



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



IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE  
CONTAMINACIÓN CON *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis EN  
CARNE DE PESCADO FRESCA CONGELADA Y AHUMADA

**CONSTANZA PAULINA DONOSO FÉREZ**

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

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE P.

SANTIAGO, CHILE  
2012



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



IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE  
CONTAMINACIÓN CON *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis EN  
CARNE DE PESCADO FRESCA CONGELADA Y AHUMADA

**CONSTANZA PAULINA DONOSO FÉREZ**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : CONSUELO BORIE P.	.....	.....
PROFESORA CONSEJERA : PILAR OVIEDO H.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO : JUAN EGAÑA M.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a todos quienes me han ayudado a llegar hasta esta, la instancia final en mi formación profesional.

A la Dra. Consuelo Borie, por su buena disposición, constante apoyo y guía durante todo este proceso.

A la Dra. María Antonieta Jara por su constante buena voluntad y buen humor.

A los docentes integrantes de las asignaturas de Enfermedades Infecciosas y Tecnología de los Alimentos por todo el apoyo entregado durante el desarrollo de mi memoria.

A los funcionarios del Departamento: Don Humberto, Don Pato y Don Carlos y también a Evelyn, por su buena disposición.

A quienes desarrollaron la parte práctica de esta memoria en conjunto conmigo: Karen, Gabriel y Denisse. Muchas gracias por hacer mejor toda esta experiencia.

A mis amigas del colegio y de Bachi.

A mis amigas y compañeras de Vetera.

A Omar, quien ha sido mi compañero incondicional durante esta etapa final.

Finalmente a mi familia, en especial a mis papás, Katty y Miguel, y a mi hermana Katty quienes han estado ahí junto a mí sin importar la distancia que nos separe.

MEMORIA DE TÍTULO

**“IMPLEMENTACIÓN DE UN PROTOCOLO DE CONTAMINACIÓN CON *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis EN CARNE DE PESCADO CONGELADA FRESCA Y AHUMADA”**

**“IMPLEMENTATION OF A CONTAMINATION PROTOCOL WITH *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis IN FROZEN FRESH AND SMOKED FISH MEAT”**

**Constanza Paulina Donoso Férrez \***

\*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

### **Financiamiento**

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto Fondecyt N° 1110038

## RESUMEN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos son un problema mundial en aumento. Uno de los agentes causales es *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE), serotipo predominante en Chile y asociado a alimentos de origen animal, entre ellos, carne de pescado. Una forma reciente de controlar la presencia de SE en los alimentos, ya en uso internacional, es el biocontrol mediante bacteriófagos. Para poder realizar a futuro estudios ajustados al escenario nacional que permitan evaluar su efecto directamente en alimentos, es primordial contar previamente con protocolos de contaminación experimental de las muestras.

Por esto, el presente estudio analizó protocolos de contaminación experimental con SE, en carne de salmón congelada fresca y ahumada, mantenida 10 días a temperatura de refrigeración y ambiente. Las variables analizadas fueron: presentación de los alimentos (molido y laminado) y técnica de contaminación (goteo con y sin homogeneización). En cada protocolo se determinó la menor dosis bacteriana (entre  $10^2$  a  $10^6$  UFC/mL) que lograra  $\geq 80\%$  de muestras contaminadas. Además, se evaluó la eficiencia de Piruvato de Sodio en la recuperación de SE en estas carnes contaminadas y refrigeradas.

Las menores dosis que lograron  $\geq 80\%$  de muestras contaminadas fueron de  $10^2$  UFC/mL para todos los protocolos independiente de la temperatura, excepto salmón fresco molido sin homogeneizar refrigerado, cuya dosis fue  $10^3$  UFC/mL. Los cuatro protocolos comparados por cada matriz no presentaron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) en la bacteriología cualitativa (detección) y cuantitativa (recuentos). La adición de Piruvato de Sodio no generó diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la recuperación de SE.

**Palabras clave:** *Salmonella* Enteritidis, carne de pescado, contaminación experimental.

## ABSTRACT

Foodborne Diseases are a rising global problem. One of the causative agents is *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE), the predominant serotype in Chile and associated with food of animal origin, including fish meat. A recent way to control the presence of SE in food, already in international use, is the biocontrol by bacteriophages. In order to perform future studies geared to the national situation to assess its effect directly in food is essential to previously have experimental contamination protocols of samples.

Therefore, this study analyzed experimental contamination protocols with SE, in fresh and smoked frozen salmon meat, kept for 10 days at refrigeration and room temperature. The variables analyzed were: presentation of food (ground and laminated) and contamination technique (drip with and without homogenization). In each protocol the lowest bacterial dose was determined (between  $10^2$  to  $10^6$  CFU/mL) which achieved  $\geq 80\%$  of contaminated samples. Also, the efficiency of Sodium Pyruvate on recovery of SE in these contaminated and refrigerated meats was evaluated.

The lowest dose that yielded  $\geq 80\%$  of contaminated samples were  $10^2$  CFU/mL for all protocols regardless of the temperature, except fresh ground salmon without homogenizing and refrigerated, whose dose was  $10^3$  CFU/mL. The four protocols compared for each meat were not statistically different ( $p>0,05$ ) in qualitative (detection) and quantitative (counts) bacteriology. The addition of Sodium Pyruvate produced no significantly statistical differences ( $p>0,05$ ) in SE recovery.

