



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

***Salmonella* Enteritidis: BACTERIÓFAGOS EN CARNE DE
SALMÓN AHUMADO Y FRESCO CONGELADO COMO
HERRAMIENTA DE BIOCONTROL.**

Luis Jonathan Bravo Tordecilla

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

PROFESORA GUÍA: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO

PROYECTO FONDECYT 1110038

SANTIAGO, CHILE
2013



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

***Salmonella* Enteritidis: BACTERIÓFAGOS EN CARNE DE
SALMÓN AHUMADO Y FRESCO CONGELADO COMO
HERRAMIENTA DE BIOCONTROL.**

Luis Jonathan Bravo Tordecilla

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CORRECTOR: BQ. CARLOS NAVARRO V.
PROFESOR CORRECTOR: DR. PEDRO ÁBALOS P.

SANTIAGO, CHILE

2013

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1. CEPA BACTERIANA.....	9
2. BACTERIÓFAGOS	9
3. MATRIZ ALIMENTARIA	9
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	10
4.1. Protocolo de contaminación	10
4.2. Preparación del inóculo	10
4.3. Contaminación y aplicación de la mezcla de bacteriófagos a las muestras.....	11
4.4. Bacteriología cuantitativa (Recuento de SE).....	12
4.5. Bacteriología cualitativa (Detección de SE).....	12
5. Análisis estadístico.....	13
6. Normas de bioseguridad.....	13
RESULTADOS.....	14
A) MATRIZ SALMÓN FRESCO CONGELADO	14
B) MATRIZ SALMÓN AHUMADO	15
DISCUSIÓN	17
REFERENCIAS	21
ANEXOS.....	25
ANEXO 1.....	25
ANEXO 2.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dosis de contaminación con <i>Salmonella</i> Enteritidis y título de la mezcla de fagos, según matriz y temperatura de incubación.....	10
Tabla 2. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de <i>Salmonella</i> Enteritidis en carne de Salmón Fresco Congelado, mantenida a temperatura ambiente durante 10 días.....	14
Tabla 3. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de <i>Salmonella</i> Enteritidis en carne de Salmón Fresco Congelado, mantenida a temperatura de refrigeración durante 10 días.....	15
Tabla 4. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de <i>Salmonella</i> Enteritidis en carne de Salmón Ahumado, mantenido a temperatura ambiente durante 10 días.....	16
Tabla 5. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de <i>Salmonella</i> Enteritidis en carne de Salmón Ahumado, mantenido a temperatura de refrigeración durante 10 días.	16

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos, son un importante problema de salud pública a nivel mundial, donde los agentes biológicos juegan un rol trascendental en su transmisión. Frente a esto, en los últimos años se han utilizado diversas tecnologías de naturaleza biológica, como los bacteriófagos, para controlar en forma efectiva *Salmonella* sp. en los alimentos.

El objetivo de este estudio fue establecer la capacidad biocontroladora de una mezcla de fagos líticos nativos en la reducción de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis (SE), en dos matrices alimentarias consideradas de riesgo como son salmón fresco congelado y salmón ahumado.

Para llevar a cabo el objetivo se trabajó con dos grupos de 25 muestras cada uno: el grupo experimental se contaminó con SE y recibió la mezcla de fagos (MOI 10^4), mientras que el grupo control sólo se contaminó con la cepa desafío. La dosis de contaminación varió según la temperatura de incubación de las muestras. Una vez contaminado y aplicada la mezcla de fagos, las muestras se incubaron por 10 días a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración para luego realizarles recuento bacteriano. Al final del periodo del estudio se observó que la aplicación de la mezcla de fagos redujo ($p \leq 0,0001$), los recuentos de SE en ambas matrices alimentarias independiente de la temperatura de incubación, obteniéndose mayores reducciones en aquellas muestras mantenidas a temperatura ambiente (3,19 unidades logarítmicas de SE/g para salmón fresco congelado y 1,96 unidades logarítmicas de SE/g para salmón ahumado).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la mezcla de fagos nativos es efectiva en la reducción de SE en carne de salmón ahumado y fresco congelado a temperatura ambiente y de refrigeración durante 10 días.

ABSTRACT

Foodborne diseases represent an important Public Health issue worldwide, where biological agents have a transcendental role on their transmission. To face this, in the last years several biological tools, as the bacteriophages (or phages), have been used to efficiently control *Salmonella* sp. in foods.

The aim of this study was to establish the biocontrolling capacity of a cocktail of native lytic phages to reduce *Salmonella* Enteritidis (SE) counts on two food matrixes regarded as risk, fresh frozen salmon meat and smoked salmon meat.

To reach the objective two groups, with 25 samples each one, were utilized: the experimental group was contaminated with SE and received the phage cocktail (MOI 104), while the control group was only contaminated with the challenge strain. The contamination dose varied according to the samples incubation temperature. Once contaminated and applied the phage cocktail, the samples were incubated for 10 days at room temperature and at refrigeration temperature. Following incubation, the bacterial count was performed. Ending this period, it was observed that the phage mix application reduced the SE counts on both food matrixes independently of the incubation temperature, getting higher bacterial counts reductions on those samples stored at room temperature (3,19 log in fresh frozen salmon meat, and 1,96 in smoked salmon meat).

The results obtained in this study suggest that the native phage cocktail it is effective reducing SE in fresh frozen salmon meat and smoked salmon meat at both room and refrigeration temperature for 10 days.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), constituyen uno de los problemas de salud pública de mayor importancia a nivel mundial. Afectan, principalmente, a la población de escasos recursos, niños, mujeres embarazadas y ancianos, generando pérdidas económicas y grandes costos a los servicios de salud en todos los países.

En Chile y en otras regiones del mundo, como Estados Unidos y Europa, el principal agente etiológico involucrado en los brotes de ETA es *Salmonella* sp. siendo el serotipo predominante *Salmonella* Enteritidis (SE). En Chile ha sido aislado principalmente de comidas elaboradas en el hogar y platos listos para consumo, seguido de huevos y ovoproductos y en tercer lugar pescados y productos de la pesca.

Pese a los esfuerzos de la industria alimentaria de erradicar *Salmonella* sp. de los productos hidrobiológicos utilizando diversas tecnologías, sumado a la existencia de un programa nacional de aseguramiento de calidad al interior de las plantas pesqueras, aun siguen existiendo brotes asociados a este agente en este tipo de alimentos, tanto en Chile como en Estados Unidos y Holanda.

