



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

favet

**BIOCONTROL MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UNA MEZCLA DE
BACTERIÓFAGOS EN CARNE FRESCA DE CERDO
CONTAMINADA CON *Salmonella enterica* SEROTIPO Enteritidis**

María José Aguirre Padilla

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

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO

SANTIAGO, CHILE
2013



**BIOCONTROL MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UNA MEZCLA DE
BACTERIÓFAGOS EN CARNE FRESCA DE CERDO
CONTAMINADA CON *Salmonella enterica* SEROTIPO Enteritidis**

María José Aguirre Padilla

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE P
PROFESORA CORRECTORA: DRA. LISETTE LAPIERRE A
PROFESOR CORRECTOR: DR. JAMES ROBESON C

SANTIAGO, CHILE

2013

AGRADECIMIENTOS

Quisiera primero que todo agradecer a Dios, por acompañarme, guiarme y apoyarme en cada momento de mi vida, incluido este.

A todos los que me acompañaron en este proceso, ya que sin ellos no hubiera sido posible:

A la Doctora Consuelo Borie, por su tiempo, disposición, dedicación y compromiso. Por todas las enseñanzas y por siempre estar ahí.

A Denisse, Geraldine, Fabiola, Karen y Nicolás, por hacer el trabajo más fácil, entretenido y eficaz.

A Don Pato, Don Humberto y Don Carlos por toda su ayuda.

A Paty por su gran disposición y buena voluntad.

A la Doctora Lisette Lapierre y el Doctor James Robeson, por su tiempo y correcciones realizadas.

A mi familia que siempre ha estado conmigo apoyándome en cada momento y decisión, incondicionalmente.

A Ernesto Miguel quien estuvo más presente y me acompañó cada día dándome fuerzas, apoyo y cariño infinito.

Y finalmente a mis amigos, quienes siempre han estado ahí acompañándome de una u otra forma, es especial a Beatriz, Carolina, Fernanda y Josefina.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
HIPÓTESIS	6
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
1. Cepa desafío.....	7
2. Bacteriófagos	7
3. Matriz cárnica	7
4. Diseño experimental	8
4.1 Protocolo de contaminación con SE	8
4.2 Preparación del inóculo bacteriano.....	8
5. Contaminación de las muestras y aplicación de la mezcla de bacteriófagos	8
5.1 Bacteriología cuantitativa (Recuento bacteriano)	9
5.2 Bacteriología cualitativa (Detección de SE).....	9
6. Análisis estadístico	10
7. Normas de bioseguridad	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
1. Bacteriología cualitativa	11
2. Bacteriología cuantitativa:	14
CONCLUSIONES	18
REFERENCIAS	19
ANEXOS	22

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA NRO. 1: Porcentaje de muestras positivas a SE en carne fresca de cerdo contaminada experimentalmente y mantenida a temperatura ambiente por 10 días..... **11**

TABLA NRO. 2: Porcentaje de muestras positivas a SE en carne fresca de cerdo contaminada experimentalmente y mantenida a temperatura de refrigeración por 10 días..... **12**

TABLA NRO. 3: Recuentos promedio (\log_{10} ufc/g) de SE en carne fresca de cerdo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura ambiente. **14**

TABLA NRO. 4: Recuentos promedio (\log_{10} ufc/g) de SE en carne fresca de cerdo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura de refrigeración. **14**

RESUMEN

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos son consideradas como un problema importante de salud pública, donde *Salmonella* spp juega un rol fundamental, siendo *Salmonella* Enteritidis (SE) el serotipo mayormente involucrado en los brotes del país y el más aislado desde productos de origen animal, como lo es la carne.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad biocontroladora de una mezcla de 5 bacteriófagos líticos sobre *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo contaminada experimentalmente.

Para esto se trabajó con 2 grupos de 25 muestras cada uno correspondiente a carne fresca de cerdo molida. Un grupo fue contaminado con $3,9 \times 10^3$ UFC/mL de SE y se le agregó una alícuota de bacteriófagos (10^7 UFP/mL), manteniéndose a temperatura ambiente por 10 días. El otro grupo se contaminó con $3,9 \times 10^4$ UFC/mL de SE y se le agregó una alícuota de bacteriófagos (10^8 UFP/mL), manteniéndose a temperatura de refrigeración por 10 días. Cada grupo experimental contó con un grupo control de 25 muestras que solo fueron contaminadas con SE.

Luego de 10 días los resultados mostraron que el 100% de las muestras fueron contaminadas, es decir, tanto los grupos experimentales como sus respectivos controles, independiente de la temperatura de almacenamiento. Sin embargo, en el grupo experimental mantenido a temperatura ambiente, se observó una reducción de 2,56 unidades logarítmicas, valor significativo ($p \leq 0,05$), al compararlo con su grupo control. Por otro lado, en el grupo mantenido a temperatura de refrigeración, los recuentos no fueron estadísticamente significativos ($p > 0,05$) entre el grupo experimental y su respectivo control.

Estos resultados indican que el uso de esta mezcla de fagos líticos, bajo ciertas condiciones de temperatura, podría ser una alternativa para el biocontrol en alimentos logrando reducciones en la contaminación de SE que, junto a otras medidas, podrían disminuir la incidencia de brotes de ETA en el país.

ABSTRACT

Foodborne diseases are considered an important public health problem, where *Salmonella* spp is one of the most prevalent pathogens, being *Salmonella* Enteritidis the most common serotype in Chilean outbreaks, and the most commonly isolated from products of animal origin, such as meat.

The objective of this study was to determine the capacity of 5 lytic phages as biocontrol agents over *Salmonella* Enteritidis on fresh pork meat experimentally contaminated.

Samples were divided into 2 groups of 25 samples, each corresponding to fresh ground pork meat. One group was contaminated with 3.9×10^3 CFU/mL of SE, and treated with 10^7 PFU/mL of a phage mixture, and was kept at room temperature for 10 days. The second group was contaminated with 3.9×10^4 CFU/mL of SE, and treated with 10^7 PFU/mL of a phage mixture, and was kept under refrigeration for 10 days. Each experimental group had a control group of 25 samples that were only contaminated with SE.

