevo embrionado demostró ser un medio de cultivo altamente favorable para el crecimiento de *Brucella* spp. Durante todos los ensayos, los embriones se mantuvieron en incubadoras que conservaban condiciones óptimas de humedad relativa (50–60%) y una temperatura constante de 37 °C. Estos parámetros fueron monitoreados diariamente con el fin de garantizar tanto la viabilidad del embrión como el adecuado desarrollo de la infección bacteriana. Se observó que variaciones bruscas en la temperatura, especialmente al inicio de los ensayos, provocaban una alta mortalidad embrionaria y una recuperación bacteriana limitada.

Con el propósito de optimizar el modelo experimental, se evaluó el impacto de la edad del embrión en la resistencia frente a la manipulación y la consistencia de los resultados. Se determinó que los embriones con menos de 7 días de desarrollo eran más susceptibles a los cambios ambientales y presentaban una tasa elevada de mortalidad, debido a la inmadurez de sus estructuras tisulares y sistemas fisiológicos. Ante esta situación, se optó por utilizar embriones de mayor edad, específicamente entre los 12 y 14 días de incubación (véase Figura 5). Esta modificación permitió observar un mayor desarrollo de los tejidos embrionarios, lo cual facilitó la extracción de órganos como el hígado y mejoró la recuperación bacteriana. Asimismo, se obtuvo un mayor índice de supervivencia embrionaria, lo que redundó en una mejora sustancial de los parámetros experimentales y en la reproducibilidad de los datos obtenidos.

Figura 5

Evaluación macroscópica de los embriones que se usaron como control.



Nota. Imagen ilustrativa de (A) Embrión de 7 días de edad y (B) Embrión de 14 días de edad.

Elaboración propia.

4.2 Ensayos de letalidad

Se realizaron tres tipos de ensayos experimentales según la edad de los embriones: 7 días, 12–14 días y 9–14 días, utilizando las dos especies bacterianas en estudio, *Brucella canis* y *Brucella abortus*. A lo largo del proyecto se llevaron a cabo un total de 31 ensayos, en los cuales se inocularon más de 160 huevos embrionados. De estos, 123 embriones sobrevivieron tras la inoculación, mientras que 37 murieron a las 3, 24 o 72 horas posteriores a la misma (véase Tabla 1).

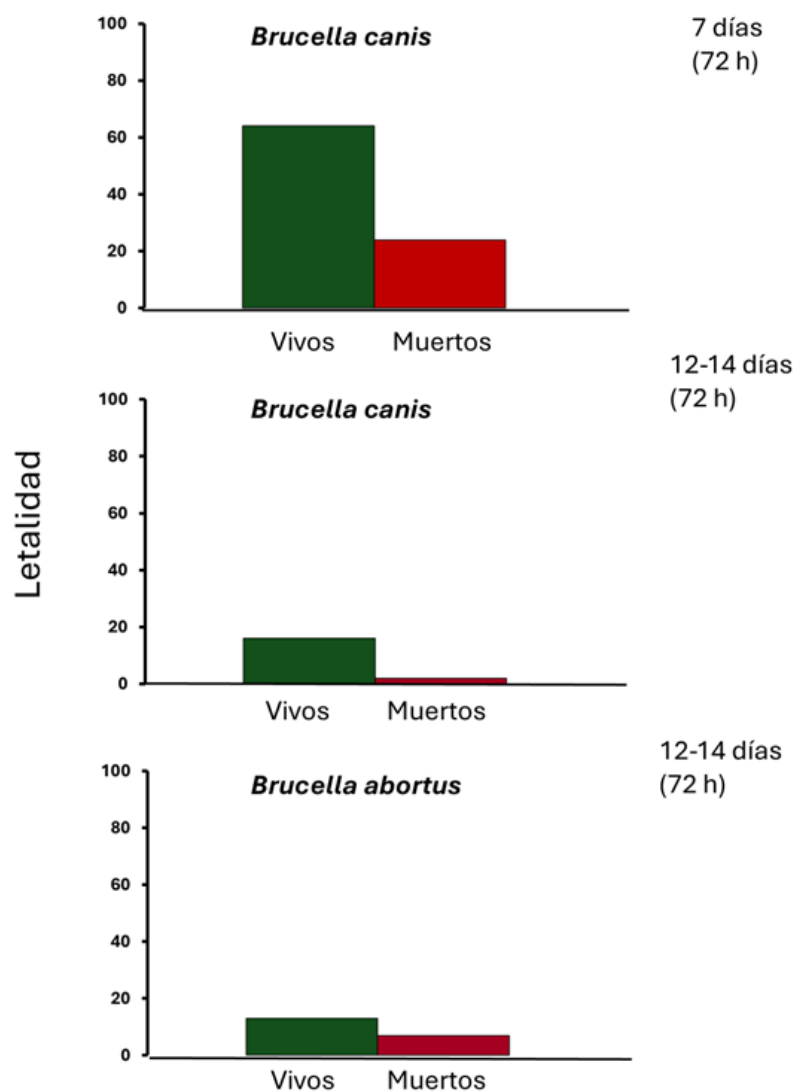
Los experimentos con *B. canis* se realizaron en embriones de 7 a 14 días de incubación, utilizando diferentes dosis de inoculación, que oscilaron entre 10^1 y 10^8

unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), con un periodo de infección de 72 horas. En los embriones de 7 días se obtuvo un total de 64 huevos viables y 24 muertos, lo cual evidencia una alta tasa de supervivencia frente a la infección por *B. canis*. En contraste, en los embriones de 12 a 14 días, se registraron 16 embriones vivos y solo 2 muertos, lo que sugiere una menor letalidad embrionaria, posiblemente relacionada con la mayor madurez del embrión.

Por otra parte, *B. abortus* se inoculó en embriones de la misma edad y bajo condiciones experimentales equivalentes. En este caso, se observó la supervivencia de 13 embriones frente a 7 fallecimientos, lo cual indica una mayor letalidad embrionaria al comparar con los resultados obtenidos para *B. canis* en idénticas condiciones (véase Figura 6).

Figura 6

*Resultados de letalidad y supervivencia embrionaria, utilizando diferentes dosis infectantes ($10^1 - 10^9$ UFC/ml) mediante la inoculación por *B. canis* y *B. abortus* en embriones de 7 días y 12-14 días de edad a 72 horas post inoculación.*



Nota. Elaboración propia.

Tabla 1

Letalidad en el modelo de huevo embrionado inoculados con B. canis y B. abortus a diferentes dosis de infección, edad embrionaria y horas post-inoculación.

Bacteria / Días de edad / Horas post-inoculación	Dosis infectante	Letalidad	Huevos vivos inoculados
<i>B. canis</i> (7 días) 72 h	10 ¹	5	14
	10 ²	2	4
	10 ³	7	17
	10 ⁴	0	4
	10 ⁵	8	20
	10 ⁸	2	5
Total	-	24	-
<i>B. abortus</i> (7 días) 72 h	10 ⁵	3	1
<i>B. canis</i> (12-14 días) 72 h	10 ⁵	2	13
	10 ⁶	0	2
	10 ⁹	0	1
<i>B. abortus</i> (12-14 días) 72 h	10 ⁵	3	10
	10 ⁶	4	2
	10 ⁸	0	1
Total	-	7	-
<i>B. canis</i> (9-14 días) 3-24 h	10 ⁵	1	14
<i>B. abortus</i> (9-14 días) 3-24 h	10 ⁵	0	15
Total	-	37	123

Nota. Elaboración propia.

También se observaron alteraciones macroscópicas indicativas del progreso de la infección causada por *Brucella* sp. Entre los hallazgos más destacados se registró la turbidez del líquido amniótico, el cual presentaba una coloración amarillenta anormal (Figura 7; A, B, C). Asimismo, se identificaron hemorragias generalizadas dentro del huevo (Figura 7;

D), junto con trastornos vasculares como la presencia de petequias en distintas zonas anatómicas del embrión, específicamente en el cuerpo (Figura 7; E) y en la membrana corioalantoidea (Figura 7; F). Además, se observaron malformaciones embrionarias notorias, tales como el desarrollo incompleto de algunos órganos internos, ausencia de extremidades o enoftalmia (Figura 7; G, H, I).

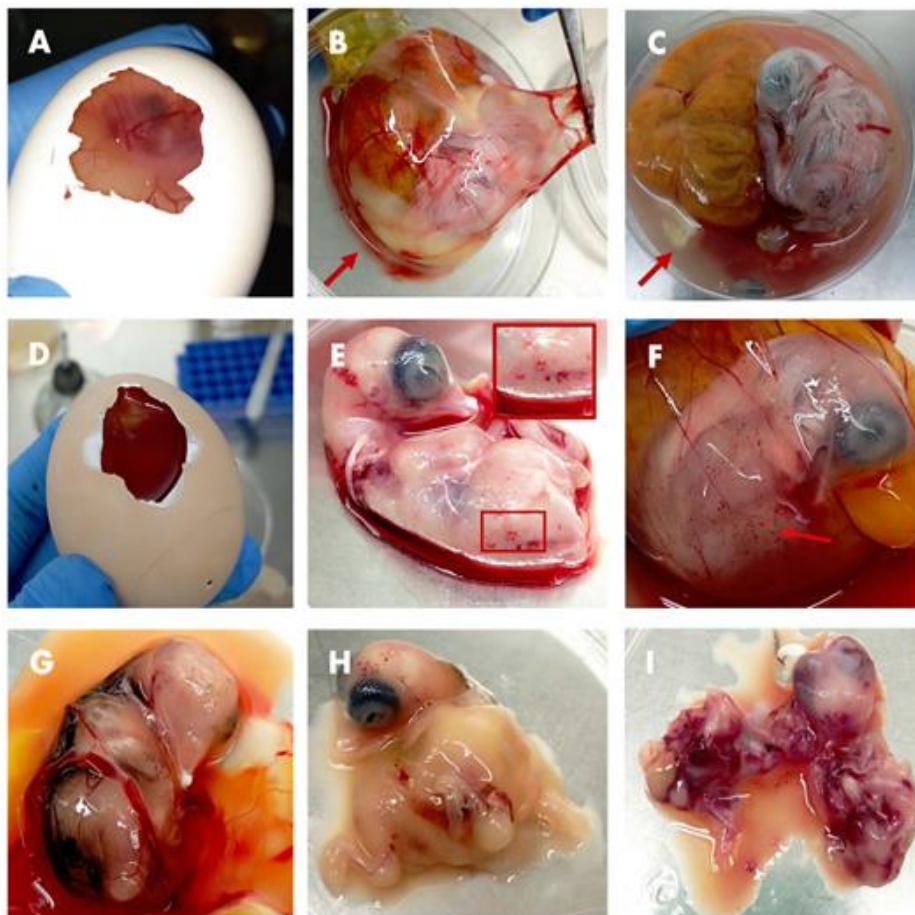
Es relevante destacar que en embriones de 7 días de edad se llevaron a cabo ensayos con *B. abortus*, utilizando una dosis de inoculación de 10^5 UFC/ml. En estos casos, se recolectaron muestras del líquido amniótico de aquellos embriones que fallecieron, en los cuales se había detectado una turbidez anormal del líquido (Figura 7; A, B, C). Dichas muestras fueron procesadas para cultivo bacteriano y recuento cuantitativo de colonias.