En relación a esto, en los últimos años se ha estado trabajando en base a ciertos virus llamados bacteriófagos capaces de lisar bacterias específicas, entre ellas, *Salmonella* sp. en diversas matrices alimentarias, como salmón ahumado y filetes de salmón fresco congelado. Dichos estudios avalan la utilización de esos fagos como instrumento selectivo para biocontrolar *Salmonella* sp. en estos alimentos.

Chile en este aspecto no se ha quedado atrás y en los últimos años se han aislado fagos nativos, que han demostrado una excelente actividad lítica *in vitro* frente a SE, además de tolerar un amplio rango de temperaturas, pH y tener una buena estabilidad en diferentes matrices alimentarias. Estas características permiten plantear la necesidad de realizar estudios de biocontrol en alimentos considerados de riesgo en Chile como son las carnes frescas y procesadas, donde encontramos el salmón fresco congelado y salmón ahumado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

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

De acuerdo a un informe entregado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2013), durante el año 2011 la Unión Europea registró un total de 5.648 brotes de origen alimentario, causando 69.553 casos humanos, 7.125 hospitalizaciones y 93 muertes. La mayoría de los brotes registrados fueron ocasionados por *Salmonella* (30,5%), siendo el serotipo predominante *Salmonella* Enteritidis (SE). Por otro lado, el año 2013, la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, conocida como *Foodnet*, componente activo del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), durante el año 2012 identificó un total de 19.531 casos confirmados de ETA, de ellos 4.563 fueron hospitalizados y causaron 68 muertes. El número de infecciones causadas por *Salmonella*, fue de 7.800 casos (39,9%), siendo el serotipo más común SE (18%) (CDC, 2012a).

Un estudio realizado por Alerte *et al.* (2012), durante el periodo 2005-2010, en la Región Metropolitana de Chile se declararon 2.434 brotes de ETA, que afectaron a un total de 12.196 personas. De ellas, 345 fueron hospitalizadas (3%), 14 fallecieron (0,1%) y 11.130 fueron pacientes ambulatorios (96,8%). Los alimentos implicados, independiente del agente patógeno, correspondieron a mariscos (15,4%), pescados (15,1%) y platos preparados (13,5%), entre otros. El principal agente biológico identificado correspondió a *Salmonella* (20,9%), siendo SE el serotipo aislado con mayor frecuencia. Además se identificó que las causas más frecuentes fueron la manipulación inadecuada de alimentos y la conservación deficiente de estos una vez elaborados. Producto de estas malas prácticas es que en Febrero del año 2011 se registró un grave brote por consumo de *sushi*. El informe epidemiológico reportó un total de 38 casos, donde SE fue aislada en 16 de los 18 coprocultivos analizados. Durante la inspección fiscalizadora al restaurante involucrado, los funcionarios estatales detectaron deficiencias en la cadena de frío y contaminación cruzada de alimentos (García-

Huidobro *et al.*, 2012). Una situación similar se vivió en Estados Unidos, durante el año 2012, donde 425 personas fueron afectadas por un brote de salmonelosis producto del consumo de *sushi* elaborado con atún crudo (CDC, 2012b). En Holanda, durante el último trimestre del año 2012, un brote de salmonelosis afectó a 866 personas, señalando al salmón ahumado como vehículo de infección (Friesema *et al.*, 2012).

De acuerdo al último informe generado por el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL, 2013), hasta la semana epidemiológica número 46 del presente año, se habían notificado 1.024 brotes de ETA, cifra superior a la registrada en igual periodo del año anterior (n=905). Dentro de los principales alimentos involucrados en estos brotes de ETA, la comida y platos preparados se ubican en primer lugar (37,8%), seguido por pescados y productos de la pesca (35,1%) y en tercer lugar carnes y productos cárneos (8,1%). Sólo en el 34,3% de los brotes fue posible aislar el agente causal, donde el principal responsable resultó ser *Salmonella* (58,1%). De los alimentos donde fue posible aislar este agente, la comida y platos preparados se ubica en primer lugar (47,5%), seguido de huevos y ovoproductos (12,3%) y en tercer lugar pescados y productos de la pesca (13,4%). Es importante destacar que dentro de comida y platos preparados se encuentra el *sushi*, alimento que sin duda ha entrado con gran fuerza en el mercado nacional, incrementando cada vez más su consumo y demanda. Lo anterior se ve reflejado con el aumento de restaurantes de comida japonesa en la Región Metropolitana y a la venta de este plato en lugares no establecidos, tales como a las salidas de las estaciones de metro y en feria libres.

Frente a estos brotes de salmonelosis surgidos en los últimos años alrededor del mundo asociados al consumo de pescado, sumado a la transformación en los sistemas de vida, hábitos alimentarios y a la incorporación de nuevas culturas culinarias, es necesario establecer políticas para controlar los patógenos transmitidos por este alimento.

En Chile existe un programa de aseguramiento de calidad basado en el análisis de peligros y control de puntos críticos al cual pueden optar todas las plantas pesqueras y barcos factorías del país. El rol de este programa es implementar un sistema de prevención y control de peligros durante el proceso, asegurando de esta forma, la calidad del producto final (SERNAPESCA, 2013). Todo esto en relación a que este tipo de alimento es cada vez

más reconocido como un componente de la dieta, debido a su gran valor nutricional ofreciendo una alta cantidad de proteínas y a sus diversas formas de consumo, ya sea listos para ingerir, semicocidos e incluso crudos (Amagliani *et al.*, 2012). Por esta razón, en la última década, diversas tecnologías han sido estudiadas con el fin de controlar algunos patógenos transmitidos por este tipo de alimento. Tales procesos van desde la aplicación de luz ultravioleta (Ozer y Demirci, 2006), aplicación de ozono (Crowe *et al.*, 2012) y la combinación de la alta presión hidrostática con el sistema de la lactoperoxidasa (Montiel *et al.*, 2012), entre otros. Adicionalmente, en los últimos años ha tomado fuerza el uso de ciertos virus, llamados bacteriófagos, capaces de controlar en forma efectiva algunas bacterias patógenas transmitidas por los alimentos (Brovko *et al.*, 2012).