After 10 days, results showed that 100% of the samples were contaminated, both experimental groups and their respective control groups regardless of the temperature they were stored under. However, in the experimental group that was kept at room temperature, a reduction of 2.56 log ($p \leq 0.05$) was observed, in comparison with the control group. On the other hand, for the group that was kept under refrigeration, the counts between the experimental group and the respective control weren't statistically significant ($p > 0.05$).

These results show that the use of lytic phages, under certain temperature conditions, may be an alternative biocontrol measure in food to reduce SE counts, and along with other strategies could reduce the incidence of foodborne diseases outbreaks.

INTRODUCCIÓN

Actualmente las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son consideradas uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial dada su alta morbilidad y mortalidad. Afectan principalmente a niños, mujeres embarazadas y ancianos, generando pérdidas económicas y grandes costos a los servicios de salud. En Estados Unidos de Norteamérica se estiman pérdidas entre 5 y 7 mil millones de dólares al año.

En Chile, *Salmonella* spp es uno de los patógenos más aislados en brotes de ETA, siendo el serotipo más frecuente *Salmonella* Enteritidis (SE), principalmente presente en alimentos de origen animal como lácteos, carnes, ovoproductos, pescados y mariscos, entre otros.

Si bien, en la cadena de producción de alimentos existen diversas técnicas de control para este patógeno, sigue habiendo brotes en la población humana. Se hace por esto necesario encontrar medidas complementarias de control que permitan disminuir la aparición de éstos. En el último tiempo, se ha investigado la aplicación de bacteriófagos en alimentos como agentes biocontroladores. Éstos, corresponden a virus que infectan y lisan específicamente bacterias, son inocuos para el hombre, no cambian las características organolépticas del alimento, son económicamente rentables y se encuentran distribuidos en diversos ecosistemas. Gracias a su capacidad de lisar bacterias, los bacteriófagos pueden ser utilizados en todas las etapas de producción de alimentos, desde la granja a la mesa.

Recientemente en el país se han aislado bacteriófagos nativos que han demostrado actividad lítica contra SE, en condiciones de laboratorio, los cuales son estables a diferentes pH y temperaturas en distintas matrices cárnicas frescas. El presente estudio pretende evaluar la efectividad del uso de una mezcla de bacteriófagos nativos aplicados en carne de cerdo fresca contaminada con *Salmonella* Enteritidis, con el fin de aportar conocimientos sobre una potencial herramienta de control para la industria alimentaria.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se definen por la OMS (1997) como el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (p. ej., bacterias o parásitos) o no biológicos (p. ej., plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas.

Según el informe de brotes de ETA del Ministerio de Salud de Chile (MINSAL, 2012), los alimentos mayormente involucrados durante el año 2012, hasta la semana ocho, fueron comidas y platos preparados con un 36,6%, pescados y productos de la pesca con un 23,1%, carnes y productos cárneos con un 12,4% y huevos y ovoproductos con un 11,3%. Por otro lado, el lugar de consumo más frecuente fue el hogar con un 49% seguido por restaurantes con un 26,2%. Entre las causas más relevantes destacó la infección por *Salmonella* spp con un 10,2%, seguido de *Escherichia coli* enteropatógena con un 1% y *Vibrio parahaemolyticus* con un 0,5%.

Datos obtenidos del Departamento de Epidemiología del MINSAL en Noviembre del 2011 (Vaquero, 2011), muestran que, del total de las cepas de *Salmonella* spp, el serotipo aislado con mayor frecuencia fue *Salmonella* Enteritidis (SE), encontrándose en un 59,02% de las cepas de origen clínico y en un 25,33% de las cepas de origen alimentario. Dentro de este último, el porcentaje de aislamiento de SE en productos cárnicos y carne, sin considerar la carne de ave, fue de un 4% (Vaquero, 2011). En Chile, bovinos y cerdos son portadores de esta bacteria, siendo aparentemente más prevalente en los últimos. En un estudio hecho por Torres (2008), se analizaron cinco planteles de cerdo bajo certificación oficial (PABCO) y de un total de 290 cerdos faenados, 67 (23,1%) fueron positivos a *Salmonella* spp en sus deposiciones, habiendo al menos un animal positivo en cada plantel. Por otro lado, en un estudio realizado por Peñaloza (2008), de un total de 2.118 muestras de deposiciones de bovinos de lechería y “feedlots” provenientes de las regiones de Valparaíso, Metropolitana y de Los Lagos, se logró aislar *Salmonella* spp solo en un 1,37%, obteniéndose una prevalencia menor que en cerdos.

Tomando en cuenta lo descrito, la carne de cerdo fresca se debe considerar como de riesgo para la salud pública haciéndose necesario insistir en controlar la presencia de *Salmonella* spp no solo en los animales, sino también en el alimento al que dan origen. Existen diversas medidas de control aplicadas directamente al alimento que van desde el uso de ozono, radiación UV y ultrasonido, entre otros (Mukhopadhyay y Ramaswamy 2011). Sin embargo estas medidas no han sido capaces de controlar la incidencia de los brotes de *Salmonella* spp, haciéndose necesario implementar nuevas medidas de control. En el último tiempo, se ha descrito como medida de control efectiva, la utilización de agentes biológicos como son los bacteriófagos líticos (Huff *et al.*, 2004; Górski y Weber-Dabrowska, 2005; Greer, 2005; García *et al.*, 2008; Goodridge y Bisha, 2011).