**Key words:** *Salmonella* Enteritidis, fish meat, experimental contamination protocol.

## INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un problema mundial que en las últimas décadas ha aumentado debido a los cambios en la producción y el consumo de los alimentos, al crecimiento de la población, urbanización en los países subdesarrollados, envejecimiento y por ende vulnerabilización de la población, pobreza, consumo frecuente de alimentos fuera del hogar y a la aparición de nuevos agentes (Olea, 2007). Se conocen alrededor de 250 agentes causales, entre ellos están *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (Olea, 2007).

*Salmonella spp.* es un patógeno bacteriano que es de relevancia mundial, tanto para los animales como para el ser humano. Un grupo de sus serovares son capaces de colonizar el tracto digestivo de una serie de animales, y pueden causar enteritis agudas o infecciones subclínicas, entre otros cuadros. Como consecuencia de la colonización intestinal y de su eliminación por las heces, en particular en los animales de abasto, las bacterias pueden entrar en la cadena alimentaria humana, colonizando el intestino, y causando un cuadro de gastroenteritis (Barrow *et al.*, 2010).

En Chile, *Salmonella spp.* es un agente sujeto a vigilancia de laboratorio y de resistencia antimicrobiana. El Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) realiza la tipificación de las cepas provenientes de aislamientos clínicos y no clínicos (alimentos, ambientales y animales). Entre los años 2005 y febrero del 2011 (Vaquero *et al.*, 2011), el ISP tipificó 20.566 cepas de *Salmonella spp.* de las cuales un 6,2% provino de alimentos; de ellos, un 25,3% correspondieron a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) haciéndolo el serotipo más aislado. Desde el año 2005 al 2010 se notificaron 87 brotes de SE, observándose importantes aumentos en los casos clínicos en los años 2009 y 2010. Entre los grupos de alimentos en los cuales se detectó SE, un 4% correspondió a pescados y mariscos (Vaquero *et al.*, 2011). En Febrero del 2011, en la Región Metropolitana de Chile, se presentó un brote por SE en restaurantes de sushi en el cual se vieron afectadas 28 personas, de las cuales nueve requirieron hospitalización; este evento finalizó con la resolución del SEREMI de Salud de prohibir el funcionamiento del local responsable. En esta intoxicación la mayoría de las infracciones fueron por falta de higiene, falta de refrigeración y venta de pescados crudos no permitidos (Anón 1, 2011).

Entonces, las infecciones humanas por SE tienen relación con cada eslabón de la cadena alimentaria, incluyendo las etapas de producción, distribución, conservación, manipulación y preparación de los alimentos por parte del consumidor final, es decir desde “la granja a la mesa”. En los alimentos, una de las formas recientes de controlar la contaminación por *Salmonella spp.* es la utilización de bacteriófagos, virus que están siendo actualmente usados de forma comercial por parte de algunos países desarrollados. El uso de estos virus, que sólo atacan y lisan bacterias, es visto con grandes expectativas como forma de proveer una mayor inocuidad alimentaria, sobretodo dado el contexto actual de la multiresistencia bacteriana, lo que, entre otros factores, permite sugerir un enfoque más hacia el control y la prevención que hacia la terapia. Los bacteriófagos son altamente específicos y poseen varias características que los convierten en buenos candidatos para el biocontrol en alimentos; por ejemplo, su capacidad de reducir la cantidad de bacterias, no alterar las características organolépticas de los alimentos, ser inofensivos para humanos, animales y plantas y ser altamente ubicuos y de fácil aislamiento y multiplicación *in vitro* (Hagens y Offerhaus, 2008).

Una posible aplicación de estos virus podría ser para controlar la presencia de SE en carnes de pescado, dado que según los datos de oficinas gubernamentales (Vaquero *et al.*, 2011) este alimento es de riesgo en Chile. Sin embargo, es un alimento que es comúnmente obviado dentro de los esfuerzos de prevención, a pesar de que esta carne frecuentemente se consume sin la adecuada cocción ya sea en su presentación ahumada o fresca de manera cruda en platos como el ceviche o el sushi, transformándolo en un alimento de riesgo ya sea por contaminación primaria o cruzada. Por este motivo, es importante preocuparse del control de la contaminación en esta preparación hecha en base a pescado.

Como base de cualquier estudio para determinar formas de control de SE directamente en alimentos, se hace necesario antes realizar una contaminación experimental de la matriz alimentaria a estudiar, estableciendo así un protocolo para generar un grupo control donde un elevado porcentaje de sus muestras logre contaminarse. De lo contrario, un efecto controlador podría no reflejarse claramente. Es importante entonces, generar protocolos de contaminación de muestras de alimentos que incluyan diversas variables ya que, factores como la dosis contaminante, presentación del alimento y técnica de inoculación, influyen en la contaminación de muestras. Es así como, en un estudio con vienasas se presentaron diferencias en el porcentaje de contaminación con SE, realizados con una misma dosis contaminante, de

acuerdo a la presentación del alimento y a la técnica de inoculación; con valores que fluctuaron entre 40 y 100% de muestras contaminadas (López, 2012).