Los bacteriófagos o fagos son un grupo de virus abundantes en el planeta, que infectan hospederos específicos y son capaces de interrumpir el metabolismo bacteriano y causar la lisis de la bacteria (Brovko *et al.*, 2012). Fueron secuencialmente descubiertos por Twort en 1915 y D'Herelle en 1917, siendo este último, quien los denominó como bacteriófagos (García *et al.*, 2008; Brovko *et al.*, 2012). Existen dos tipos de fagos: líticos y lisogénicos. Los fagos líticos comienzan su ciclo infectivo con la adsorción o unión de estructuras especializadas que reconocen moléculas específicas de superficie de las bacterias permitiendo la internalización de su genoma; una vez dentro comienza la transcripción y replicación del material viral; el ciclo finaliza con la lisis osmótica de la bacteria, liberándose la progenie viral. Estos fagos tienen la potencialidad de transducir una porción del genoma bacteriano desde la progenie viral hacia una bacteria susceptible, sin embargo, la probabilidad que ocurra este fenómeno es muy baja (Murray *et al.*, 2006). Por otro lado, los fagos lisogénicos infectan la célula hospedera integrando su genoma, el que es replicado junto con el material genético de la célula bacteriana quedando en estado de latencia como profago (lisogenia). Bajo condiciones de estrés el profago puede activarse y producir la lisis bacteriana, tal como un fago lítico (Brovko *et al.*, 2012). Producto de la capacidad que tienen los fagos lisogénicos de integrar su genoma en las bacterias, pudiendo provocar altos niveles de transferencias horizontal de genes indeseables entre poblaciones bacterianas, como por ejemplo, genes de virulencia (*Shiga like toxin* de *Escherichia coli*), es que ellos son malos candidatos para ser utilizados como biocontroladores (Monk *et al.*, 2010).

La capacidad lítica de los fagos constituye entonces, la base para ser usados como agentes biológicos reductores de la carga bacteriana. En la industria de alimentos, se pueden aplicar en cuatro etapas de la cadena alimentaria: reducción de la colonización bacteriana en animales de abasto (fagoterapia); desinfección de equipamientos y superficies de contacto en la industria alimentaria (biosanitización); extensión de la durabilidad de alimentos producidos (bioconservación) y descontaminación de las canales y otros productos crudos como vegetales y fruta fresca (biocontrol) (García *et al.*, 2008). En esta última etapa, se aplican directamente sobre la superficie de los alimentos reduciendo la contaminación durante el procesamiento. Las principales ventajas que poseen los fagos líticos como biocontroladores son su especificidad, inocuidad, estabilidad, economía y facilidad de producir. No obstante, tienen algunos inconvenientes como la limitada gama de hospederos, la potencial transducción de caracteres virulentos de una cepa bacteriana a otra y el riesgo de desarrollar resistencia bacteriana. Todas estas desventajas pueden ser minimizadas utilizando mezclas de diferentes tipos de fagos y analizando el genoma viral en búsqueda de genes indeseables (Brovko *et al.*, 2012).

Durante los últimos años se han incrementado los estudios de aplicación de fagos contra *Salmonella* sp. y otros patógenos alimentarios en productos hidrobiológicos, demostrando todos ellos disminuciones de recuentos bacterianos que fluctúan entre 1,9 – 2,3 unidades logarítmicas, según el tipo de matriz, temperatura y tiempo de almacenamiento. Así, Guenther *et al.* (2009), estudiaron el efecto de fagos contra *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado, entre otros alimentos. Las muestras fueron inoculadas con 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. monocytogenes*/mL y 10^8 unidades formadoras de placa (UFP) de fagos/mL y almacenadas a 6° C durante seis días. Al final del periodo observaron que la mezcla de bacteriófagos logró reducir 2,2 unidades logarítmicas por gramo de alimento. Frente a estos resultados concluyeron que los fagos estudiados pueden ser muy eficaces para el control biológico específico de *L. monocytogenes* en este tipo de alimento.

Soni y Nannapaneni (2010), observaron el efecto de una preparación comercial de fagos (LISTEX™ P100), frente a *L. monocytogenes* en filetes de salmón crudo, los cuales fueron inoculados con 10^2 UFC de *L. monocytogenes*/g y 10^8 UFP de fagos/g e incubados a 4° C

durante 10 días. Al final de la experiencia el preparado comercial causó una disminución en la población de *L. monocytogenes* del orden de las 2,3 unidades logarítmicas por gramo de alimento. En relación a esto, los autores avalan la utilización de este producto como listericida en filetes de salmón crudo y su uso en la reducción cuantitativa de *L. monocytogenes*.

Guenther *et al.* (2012), evaluaron un fago lítico en la reducción de *Salmonella* Typhimurium (ST), en alimentos listos para su consumo, dentro de ellos una mezcla de mariscos. Las muestras se inocularon con 10^3 UFC de ST/g y 10^8 UFP de fago/g. Los alimentos se incubaron durante seis días a 8 y 15° C. A 8° C, no se observaron bacterias viables después de la aplicación del fago en la mezcla de mariscos y leche con chocolate. Mientras que a 15° C, la aplicación de fago en la mezcla de mariscos disminuyó los recuentos de ST en 1,9 unidades logarítmicas por gramo de alimento. Por otro lado, en salchichas a 15° C, la aplicación de fago redujo los recuentos en 3 unidades logarítmicas por gramo de alimento, mientras que en leche con chocolate la reducción alcanzó las 5 unidades logarítmicas por mililitros de leche, sin embargo, en yema de huevo no se observaron diferencias significativas a los seis días de incubación. Por lo tanto y tomando en cuenta las exitosas reducciones logradas en la mayoría de las matrices alimentarias, es que los autores concluyeron que los fagos utilizados en este estudio ofrecen una medida de control eficaz para ST en estos alimentos.

En Chile, Robeson *et al.* (2012), lograron aislar fagos nativos desde el estero Marga Marga de Viña del Mar. Estos fagos fueron estudiados de acuerdo a su rango de hospedero, tolerancia a diferentes pH y temperatura. Adicionalmente estudiaron la estabilidad en diversas matrices alimentarias no contaminadas, dentro de ellas salmón fresco congelado y salmón ahumado durante 10 días. Ellos observaron que tres de los cinco fagos no presentaron disminución apreciable de título en todas las matrices analizadas. Sin embargo, de los dos restantes que componen la mezcla, uno decae en dos unidades logarítmicas al día 10, mientras que el otro decae inicialmente, pero su título permanece estable al final del periodo.