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que solo infectan bacterias presentando dos formas de interacción con ellas: ciclo lítico y ciclo lisogénico. Los fagos líticos siguen el ciclo infectivo lítico, que comienza con la adsorción o unión a la bacteria utilizando como receptores la cápsula bacteriana, flagelos y otras proteínas de superficie. Luego, el virus se multiplica en la célula bacteriana utilizando su metabolismo, produciéndose la lisis al final del ciclo, con la liberación de nuevas partículas fágicas. Por otra parte, los fagos lisogénicos utilizan la vía lisogénica, donde el genoma fágico se integra y replica como parte del genoma hospedero, permaneciendo en estado de latencia por extensos periodos de tiempo; si la bacteria hospedera encuentra condiciones ambientales adversas, el profago puede activarse y retomar el ciclo lítico, al final del cual las partículas fágicas son liberadas tras la lisis bacteriana (Skurnik y Strauch, 2006). La capacidad de estos últimos de integrar su genoma en las bacterias, los hace malos candidatos para ser utilizados como biocontroladores (Górski y Weber-Dabrowska, 2005) ya que podrían otorgar información genética no deseada como por ejemplo, la síntesis de toxinas u otro factor de virulencia.

Fue Ernest Hankin en 1896 y Frederick Twort en 1915 quienes describieron la actividad antibacteriana de los bacteriófagos líticos por primera vez, pero fue Felix d'Herelle en 1919 quien primero usó bacteriófagos líticos como terapia antimicrobiana en niños. Hoy en día el uso de fagos se ha ampliado hacia la terapia en la población animal y en la industria de alimentos, como biocontrol de patógenos alimentarios (García *et al.*, 2008).

Los fagos se encuentran en diversos ecosistemas y juegan un rol importante en el balance bacteriano. No infectan células vegetales ni animales, solo bacterias, siendo altamente específicos. Sin embargo, existen algunos fagos polivalentes, es decir, con un amplio rango de hospederos dentro de las bacterias (Huff *et al.*, 2004).

La literatura científica ha demostrado la posibilidad de utilizar fagos líticos para reducir la presencia de patógenos en alimentos frescos y procesados. Hasta hoy ha habido mayor progreso en la utilización de fagos sobre alimentos que sobre animales vivos ya que, los primeros, no están sometidos a la dinámica de un animal vivo como lo es la interacción con el sistema inmune y el constante cambio de microambientes (Goodridge y Bisha, 2011).

Las principales ventajas de los bacteriófagos en su uso como herramienta de biocontrol en alimentos son su ubicuidad, su inocuidad, su especificidad, su estabilidad en los alimentos resistiendo el procesamiento de éste y su capacidad de no afectar las características organolépticas. Además su aislamiento es económico, son fáciles de preparar y su manipulación es relativamente simple (Greer, 2005; García *et al.*, 2008).

Por otro lado, se presentan como desventajas las propiedades intrínsecas del alimento como su componente en grasas, proteínas y carbohidratos, pues afectan la habilidad del fago de encontrar e infectar a la bacteria; también se describe como desventaja, la necesidad de un número elevado de bacterias para ejercer su efecto y la presencia de bacterias mutantes resistentes a ellos, entre otras. En cuanto a esta última, el efecto de la resistencia bacteriana puede ser minimizado utilizando mezclas de fagos (Greer, 2005; Goodridge y Bisha, 2011).

En el último tiempo han surgido diversos estudios donde se ha demostrado su efectividad en la reducción de la concentración bacteriana. Algunos de ellos son:

1.- Leverentz y colaboradores (2001), estudiaron una mezcla de cuatro fagos contra SE en trozos de melón y manzana, inoculados cada uno con 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de SE y 2×10^8 unidades formadoras de placas líticas (UFP)/mL de cada fago, e incubados a 5, 10, y 20°C por siete días. En el caso del melón, a 5°C la mezcla de fagos fue más eficiente en la reducción de SE en comparación con las otras temperaturas, disminuyendo la concentración en 3,5 unidades logarítmicas; sin embargo, en los trozos de manzana, la mezcla de fagos no tuvo efecto sobre la concentración de SE, mostrando una

rápida disminución de su título a todas las temperaturas de incubación. Los resultados fueron asociados a la diferencia de pH existente entre el melón (pH: 5,8) y la manzana (pH: 4,2) sugiriendo la posible inactivación de los fagos debido al pH.

2.- Modi y colaboradores (2001), analizaron el efecto lítico de los fagos en la manufactura del queso Cheddar utilizando leche cruda y leche pasteurizada. Para ello, los quesos se mantuvieron al vacío inoculados con 10^4 UFC/mL de SE y 10^8 UFP/mL de bacteriófagos a 8°C . A los 89 días hubo un recuento de 10^2 UFC/g en quesos fabricados con leche cruda y fagos, mientras que, en quesos fabricados con leche pasteurizada y fagos, no existió presencia de SE. Por otro lado en quesos solo inoculados con SE, sin fagos, se encontró un recuento de 10^3 UFC/g a los 99 días, independiente de la leche utilizada, lo que demostró que la adición de bacteriófagos puede ser útil en la reducción de esta bacteria en quesos.

3.- Un estudio realizado por O'Flynn y colaboradores (2004), evaluó la capacidad lítica de una mezcla de tres fagos contra *Escherichia coli* O157:H7 en la superficie de trozos de carne fresca de bovino. Para esto, se contaminaron 18 trozos de carne con un total 100 μL de una suspensión de *E. coli* O157:H7 (2×10^3 UFC/mL), y fueron mantenidos a 37°C por una hora. Luego, a nueve de las muestras, se les adicionó un mL de la suspensión de fagos (2×10^8 UFP/mL). Las muestras se mantuvieron a 37°C por tres horas, para posteriormente realizar los recuentos. Como resultado se obtuvo que en las nueve muestras control había un recuento promedio de 10^5 UFC/mL mientras que, en siete de las nueve muestras restantes, no se evidenció la presencia de *E. coli* y en dos había un recuento menor a 10 UFC/mL, lo que demostró la eficacia de estos fagos como biocontroladores en esta carne.

4.- En Chile, Farfán (2010) analizó la efectividad de la aplicación de una mezcla nativa de fagos líticos sobre huevos libres de patógenos específicos (SPF) contaminados experimentalmente con SE, obteniendo una reducción aproximada de tres unidades logarítmicas en el recuento bacteriano, detectándose actividad lítica incluso hasta cinco días post administración de los fagos.