Las muestras analizadas incluyeron el sitio de inoculación (SI), el líquido amniótico y el embrión propiamente dicho. Los resultados mostraron una recuperación significativa de bacterias en el líquido amniótico y en el tejido embrionario, con una concentración de 4.8×10^8 UFC/ml en el líquido amniótico y 7.7×10^6 UFC/ml en el embrión. Sin embargo, en el sitio de inoculación no se recuperó presencia bacteriana. Estos datos evidencian una diseminación sistémica de *B. abortus* en el embrión, la cual estaría asociada a un cuadro de infección aguda generalizada que condujo a la muerte del embrión.

Cabe señalar que no todos los embriones procesados presentaban una turbidez tan marcada del líquido amniótico; algunos mostraban únicamente una leve opacidad, lo cual sugiere distintos grados de progresión de la infección entre los casos analizados.

Figura 7

*Evaluación macroscópica del huevo embrionario con presencia de signos patológicos y malformaciones embrionarias en embriones entre 7- 14 días de edad post inoculación con *B. canis* y *B. abortus*.*



Nota. Turbidez del líquido amniótico (A, B, C), hemorragia generalizada en el huevo embrionado (D), hemorragias petequiales en el cuerpo del embrión (E), hemorragias petequiales en la membrana corioalantoidea (F), anoftalmia y falta de desarrollo de las extremidades (G), malformaciones en órganos y cuerpo del embrión (H, I). Elaboración propia.

4.3 Evaluación de la capacidad infectiva de *B. canis* y *B. abortus* en el modelo de huevo embrionado

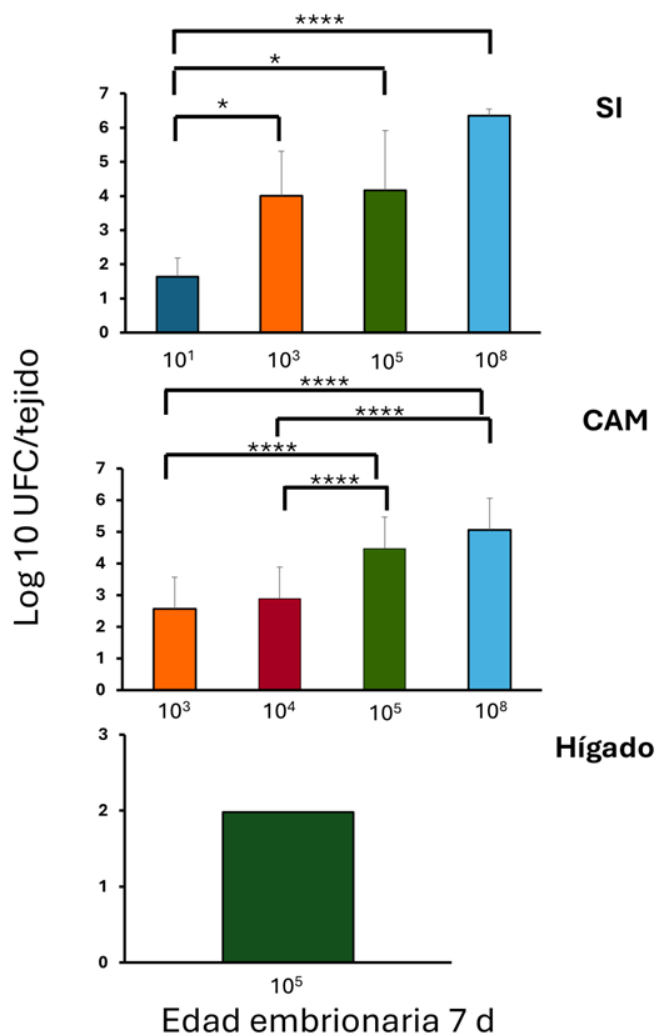
Se evaluó la capacidad infectiva de la bacteria *Brucella* sp. mediante la utilización de diferentes inóculos y cepas bacterianas, analizando su presencia en distintos órganos embrionarios donde la bacteria podría alojarse y establecer una infección. Los tejidos evaluados incluyeron el sitio de inoculación (SI), la membrana corioalantoidea (CAM) y el hígado.

La primera especie utilizada fue *Brucella canis*, inoculada en embriones de pollo de 7 días de edad, con un período de infección de 72 horas. La bacteria logró multiplicarse en todos los tejidos analizados, independientemente de la dosis administrada, la cual varió desde 10^1 hasta 10^8 UFC/ml. El mayor promedio de recuperación bacteriana se observó en el SI, con un valor de 6,35 UFC/g a una dosis de infección de 10^8 UFC/ml, diferencia que resultó estadísticamente significativa en comparación con los demás grupos de infección ($p \leq 0,05$).

En segundo lugar, se registró un promedio de 5,06 UFC/g en la CAM, también a una dosis de 10^8 UFC/ml, con diferencias significativas entre los distintos niveles de inóculo evaluados. Finalmente, en el hígado se determinó un promedio máximo de infección de 1,98 UFC/g a una dosis de 10^5 UFC/ml, aunque con valores significativamente menores respecto a los otros tejidos analizados ($p \leq 0,05$). No obstante, esta evidencia demuestra que *B. canis* posee la capacidad de alcanzar y colonizar órganos internos, como el hígado, lo que confirma su potencial invasivo en tejidos embrionarios (Figura 8).

Figura 8

Resultados de la recuperación bacteriana obtenida por B. canis en el SI, CAM e hígado, utilizando diferentes concentraciones bacterianas en embriones de 7 días de edad.



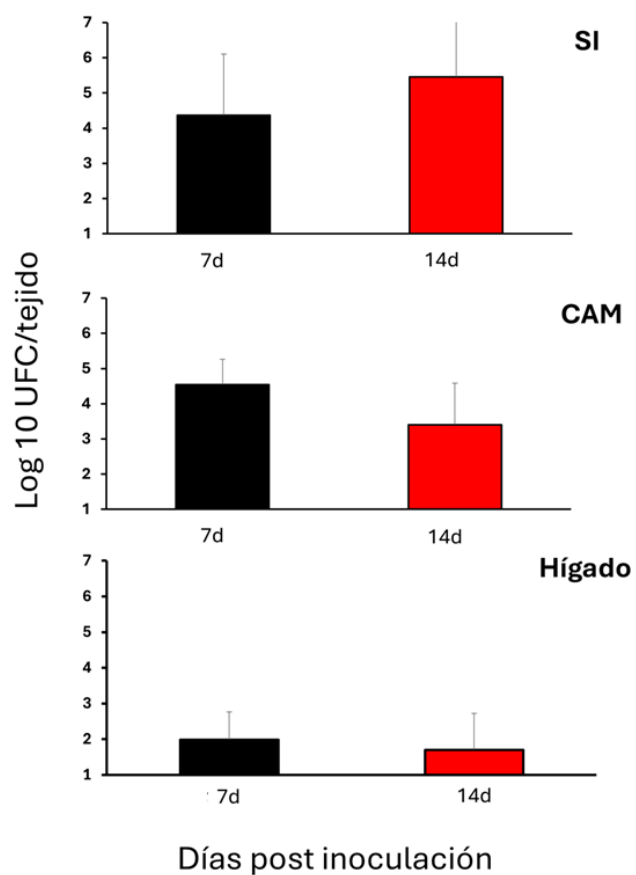
Nota. Elaboración propia.

Seguidamente, se realizaron estudios comparativos entre edades embrionarias de 7 y 14 días edad con 72 horas de infección por *B. canis* a concentraciones de 10⁵ UFC/ml

para evaluar la capacidad infectiva de la bacteria de acuerdo con la edad embrionaria. Los resultados obtenidos evidenciaron que los huevos embrionados a ambas edades hubo mayor infección bacteriana en el SI, seguidamente en la membrana corioalantoidea y en menor proporción en el hígado (Figura 9). Pero no hubo diferencia significativa entre edades.

Figura 9

Resultados de la recuperación bacteriana obtenida por B. canis en los diferentes tejidos embrionarios SI, CAM e hígado, utilizando concentraciones bacterianas de 10^5 en huevos embrionados de 7 y 14 días de edad.