En el ámbito internacional existen estudios que han realizado ensayos de contaminación experimental para analizar distintas formas de control de *Salmonella spp.* en diferentes especies de pescado. Estas contaminaciones fueron exitosamente logradas con diversos serotipos de este patógeno y considerando diferentes dosis bacterianas, variadas presentaciones del alimento (molido, fileteado, etc.) y técnica de contaminación. Entre éstas se describen los siguientes:

Con respecto a las dosis bacterianas utilizadas como inóculo, Bernbom *et al.* (2009) utilizaron una suspensión de  $10^3$  UFC/g de SE para contaminar carne de trucha (*Salmo trutta*), mientras que Lu y Cai (2010) utilizaron  $10^4$  UFC/mL de *S. Typhimurium* para contaminar tilapia (*Oreochromis sp.*) logrando en ambos casos contaminar la matriz alimentaria. Otros investigadores han logrado contaminar con dosis tan bajas como 0,2 UFC/g (Perelle *et al.*, 2004) y tan altas como  $2 \times 10^6$  UFC/g de pescado (Kumar *et al.*, 2010), logrando altos niveles de recuperación de muestras positivas, llegando al 100% en algunos casos como el de Hein *et al.* (2006). Dosis mayores a estas fueron utilizadas por Mol *et al.* (2010) quienes con 7 a 8 Log ( $10^7$  a  $10^8$ ) UFC/mL de SE, contaminaron jurel (*Trachurus trachurus*) logrando una recuperación de  $4,04 \pm 0,13$  Log UFC/g al cabo de 10 días.

Con respecto a la presentación del alimento, Lu y Cai (2010) utilizaron láminas de tilapia para ser contaminadas experimentalmente con *S. Typhimurium*, mientras que Bernbom *et al.* (2009) utilizaron SE para contaminar trucha en forma picada y en ambos estudios los resultados fueron exitosos.

Por otra parte, un factor importante de considerar para obtener muestras exitosamente contaminadas es la técnica de contaminación utilizada. Así por ejemplo Lu y Cai (2010) contaminaron mediante goteo con posterior homogenización mientras que Mol *et al.* (2010) inocularon filetes, previamente lavados con agua, mediante aspersión y posteriormente utilizaron una varilla doblada de vidrio para esparcir y obtener una distribución uniforme de las células, logrando en ambos estudios la contaminación de las muestras.

Los estudios antes señalados no sólo dejan en evidencia el interés que existe por parte de la comunidad científica de investigar sobre la carne de pescado, entendida como un alimento de riesgo, sino también demuestran que existen diferentes formas de contaminar estas matrices, para poder lograr contaminaciones experimentales exitosas.

Tomando en cuenta que la carne de pescado se presenta como un alimento de riesgo para la adquisición de salmonelosis y la existencia de diversas formas de lograr la contaminación experimental, este estudio analizó diferentes protocolos de contaminación de carnes de pescado con SE. Específicamente, se buscó implementar un protocolo de contaminación logrado con la menor dosis de SE en carne de pescado fresca y ahumada que contaminara al menos un 80% de las muestras mantenidas a temperatura ambiente y de refrigeración. Adicionalmente, se determinó el efecto de la adición de un suplemento al medio de cultivo sobre la recuperación (recuentos) de SE desde estas carnes mantenidas a temperatura de refrigeración, como una manera de reducir el estrés térmico sobre las bacterias. Los resultados de este estudio servirán como base para una posterior investigación sobre la aplicabilidad de bacteriófagos en el biocontrol de SE en el marco de la realización de experimentos ajustados a la realidad nacional y que apunten a lograr una mayor inocuidad alimentaria al servicio de la salud pública.

## MATERIALES Y MÉTODO

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología y de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El estudio se realizó bajo las normas de bioseguridad correspondientes al nivel 2 del Manual de Normas Bioseguridad que establece CONICYT para sus investigaciones (CONICYT, 2008) y además, se contó con un certificado de la entidad local.

### *Muestras de alimentos*

Para la realización de este estudio preliminar se consideró un tamaño muestral de 20 para cada protocolo de contaminación, el cual fue calculado con un 95% de confianza. Se usaron filetes de salmón (*Salmo trutta*, *Salmo salar* u *Oncorhynchus kisutch* según estacionalidad) fresco congelado y ahumado congelado en envases sellados, adquiridos en un supermercado de Santiago. Los alimentos fueron transportados en neveras en un periodo no mayor a cuatro horas desde su compra y fueron refrigerados en el Laboratorio hasta su procesamiento. Antes de iniciar el procesamiento, todos los alimentos se probaron para determinar su negatividad a *Salmonella* de campo; los análisis realizados fueron bacteriología cualitativa y posterior prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), técnica que posee una sensibilidad de  $10^1$  UFC/mL (Malorny *et al.* 2003; Sánchez 2007). Todo alimento positivo fue desechado del experimento.

### *Contaminación experimental de las muestras*

Se analizaron distintos protocolos de contaminación tanto para la carne de pescado en su forma fresca como ahumada. Las variables a analizar fueron: a) dosis del inóculo bacteriano, b) presentación del alimento (laminado y molido) y c) técnica de contaminación (con y sin homogeneización del inóculo bacteriano).