En esta memoria de título se estudiará la efectividad de una mezcla de fagos líticos nativos utilizados como elementos de biocontrol en carne de cerdo fresca contaminada experimentalmente con SE con el fin reducir la contaminación bacteriana.

HIPÓTESIS

Dado que la mezcla de bacteriófagos nativos, previamente aislados, demuestra actividad lítica sobre *Salmonella* Enteritidis en condiciones de laboratorio y, a que además, son estables en la carne fresca de cerdo, su aplicación en esta matriz alimentaria contaminada experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis, reducirá los recuentos de ésta.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de una mezcla de bacteriófagos nativos líticos en la reducción de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo contaminada experimentalmente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el número de muestras de carne fresca de cerdo contaminadas con *Salmonella* Enteritidis, producto de la administración de una mezcla de bacteriófagos nativos líticos.
2. Cuantificar el grado de contaminación con *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo, a los 10 días de ser tratada con bacteriófagos líticos y mantenida a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepa desafío

La cepa a utilizar correspondió a *Salmonella* Enteritidis de origen aviar. De esta cepa se seleccionó una mutante espontánea resistente a Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*) en el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, de tal manera de trabajar con una cepa marcada, facilitando su aislamiento e identificación.

2. Bacteriófagos

Para este estudio se utilizaron cinco fagos líticos aislados del estero Marga Marga de Viña del Mar, por el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica. Estos fagos fueron seleccionados dadas sus características líticas frente a la cepa desafío, su estabilidad en el tiempo en la matriz cárnica en estudio, su tolerancia a pH y temperaturas entre -20°C y 25°C, y a su rango de hospederos¹. Se utilizó una MOI de 10⁴ (MOI= multiplicidad de infección, definida como una relación entre cantidad de fagos por cada bacteria). La actividad lítica de la preparación de fagos sobre la cepa desafío fue previamente evaluada¹.

3. Matriz cárnica

La matriz alimentaria, correspondiente a Pulpa proveniente de los músculos de la parte alta de la pierna de cerdo, se obtuvo desde un Supermercado de la ciudad de Santiago (RM), en un envase sellado, con fecha de elaboración cercana al día de la adquisición, y fue transportada en un plazo inferior a cuatro horas en una caja isotérmica con refrigerantes al Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La marca comercial del corte fue confidencial.

Todas las muestras fueron sometidas a detección de *Salmonella* spp por cultivo tradicional y mediante PCR (Sánchez, 2007), por el laboratorio de Bacteriología Veterinaria. Sólo se

¹ ROBESON, JAMES. 2011. [Comunicación personal]. Laboratorio de Bacteriología. Instituto de Biología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

trabajó con muestras negativas a *Salmonella* spp, las cuales se mantuvieron refrigeradas, entre 2-8 °C, hasta el momento de su análisis, por no más de 72 horas.

4. Diseño experimental

4.1 Protocolo de contaminación con SE

La matriz fue contaminada de acuerdo a un protocolo previamente seleccionado por Espina (2012), aumentando diez veces la dosis de contaminación para las muestras mantenidas a temperatura ambiente y cien veces para las muestras refrigeradas (Anexo 1).

4.2 Preparación del inóculo bacteriano

El inóculo se elaboró desde un cultivo de SE *nal^r rif^r* en caldo Luria Bertani (Difco ®) incubado a 36°C ± 1°C durante 24 horas. A partir de este cultivo se preparó un tubo con titulación aproximada de 10⁸ UFC/mL mediante la comparación con el tubo 0,5 del nefelómetro de Mc Farland (1,5 x 10⁸ bacterias / mL). De aquí se prepararon diluciones al décimo con Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco ®) hasta llegar a las concentraciones teóricas de contaminación para cada temperatura (Anexo 1).

La concentración del inóculo fue corroborada mediante recuento, sembrando 100µL de cada dilución en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Difco ®) adicionadas con Ácido Nalidíxico (Arlab ®, 50µg/mL) y Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL).

5. Contaminación de las muestras con la cepa desafío y aplicación de la mezcla de bacteriófagos

Se trabajó con dos grupos experimentales de 25 muestras cada uno, valor previamente establecido en el trabajo de Espina (2012). Cada muestra constó de 25 g de carne molida de cerdo individualizadas en bolsas Whirl-Pak®, contaminándose posteriormente con SE *nal^r rif^r* según su protocolo (Anexo 1).

La inoculación se llevó a cabo en un gabinete de bioseguridad (Heal Force ®m clase A II), con un volumen de inóculo aproximado al 10% del tamaño total de la muestra (2,5 mL). Las muestras, una vez inoculadas, se dejaron en reposo por dos horas para permitir la adaptación al medio y adhesión de la bacteria a la superficie de la matriz.

Luego, a cada muestra contaminada, se le agregó una alícuota de la mezcla de fagos suspendidos en suero fisiológico estéril, en un volumen aproximado del 10% del peso de la muestra, utilizando una MOI de 10^4 (Anexo 1). Estas muestras se mantuvieron en cajas herméticamente cerradas a temperatura ambiente (estufa a 18°C) y de refrigeración (entre 2 a 8°C) por 10 días. Finalizados los 10 días, se agregaron 225 mL de Agua Peptonada Tamponada (APT. Difco ®) a la muestra y se homogeneizó en un equipo triturador homogeneizador (Masticator ®) por un minuto. Luego, todas las muestras fueron sometidas a Bacteriología cuantitativa y Bacteriología cualitativa.

Se estableció un grupo control de 25 muestras contaminadas sólo con SE para cada temperatura, las que se mantuvieron y procesaron separadas de los grupos experimentales, evitando toda posibilidad de contaminación cruzada. Además se contó con dos grupos blancos de 5 muestras para cada temperatura, los que se mantuvieron con las muestras en estudio y no fueron contaminados con SE. Luego de 10 días se sometieron a bacteriología cualitativa para descartar la posibilidad de contaminación intralaboratorio con SE.