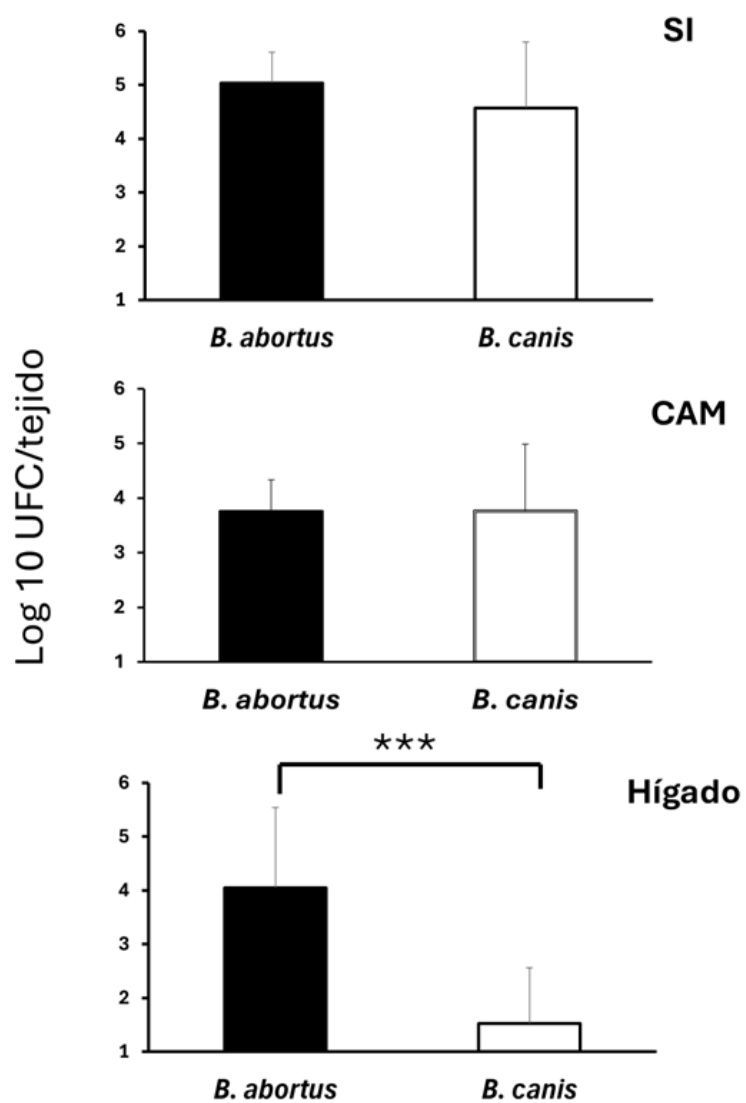


Nota. Elaboración propia.

En otro ensayo, se comparó la virulencia entre las dos especies *B. canis* y *B. abortus* en los diferentes órganos, en embriones de 12-14 días de edad a una concentración de 10^5 UFC/ml. *B. abortus* tuvo mayor número de bacterias por UFC/g en el hígado y SI, obteniendo hasta 4,05 UFC/g (hígado) y 5,03 UFC/g (SI), sin embargo, en SI no hubo una diferencia significativa. En hígado sí hubo una diferencia significativa entre *B. canis* y *B. abortus* ($t = 3.86$, $p < 0.001$). En la membrana corioalantoidea la recuperación fue la misma tanto en *B. canis* como en *B. abortus*. Los resultados indican que *B. abortus* es más infecciosa pudiendo llegar a órganos internos, en comparación a la especie de *B. canis*, obteniendo muy poca recuperación bacteriana como se puede observar en el siguiente gráfico (Figura 10).

Figura 10

Resultados de la recuperación bacteriana obtenida mediante la comparación de *B. canis* y *B. abortus* en los diferentes tejidos embrionarios utilizando concentraciones bacterianas de 10^5 en embriones de 12-14 días de edad.



Nota. Elaboración propia.

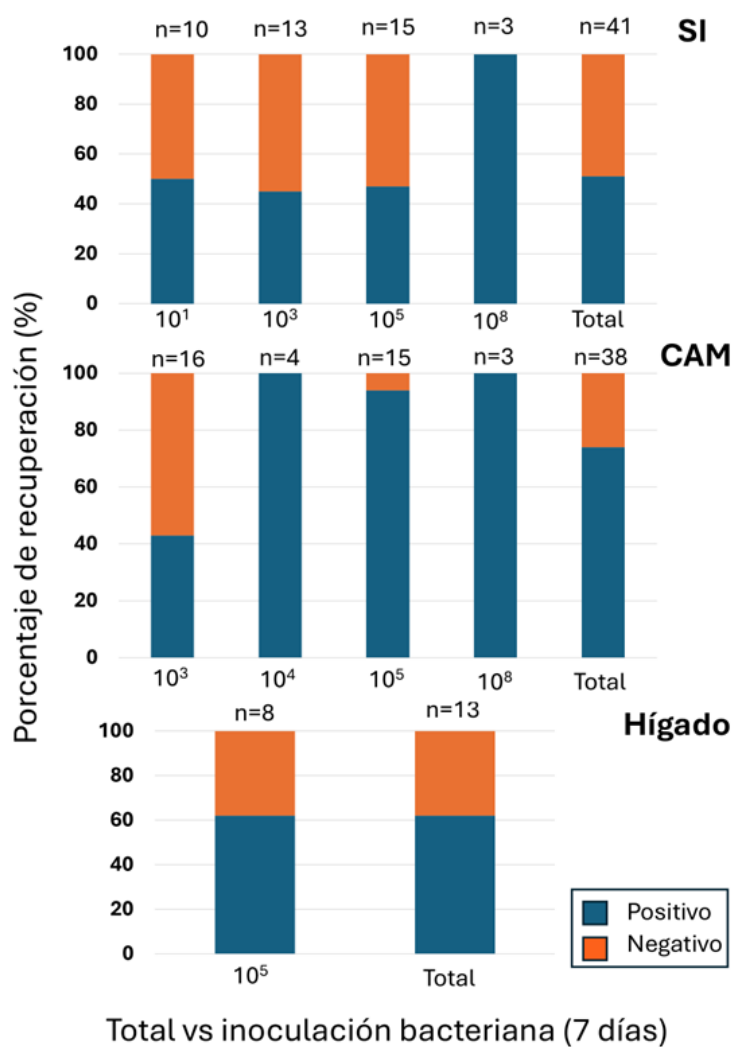
Por otro lado, se evaluó el porcentaje de recuperación bacteriana en aquellos huevos embrionados que resultaron positivos a la presencia de *Brucella canis*, considerando el número total de huevos inoculados y la proporción de muestras con aislamiento bacteriano exitoso. Esta evaluación se realizó en embriones de 7 días de edad.

En el sitio de inoculación (SI), se inoculó un total de 41 huevos a diferentes concentraciones bacterianas (10^1 , 10^3 , 10^5 y 10^8 UFC/ml), observándose que, en la mayoría de los casos, se logró una recuperación bacteriana superior al 40 %. En el caso de la membrana corioalantoidea (CAM), se inocularon 38 huevos a dosis similares (10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^8 UFC/ml), y nuevamente, la mayoría de los embriones presentaron una tasa de recuperación bacteriana superior al 40 %.

Finalmente, en el hígado se trabajó con 13 embriones inoculados a una dosis de 10^5 UFC/ml, de los cuales 8 sobrevivieron y presentaron una recuperación bacteriana superior al 60 %. Estos resultados sugieren que la eficacia en la recuperación bacteriana se incrementa notablemente al utilizar concentraciones iguales o superiores a 10^5 UFC/ml, alcanzando tasas de aislamiento consistentes entre el 40 % y el 60 % en los distintos tejidos analizados (Figura 11).

Figura 11

*Porcentajes de recuperación bacteriana por *B. canis* obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) según el total de huevos embrionados inoculados vs inoculación bacteriana, mediante el uso de diferentes dosis de inoculación en embriones de 7 días de edad.*

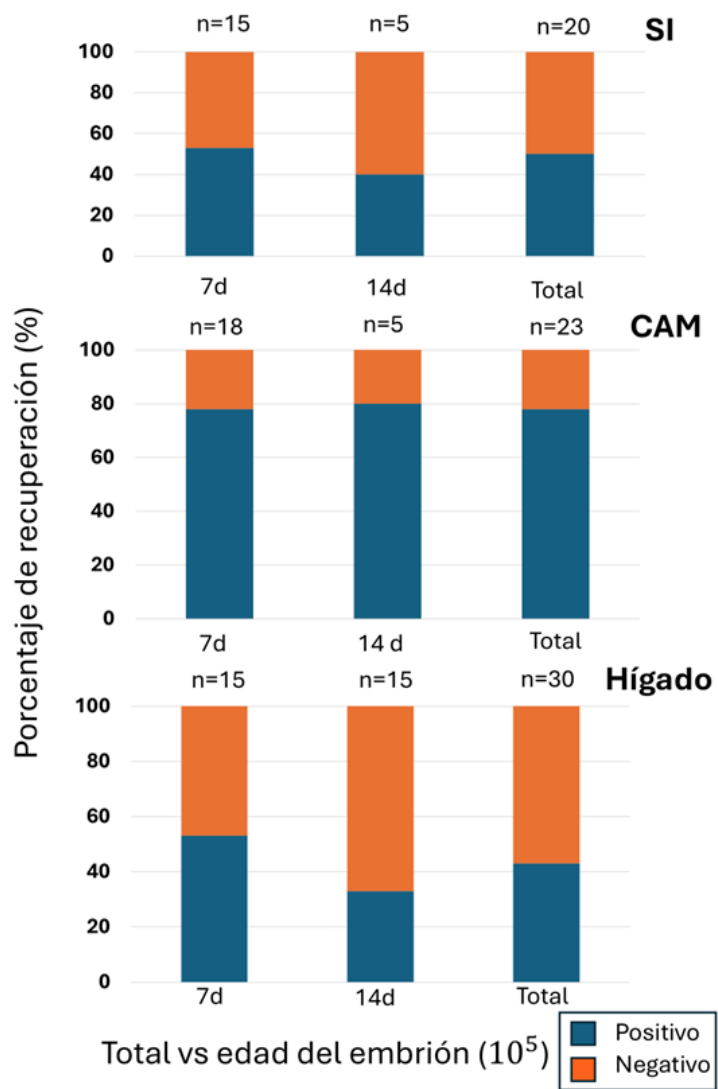


Nota. Elaboración propia.