La contaminación de los alimentos se realizó con una cepa nativa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis de origen aviar donada por la Dra. Irma Acevedo González (Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola Ganadero); a partir de esta, fue seleccionada una cepa mutante espontánea, con resistencia a Ácido Nalidíxico (*nal*) y Rifampicina (*rif*) por parte del Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Las **dosis** incluidas dentro del estudio fueron de  $10^2$  a  $10^6$  UFC/mL. Estas fueron preparadas a partir de un cultivo de SE crecido en caldo común a 37°C en agitación orbital (Big Bill digital, Thermolyne®)

por 24 horas al cual se le adicionó Agua Peptonada Tamponada (APT) (Difco®) estéril hasta ajustar su turbidez al tubo 0,5 del Nefelómetro de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  bacterias/mL). A partir de esta suspensión se prepararon diluciones al décimo hasta obtener las concentraciones teóricas deseadas. Posteriormente, la concentración de los inóculos fue corroborada mediante recuento bacteriano tradicional.

Las **presentaciones** de los alimentos analizadas fueron: molida (mediante Moulinex®) y laminada con un grosor aproximado de 1 cm, siendo ambos procedimientos realizados bajo condiciones de asepsia. Las **técnicas de contaminación** fueron: mediante goteo con micropipeta con y sin posterior homogeneización del inóculo. En el caso de los alimentos laminados, la contaminación fue realizada sobre sólo un lado de las láminas. Es así como se generaron las siguientes combinaciones de variables: molido con homogeneización (M.H.), molido sin homogeneización (M.S.), laminado con homogeneización (L.H.) y laminado sin homogeneización (L.S.).

Para la contaminación, las muestras de 25 g cada una (INN, 2002) fueron colocadas en bolsas estériles Whirl-pak® y a continuación fueron contaminadas con un volumen de aproximadamente un 2% del peso de las muestras (500 µL totales), bajo gabinete de bioseguridad. El alimento ya contaminado se dejó reposar a temperatura ambiente dentro del gabinete de bioseguridad por dos horas para permitir que la bacteria se adaptara al nuevo medio. Luego las muestras fueron mantenidas durante 10 días a dos temperaturas: ambiente y a temperatura de refrigeración, cada grupo con un tamaño de 20 muestras.

#### *Bacteriología cualitativa (detección de muestras positivas)*

Transcurridos los 10 días de almacenamiento tanto a temperatura ambiente como de refrigeración, todas las muestras fueron analizadas para bacteriología cualitativa según la Norma Chilena Oficial NCh 2675.Of2002: "Detección de *Salmonella* en Productos Hidrobiológicos" emitida por el Instituto Nacional de Normalización de Chile (INN, 2002). Las muestras de 25 g de alimento adicionadas de 225 mL de APT (Difco®) fueron homogeneizadas en equipo triturador homogeneizador (Masticator®) por máximo un minuto. Se utilizaron como caldos de enriquecimiento selectivo el caldo Rappaport Vassiliadis (incubado a 42°C) y el Selenito/Cistina (incubado a 36°C), y como agares selectivos se utilizaron placas de agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato) (Difco®) y de agar *Salmonella-Shigella* (S.S.) (Difco®), ambas adicionadas de Rifampicina (Caisson®) (50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Arlab®) (50 µg/mL) e

incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Para cada tipo de carne de salmón, aquellos protocolos que presentaron porcentajes de positividad mayores o iguales a 80% logrados con la misma dosis bacteriana, fueron comparados entre sí mediante recuento bacteriano.

#### *Bacteriología cuantitativa (recuento bacteriano)*

Para realizar el recuento de SE, se utilizaron 10 muestras contaminadas experimentalmente, las cuales una vez en las bolsas Whirl-pak® fueron almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración por 9 días, para luego adicionar 225 mL de APT, y homogeneizar (Masticator®) por máximo un minuto. Posterior a esto las muestras fueron incubadas a 37°C por 18 horas. De cada bolsa se realizaron 4 diluciones en APT (Difco®) estéril de las cuales se traspasaron 0,1 mL a placas de agar XLD (Difco®) adicionadas con Rifampicina (Caisson®) (50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Arlab®) (50 µg/mL). Estas placas fueron sembradas en superficie mediante asa de Digrafsky y posteriormente incubadas por 18 a 24 horas a 37°C, realizando lectura sólo de las placas que tuvieran un máximo de 150 colonias. A una colonia de cada muestra se le realizó la prueba de aglutinación con suero anti *Salmonella* grupo D1 (Difco®) para corroborar su identidad. En el caso de no obtener crecimiento en ninguna de las placas, se realizó un análisis de bacteriología cualitativa para corroborar la presencia de la bacteria en las muestras. Con los resultados de los recuentos se seleccionó, tanto para salmón fresco como ahumado, aquel método que, siendo similar en sus porcentajes de detección y habiendo sido logrado con la misma dosis bacteriana, presentara el más alto recuento bacteriano.

#### *Eficiencia de la adición de un suplemento en la recuperación de SE.*

*Salmonella spp.* es susceptible de sufrir shock térmico a bajas temperaturas si es expuesta a descensos repentinos de al menos 10°C, respondiendo inicialmente con un cese de su crecimiento para reanudarlo posteriormente luego de una etapa adaptativa (Wesche *et al.*, 2009); esta situación podría llevar a una subestimación de los recuentos de *Salmonella* en los alimentos contaminados y almacenados por 10 días en refrigeración. Para evitar esto, es recomendable adicionar Piruvato de Sodio, el cual ha mostrado aumentar considerablemente el recuento de *Salmonella* térmicamente lesionada al agregarlo a un agar no selectivo, como es el Tripticasa de Soya (Wu, 2008). Basándose en esto, el mejor protocolo seleccionado a temperatura de refrigeración fue repetido en ambos tipos de carne de salmón usando 10 muestras, las cuales fueron almacenadas a temperatura de refrigeración por 9 días, posterior a los cuales se les repitió el procedimiento descrito anteriormente para bacteriología cuantitativa, con la salvedad de que esta vez los recuentos se realizaron en placas de agar Tripticasa Soya

(Difco®) con Rifampicina (Caisson®) (50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Arlab®) (50 µg/mL) con y sin la adición de Piruvato de Sodio (Merck ®) al 1%. Estas últimas placas constituyeron el grupo control.