5.1 Bacteriología cuantitativa (Recuento bacteriano)

De la muestra homogeneizada se tomaron 1000µL y se prepararon diluciones al décimo en APT (Difco®). Posteriormente, 100µL de cada dilución fueron transferidos a una placa de agar XLD, adicionada con Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Arlab ®, 50µg/mL), y sembrados en superficie con un asa de Digrafsky.

Las placas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, realizando el recuento sólo en aquellas que presentaron menos de 150 colonias. Las muestras negativas fueron repetidas a partir de la muestra incubada a 36°C por 24 horas.

5.2 Bacteriología cualitativa (Detección de SE)

Se utilizaron como referencias las recomendaciones establecidas por la Norma Chilena Oficial 2675 Of 2002: “Detección de *Salmonella* en Productos Hidrobiológicos” (INN, 2002), y las sugerencias de Espina 2012.

Posterior a la extracción de los 1000 µL para la bacteriología cuantitativa, la muestra restante se incubó a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 horas \pm 2 horas. Luego, se transfirieron 100 µL a un

tubo con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco®) y se incubaron en baño termostático a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas. A partir del cultivo en el caldo RV, se sembró en agar XLD (Difco®), adicionado con Rifampicina (Caisson®, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Ácido Nalidíxico (Arlab®, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizando un asa calibrada de 10 μL (tres asas por muestra). Las placas sembradas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un máximo de $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

6. Análisis estadístico

Para el primer objetivo específico, los resultados de la bacteriología cualitativa de cada grupo experimental con su respectivo control, fueron expresados como porcentaje de muestras contaminadas con SE, y sus diferencias analizadas mediante la herramienta estadística χ^2 (chi cuadrado), como prueba de diferencia de proporciones.

Para el segundo objetivo específico, los resultados de la bacteriología cuantitativa de cada grupo experimental con su respectivo control, fueron expresados en unidades logarítmicas, y sus diferencias analizadas mediante un Análisis de Varianza, utilizando el análisis Student-Newman-Keuls en caso de existir diferencias entre las medias ($p \leq 0,05$). A las muestras negativas a bacteriología cuantitativa, pero positivas en bacteriología cualitativa, se les asignó como valor 10^2 UFC/mL.

Todos los datos obtenidos en la investigación fueron analizados a través del programa computacional para análisis estadístico InfoStat® versión 2008.

7. Normas de bioseguridad

El proyecto cuenta con un Certificado de bioseguridad local (FAVET), que permitió su realización. Se utilizó delantal, guantes, mangas y mascarillas desechables. También se contó con un gabinete de seguridad para la contaminación y procesamiento de las muestras. Como desinfectante/antiséptico se utilizó alcohol y alcohol yodado y, para la desinfección de los mesones, cloro.

Todos los residuos sólidos contaminados fueron incinerados y/o esterilizados en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y los residuos líquidos, fueron clorados (5.000 ppm) previa descarga. La eliminación de todos los residuos químicos tóxicos, líquidos y sólidos, fueron realizados por una compañía externa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración del inóculo bacteriano de *Salmonella* Enteritidis aplicado a las muestras mantenidas a temperatura ambiente fue de $3,9 \times 10^3$ UFC/mL, mientras que, para las muestras mantenidas a temperatura de refrigeración, fue de $3,9 \times 10^4$ UFC/mL.

Para la dosis del inóculo aplicado se tomó como referencia el protocolo realizado por Espina (2012), que logró contaminaciones exitosas en carne de cerdo con una concentración de 10^2 UFC/mL. En este estudio, se decidió elevar la dosis a 10^3 UFC/mL y 10^4 UFC/mL para temperatura ambiente y temperatura de refrigeración, respectivamente. Esto para obtener un mayor porcentaje de muestras con recuentos factibles de contar (hasta 150 colonias /placa) y otorgar una mayor concentración bacteriana inicial para lograr la adecuada acción lítica de la mezcla de fagos. Estos valores se encuentran dentro de los rangos utilizados en estudios similares tales como el de Bigwood y colaboradores (2008) con concentraciones menores a 10^2 UFC/cm² de *Salmonella* Typhimurium en carne, Guenther y colaboradores (2012) con concentraciones de 10^3 UFC/mL de *Salmonella* Typhimurium en diversas matrices alimentarias y Leverentz y colaboradores (2001) con concentraciones de 10^6 UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis en trozos de melón.

1. Bacteriología cualitativa

Los resultados de la bacteriología cualitativa (Tablas n°1 y n°2) demostraron que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el porcentaje de muestras contaminadas del grupo control (100%) y el porcentaje de muestras contaminadas del grupo experimental (100%), independiente de la temperatura de almacenaje.

Tabla Nro. 1: Porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo contaminada experimentalmente y mantenida a temperatura ambiente por 10 días.

Grupo*	Muestras contaminadas	Muestras positivas en bacteriología cualitativa	Porcentaje de positividad
CAC	25	25	100 ^a
CAF	25	25	100 ^a

*CAC: Grupo control, carne molida de cerdo contaminada con SE, mantenida a t° ambiente.

CAF: Grupo experimental, carne molida de cerdo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° ambiente.

a, a : letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$)

Tabla Nro. 2: Porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo contaminada experimentalmente y mantenida a temperatura de refrigeración por 10 días.

Grupo*	Muestras contaminadas	Muestras positivas en bacteriología cualitativa	Porcentaje de positividad
CRC	25	25	100 ^a
CRF	25	25	100 ^a

*CRC: Grupo control, carne molida de cerdo contaminada con SE, mantenida a t° de refrigeración.

CRF: Grupo experimental, carne molida de cerdo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° de refrigeración.