Por otro lado, utilizando la misma bacteria *B. canis*, se pudo obtener el porcentaje de recuperación bacteriana en embriones entre 7 y 14 días de edad en los diferentes órganos a una concentración bacteriana de 10^5 UFC/ml. En el SI se analizaron un total de 20 huevos embrionados, de las cuales, se obtuvo un 50% de recuperación bacteriana en aquellos huevos inoculados con 7 días de edad, en comparación al porcentaje que se obtuvo en embriones con 14 días de edad que fue menor a un 40%. En CAM se analizaron un total de 23 huevos embrionados donde la recuperación bacteriana fue igualitaria con un 80 % en huevos de 7 y 14 días de edad. En el hígado se analizó un total de 30 huevos embrionados, lo cual, hubo mayor recuperación bacteriana en huevos embrionados de 7 días de edad con un porcentaje mayor al 50%, en comparación a embriones de 14 días de edad donde solamente se obtuvo un 30% de recuperación bacteriana evidenciando que, en embriones de 14 días, *B. canis* es menos virulenta (Figura 12).

Figura 12

*Porcentajes de recuperación bacteriana por *B. canis* obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) según el total de huevos embrionados inoculados vs edad del embrión en huevos de 7 y 14 días de edad, utilizando una concentración de 10^5 UFC/ml.*

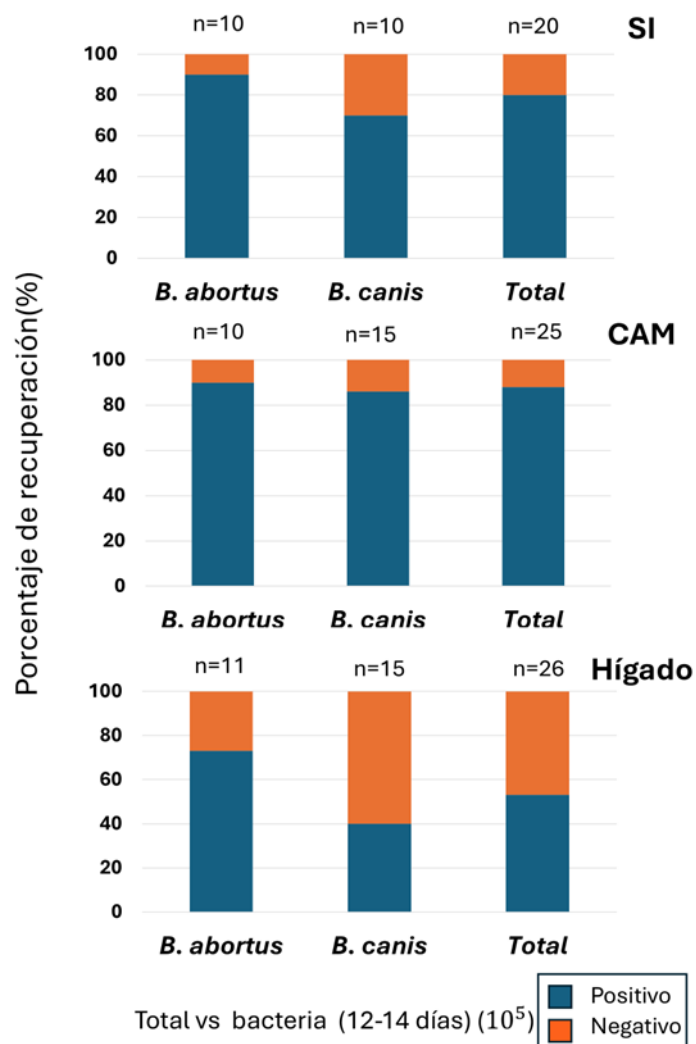


Nota. Elaboración propia.

También, se logró comparar el porcentaje de recuperación bacteriana entre las dos especies estudiadas *B. canis* y *B. abortus* en huevos embrionados de 12-14 días de edad en los diferentes órganos a una concentración bacteriana de 10^5 UFC/ml. En el SI se logró recuperar la bacteria en un total de 20 huevos embrionados inoculados por *Brucella* sp., de las cuales hubo un total de recuperación de un 80%, entre las dos especies de bacteria hubo mayor cantidad de recuperación bacteriana por *B. abortus* con un 90%, en comparación con *B. canis* donde solamente se pudo recuperar un 70% de la bacteria. En CAM se recuperó un total de 25 huevos inoculados con presencia de bacteria, dando lugar a un 88% de recuperación total entre ambas especies de bacteria, por lo tanto, la recuperación fue casi la misma para *B. canis* y *B. abortus* con un porcentaje entre el 85 al 90% de recuperación. En Hígado, siendo un órgano bastante difícil de recuperar, se obtuvo un total de 26 huevos inoculados dando lugar a un 53% de recuperación total entre ambas bacterias, obteniendo más de un 73% de recuperación con *B. abortus* en comparación a la poca recuperación bacteriana por *B. canis* con solamente el 40% de recuperación (Figura 13).

Figura 13

Porcentajes de recuperación bacteriana por B. canis y B. abortus obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) según el total de huevos embrionados inoculados vs cepa bacteriana, en huevos embrionados de 12 - 14 días de edad a una concentración de inoculación de 10^5 UFC/ml.



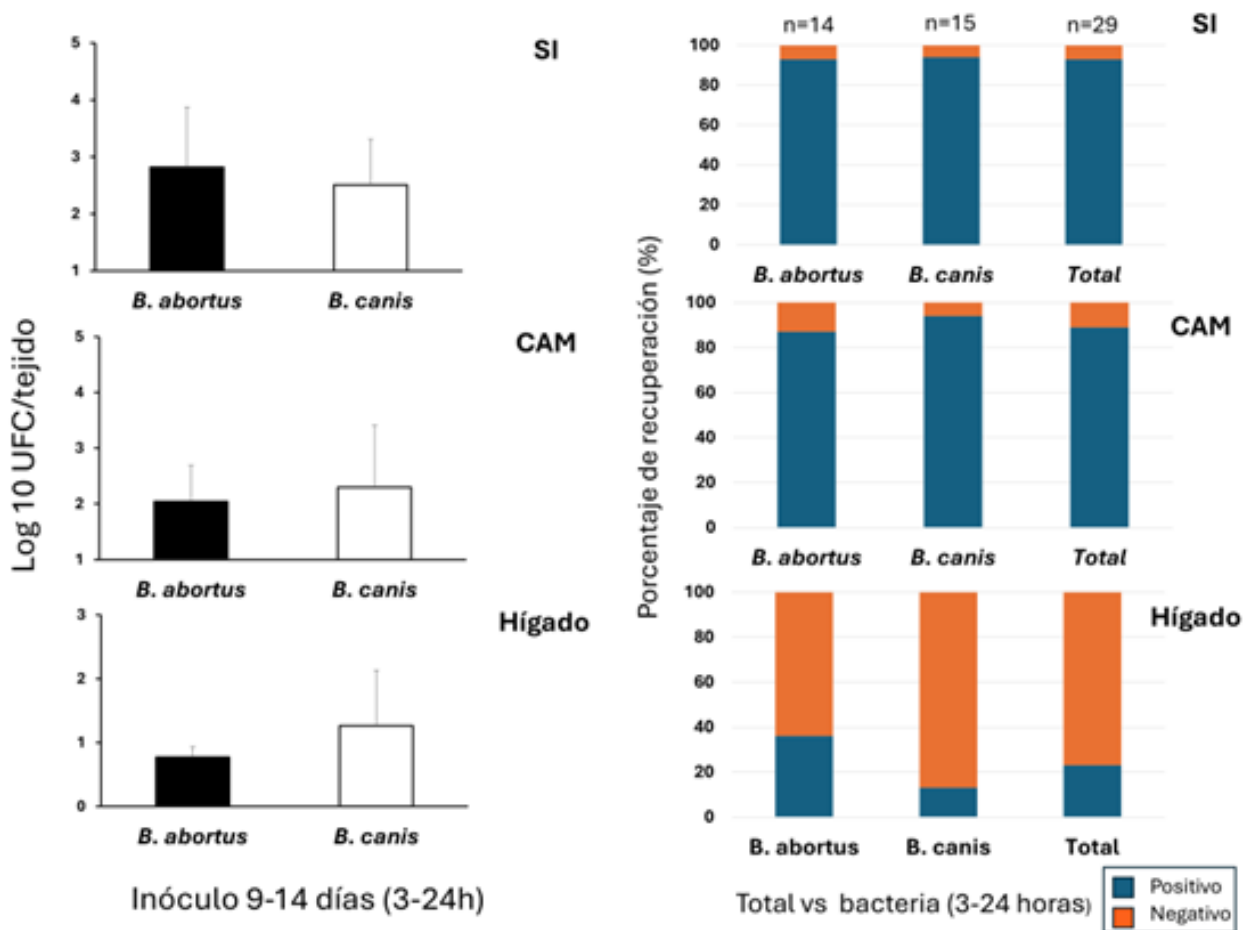
Nota. Elaboración propia.

Además de realizar ensayos con periodos de infección de 72 horas, también se inocularon huevos embrionados entre 9-14 días de edad con 3-24 horas de infección analizando los diferentes órganos. En el SI el promedio de recuperación bacteriana entre *B. canis* y *B. abortus* fue muy similar, con un promedio de 2.82 UFC/g para *B. abortus* y 2.51 UFC/g para *B. canis*, además hubo una similitud en el porcentaje de recuperación bacteriana en ambas especies, siendo mayor al 90% de recuperación, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

En CAM el resultado fue muy similar, la recuperación bacteriana fue más de un 90% en ambas especies, sin embargo, el promedio fue distinto, obteniendo mayor infección para *B. canis* con 2.30 UFC/g, en comparación con *B. abortus* con un promedio de 2.04 UFC/g, no se encontraron diferencias significativas. En hígado, los resultados también fueron distintos, el número de huevos con recuperación bacteriana fue mayor con *B. abortus* con un 35% que con *B. canis* con un 10% de recuperación bacteriana, sin embargo, el promedio de infección que se obtuvo fue mayor en la bacteria *B. canis* con un promedio de 1.31 UFC/g en comparación con *B. abortus* con un promedio de 0.82 UFC/g, sin embargo, no hubo diferencias significativas (Figura 14).

Figura 14

Promedio de infección por B. canis y B. abortus obtenidos en los diferentes tejidos (SI, CAM, Hígado) y porcentajes de recuperación bacteriana según el total de huevos inoculados en embriones de 9 - 14 días de edad en periodos de infección de 3-24 horas a concentraciones del inóculo de 10^5 UFC/ml.