Considerando los resultados de Robeson *et al.* (2012), Jorquera *et al.* (2012a), evaluaron la actividad lítica de la mezcla de los cinco fagos nativos en carne fresca de pollo. Dichas muestras fueron inoculadas con $5,7 \times 10^5$ UFC de SE/mL y 10^9 UFP de fagos/mL, se incubaron a 4° C por 10 días, realizando recuento de SE a los tres, seis y 10 días. En todas las muestras tratadas con fagos disminuyó el recuento de SE en rangos entre 1,0 – 1,55 unidades logarítmicas de SE/g, siendo su mayor efecto a los 10 días.

La presente memoria pretende evaluar la efectividad de la aplicación de la mezcla de cinco fagos nativos frente a SE en carne de salmón ahumado y fresco congelado por ser un alimento de riesgo, involucrado en brotes de ETA a nivel nacional como internacional y debido a que es consumida en forma cruda (salmón fresco congelado) y listo para consumo, en el caso del salmón ahumado.

HIPÓTESIS

Debido a que la mezcla de fagos nativos ha mostrado tener una buena estabilidad en carne de salmón ahumado y fresco congelado y, poseer una buena actividad lítica *in vitro* frente a cepas de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, su aplicación reducirá el recuento de esta bacteria.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la capacidad biocontroladora de una mezcla de bacteriófagos nativos líticos en la reducción de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en carne de salmón ahumado y fresco congelado contaminado experimentalmente.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Determinar la disminución de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en carne de salmón ahumado y fresco congelado tratados con una mezcla de bacteriófagos y mantenidos por 10 días a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepa bacteriana

La cepa correspondió a *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (SE), de origen aviar (donada por la Dra. Irma Acevedo González del Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile). A partir de ésta se seleccionó una doble mutante espontánea resistente a Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*), por el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV).

2. Bacteriófagos

Para este estudio se utilizaron cinco fagos líticos aislados del estero Marga Marga de Viña del Mar y preparados por el Dr. James Robeson, del Instituto de Biología de la PUCV. Estos fagos se seleccionaron por sus características líticas frente a la cepa bacteriana, su estabilidad en el tiempo en la matriz en estudio, su tolerancia al pH y a temperaturas entre -20° C y 25° C y a su rango de hospederos (Robeson *et al.*, 2012), lo cual puede ser observado en el Anexo 1. Se utilizó una multiplicidad de infección (MOI=relación entre cantidad de fagos por cada bacteria) de 10⁴.

3. Matriz alimentaria

Para realizar este estudio se utilizaron trozos de carne de salmón fresco congelado y salmón ahumado en frío laminado, cuyas composiciones nutricionales se detallan en el Anexo 2. Ambas matrices fueron obtenidas en un supermercado de la Región Metropolitana, las que se encontraban en envases sellados, con fecha de elaboración cercana a la de adquisición (máximo siete días) y fueron transportadas en cajas isotérmicas con refrigerantes, en un tiempo inferior a cuatro horas hasta el Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile. Las marcas comerciales de las matrices fueron confidenciales.

Se trabajó sólo con muestras negativas a *Salmonella* sp., la cual se determinó mediante cultivo tradicional y PCR (Sánchez, 2007), por el laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile. Las

muestras se mantuvieron congeladas hasta el momento de su análisis, por no más de 96 horas.

4. Diseño experimental

4.1. Protocolo de contaminación

Se siguió el protocolo previamente establecido por Donoso (2012), aumentando la dosis de contaminación diez veces en temperatura ambiente y cien veces para temperatura de refrigeración (Tabla 1).

Tabla 1. Dosis de contaminación con *Salmonella* Enteritidis y título de la mezcla de fagos, según matriz y temperatura de incubación.

Matriz*	T° Ambiente (18° C)		T° Refrigeración (5° C)	
	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL
SFC	10 ³	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁹
SAh	10 ³	10 ⁷	10 ⁴	10 ⁸

***SFC:** Salmón Fresco Congelado; **SAh:** Salmón Ahumado.

4.2. Preparación del inóculo

El inóculo se elaboró a partir de la cepa de SE *nal^r* y *rif^r* preparada en caldo Luria Bertani (LB, Difco®), incubado a 37° C por 18 horas en agitación orbital (Big Bill digital, Thermolyne®). Este cultivo se diluyó en tubos redondos de 16mm y se ajustó su turbidez a un valor de absorbancia entre 0,6 – 0,8 (OD_{625nm}, Spectroquant ®Pharo 300-Merck®), rango en el cual la suspensión bacteriana alcanza una concentración de 10⁸ UFC/mL. A partir de esta preparación, se realizaron diluciones al décimo en Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco®) estéril, hasta obtener las concentraciones deseadas.

Las concentraciones fueron corroboradas mediante recuento bacteriano, sembrando en duplicado 100µL de las diluciones en placas de Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Difco®), adicionadas con Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL) e incubadas a 37° C durante 24 a 48 horas.

4.3. Contaminación y aplicación de la mezcla de bacteriófagos a las muestras

Las muestras de carne de salmón fresco congelado y salmón ahumado fueron lavadas con agua destilada estéril, molidas (Moulinex®) y posteriormente contaminadas con SE *nal^r rif* según dosis de contaminación (Tabla 1). Se utilizaron grupos de 50 muestras de 25 gramos cada una, las que fueron individualizadas en bolsas Whirl-Park®.

La contaminación fue llevada a cabo en un gabinete de Bioseguridad Healforce® (HF safe 1200), con un volumen de SE correspondiente al 10% de la muestra (2,5 mL). Luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos horas para la adaptación bacteriana al medio y la adhesión de ésta a la matriz alimentaria.

A cada muestra contaminada, se le agregó una alícuota de la mezcla de fagos suspendidos en buffer SM modificado (50 mL Tris-HCl 1 M, pH 7,5 - 2g MgSO₄ H₂O), en un volumen aproximado del 10% del peso de la muestras. Estas se mantuvieron en cajas herméticamente cerradas durante 10 días, la mitad (n=25) a temperatura ambiente controlada (estufa a 18° C) y la otra mitad (n=25) a temperatura de refrigeración (5° C). Cada refrigerador contó con un termómetro digital, registrándose la temperatura dos veces al día durante toda la experiencia; a partir de estos datos se obtuvo un promedio y desviación estándar, para los 10 días de almacenamiento. Finalizado el periodo de incubación, las muestras fueron analizadas para determinar el recuento de SE (bacteriología cuantitativa).