^{a, a} : letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas (p>0,05)

Tanto en el grupo control como en el grupo experimental se contaminó la totalidad de las muestras (100% de positividad) es decir, la aplicación de fagos no logró disminuir el número de muestras de carne contaminadas con *Salmonella* Enteritidis. Esta situación coincide con la mayoría de los estudios realizados con bacteriófagos como agentes de biocontrol. Es así como en el estudio realizado por Farfán (2010) donde se contaminaron huevos y se adicionaron fagos a una MOI de 10⁶, el porcentaje de muestras contaminadas fue de un 100% para los grupos control y los grupos experimentales, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas. Resultados similares fueron obtenidos por Leverentz y colaboradores (2001), en trozos de melón contaminados con *Salmonella* Enteritidis, Modi y colaboradores (2001), en leche fresca contaminada con *Salmonella* Enteritidis, Bigwood y colaboradores (2008) en carne cruda y cocida contaminada con *Salmonella* Typhimurium, Guenther y colaboradores (2012) en leche chocolatada, hot dogs y mariscos contaminados con *Salmonella* Typhimurium, entre otros.

Son escasos los estudios donde se puede observar que los fagos son capaces de disminuir el número de muestras contaminadas. O' Flynn y colaboradores (2004) contaminaron trozos de carne con una suspensión de *E. coli* O157:H7 (2 x 10³ UFC/mL) a los cuales se les adicionó una suspensión de fagos (2 x 10⁸ UFP/mL) y fueron mantenidas a 37 °C por una hora. Luego de este tiempo, se logró una reducción significativa en la incidencia de contaminación en el 78% de las muestras, sin embargo, este estudio se hizo considerando solo la contaminación superficial de la carne, por lo que no se evaluó el efecto de los fagos sobre el grado de contaminación en el interior de la carne. Armijo (2010) contaminó

albúminas y yemas de huevo con *Salmonella* Enteritidis adicionándoles una mezcla de bacteriófagos a distintas concentraciones y fueron mantenidas a 37°C por 24 y 48 horas. De estas muestras solo se logró una reducción significativa en la incidencia de contaminación en el 32% de las muestras de albúminas tratadas con la MOI más alta (10^5) a las 48 hrs. Se concluyó que, mientras la MOI sea más alta, mayor es el efecto del bacteriófago en la reducción de muestras contaminadas. Más recientemente Guenther y colaboradores (2012) contaminaron mariscos y leche chocolatada con 1×10^3 UFC/g de *Salmonella* Typhimurium y se les agregó una concentración del fago FO1-E2 a 3×10^8 UFP/g, las muestras fueron mantenidas a 8°C por 6 días, obteniéndose como resultado un 100% de muestras donde la bacteria no fue capaz de crecer, es decir, se logró una reducción total del número de muestras contaminadas. Sin embargo los autores señalan que estos resultados son cuestionables ya que en las muestras contaminadas, sin adición de fagos, hubo una disminución de 0,5 a 1,4 unidades logarítmicas en los recuentos bacterianos. Un factor señalado por los autores que pudo influir en el resultado, fue que la técnica utilizada no era lo suficientemente sensible para detectar *Salmonella* Typhimurium a bajas cantidades, dado que, al someter al grupo experimental a un protocolo de enriquecimiento, se demostró que *Salmonella* Typhimurium se encontraba presente.

En el caso del presente estudio, la no disminución en el número de muestras contaminadas con SE pudo haber radicado en la concentración de fagos aplicada ya que en los estudios donde se ha logrado esta disminución la MOI siempre fue de 10^5 (O' Flynn *et al.*, 2004; Armijo, 2010), no así en este estudio donde fue de 10^4 . Es por esto factible postular que, en futuros estudios, si se aumentara la MOI, podría eventualmente ocurrir una disminución en el número de muestras contaminadas.

Otro factor que pudiera explicar el elevado porcentaje de contaminación de las muestras del grupo experimental es el tipo de matriz. En un estudio realizado por Guenther y colaboradores (2009), donde se evaluó el efecto de un bacteriófago como agente de biocontrol en diversas matrices de alimentos contaminadas con *Listeria monocytogenes*, se concluyó que en matrices de alimento líquido, como la leche, la suspensión de bacteriófagos difunde libremente lográndose más fácilmente un efecto deseado, no así en matrices de alimento sólido donde la difusión del fago y la habilidad de la matriz de

absorberlo, es menor. Los autores señalan que una de las matrices más difíciles de tratar con fagos es la carne, debido a la superficie irregular que limita físicamente la distribución de los fagos, esto influye en el contacto entre la bacteria y las partículas fágicas lo que conlleva a una menor efectividad.

En cuanto al grupo de blancos, las muestras correspondientes a éste fueron negativas a SE, lo cual descartó la contaminación intralaboratorio con la cepa desafío.

2. Bacteriología cuantitativa:

Analizando los recuentos (\log_{10} UFC/g) de los distintos grupos, se observó que las diferencias entre el grupo experimental y su respectivo grupo control fueron significativas ($p \leq 0,05$) para las muestras mantenidas a temperatura ambiente (Tabla n°3), mientras que, en las muestras mantenidas a temperatura de refrigeración (Tabla n°4), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tabla Nro. 3: Recuentos promedio (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura ambiente.

Grupo*	Nº muestras	Recuento promedio (\log_{10} UFC/g) ± D.E.**	Recuentos mínimos - máximos de SE (\log_{10} UFC/g)
CAC	25	5,53 ^a ± 0,30	4,94 – 6,08
CAF	25	2,97 ^b ± 0,60	0,64 – 4,06

*CAC: Grupo control, carne molida de cerdo contaminada con SE, mantenida a t° ambiente.

CAF: Grupo experimental, carne molida de cerdo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° ambiente.

**D.E.: Desviación Estándar

^{a, b} : letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

Tabla Nro. 4: Recuentos promedio (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura de refrigeración.

Grupo*	Nº muestras	Recuento promedio (\log_{10} UFC/g) ± D.E.**	Recuentos mínimos - máximos de SE (\log_{10} UFC/g)
CRC	25	2,81 ^a ± 0,99	0,64 – 3,52
CRF	25	2,81 ^a ± 0,58	0,64 – 3,24

*CRC: Grupo control, carne molida de cerdo contaminada con SE, mantenida a t° de refrigeración.

CRF: Grupo experimental, carne molida de cerdo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° de refrigeración.