#### *Análisis Estadístico*

Los datos que se desprendieron del estudio fueron analizados con el programa Info Stat® (Di Rienzo *et al.*, 2008). Para los datos derivados de los análisis de bacteriología cualitativa, ellos se expresaron como porcentaje de positividad y se utilizó la prueba de diferencia de proporciones para determinar diferencias estadísticas entre protocolos para cada matriz.

Para el análisis de bacteriología cuantitativa (usado para protocolos con similar eficiencia de contaminación y para la evaluación del Piruvato de Sodio), los datos se expresaron en unidades logarítmicas y se les realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) para determinar si existían diferencias entre los protocolos analizados según matriz y temperatura. Valores de  $p \leq 0,05$  fueron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

Los diferentes protocolos probados en este estudio se realizaron apuntando a encontrar aquel que entregara un 80% o más de muestras positivas logradas con la menor concentración de inóculo bacteriano.

En general, los cuatro protocolos analizados con carne de salmón fresca y con carne ahumada lograron porcentajes superiores al 80% de positividad a SE con las menores dosis de inóculo analizadas, es decir con  $10^2$  y  $10^3$  UFC/mL. Los resultados de los análisis de bacteriología cualitativa de las muestras contaminadas y almacenadas a temperatura ambiente (Tabla 1) demuestran un 100% de contaminación, independiente de la presentación del alimento y de la técnica de contaminación.

**Tabla 1.** Porcentaje de positividad a SE de muestras de Carnes de Pescado contaminadas experimentalmente y almacenadas a temperatura Ambiente.

Tipo de Pescado	Presentación del Alimento	Técnica de Contaminación	Porcentaje de Positividad a SE
			Concentración de Inóculo $10^2$ (UFC/mL)
Salmón Fresco	Molido	Con Homogeneización	100%*
		Sin Homogeneización	100%*
	Laminado	Con Homogeneización	100%
		Sin Homogeneización	100%
Salmón Ahumado	Molido	Con Homogeneización	100%
		Sin Homogeneización	100%
	Laminado	Con Homogeneización	100%*
		Sin Homogeneización	100%*

El signo (\*) indica los protocolos preseleccionados para el estudio de recuento bacteriano.

Para las muestras contaminadas y almacenadas a temperatura de refrigeración (Tabla 2), en el salmón ahumado se lograron porcentajes de positividad mayores al 80% con la menor dosis empleada ( $10^2$  UFC/mL), mientras que para salmón fresco se logró contaminar el 100% de las muestras con una dosis de  $10^3$  UFC/mL, independiente de la presentación del alimento y la técnica de contaminación de éste.

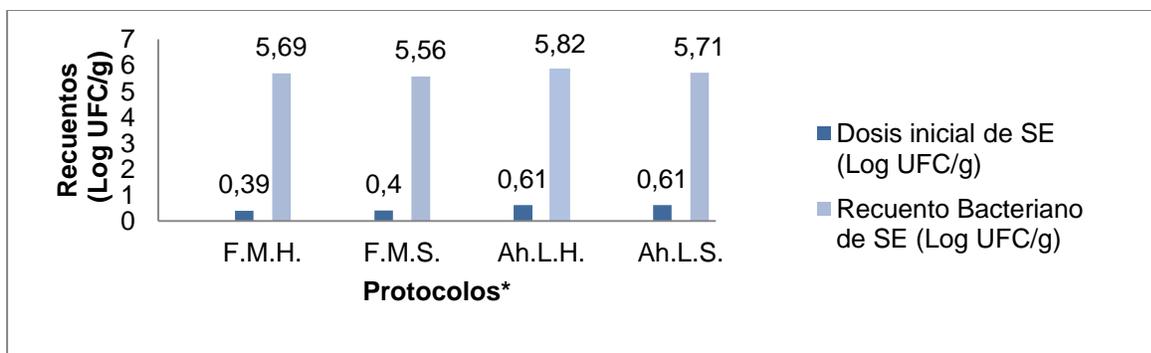
**Tabla 2.** Porcentaje de positividad a SE de muestras de Carnes de Pescado contaminadas experimentalmente y almacenadas a temperatura de Refrigeración.

Tipo de Pescado	Presentación del Alimento	Técnica de Contaminación	Porcentaje de Positividad a SE	
			Concentración de Inóculo $10^2$ (UFC/mL)	$10^3$
Salmón Fresco	Molido	Con Homogeneización	30%	<b>100%*</b>
		Sin Homogeneización	-	<b>100%*</b>
	Laminado	Con Homogeneización	-	100%
		Sin Homogeneización	-	100%
Salmón Ahumado	Molido	Con Homogeneización	100%	-
		Sin Homogeneización	100%	-
	Laminado	Con Homogeneización	<b>100%*</b>	-
		Sin Homogeneización	<b>95%*</b>	100%

El signo (-) indica no realizado; El signo (\*) indica los protocolos preseleccionados para el estudio de recuento bacteriano.