Para cada grupo experimental se estableció un grupo control de 25 muestras contaminadas con SE, las que se mantuvieron y procesaron separadas de los grupos que recibieron fagos y se sometieron a bacteriología cuantitativa al final del periodo. Se contó además con un grupo blanco mantenido a temperatura ambiente, el cual no fue contaminado con SE ni recibió la aplicación de fagos. La mitad (n=5) se mantuvo en el laboratorio del grupo experimental y la otra mitad (n=5) en el laboratorio del grupo control. Al final del periodo a las muestras se les realizó bacteriología cualitativa para descartar contaminación intralaboratorio con SE.

4.4. Bacteriología cuantitativa (Recuento de SE)

Finalizado los 10 días y utilizando el gabinete de bioseguridad, a cada bolsa se le adicionó 225 mL de APT (Difco®) y se mezcló en un equipo homogeneizador y triturador (Stomacher® 400 circulator), durante aproximadamente 1 minuto. A partir de estas bolsas, se realizaron diluciones al décimo con APT (Difco®), sembrando 100 µL, en duplicado, en placas de agar XLD (Difco®), adicionadas con Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL). Las placas fueron sembradas en superficie mediante asa de Digrafsky e incubadas a 37° C durante 24 a 48 horas, realizando lectura sólo en aquellas que presentaron \leq a 150 colonias. Las muestras negativas, donde no se observó desarrollo bacteriano, fueron sometidas a bacteriología cualitativa.

4.5. Bacteriología cualitativa (Detección de SE)

Se realizó mediante la norma ISO 6579:2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.” (ISO 6579, 2002), modificada de acuerdo a protocolos internos del laboratorio. Dichas adaptaciones fueron la utilización de un solo medio de enriquecimiento (Caldo Rappaport-Vassiliadis, RV Difco®) y un medio selectivo (XLD, Difco®), al cual se le adicionó Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL), para mejorar la selectividad.

A partir de las bolsas incubadas a 37° C \pm 1° C por 18 horas \pm 2 horas, se transfirieron 100 µL a un tubo con 10 mL de caldo RV (Difco®) y se incubaron a 41° C \pm 1° C en baño termostático durante 24 horas \pm 3 horas. A partir de este caldo, se sembraron 30 µL en agar XLD (Difco®), adicionado con Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL). Las placas fueron incubadas a 37° C \pm 1° C por 24 horas \pm 3 horas. Las colonias sospechosas se sometieron a aglutinación mediante el antisero comercial *Salmonella* O Antiserum Poly A – I & Vi (Difco®).

5. Análisis estadístico

Los resultados del recuento del grupo experimental con su respectivo control, fueron expresados en unidades logarítmicas y analizados mediante un análisis de varianza del programa InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008). A las muestras negativas a bacteriología cuantitativa, pero positivas en bacteriología cualitativa, se les asignó un valor de 10^1 UFC/mL. Mientras que aquellas muestras cuyos recuentos fueron incontables (> 150 colonias), se les asignó un valor de 10^6 UFC/mL.

6. Normas de bioseguridad

El trabajo cuenta con un certificado de bioseguridad local entregado por la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile, que permite su realización. Se trabajó bajo un Nivel de Bioseguridad II (CONICYT, 2008), utilizando delantal, guantes, mangas y mascarillas desechables. Además de un gabinete de bioseguridad 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

La mezcla de bacteriófagos nativos fueron evaluados en dos matrices cárneas de origen hidrobiológico, a temperatura de ambiente ($18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y a temperatura de refrigeración ($5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

a) Matriz Salmón Fresco Congelado

El desarrollo de la cepa bacteriana en ambas temperaturas se observa en los grupos controles. Así, en las muestras de salmón fresco congelado incubadas a temperatura ambiente la concentración bacteriana aumentó en 4 unidades logarítmicas de SE/g entre el día 0 y el 10 (Tabla 2). Por otro lado, en las muestras incubadas a temperatura de refrigeración la concentración bacteriana disminuyó en menos de 1 unidad logarítmica de SE/g entre el día 0 y 10 de estudio (Tabla 3).

Los resultados de la aplicación de fagos en las muestras incubadas a temperatura ambiente se muestran en la Tabla 2, donde se alcanzaron reducciones significativas ($p \leq 0,0001$), de 3,19 unidades logarítmicas de SE/g al comparar el grupo experimental con su control. Por otro lado, las reducciones bacterianas de las muestras que se encontraban a temperatura de refrigeración se muestran en la Tabla 3, donde se observan reducciones significativas de 2,82 unidades logarítmicas de SE/g ($p \leq 0,0001$).

Tabla 2. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne de Salmón Fresco Congelado, mantenida a temperatura ambiente¹ durante 10 días.

Grupo ²	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ³	Recuentos mín. - máx. de SE (\log_{10} UFC/g)
SCA	1,9	$5,90^a \pm 0,49$	4,64 – 6,66
SFA	1,9	$2,71^b \pm 0,98$	0,64 – 4,48

1: Temperatura ambiente: $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

2: SCA: Grupo control de 25 muestras de carne molida de salmón fresco congelado contaminada con SE, mantenida a t° ambiente.

SFA: Grupo experimental de 25 muestras de carne molida de salmón fresco congelado contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° ambiente.

3:D.E.: Desviación Estándar.

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,0001$).

Tabla 3. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne de Salmón Fresco Congelado, mantenida a temperatura de refrigeración¹ durante 10 días.

Grupo ²	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ³	Recuentos mín. - máx. de SE (\log_{10} UFC/g)
SCR	3,94	3,12 ^a \pm 0,45	1,64 – 3,96
SFR	3,94	0,30 ^b \pm 0,43	-0,36* – 1,02

1: Temperatura de Refrigeración 4° C \pm 1° C.

2: SCR: Grupo control de 25 muestras de carne molida de salmón fresco congelado contaminada con SE, mantenida a t° de refrigeración.

SFR: Grupo experimental de 25 muestras de carne molida de salmón fresco congelado contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° de refrigeración.

3: D.E.: Desviación Estándar.

* En 4 de las 25 muestras se asumió el valor de 10¹ UFC/mL, dado que se encontraron bajo el límite de detección.