Nota. Elaboración propia.

4.4 Citologías por inmunofluorescencia directa

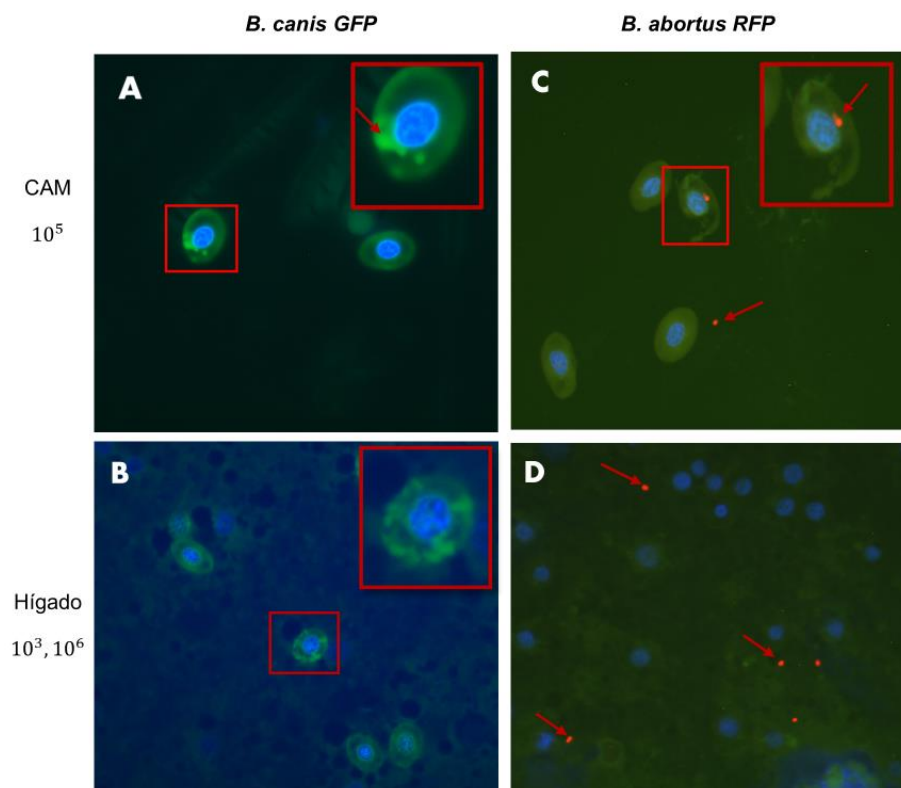
Durante la etapa de observación microscópica, se empleó la técnica de inmunofluorescencia directa con tinción DAPI en muestras de tejido previamente macerado. Esta metodología permitió la visualización de las células correspondientes a cada tejido, así como la detección de *Brucella* sp. Se identificó la presencia de *B. canis* únicamente en tejidos como la membrana corioalantoidea (CAM) y el hígado; sin embargo, resultó complejo observar su presencia en el sitio de inoculación (SI), probablemente debido a la baja carga bacteriana, a la dificultad técnica para la visualización en las láminas, y a una posible degradación celular en dicha zona.

Aunque la especie *B. canis* fue recuperada de tejidos embrionarios mediante recuentos bacterianos, ello no garantiza necesariamente su presencia detectable en todos los tipos de tejido celular a través de la microscopía. En la CAM se observaron varias bacterias de *B. canis* (cepa GFP) ubicadas intracelularmente, con indicios de replicación aparente (Figura 15; A), tras la inoculación con una concentración de 10^5 UFC/ml. Asimismo, en tejido hepático se logró observar la presencia de la bacteria en el interior celular utilizando una concentración de inóculo menor, de 10^3 UFC/ml, lo que sugiere una infección activa (Figura 15; B).

En relación con *B. abortus* (cepa RFP), se visualizó la presencia de bacterias individuales tanto intra como extracelulares en la CAM, utilizando una concentración de inóculo de 10^5 UFC/ml (Figura 15; C). En el hígado, se identificaron bacterias dispersas de manera extracelular a partir de una concentración de 10^6 UFC/ml (Figura 15; D).

Figura 15

Observación microscópica de tejido embrionario CAM e hígado, presencia de bacterias individuales dentro y fuera de la célula por B. abortus RFP y replicación bacteriana intracelular por B. canis GFP a un aumento de 600x.

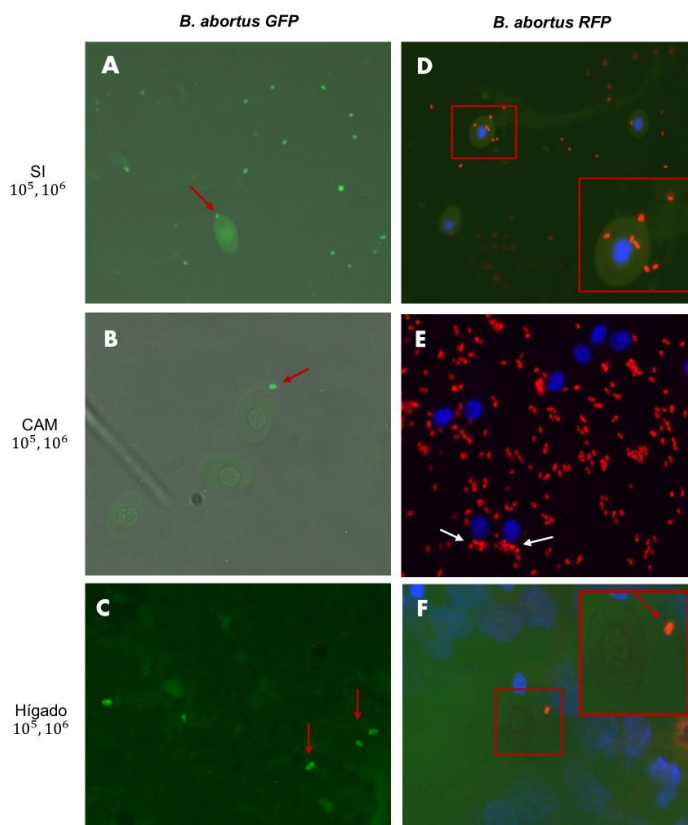


Nota. (A) Bacterias intracelulares en CAM de *B. canis* GFP (flecha) con una dosis de infección 10^5 UFC/ml. (B) Replicación bacteriana de *B. canis* GFP intracelular en hígado (recuadro) con una dosis de infección 10^3 UFC/ml. (C) Células de la CAM con bacterias intracelulares individuales de *B. abortus* RFP (recuadro) y una bacteria extracelular de *B. abortus* (flecha) con una dosis de infección 10^5 UFC/ml (D) Bacterias extracelulares en hígado por *B. abortus* RFP (flechas) con una dosis de infección 10^6 UFC/ml. Elaboración propia.

Se observó *B. abortus GFP* en los tres tejidos embrionarios a diferentes concentraciones de inoculación (10^5 , 10^6). En los tejidos embrionarios analizados (SI, CAM e hígado) se observó *B. abortus* en el espacio extracelular sin evidencia de replicación bacteriana (Figura 16, A, B, C). Por otro lado, se observó gran cantidad de bacterias fluorescentes rojas en los diferentes tejidos, como SI (Figura 16; D) donde la bacteria estaba localizada extracelular e intracelularmente. Además, en CAM (Figura 16; E) se pudo identificar la presencia de replicación bacteriana dentro y fuera de las células, indicando infección activa. Por último, se observó poca cantidad de bacteria en hígado (Figura 16; F) pero se pudo comprobar la presencia de la bacteria fuera de las células.

Figura 16

Observación microscópica de tejido embrionario SI, CAM e hígado con presencia de bacterias de B. abortus GFP extracelular y replicación bacteriana intracelular por B. abortus RFP a un aumento de 600x.

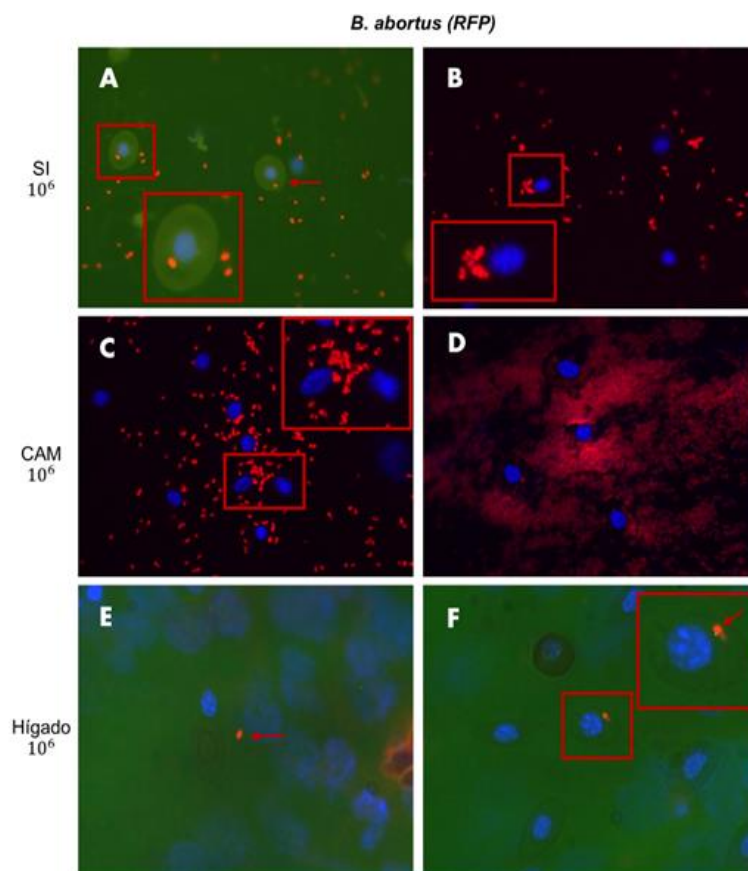


Nota. (A), (B), (C) Bacterias extracelular (Flechas) de *B. abortus* GFP en SI, CAM e Hígado con una dosis de infección 10^5 UFC/ml. (D) Bacterias dentro y fuera de las células de *B. abortus* RFP en SI con una dosis de infección 10^6 UFC/ml (Cuadro). (E) Infección activa, bacterias intra (Flecha) y extracelular de *B. abortus* RFP en CAM con una dosis de infección 10^6 UFC/ml. (F) Bacteria extracelular de *B. abortus* RFP en hígado con una dosis de infección 10^6 UFC/ml (cuadro).
Elaboración propia.