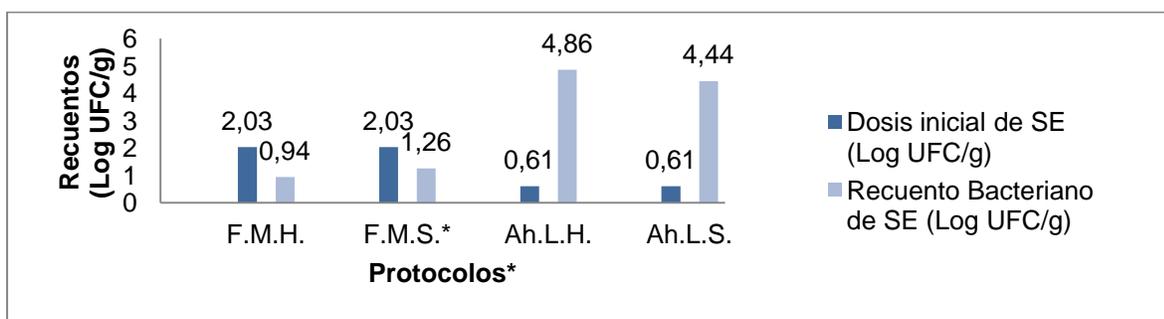
El análisis estadístico de los porcentajes de positividad determinó que los protocolos con porcentajes mayores al 80% no fueron diferentes ( $p > 0,05$ ) por lo que, basándose en factibilidad técnica, se preseleccionaron sólo 2 protocolos (Tablas 1 y 2, signo asterisco) por tipo de carne para su comparación mediante el estudio de recuentos bacterianos.

En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados de los recuentos bacterianos de los protocolos preseleccionados, tanto a temperatura ambiente como de refrigeración respectivamente. Del análisis estadístico de protocolos para cada tipo de carne de pescado se desprende que no existían diferencias significativas en los recuentos bacterianos ( $p > 0,05$ ) para ninguna de las dos temperaturas analizadas.



F: Fresco; Ah: Ahumado; M: Molido; L: Laminado; H: Con Homogeneización; S: Sin Homogeneización.

**Figura 1.** Recuentos bacterianos y dosis de contaminación (Log UFC/g) de los protocolos de contaminación de muestras de carne de pescado mantenidas a temperatura ambiente por 10 días.

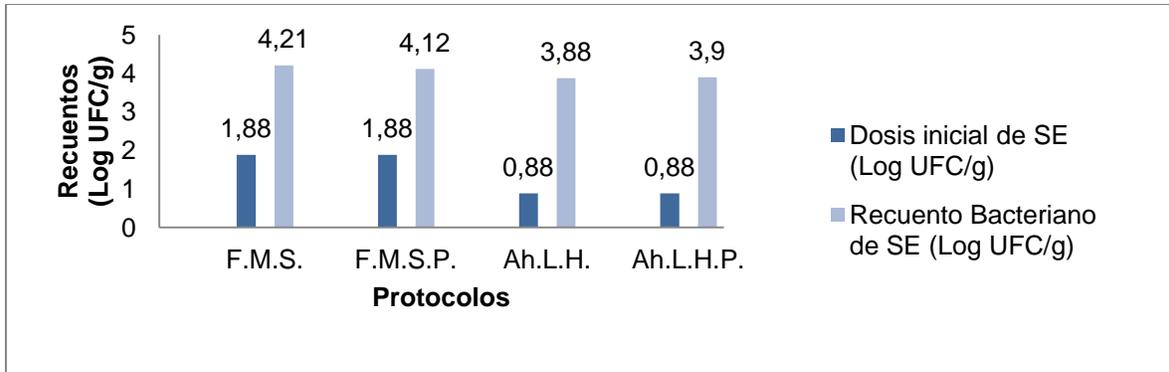


F: Fresco; Ah: Ahumado; M: Molido; L: Laminado; H: Con Homogeneización; S: Sin Homogeneización.

(\*): Una de las muestras experimentalmente contaminadas resultó negativa a los análisis de bacteriología cuantitativa y cualitativa a los cuales fue sometida, por lo que no se consideró dentro del análisis estadístico.

**Figura 2.** Recuentos bacterianos y dosis de contaminación (Log UFC/g) de los protocolos de contaminación de muestras de carne de pescado mantenidas a temperatura de refrigeración por 10 días.

Para poder responder el último de los objetivos del presente estudio, el cual dice relación con la adición de Piruvato de Sodio para el análisis de bacteriología cuantitativa de las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración, se seleccionó arbitrariamente un protocolo para cada tipo de carne de pescado (F.M.S. y Ah.L.H). Los protocolos elegidos y los resultados de sus recuentos para evaluar la eficiencia de la adición de un suplemento en la recuperación de SE se muestran en la figura 3.



F: Fresco; Ah: Ahumado; M: Molido; L: Laminado; H: Con Homogeneización; S: Sin Homogeneización; P: adicionado de Piruvato de Sodio al 1%.

**Figura 3.** Recuentos bacterianos de los Protocolos de contaminación de carnes de pescado mantenidas a temperatura de refrigeración con y sin la adición de Piruvato de Sodio al 1%.