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,0001$).

b) Matriz Salmón Ahumado

El desarrollo de SE fue posible observarlo en los grupos controles almacenados a ambas temperaturas. Así en las muestras almacenadas a 18° C la concentración bacteriana aumentó en 4,7 unidades logarítmicas de SE/g entre el día 0 y 10 (Tabla 4). Por otro lado en las muestras incubadas a temperatura de refrigeración la concentración bacteriana disminuyó en 1 unidad logarítmica de SE/g entre el día 0 y 10 de estudio (Tabla 5). Comportamiento similar a lo ocurrido en la otra matriz en estudio.

Las reducciones bacterianas de las muestras mantenidas a temperatura ambiente pueden observarse en la Tabla 4, donde fue posible observar reducciones significativas de 1,96 unidades logarítmicas de SE/g ($p \leq 0,0001$). Las reducciones obtenidas en las muestras incubadas a temperatura de refrigeración fueron significativas ($p \leq 0,0001$), correspondiendo a 1,16 unidades logarítmicas de SE/g (Tabla 5).

Tabla 4. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne de Salmón Ahumado, mantenido a temperatura ambiente¹ durante 10 días.

Grupo ²	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ³	Recuentos mín. - máx. de SE (\log_{10} UFC/g)
ACA	2,2	6,96 ^a \pm 0,42	5,64 – 7,45
AFA	2,2	5,0 ^b \pm 0,48	3,64 – 5,54

1 Temperatura Ambiente 18° C \pm 1° C.

2 ACA: Grupo control de 25 muestras de carne molida de salmón ahumado contaminada con SE, mantenida a t° de ambiente.

AFA: Grupo experimental de 25 muestras de carne molida de salmón ahumado contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° ambiente.

3 D.E.: Desviación Estándar.

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,0001$).

Tabla 5. Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne de Salmón Ahumado, mantenido a temperatura de refrigeración¹ durante 10 días.

Grupo ²	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ³	Recuentos mín. - máx. de SE (\log_{10} UFC/g)
ACR	3,2	2,28 ^a \pm 0,24	1,99 – 2,99
AFR	3,2	1,12 ^b \pm 0,32	0,64 – 1,72

1 Temperatura de Refrigeración 4° C \pm 1° C.

2 ACR: Grupo control de 25 muestras de carne molida de salmón ahumado contaminada con SE, mantenida a t° de refrigeración.

AFR: Grupo experimental de 25 muestras de carne molida de salmón ahumado contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° de refrigeración.

3 D.E.: Desviación Estándar.

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,0001$).

En cuanto a las muestras del grupo blanco, estas resultaron negativas a la bacteriología cualitativa, lo cual descartó una posible contaminación intralaboratorio con la cepa bacteriana utilizada en este estudio.

Además, es importante destacar que en las muestras de los grupos controles no se detectaron bacteriófagos nativos, información entregada por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, quienes desarrollaron esta parte del estudio.

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que la mezcla de cinco fagos nativos redujo significativamente los recuentos de *Salmonella* Enteritidis (SE), en carne de salmón ahumado y salmón fresco congelado, almacenados durante 10 días a temperatura ambiente y de refrigeración. Es importante destacar que las mayores reducciones se lograron en el salmón fresco congelado (3,19 unidades logarítmicas de SE/g a 18° C y 2,82 unidades logarítmicas de SE/g a 5° C), al compararlo con el salmón ahumado (1,96 unidades logarítmicas de SE/g a 18° C y 1,16 unidades logarítmicas de SE/g a 5° C), independiente de la temperatura de incubación. Esta diferencia podría explicarse por el diferente contenido de agua de ambas matrices, ya que pese a ser adquiridas en forma congelada, el salmón fresco poseía una mayor cantidad de hielo debido a su comercialización en trozos y no laminado como el salmón ahumado. Esta característica pudo haber favorecido la movilización del fago logrando mayores reducciones en el salmón fresco congelado. Por el contrario, producto de la menor actividad de agua (Anexo 2) del salmón ahumado que le confiere una textura seca, sumada al periodo de incubación (10 días), provocó que esta matriz alimentaria adquiriera una textura más seca lo que pudo restringir la difusión de los fagos. Esta situación fue observada por Bigwood *et al.* (2008), quienes trabajaron aplicando una mezcla de fagos en muestras de carne de vacuno cruda y cocida contaminadas con *Salmonella* Typhimurium e incubadas durante ocho días a 5° C. Al final del periodo lograron una mayor inactivación del patógeno en carne cruda que en las muestras cocinadas, dado que esta última poseía una consistencia seca lo que impediría la movilización del fago.

El proceso de ahumado y secado de los alimentos son considerados los métodos más antiguos de preservación, los cuales limitan el subsecuente crecimiento de patógenos en su distribución y almacenaje (Eklund *et al.*, 2004). Por lo tanto, es posible pensar que este proceso pudiera haber afectado el crecimiento de la cepa desafío en el salmón ahumado, explicando parcialmente los bajos resultados obtenidos en él. Sin embargo, al analizar los recuentos de la bacteria en el grupo control se observa que su tasa de crecimiento es similar a la del salmón fresco congelado (4,0 unidades logarítmicas de SE/g en salmón fresco congelado; 4,7 unidades logarítmicas de SE/g en salmón ahumado), por tanto pareciera ser

que el principal factor de estos resultados fue la resequedad del alimento y no el proceso de ahumado por sí solo.

Los diferentes resultados observados según el tipo de matriz en este estudio coinciden con los de otros autores, quienes indican que la capacidad de reducción de los fagos depende fuertemente del tipo de matriz alimentaria. Esto, está asociado a factores intrínsecos tales como fuerza iónica, pH y componentes propios del alimento que pueden interferir en el proceso de la unión de los fagos a los receptores de la superficie bacteriana (Bigwood *et al.*, 2008; Guenther *et al.*, 2009).