También se realizaron inoculaciones a concentraciones de 10^6 UFC/ml para buscar la presencia de *B. abortus* en SI, CAM e hígado. En el SI se observa que hubo bacterias ubicadas intracelular y extracelularmente (Figura 17; A) y la presencia de bacterias en replicación dentro de la célula embrionaria (Figura 17; B). En CAM hubo mayor cantidad de replicación bacteriana (Figura 17; C, D), evidenciando que hubo una infección activa en esta zona anatómica del embrión. Por último, en el hígado, hubo menor cantidad de presencia bacteriana al verse solamente unas cuantas bacterias de manera individual rodeando las células del hígado indicando su presencia en órganos internos (Figura 17; E, F).

Figura 17

Celularidad embrionaria en SI, CAM e hígado, bajo la infección activa por B. abortus RFP y el alcance intra y extracelular de la bacteria a órganos internos vistas a un aumento de 600x.



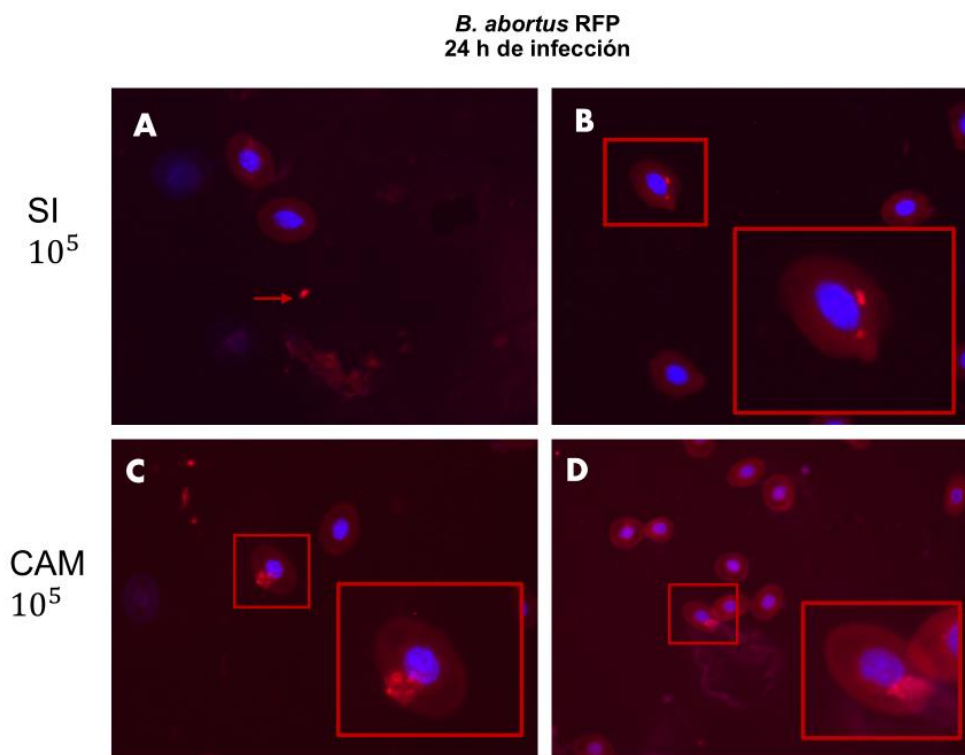
Nota. (A) Presencia de bacterias extracelular e intracelular de *B. abortus* GFP en SI y (B) replicación bacteriana intracelular (recuadro) con una dosis de infección 10^6 UFC/ml. (C)(D) Replicación bacteriana activa intracelular y extracelular de *B. abortus* RFP en CAM con una dosis de infección 10^6 UFC/ml. (E)(F) Presencia bacteriana intracelular de *B. abortus* RFP en Hígado con una dosis de infección 10^6 UFC/ml (recuadro). Elaboración propia.

Seguidamente, se observó *B. abortus* (RFP) con solamente 24 horas de infección, la bacteria estuvo presente en el SI y CAM con concentraciones de 10^6 UFC/ml, sin la

posibilidad de observar bacterias en el hígado que puede atribuirse al periodo inicial de establecimiento de la infección. En el SI se observaron bacterias que se encontraban extracelularmente (Figura 18; A) y dentro de la célula (Figura 18; B). En CAM las concentraciones bacterianas fueron mayores, ya que se logró observar dos repeticiones bacterianas intracelular, dando lugar a que hubo mayor cantidad de bacterias en esta zona del embrión y evidencia el transcurso de la infección (Figura 18; C, D).

Figura 18

Celularidad embrionaria en SI y CAM con presencia de B. abortus intracelular, extracelular y replicación bacteriana en el transcurso de 24 horas post inoculación vistas a un aumento de 600x.



Nota. (A) Bacteria extracelular de *B. abortus* en el SI con una dosis de infección 10^5 UFC/ml. (flecha). (B) Presencia de dos bacterias intracelular *B. abortus* en el SI con una dosis de infección 10^5 UFC/ml (Recuadro). (C), (D). Presencia de replicación bacteriana de *B. abortus* dentro de dos células en CAM con una dosis de infección 10^5 UFC/ml. Elaboración propia.

V. DISCUSIÓN

La inoculación en embriones de pollo se consolida como una herramienta ideal para el aislamiento de agentes infecciosos intracelulares como *Brucella* sp. En este estudio se demostró que *B. canis* y *B. abortus* poseen la capacidad de replicarse eficazmente dentro de las células embrionarias de pollo, alcanzando incluso órganos internos como el hígado. Además, el número de bacterias recuperadas fue considerable (hasta 10^8 UFC/ml), superando la dosis de inoculación inicial, tal como lo han reportado estudios previos que utilizaron este mismo modelo experimental (Wareth et al., 2015; Itzcoatl et al., 2008).

La vía de inoculación a través de la membrana corioalantoidea demostró ser particularmente eficaz, ya que proporciona un ambiente altamente nutritivo para la replicación bacteriana de *Brucella* sp. Esta membrana constituye un órgano de fácil acceso que permite la inoculación directa, lo que resultó en una tasa de recuperación bacteriana superior al 90%. Por ello, el modelo de huevo embrionado se confirma en este estudio como una herramienta diagnóstica eficiente para el aislamiento de *Brucella* sp. Estos hallazgos coinciden con los resultados obtenidos por Wareth et al. (2015) y Pulido et al. (2012), quienes también validaron la efectividad del modelo embrionado como método de aislamiento bacteriano. Además de facilitar el crecimiento bacteriano, este modelo presenta ventajas como su fácil manipulación, la posibilidad de infectar distintos tejidos embrionarios, su entorno estéril y la variedad de rutas de inoculación disponibles.

En cuanto a la letalidad embrionaria inducida por *B. canis*, se observó un efecto significativo. Los resultados indicaron que concentraciones entre 10^3 y 10^5 UFC/ml provocaron una elevada tasa de mortalidad embrionaria, especialmente en embriones

jóvenes de siete días de edad (24 muertos de un total de 64). No obstante, se demostró que concentraciones bacterianas mayores (10^5 , 10^6 y hasta 10^9 UFC/ml) presentaron una menor letalidad en embriones de 12 a 14 días de edad, considerados más resistentes a la infección por *B. canis* (2 muertos de 16).

Por el contrario, bajo infección con *B. abortus*, se registró una mayor mortalidad en embriones de 12 a 14 días (7 muertos de 13), lo cual sugiere que *B. abortus* posee un mayor grado de virulencia en comparación con *B. canis*, al provocar mayor letalidad en embriones con un mayor grado de desarrollo tisular. Este hallazgo coincide con estudios como los de Quintana (2011) y Manders et al. (2020), quienes señalaron que factores como la edad embrionaria inferior a los 14 días, el grado de desarrollo de los tejidos, las condiciones de incubación y el manejo durante el transporte pueden incidir significativamente en la tasa de letalidad embrionaria.

En este estudio se demostró que *Brucella* sp. posee la capacidad de propagarse a distintos tejidos embrionarios, produciendo una infección generalizada que provoca, entre otras manifestaciones, hemorragias, petequias localizadas en el cuerpo, cabeza y membrana corioalantoidea (CAM), congestión vascular, y la invasión de órganos internos, evidenciada por la presencia de la bacteria en el tejido hepático. Asimismo, la replicación bacteriana indujo en algunos embriones turbidez del líquido amniótico, acompañada de una proliferación significativa de bacterias, lo que llevó a la interrupción del desarrollo embrionario, malformaciones anatómicas, ausencia de extremidades y falta de formación de órganos. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que reportan lesiones embrionarias similares, particularmente a nivel vascular (Wareth et al., 2015).

Por otra parte, se evaluó la capacidad infectiva comparativa entre *B. abortus* y *B. canis*, determinando que la primera presenta una mayor virulencia. Esto se evidenció en los valores promedio de infección, los cuales fueron más elevados para *B. abortus* en el sitio de inoculación (SI) (5,03 frente a 4,57) y en el hígado (4,05 frente a 1,52), mientras que en CAM ambas especies presentaron valores similares (3,76). La mayor capacidad de *B. abortus* para alcanzar diversos órganos y su elevado porcentaje de recuperación bacteriana justifican su clasificación como la especie más virulenta en este estudio a las 72 horas post-infección. Estos resultados se encuentran en concordancia con investigaciones previas que señalan que *B. abortus* tiende a diseminarse ampliamente por los tejidos, siendo el hígado y el bazo los órganos más afectados (González et al., 2021).