El análisis estadístico mostró que la adición de Piruvato de Sodio, en muestras contaminadas y mantenidas por 10 días a temperatura de refrigeración, no generó un aumento significativo en los recuentos ( $p > 0,05$ ) comparado con el grupo control.

## DISCUSIÓN

SE en carnes de pescado es una causa de ETA, ya sea como contaminación primaria o cruzada a partir de otros alimentos, como quedó de manifiesto con el brote producido en Febrero del 2011 en Santiago de Chile (Anón 2, 2011).

Tratar de disminuir la presencia de este patógeno en los alimentos cuando éste se encuentra en las últimas etapas de su cadena de producción, es una de las metas del proyecto Fondecyt en el cual se encuentra enmarcada esta memoria de título. La fase inicial para poder realizar estos estudios es primero generar un protocolo de contaminación experimental que entregue un grupo control para, a futuro, lograr poner de manifiesto los efectos benéficos del uso de bacteriófagos como biocontroladores de SE.

En este estudio se logró contaminar experimentalmente salmón fresco y ahumado con bajas dosis de SE, siendo de  $10^2$  UFC/mL para los protocolos que incluían la mantención de las muestras contaminadas a temperatura ambiente. Para el caso de la temperatura de refrigeración, esta misma dosis fue exitosa para el salmón ahumado, sin embargo para el tipo fresco, la dosis mínima exitosa fue de  $10^3$  UFC/mL.

Las dosis de SE con las que se lograron los protocolos óptimos de contaminación (positividad mayor o igual a 80%), fueron las más bajas dentro del intervalo analizado en este estudio, con excepción del protocolo de contaminación de F.M.S.R. (Salmón Fresco Molido Sin homogeneizar en Refrigeración), lo cual las hace asemejarse a las posibles cantidades con las que un alimento es factible de encontrarse naturalmente contaminados con *Salmonella* (Kumar *et al.*, 2010). Una posible explicación para que F.M.S.R. haya necesitado una mayor dosis para lograr contaminar 80% o más de las muestras es que esta matriz venía en su presentación comercial de forma congelada en trozos más grandes que para el caso del ahumado, el cual venía finamente laminado; es por esta razón que el tipo fresco durante el desarrollo de la experiencia, se notaba macroscópicamente aún con algunos pequeños trozos de hielo, lo cual no se vio para la forma ahumada. Entonces se puede asumir que la forma fresca se encontraba a una menor temperatura, presentando así un ambiente más difícil para que la bacteria se adaptara y creciera. Lo anterior sumado a que luego las muestras fueron almacenadas a temperatura de refrigeración, pudo haber generado en adición un efecto de cese de crecimiento e incluso muerte bacteriana (Wesche *et al.*, 2009).

Con respecto a la presentación de los alimentos, las formas analizadas fueron molido y laminado, resultando ambas igualmente exitosas, por lo que en este estudio, la forma de presentación del alimento no fue un factor que mejoró los resultados de los protocolos de contaminación, como sí se vio en otras experiencias revisadas (López, 2012). Cabe mencionar que dentro de la literatura se mencionaba además la técnica de aspersion (Mol *et al.*, 2010), sin embargo ésta fue descartada por ser más contaminante para el ambiente, a pesar del uso de gabinete de bioseguridad.

En cuanto a las formas de contaminación analizadas, con y sin homogeneización del inóculo, ambas fueron exitosas, ya que lograron 80% o más de las muestras contaminadas. La elección de los protocolos óptimos, entre los pares de protocolos preseleccionados, se hizo basándose en aquel que lograra un mayor recuento promedio para las muestras analizadas, a pesar de que al someter los resultados a análisis estadísticos, estos revelaron que no existían diferencias significativas entre ellos, sin embargo en valores absolutos, los protocolos elegidos reportaron mayores cantidades bacterianas.

Otro factor relevante de discutir es la temperatura a la cual se almacenaron las muestras luego de su contaminación, dado que resultó en diferencias en los recuentos bacterianos luego de los 10 días de almacenamiento. En el caso de la temperatura ambiente, esta significó que todos los protocolos sufrieran un aumento de más de 5,16 Log UFC/g aproximadamente en su recuento con respecto a la dosis de inoculación. Para el caso de la temperatura de refrigeración el caso fue distinto ya que el salmón ahumado registró un aumento de 4,25 Log UFC/g, mientras que el salmón fresco sufrió una disminución en su recuento de 0,77 Log UFC/g, posiblemente explicado porque en esta matriz alimentaria, SE no fue capaz de sobreponerse al estrés por frío y mantener su población y menos aún multiplicarse, posiblemente por lo explicado anteriormente por la forma en trozos en que esta matriz se comercializa.

Con respecto a la adición al medio de cultivo, de Piruvato de Sodio al 1% y su efecto en la recuperación de SE, contrario a lo descrito por el estudio de Wu (2008), de los resultados estadísticos se desprende que tanto para la carne de salmón fresca como para la ahumada no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) al comparar los recuentos bacterianos con y sin la adición del suplemento mencionado. Los resultados obtenidos podrían posiblemente ser explicados debido a que el Piruvato de Sodio en un comienzo pudo haber reducido el daño provocado por las bajas temperaturas de mantención de las muestras, pero con el pasar de los

días, SE fue capaz de generar una respuesta al estrés por frío en su metabolismo que se evidenció con una adaptación y posterior crecimiento bacteriano (Wesche *et al.*, 2009) situación que equiparó los recuentos al día 10 de almacenamiento en ambos grupos experimentales. Otra posible explicación es que este serotipo de *Salmonella* se comporta distinto al descrito en el estudio de Wesche *et al.* (2009) que fue realizado con *Salmonella* Senftenberg. Tomando en cuenta esto, sería recomendable que en posibles experimentos posteriores se realizaran análisis de bacteriología cuantitativa a un número menor de días que los 10 analizados en este estudio, para poder evaluar más en detalle el efecto que tendría la adición de este suplemento.