Otro punto importante de destacar es que en ambas matrices alimentarias las mayores reducciones se lograron a temperatura ambiente, lo que puede ser atribuido a que los fagos para poder sintetizar sus componentes y lograr la lisis bacteriana necesitan de la maquinaria enzimática de la célula hospedera, la cual a 18° C se encuentra en crecimiento activo. Este tipo de lisis se conoce como *Lysis from within* o lisis desde adentro. Por el contrario, en el caso de las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración podría acontecer otro tipo de lisis, denominada *Lysis from without* o lisis desde afuera. En este caso la muerte celular ocurre cuando un gran número de fagos se unen a receptores de superficie bacteriana, lo que resulta en daños a la pared celular, estrés fisiológico y eventual lisis celular. Esta vía es la más probable de biocontrol de patógenos bacterianos entéricos en productos almacenados bajo refrigeración, donde la temperatura impide la finalización del ciclo lítico completo, sumado a la baja tasa de crecimiento bacteriano de SE a esta temperatura (Abedon, 2011; Ferguson *et al.*, 2013). Sin embargo, para evitar parcialmente este tipo de lisis en el presente estudio se aumentó la concentración de SE en todas las muestras incubadas a temperatura de refrigeración (Tabla 1).

Si bien las reducciones logradas en este estudio utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10^4 en ambas matrices y temperaturas son satisfactorias y similares a otras publicaciones, dichos valores podrían mejorar aumentando la MOI. Algunos autores destacan que lograron una mayor inactivación cuando aplicaron los fagos en concentraciones superiores. Así, Guenther *et al.* (2009), estudiaron un fago a diferentes concentraciones frente a *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo,

almacenados durante seis días a 6° C. En él observaron que en vienasas utilizando una MOI de 10^3 y 10^4 obtenían reducciones de 2,2 y 2,7 unidades logarítmicas por gramo de alimento, respectivamente. Sin embargo, utilizando una MOI de 10^5 era suficiente para controlar completamente al patógeno. De igual manera Hudson *et al.* (2013), evaluaron la actividad de un fago a diferentes concentraciones manteniendo estable la de la bacteria hospedera, en este caso *Escherichia coli* O157:H7, en muestras de carne cruda de vacuno almacenadas a 37° C durante 1 hora. En ese estudio evidenciaron que utilizando una MOI de 10^4 existía una marcada inactivación de la bacteria > 2,6 unidades logarítmicas por pieza de alimento, mientras que a una MOI de 10^1 no había inactivación de la bacteria hospedera. Por lo tanto y tomando en cuenta estos datos, es importante enfatizar que la concentración de fagos debe ser lo suficientemente alta para asegurar el contacto de los fagos con su bacteria hospedera, teniendo en cuenta las limitaciones físicas que presenta el alimento, para su correcta difusión.

Los resultados positivos en relación a las reducciones bacterianas en carne de salmón son similares a los observados en carnes de otras especies animales. Así, Jorquera *et al.* (2012b), estudiaron la aplicación de los mismos fagos nativos utilizados en este estudio frente a SE en muestras de carne fresca de bovino almacenadas durante 10 días a 4° C, contaminando con una concentración de 10^5 y utilizando una MOI de 10^4 . Al final del periodo obtuvieron reducciones estadísticamente significativas del orden del 1,37 unidades logarítmica de SE/g. Por otro lado, Kang *et al.* (2013), estudiaron la aplicación de un fago frente a SE en muestras de piel de pollo, almacenadas a 8° C durante siete días y contaminadas con una concentración de 10^3 UFC/cm² y utilizando una MOI de 10^4 . Al final de la experiencia obtuvieron reducciones significativas del orden de 2,43 unidades logarítmicas por cm². Por último, Spricigo *et al.* (2013), estudiaron la aplicación de una mezcla de fagos contra SE en piel de cerdo, la cual fue contaminada con una concentración inicial de 10^6 UFC/mL y utilizando una MOI de 10^4 , las muestras fueron almacenadas durante seis horas a 33° C. Al final de la experiencia existió una reducción estadísticamente significativa del orden 2 unidades logarítmicas por cm².

Finalmente, los resultados obtenidos permiten concluir la efectividad de la mezcla de los cinco fagos nativos en la reducción de SE en carne de salmón fresco congelado y ahumado,

incubadas a temperatura ambiente y de refrigeración durante 10 días. Por lo tanto, esta mezcla de bacteriófagos podría ser un buen candidato como una herramienta de biocontrol alternativa frente SE en este tipo de alimentos.

REFERENCIAS

- **ABEDON, S.** 2011. Lysis from without. *Bacteriophage* 1(1):46-49.
- **ALERTE, V.; CORTÉS, S.; DÍAZ, J.; VOLLAIRE, J.; ESPINOZA, M.; SOLARI, V.; CERDA, J.; TORRES, M.** 2012. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *Revista Chilena Infectología* 29(1):26-31.
- **AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G.** 2012. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Research International* 45(2):780-788.
- **BROVKO, L.; ANANY, H.; GRIFFITHS, M.** 2012. Bacteriophages for Detection and Control of Bacterial Pathogens in Food and Food-Processing Environment. *Advances in Food and Nutrition Research* 67:241-288.
- **BIGWOOD, T.; HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; HEINEMANN, J.** 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology* 255(2):400-406.
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2ª ed. Santiago, Chile. 139 p.
- **CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2012^a. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 62(15):277-300.
- **CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 2012^b. Multistate Outbreak of *Salmonella* Bareilly and *Salmonella* Nchanga Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (Final Update). [en línea]. <<http://www.cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/index.html>>. [consulta: 29-03-2013].
- **CROWE, K.; SKONBERG, D.; BUSHWAY A.; BAXTER, S.** 2012. Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. *Food Control* 25(2):464-468.
- **DI RIENZO, A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, G.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.** 2008. InfoStat *Software* estadístico, versión 2008. Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- **DONOSO, C.** 2012. Implementación de un protocolo de contaminación con *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis en carne de pescado fresco congelada y ahumada. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 23p.