En cuanto al porcentaje de recuperación bacteriana en relación con la edad embrionaria, se observó que en embriones de 12 a 14 días, *B. canis* presentó un menor porcentaje de recuperación y valores promedio de infección más bajos. En contraste, *B. abortus* mostró una recuperación bacteriana significativamente mayor y promedios de infección más altos, lo cual también se observó en los embriones de entre 7 y 12 días de edad. Por tanto, en el contexto de este estudio, se concluye que *B. abortus* presenta una mayor capacidad para generar infección que *B. canis*. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que destacan la mayor tasa de infección, la capacidad abortiva y la afinidad de *B. abortus* por el eritritol, lo cual facilita su proliferación en tejidos placentarios (Mackey & Watkins, 1975; Pulido et al., 2010; Padrón, 2011).

VI. CONCLUSIONES

- La inoculación del embrión de pollo como un modelo *in vivo*, favoreció la recuperación bacteriana de *Brucella* sp, al tener la capacidad de multiplicarse en las células inmaduras del embrión, esto confirma que *B. canis* y *B. abortus* tiene la capacidad infectiva de multiplicarse con UFC mínimas, ya que ambas especies bacterianas lograron infectar tejido embrionario a diferentes dosis de inoculación.
- El modelo de huevo embrionado como modelo de infección, permitió medir la tasa de letalidad, comprobando así que es mejor el uso de huevos embrionados de mayor edad entre 12-14 días.
- La inoculación del embrión de pollo permitió determinar la distribución, ubicación intracelular y virulencia de *Brucella* sp., se concluye que el uso de dosis altas de inoculación bacteriana permitirá mayor capacidad de infección y replicación dentro de las células embrionarias.
- *B. abortus* puede llegar a ser más virulenta que *B. canis*, teniendo mayor replicación dentro de los tejidos a tiempos de infección de 24 a 72 horas.
- Mediante la técnica de inmunofluorescencia directa se pudo determinar la presencia de *B. canis* y *B. abortus* en los diferentes tejidos embrionarios hasta llegar a infectar órganos internos del embrión.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar nuevos ensayos empleando embriones entre 12 a 14 días de edad, a fin de reducir la mortalidad, optimizar su manipulación y, al ser embriones más vigorosos y resistentes a la infección, favorecer tanto la supervivencia embrionaria como la replicación bacteriana.
- Es recomendable complementar el estudio con métodos diagnósticos más avanzados, por medio de la histopatología para observar más detalladamente cambios microscópicos en la citoarquitectura de las células en los órganos afectados.
- Se sugiere ampliar los tiempos de observación microscópica de muestras de tejido para inmunofluorescencia directa, con el fin de prevenir su degradación, mejorar la visualización de las bacterias, mantener la viabilidad de la tinción y preservar la arquitectura celular.
- Se aconseja ampliar los criterios de evaluación al cuantificar UFC/g en otros tejidos como bazo y saco vitelino a las 72 horas post infección para potenciar los datos obtenidos por este estudio en tejidos que pueden llegar a ser un buen foco de infección.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alton, G., Jones, L., Angus, R., & Verger, J. (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique.
- Álvarez, N., Díaz, M., & Ortiz, M. (2015). *Brucellosis, una zoonosis frecuente*. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.
- American Veterinary Medical Association. (2020). *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 edition*. <https://doi.org/10.2460/ajvr.81.9.717>
- Beccia, R., Biver, T., Pardini, A., Spinelli, J., Secco, F., Venturini, M., ... & Prado Gotor, R. (2012). El fluoróforo 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) induce el plegamiento del ADN en ADN largo de doble cadena. *Chemistry: An Asian Journal*, 7(8), 1803–1810.
- Cabasso, V. (1967). *Algunos progresos en virología* (Vol. 6). Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria.
- Castro, H., González, S., & Prat, M. (2005). Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(2), 203–216.
- Chacón-Díaz, C., Altamirano-Silva, P., González-Espinoza, G., Medina, M. C., Alfaro Alarcón, A., Bouza-Mora, L., Jiménez-Rojas, C., Wong, M., Barquero-Calvo, E., Rojas, N., Guzmán-Verri, C., Moreno, E., & Chaves-Olarte, E. (2015). *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts. *Infection and Immunity*, 83(12), 4861–4870. <https://doi.org/10.1128/IAI.00995-15>
- Contreras, J., Martínez, P., Santos, I., & Rojo, C. (2018). El embrión de pollo como modelo de experimentación: ven y descubre la embriología. Departamento de Anatomía y

Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.

- De Figueiredo, P., Ficht, T. A., Rice, A., Rossetti, C. A., & Adams, L. G. (2015). Pathogenesis and immunobiology of brucellosis. *The American Journal of Pathology*, 185(6), 1505–1517. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.03.003>
- Esquivel, S., & König, E. (2011). Bienestar animal en investigación biomédica. *Ciencias Veterinarias*, 29(1), 21–35.
- Freer, E., & Castro, R. (2001). *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 22(1–2), 73–82.
- Galindo, R., & Lisette, S. (2005). Embriodiagnos y ovoscopía. En *Análisis y control de calidad de los huevos incubables (REDVET)*, 6[3], 1–25.
- Głowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., & Bielawska, A. (2018). *Brucella*: Virulence factors, pathogenesis and treatment. *Polish Journal of Microbiology*, 67(2), 151–161. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-021>
- Gorvel, J. P., & Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 281–297. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
- Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
- González-Espinoza, G., Arce-Gorvel, V., Mémet, S., & Gorvel, J. P. (2021). *Brucella*: Reservoirs and niches in animals and humans. *Pathogens*, 10(2), 186. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020186>

- Hernández, G., Bonilla, R., Barrantes, O., Esquivel, A., Montero, D., González, R., et al. (2017). Brucellosis in mammals of Costa Rica: An epidemiological survey. *PLoS ONE*, 12(8), e0182644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182644>
- Hernández, G., Ruiz, N., Bonilla, R., Romero, J. J., Jiménez, J., González, R., et al. (2017). Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease. *PLoS ONE*, 12(8), e0182380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182380>
- Insumolab. (2018). *Caldo Trypticosa de soya: Certificado de análisis*. Capitán Orella.
- Instituto de Estudios del Huevo. (2017). *El gran libro del huevo* (1.ª ed., pp. 28–37). Everest S. A.
- Itzcoatl, D., Amador, V., Peniche, A., Barradas, F., Villanueva, M., Landín, L., Franco, J., Flores, R., & Morales, J. (2008). Empleo de embriones de pollo como modelo para aislar *Brucella abortus* a partir de leche. En *XXI Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz*. México.
- Jar, A. M. (2014). Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 77–79.
- Manders, T. T. M., Matthijs, M. G. R., Veraa, S., van Eck, J. H. H., & Landman, W. J. M. (2020). Tasas de éxito de la inoculación de los distintos compartimentos de huevos de gallina embrionados en diferentes días de incubación. *Patología Aviar*, 50(1), 61–77. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1834503>
- Martínez, D., Amador, V., Peniche, A., Tobías, F., Villanueva, M., Landín, L., Franco, J., Flores, R., & Morales, J. (2008). Empleo de embriones de pollo como modelo para aislar *Brucella abortus* a partir de leche.

- Martínez, D., Padrón, O., Salcedo, M., Robledo, M., Pulido, E., Peniche, A., Moreno, A., Carrasco, A., Flores, R., & Morales, F. (2008). Histología de órganos parenquimatosos de ratonas albinas utilizadas como modelo de infección por *Brucella abortus*. Veracruz, México.
- Moreno, E., & Moriyón, I. (2006). The genus *Brucella*. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (Vol. 5, pp. 315–456). Springer-Verlag.
- OIE. (2010). *Brucellosis*. The Center for Food Security and Public Health & Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 1–16.
- OIE. (2018). Bursitis infecciosa (enfermedad de Gumboro). En *Manual terrestre de la OIE* (Cap. 3.3.12).
- Olsen, S. C., & Tatum, F. M. (2010). Bovine brucellosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(1), 15–27.
- Padrón, O. (2011). *Identificación de la tolerancia inmune en bovinos persistentemente infectados con Brucella abortus* (Tesis de grado). Universidad Veracruzana, México.
- Piche, M., Alfaro, A., Morales, J., Murcia, P., & Jiménez, C. (2018). Reporte de influenza canina en Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 36(3), 17. <https://doi.org/10.15359/rcv.36-3.9>
- Prosdócimo, F. M. (2014). *Patogénesis experimental de Salmonella Enteritidis y Salmonella Gallinarum en producción avícola* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Luján, Argentina.

- Pulido, E. (2010). *El embrión de pollo como modelo de infección por Brucella spp., a partir de leche de bovinos infectados* (Tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, México.
- Pulido, E., Martínez, D. I., Pardío-Sedas, V. T., Ramírez-Mendoza, H., Rivera-Benítez, F., Padrón-Tello, O., & Flores-Castro, R. (2011). Histopathologic effect of *Brucella abortus* on chicken embryos inoculated with milk from seropositive cows. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3), 789–794.
- Pulido, E., Martínez, H., Villanueva, V., Amador, O., Peniche, C., Pardío, S., et al. (2012). The use of chicken embryos as a model for *Brucella abortus* strains isolation from milk collected samples. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(4), 483–487.
- Querol, J. (2011). Cuestiones clínicas, epidemiológicas y diagnósticas de la brucelosis bovina, ovina y caprina. *Sitio Argentino de Producción Animal*.
<https://www.produccion-animal.com.ar>
- Quintana, J. A. (2011). *AVITECNIA: Manejo de las aves domésticas más comunes* (2.^a ed.). Editorial Trillas.
- Mackey, P. M., & Watkins, G. C. (1975). The role of erythritol in the pathogenesis of brucellosis. *Journal of Bacteriology*, 121(2), 619–630.
<https://doi.org/10.1128/jb.121.2.619-630>
- Rivers, R., Andrews, E., González, A., Donoso, G., & Oñate, A. (2006). *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 38(1), 7–18.