En conclusión, este estudio muestra que es factible lograr la recuperación de SE desde carne de salmón, tanto fresca como ahumada, contaminada experimentalmente con bajas dosis bacterianas ( $10^2$  a  $10^3$  UFC/mL) y almacenada por 10 días a temperatura de refrigeración y ambiente, independiente del protocolo con el cual fue lograda la contaminación, entregando en la mayoría un porcentaje de contaminación de las muestras mayor al 80%. La adición del suplemento Piruvato de Sodio al 1% en los medios de cultivo no logró generar un aumento significativo en la recuperación de SE luego de 10 días, al compararlo con el grupo control sin Piruvato de Sodio al 1%.

Finalmente, esta memoria sirve como base para los futuros análisis del proyecto Fondecyt dentro del que se encuentra, sobre la aplicabilidad de bacteriófagos en el biocontrol de SE en el marco de la realización de experimentos ajustados a la realidad nacional y que apunten a lograr una mayor inocuidad alimentaria al servicio de la salud pública.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Anón 1. Aumenta número de intoxicados por consumo de sushi en local de Alonso de Córdova. [Internet]. Emol. 22 febrero 2011. Disponible en: <http://www.emol.com/noticias/nacional/detalle/detallenoticias.asp?idnoticia=466032> [citado 11 Mar 2011].
2. Anón 2. Seremi de Salud ordena sumarios a 29 locales de sushi en la Región Metropolitana. [Internet]. La Tercera. 22 febrero 2011. Disponible en: <http://latercera.com/noticia/nacional/2011/02/680-346812-9-autoridad-sanitaria-ordena-sumarios-a-29-locales-de-sushi-en-la-region.shtml> [citado 22 Oct 2011].
3. Barrow P, Jones M, Thomson N. *Salmonella*. In: Gyles C, Prescott J, Songer G, Thoen C, editors. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4th Ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2010. p. 231-265.
4. Bernbom N, Yoke yin N, Paludan-müller C, Gram L. Survival and growth of *Salmonella* and *Vibrio* in som-fak, a Thai low-salt garlic containing fermented fish product. Int J Food Microbiol. 2009;134(3):223-229.
5. CONICYT. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica. Manual de Normas de Bioseguridad. 2° edición 2008. Chile. [Internet] Disponible en: [http://www.fondecyt.cl/578/articles-30555\\_recurso\\_1.pdf](http://www.fondecyt.cl/578/articles-30555_recurso_1.pdf) [citado 1 Dic 2011].
6. Di Rienzo A, Casanoves F, Balzarini G, Gonzales I, Tablada M, Robledo W. InfoStat, versión 2008, grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
7. Hagens S, Offerhaus M. Bacteriophages, New Weapons for Food Safety. Food Technol-Chicago. 2008;62(4): 46-54.
8. Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M. Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. J Microbiol Meth. 2006;66(3):538-547.

9. INN. Instituto Nacional de Normalización de Chile. Norma Chilena Oficial NCh 2675. Of2002. Productos hidrobiológicos-Detección de *Salmonella*. 2002. 31 p.
10. Kumar R, Surendran P, Thampuran N. Rapid quantification of *Salmonella* in seafood using real-time PCR assay. *J Microbiol Biotech*. 2010;20(3):569-573.
11. López G. 2012. Tesis/Memoria. Inoculación experimental con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en distintos tipos de cecinas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 28 p.
12. Lu F, Cai J. The protective effect of Bdellovibrio-and-like organisms (BALO) on tilapia fish fillets against *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium. *Lett App Microbiol*. 2010;51(6):625-31.
13. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69(1):290-296.
14. Mol S, Cosansu S, Ucok D, Ozturan S. Survival of *Salmonella* Enteritidis during salting and drying of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) fillets. *Int J Food Microbiol*. 2010;139:36-40.
15. Olea A. Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos: un fenómeno frecuente de magnitud real desconocida. El vigía. Boletín de vigilancia en salud pública de Chile. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud de Chile. 2007;10(25):37-42.
16. Perelle S, Dilasser F, Malorny B, Grout J, Hoorfar J, Fach P. Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. *Mol Cell Probe*. 2004;18(6):409-420.
17. Sánchez P. 2007. Tesis/Memoria. Uso de reacción de polimerasa en cadena en el diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en tejido y contenido intestinal de pollos experimentalmente infectados. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 36 p.

18. Vaquero A, Fernández A, Díaz J. Informe Salmonella Enteritidis. [Internet] Disponible en: [http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Salmonella/Informe\\_Salmonella\\_2011.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Salmonella/Informe_Salmonella_2011.pdf)  
[citado 12 Sep 2011]
19. Wesche A, Gurtler J, Marks B, Ryser E. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Protect.* 2009; 72(5): 1121-1138.
20. Wu V. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiol.* 2008; 25: 735- 744.