**D.E.: Desviación Estándar

^{a, a} : letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$)

Cabe señalar que en dos de las muestras, una en el grupo experimental mantenida a temperatura ambiente, y otra en el grupo experimental mantenida a temperatura de refrigeración, no se observó desarrollo bacteriano en la placa de agar, por lo que no se pudo realizar el recuento, sin embargo, estas muestras fueron positivas a la bacteriología cualitativa. Esto ocurrió debido a que el método utilizado no fue lo suficientemente sensible para detectar cantidades tan bajas de SE, a diferencia del método utilizado para la bacteriología cualitativa, el cual, utiliza un medio de enriquecimiento que estimula el crecimiento bacteriano, similar a lo señalado por Guenther y colaboradores (2012).

En relación al análisis cuantitativo realizado a las muestras almacenadas a temperatura ambiente por diez días, los resultados obtenidos muestran recuentos con valores estadísticamente mayores para el grupo control que para el grupo experimental ($p \leq 0,05$), lográndose reducciones del orden de 2,56 unidades logarítmicas de SE/g. Estos resultados favorables coinciden con diversos estudios realizados, como el de Leverentz y colaboradores (2001), que contaminaron trozos de melón con *Salmonella* Enteritidis (1×10^6 UFC/mL) agregándoles 2×10^8 unidades UFP/mL de cada fago, los cuales fueron incubados a 20°C por siete días, lográndose reducciones de 2,5 unidades logarítmicas. En el estudio de O' Flynn y colaboradores (2004), realizado en trozos de carne contaminados con *E. coli* O157:H7 mantenidos a 37°C por una hora, la adición de fagos logró reducciones del orden de 5 unidades logarítmicas. Por otra parte en un estudio realizado por Guenther y colaboradores (2009), quienes analizaron la efectividad de bacteriófagos en el control de *Listeria monocytogenes* en diversas matrices alimentarias, mantenidas a 20°C por 6 días, se lograron reducciones de 3,8 unidades logarítmicas en hotdogs, 4,7 unidades logarítmicas en repollo y 6,4 unidades logarítmicas en leche chocolatada. Es así como también, en estudios recientes realizados en matrices cárnicas, se lograron resultados favorables. Prieto (2012) en carne de bovino y Cruz (2012) en carne de pollo, contaminaron muestras con *Salmonella* Enteritidis y le adicionaron una mezcla de bacteriófagos, logrando reducciones significativas en los recuentos bacterianos de 3,65 unidades logarítmicas y 0,88 unidades logarítmicas, respectivamente.

Por otro lado, a pesar de que los fagos utilizados en este estudio poseen una buena tolerancia a temperatura de refrigeración² (actividad lítica entre -20°C y 25°C), éstos no lograron reducir ($p > 0,05$) los recuentos bacterianos en las muestras analizadas. Estos resultados no fueron los esperados ya que, en estudios realizados por otros autores, a condiciones similares de temperatura, se lograron reducciones significativas en los recuentos bacterianos. En el estudio realizado por Leverentz y colaboradores (2001), donde se contaminaron trozos de melón con *Salmonella* Enteritidis, se evaluó el efecto de una mezcla de bacteriófagos a 5°C obteniéndose mayores reducciones que a 20°C, siendo de 3,5 unidades logarítmicas y 2,5 unidades logarítmicas, respectivamente. En el estudio realizado por Guenther y colaboradores (2009) en que se contaminaron diversas matrices alimentarias con *Listeria monocytogenes* y fueron mantenidas a 6°C por 6 días, también se lograron buenos resultados, obteniéndose reducciones del orden de 2,3 a 5 unidades logarítmicas, dependiendo de la matriz. Estos valores son incluso más prometedores que los obtenidos a temperatura ambiente en este mismo estudio ya que, a pesar de que el porcentaje de reducción en los recuentos fueron mayores para 20°C en comparación a 5°C, la cantidad de *Listeria monocytogenes* presente en las muestras tratadas con fagos, mantenidas a ésta temperatura, fueron más altas que a temperatura de refrigeración.

Se describe en la literatura que, para que los bacteriófagos puedan ejercer su efecto correctamente, tanto el fago como la bacteria deben encontrarse físicamente cercanos para lograrse su interacción; el bacteriófago debe tener afinidad con la bacteria y la cantidad de fagos debe ser suficientemente alta para poder contactarse con la bacteria. Otros factores a considerar son las barreras físicas presentes en el alimento, que impiden la interacción inicial fago-bacteria, es decir, las colisiones que permiten la adsorción del fago en los receptores de superficie de la bacteria, tal como la superficie de la matriz y la cantidad de fluido presente en la matriz ya que esto afectaría la difusión del bacteriófago y su accesibilidad a la bacteria (Greer, 2005; Hagens y Loessner, 2010). Se describe también que en el caso de los alimentos sólidos, la superficie total de alimento y su capacidad de

² ROBESON, JAMES. 2011. [Comunicación personal]. Laboratorio de Bacteriología. Instituto de Biología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

absorber el inóculo de fagos, son los parámetros decisivos para el éxito (Guenther *et al.*, 2009). Estos factores no debieran afectar los resultados de este estudio por cuanto todas las muestras correspondieron al mismo tipo de matriz, trozo y corte de carne, y mismo protocolo de contaminación y aplicación de fagos.

Otro de los factores que determinan la efectividad del bacteriófago como agente de biocontrol es que la bacteria debe ser capaz de replicarse en el ambiente en el que se encuentra (Hagens y Loessner, 2010). Se describen diversos tipos agentes estresantes que pueden afectar a los microorganismos que se encuentran en los alimentos, los cuales producirían un descenso en el crecimiento bacteriano. La baja temperatura como lo es la temperatura de refrigeración sumado al prolongado tiempo de almacenamiento, se considera por Wesche y colaboradores (2009) como un estrés de tipo moderado, el cual desencadenaría la muerte de una cierta cantidad de *Salmonella*. Si se comparan los recuentos promedios entre los grupos controles según la temperatura, se puede observar que, a temperatura ambiente, la bacteria logró crecer adecuadamente alcanzando un recuento promedio de 5,53 log₁₀ UFC/g, mientras que, a temperatura de refrigeración, el recuento promedio llegó a 2,81 log₁₀ UFC/g. Entonces, al haber un bajo desarrollo de bacterias, se perdería la relación fago-bacteria mínima necesaria para lograr una correcta interacción o colisión entre fagos y bacterias, por lo que éstos no podrían ejercer su acción adecuadamente.