- SENASA. (2020). *Informe sobre la situación sanitaria de Costa Rica 2020*. Servicio Nacional de Salud Animal y Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- Silva, T. M. A., Costa, E. A., Paixão, T. A., Tsolis, R. M., & Santos, R. L. (2011). Laboratory animal models for brucellosis research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/518323>
- Stable, Y., Zamora, Z., & Fernández, A. (2021). Método de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo: una alternativa en la experimentación toxicológica y farmacológica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 52(2), 118–128.
- Vargas, O., Solano, M., León, B., & Guevara, M. (2009). Análisis molecular de una cepa de virus de Newcastle de origen vacunal aislada a partir de un hisopado cloacal de aves sanas en Costa Rica. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(11), 1–19.
- Wareth, G., Böttcher, D., Melzer, F., Shehata, A. A., Roesler, U., Neubauer, H., & Schoon, H.-A. (2015). Experimental infection of chicken embryos with recently described *Brucella microti*: Pathogenicity and pathological findings. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 41, 28–34.
- Wareth, G., Kheimar, A., Neubauer, H., & Melzer, F. (2020). Susceptibilidad de las especies aviares a la infección por *Brucella*: un estudio basado en hipótesis. *Pathogens*, 9(2), 77. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020077>
- Warin, S. (2008). Incubación: El desarrollo embrionario. *Selecciones Avícolas*, (p. 40). Ceva Santé Animale.
- Xavier, M. N., Paixão, T. A., den Hartigh, A. B., Tsolis, R. M., & Santos, R. L. (2010). Pathogenesis of *Brucella* spp. *The Open Veterinary Science Journal*, 4(1), 1–9.

IX. ANEXOS



Protocolo para la inoculación de huevo embrionado como modelo de experimentación científica

Melissa Rojas Naranjo, UTN

1 SELECCIÓN DE HUEVOS FÉRTILES

Preferiblemente entre 12 y 14 días de edad.

2 OVOSCOPIA

En un cuarto oscuro, verificar a través de una fuente de luz el movimiento voluntario de los embriones y verificar su viabilidad.



3 SELECCIÓN DE BACTERIA/CEPA

Seleccionar la cepa. Debe ser cultivada en un medio de cultivo ATS a una temperatura de 37°C por 72 horas.

4 DENSIDAD ÓPTICA

Medir la D.O. de la Bacteria con ayuda de un espectrómetro. Centrifugar la bacteria si se requiere.



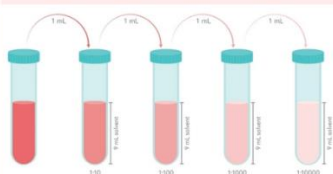
5 CÁLCULO DE LA DENSIDAD ÓPTICA

$$\frac{A(420nm) - (0.0635)}{8 \times 10^{-11}}$$

Se debe ajustar la dosis a la concentración deseada para el inóculo bacteriano.

6 DILUCIONES BACTERIANAS

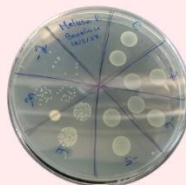
Posteriormente, se realizan diluciones seriadas del cultivo bacteriano inicial, ajustada mediante densidad óptica.



7 RECUENTOS BACTERIANOS

Se realizan recuentos en una placa de ATS estéril, poniendo 2 gotas por dilución. Se deja en incubación a 37° por 72 horas.

Se realiza antes y después del inóculo, para verificar si la concentración bacteriana fue la deseada.



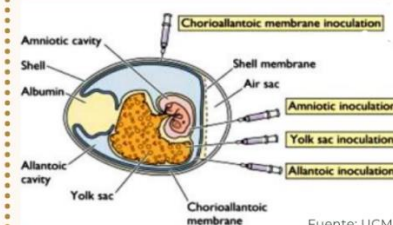
Fórmula para el cálculo de colonias en placa UFC/ml

$$[\] \text{ Recuento Inicial} = \frac{\text{Suma de } \frac{UFC}{ml}}{2} = \text{conteo final } \frac{UFC}{ml}$$

$$[\] \text{ Inicial} = \frac{\text{Conteo final UFC}}{\text{cantidad de gota (ml)}} = \frac{UFC}{ml} \div \text{Dilución} = \text{Número de Bacterias}$$

8 INOCULACIÓN DEL HUEVO EMBRIONADO

Elegir la vía de inoculación:



Fuente: UCM

Inoculación en membrana corioalantoidea (CAM):

1. Desinfectar el huevo con alcohol al 70%
2. Marcar con lápiz la ubicación del embrión y la cámara de aire
3. Colocar el huevo en una posición vertical, en una superficie estable con la cámara de aire hacia arriba.
4. Realizar un pequeño agujero en la cámara de aire y otro en la zona horizontal del huevo verificando la zona de vascularización.
5. Con ayuda de una jeringa de 20 ml, realizar presión negativa a través del agujero de la cámara de aire para crear una nueva cámara en la parte horizontal del huevo.
6. Con ayuda de una pinza se abre un poco el cascaron y se realiza un pequeño orificio en la membrana blanca del huevo para observar la CAM
7. Una vez elegida la concentración deseada del inóculo bacteriano, con ayuda de una pipeta se inoculara 100 ul de bacteria
8. Se debe sellar completamente el orificio con parafilm y cinta
9. Los huevos inoculados se dejan en una incubadora a 37°C y humedad al (50-60%).

CARTA DE APROBACIÓN FILOLÓGICA

San José, 01 de mayo de 2025

Señores y señoras

Universidad Técnica Nacional

Por medio de la presente hacemos constar

yo, Marta Eugenia Rojas Porras, inscrita en Colypro bajo el número de carnet 05650, cédula 103870924, y yo Byron Alberto Ramírez Agüero, carné profesional 65679, cédula 116760899, damos fe de haber corregido exhaustivamente el trabajo titulado: **"EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA DE BRUCELLA ABORTUS Y BRUCELLA CANIS EN LOS TEJIDOS DE UN MODELO DE HUEVO EMBRIONADO DE POLLO"**, correspondiente al Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado de LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA, a cargo de la estudiante: MELISSA ROJAS NARANJO.

Han sido revisados los aspectos relacionados con estructura gramatical, acentuación, ortografía, puntuación y vicios del lenguaje presentes en el texto. Por consiguiente, se considera que, desde el punto de vista filológico, una vez considerados los cambios recomendados, el presente trabajo se encuentra listo para utilizarse en los trámites formales que las personas estudiantes consideren apropiados.

Atentamente,

**Byron Alberto Ramírez Agüero**

Carnet profesional: 65679

**Marta Eugenia Rojas Porras**

Carnet profesional: 05650

**CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA USO Y MANEJO DE LOS TRABAJOS FINALES
DE GRADUACIÓN UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL
(Trabajo Individual)**

Atenas,

9 de mayo 2025.

Señores/as:

Vicerrectoría de Investigación y transferencia.

Sistema Integrado de Bibliotecas y Recursos Digitales.

Estimados señores/as:

Yo **Melissa Rojas Naranjo** portador (a) de la cédula de identidad número **1-1739-0771**. En mi calidad de autor (a) del trabajo de graduación titulada: "**Evaluación de la virulencia de *Brucella abortus* y *Brucella canis* en los tejidos de un modelo de huevo embrionado de pollo**"

El cual se presenta bajo la modalidad de, Tesis de Graduación.

Presentado en la fecha 9/mayo/2025, autorizo a la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas, para que mi trabajo pueda ser manejado de la siguiente manera:

Ver CAPÍTULO V, DISPOSICIONES, FINALES. Artículo 43. RTFG.	
Marque con una X o un ✓	
Conservación y disseminación en las bibliotecas de la Universidad	✓
Almacenado en el Repositorio institucional.	✓
Divulgado en el Repositorio institucional.	✓
Divulgación del resumen en el Repositorio UTN con una cantidad de 200 a 500 palabras (Describe en forma breve el contenido del documento)	✓
Consulta electrónica con texto protegido	✓
Descarga electrónica del documento en texto completo protegido	✓
Inclusión en bases de datos y sitios web que se encuentren en convenio con la Universidad Técnica Nacional contando con las mismas condiciones y limitaciones aquí establecidas.	✓

Por otra parte, declaro que el trabajo que aquí presento es de plena autoría, es un esfuerzo realizado de forma personal, académica e intelectual con plenos elementos de originalidad y creatividad. Garantizo que no contiene citas, ni transcripciones de forma indebida que puedan devenir en plagio, pues se ha utilizado la normativa vigente de la American Psychological Association (APA) última edición en español. Las citas y transcripciones utilizadas se realizan en el marco de respeto a las obras de terceros. La responsabilidad directa en el diseño y presentación son de competencia exclusiva, por tanto, eximo de toda responsabilidad a la Universidad Técnica Nacional. Consciente de que las autorizaciones no reprimen mis derechos patrimoniales como autor del trabajo. Confío en la que Universidad Técnica Nacional respete y haga respetar mis derechos de propiedad intelectual.



Melissa Rojas Naranjo

1-1739-0771

Fecha 9/05/2025



CICUA Comité Institucional de
Cuido y Uso de Animales

11 de noviembre de 2021
CICUA-067-2021

Dr. Carlos Chacón
CIET

Estimado señor:

El Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA), en su sesión ordinaria 222-2021, realizada el 11 de noviembre del 2021, valoró las aclaraciones del proyecto "Papel de los neutrófilos y el complemento en la modulación de la respuesta inmunológica contra infecciones bacterianas de importancia en Costa Rica" solicitadas en el oficio CICUA-065-2021.

Al respecto se le solicita por favor incluir en el formulario lo aclarado con usted mediante conversación telefónica realizada durante la sesión antes citada, respecto al procedimiento de Fluorescencia *in vivo*: debe incluir procedimiento completo e indicación de los protocolos anestésicos que se utilizarán en esta parte de la metodología, según acordamos.

El Comité acepta las aclaraciones y le solicita incluir para efectos de archivo lo antes indicado en el formulario que debe entregar nuevamente a la secretaria del CICUA

EL Comité aprueba el proyecto.

Atentamente,

SARA MARIA
GONZALEZ
CAMACHO (FIRMA)

Firmado digitalmente por
SARA MARIA GONZALEZ
CAMACHO (FIRMA)
Fecha: 2021.11.12 09:08:17
+0500'

Dra. Sara González Camacho
Coordinadora

NGS

C. Dra. María Laura Arias, Vicerrectora de Investigación
Archivo