Finalmente, los resultados de este trabajo sugieren que la actividad lítica de la mezcla de cinco bacteriófagos es efectiva en la reducción de la contaminación de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de cerdo mantenida a temperatura ambiente por diez días, no así a temperatura de refrigeración, siendo esto último dependiente de la concentración bacteriana y la tolerancia de los fagos a esta temperatura. Por lo anterior, esta mezcla de bacteriófagos podría ser una alternativa para ser utilizada comercialmente a futuro como un agente de biocontrol.

CONCLUSIONES

- La administración de una mezcla de bacteriófagos líticos, bajo las condiciones de este estudio, en carne de cerdo contaminada experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis no disminuye la cantidad de muestras contaminadas en 10 días, independiente de la temperatura.
- La administración de una mezcla de bacteriófagos líticos, bajo las condiciones de este estudio, reduce los recuentos de contaminación de *Salmonella* Enteritidis en carne de cerdo contaminada experimentalmente y mantenida a temperatura ambiente por 10 días.
- La administración de una mezcla de bacteriófagos líticos, bajo las condiciones de este estudio, no reduce los recuentos de contaminación de *Salmonella* Enteritidis en carne de cerdo contaminada experimentalmente y mantenida a temperatura de refrigeración por 10 días.

REFERENCIAS

- **ARMIJO, J.** 2010. Uso de bacteriófagos para la reducción in vitro de *Salmonella* Enteritidis en albúmina y yema de huevos SPF. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 71p.
- **BIGWOOD, T.; HUDSON, J.; BILLINGTON, G.; CAREY-SMITH, G.; HEINEMANN, J.** 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.* 25:400-406.
- **CRUZ, F.** 2012. Bacteriófagos líticos como agentes biológicos reductores de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en carne fresca de pollo experimentalmente contaminada. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 20p.
- **ESPINA, K.** 2012. Contaminación experimental con *Salmonella* Enteritidis en carnes crudas de pollo, pavo, cerdo y bovino. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 25p.
- **FARFÁN, F.** 2010. Efecto de una mezcla de tres bacteriófagos en la reducción de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF experimentalmente infectados. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.
- **GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J. M.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett. Appl. Microbiol.* 47:479-485.
- **GOODRIDGE, L.; BISHA, B.** 2011. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage.* 1(3): 130-137.
- **GÓRSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.** 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell.Mol.Life.Sci.* 62:511-519.
- **GREER, G.** 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food. Prot.* 68(5):1102-1111.
- **GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.** 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:93-100.
- **GUENTHER, S.; HERZIG, O.; FIESELER, L.; LOESSNER, M.** 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage F01-E2. *Int. J. Food Microbiol.* 154: 66-72.
- **HAGENS, S.; LOESSNER, M.** 2010. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: Calculations and considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11:58-68.

- **HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; BALOG, J.; DONOHUE, A.** 2004. Bacteriophage: potential role in food safety. **In:** Preharvest and postharvest food safety. Blackwell publishing professional. Iowa, Estados Unidos. pp. 365-373.
- **INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2002. Norma chilena oficial NCh 2675. Of2002. Productos hidrobiológicos - detección de *Salmonella*. 05 Abril 2002. 31p
- **LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W.J.; FUCHS Y.; CAMP, M.J.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A.** 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. J. Food. Prot. 64:1116-1121.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2012. Informe de Brotes por Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Departamento Epidemiología. [en línea]. <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/ETA/ETA_SE82012.pdf> [consulta: 07-06-2012].
- **MODI, R.; HIRVI, Y.; HILL, A.; GRIFFITHS, M. W.** 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. J. Food. Prot. 64 (7): 927–933.
- **MUKHOPADHYAY, S.; RAMASWAMY, R.** 2011 Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. Food. Res. Int. 45(2):666-677.
- **O'FLYNN, G.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A.** 2004 . Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of Escherichia coli O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 70:3417-3424.
- **OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** 1997. Vigilancia y prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Subcomité de Planificación y Programación del Comité Ejecutivo. 29ª sesión, 1 y 2 de Diciembre, 1997.
- **PEÑALOZA, C.** 2008. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp aisladas de bovinos de las regiones V, Metropolitana y X. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 50p.
- **PRIETO, G.** 2012. Eficacia del uso de una mezcla de bacteriófagos en la reducción de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de bovino. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 30p.

- **SÁNCHEZ, P.** 2007. Uso de reacción de polimerasa en cadena en el diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en tejidos y contenido intestinal de pollos experimentalmente infectados. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.
- **SKURNIK, M.; STRAUCH, E.** 2006. Phage therapy: Facts and fiction. Inter. J. Med. Microbiol. 296(1):5-14.
- **TORRES, C.** 2008. Aislamiento y sensibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp En cerdos provenientes de plantales animales bajo certificación oficial faenados en La Región Metropolitana. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 54 p.
- **VAQUERO, A.** 2011. Informe *Salmonella* Enteritidis 7 de Noviembre 2011. [en línea].<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Salmonella/Informe_Salmonella_2011.pdf> [consulta: 07-06-2012].
- **WESCHE A., GURTNER J., MARKS B., RYSER E.** 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. J. Food Prot. 72(5):1121-1138

ANEXOS

1. Protocolos de contaminación con SE y título de la mezcla de fagos según temperatura de mantención.

Matriz	Temperatura ambiente			Temperatura refrigeración		
	Protocolo	Dosis SE **UFC/mL	Título fagos ***UFP/mL	Protocolo	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL
Cerdo	MH	10 ³	10 ⁷	MH	10 ⁴	10 ⁸

* MH= Molido (en Moulinex®), inóculo homogeneizado, ** UFC= Unidades formadoras de colonias

***UFP= unidades formadoras de placas líticas