- **EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11(4):1-250.
- **EKLUND, M.; PETERSON, M.; POYSKY, F.; PARANJPYE, R.; PELROY, G.** 2004. Control of bacterial pathogens during Processing of Cold-Smoked and Dried Salmon Strips. *Journal of Food Protection.* 67(2):347-351.
- **FERGUSON, S.; ROBERTS, CH.; HANDY, E.; SHARMA, M.** 2013. Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 on fresh cut lettuce introduced through cross-contamination. *Bacteriophage* 3(1):1-7.
- **FRIESEMA, I.; DE JONG, A.; FITZ, I.; HECK, M.; VAN DEN KERKHOF, J.; NOTERMANS, D.; VAN PELT, W.; HOFHUIS, A.** 2012. Outbreak of *Salmonella* Thompson in the Netherlands since July 2012. *Euro Surveill* 17(43):1-4.
- **GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology* 47(6):479-485.
- **GARCÍA-HUIDOBRO, D.; CARREÑO, M.; ALCAYAGA, S.; ULLOA, J.** 2012. Descripción clínica y epidemiológica de un grave brote de salmonelosis transmitida por alimentos. *Revista Chilena de Infectología* 29(2):132-137.
- **GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.** 2009. Virulent Bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology* 75(1):93-100.
- **GUENTHER, S.; HERZIG, O.; FIESELER, L.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.** 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology* 154(1-2):66-72.
- **HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CORNELIUS, A.; WILSON, T.; ON, S.; PREMARATNE, A.; KING, N.** 2013. Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Food Microbiology* 36(1):14-21.
- **ISO 6579. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2002. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. 15 Julio 2002. 34p.
- **JORQUERA, D.; ESPINA K., CRUZ, F.; TURRA, G.; HUBER, K., ROBESON, J.; BORIE, C.** 2012^a. Actividad lítica de una mezcla de bacteriófagos en carne fresca de pollo contaminada con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis. **In:** 17° Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Valdivia, Chile. 18 al 20 Noviembre. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias.

- **JORQUERA, D.; OVIEDO, P.; ESPINA, K.; PRIETO, G.; TURRA, G.; ROBESON, J.; BORIE, C.** 2012^b. Reducción de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de bovino mediante la aplicación de una mezcla de bacteriófagos. **In:** XIV Congreso Internacional Inocuidad Alimentaria. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 8 al 10 Noviembre. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, División de Ciencias Básicas / Departamento de Farmacología.
- **KANG, H.; KIM, J.; JUNG, T.; WOO, G.** 2013. Wks13, a New biocontrol agent for *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in foods: characterization, application, sequence analysis, and oral acute toxicity study. *Applied and Environmental Microbiology* 79(6):1956-1968.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2013. Enfermedades transmitidas por alimentos Informe Situación SE 1 a la SE 46 del 2013. [en línea]. <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/Informe_entericas_SE462013.pdf>. [consulta: 25-11-2013].
- **MONK, A.; REES, C.; BARROW, P.; HAGENS, S.; HARPER, D.** 2010. Bacteriophage applications: where are we now. *Letters in Applied Microbiology* 51(4):363-369.
- **MONTIEL, R.; BRAVO, D.; DE ALBA, M.; GAYA, P.; MEDINA, M.** 2012. Combined effect of high pressure treatments and the lactoperoxidase system on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16:26-32.
- **MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFAÛER, M.** 2006. Genética Bacteriana. **In:** *Microbiología Médica*. 5^a ed. Elsevier. Madrid, España. pp. 35-46.
- **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. 29^a sesión, 1 y 2 de Diciembre. 96p.
- **OZER, N.; DEMIRCI, A.** 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon filets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science & Technology* 41(4):354-360.
- **ROBESON, J.; TURRA, G.; HUBER, K.; BORIE, C.** 2012. Persistencia de bacteriófagos de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en matrices alimentarias. **In:** XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. 23-26 Noviembre 2012. Sociedad de Microbiología de Chile.

- **SÁNCHEZ, P.** 2007. Uso de reacción de polimerasa en cadena en el diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en tejidos y contenido intestinal de pollos experimentalmente contaminados. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.
- **SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA.** 2013. Programa de aseguramiento de calidad. Manual de procedimientos Sección 1. Procedimientos administrativos para participar en el Programa de Aseguramiento de Calidad. pp. 52
- **SONI, K.; NANNAPANENI, R.** 2010. Bacteriophages significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *Journal of Food Protection* 73(1):32-38.
- **SPRICIGO, D.; BARDINA, C.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M.** 2013. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* and the food industry. *International Journal of Food Microbiology* 165(2):169-174.

ANEXOS

ANEXO 1

1. Rango de hospederos de los cinco fagos que componen la mezcla aislados con actividad lítica contra *Salmonella* Enteritidis.

Hospederos	fSE7	fSE8	fSE12	f1C	f4S
<i>S. Bredeney</i>	+	+	+	(-)	(-)
<i>S. Seftenberg</i>	+	+	+	-	-
<i>S. Hadar</i>	(-)	(-)	(-)	-	-
<i>S. Worthington</i>	+	+	+	(-)	(-)
<i>S. Derby</i>	+	+	+	(-)	(-)
<i>S. Dublin</i>	+	+	+	-	-
<i>S. Cubana</i>	(-)	(-)	(-)	-	-
<i>S. Anatum</i>	(-)	(-)	+	(-)	-
<i>S. Infantis</i>	(-)	(-)	+	+	+
<i>S. Heidelberg</i>	+	+	+	+	+
<i>S. Enteritidis</i>	+	+	+	+	+
<i>E. coli C</i>	+	+	+	-	-

+: actividad lítica.; - : ausencia de actividad lítica.; (-): pseudolisis.

2. Estabilidad en diferentes temperaturas de los cinco fagos que componen la mezcla.

	-20° C	4° C	25° C	37° C
fSE7 (UFP/mL)	1,5x10 ⁸	1,3x10 ⁸	9,5x10 ⁷	1,2x10 ⁷
fSE8 (UFP/mL)	2,6x10 ⁸	2,7x10 ⁸	1x10 ⁸	1,3x10 ⁷
fSE12 (UFP/mL)	2,3x10 ⁸	5,3x10 ⁸	1,6x10 ⁸	2,6x10 ⁷
f1C (UFP/mL)	1,2x10 ⁸	8,1x10 ⁷	6x10 ⁷	1x10 ⁷
f4S (UFP/mL)	1x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,6x10 ⁸	1,6x10 ⁸

3. Estabilidad en diferentes pH de los cinco fagos que componen la mezcla.

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
fSE7 (UFP/mL)	0	0	2,1x10 ³	1,8x10 ⁶	2,2x10 ⁸	1,8x10 ⁸
fSE8 (UFP/mL)	0	0	2,4x10 ⁴	3,4x10 ⁶	2,7x10 ⁸	2,0x10 ⁸
fSE12 (UFP/mL)	0	0	5,4x10 ⁴	7,9x10 ⁶	6,3x10 ⁸	5,5x10 ⁸
f1C (UFP/mL)	2,4x10 ⁸	3,4x10 ⁸	2,9x10 ⁸	2x10 ⁸	2,5x10 ⁸	3x10 ⁸
f4S (UFP/mL)	2,3x10 ⁸	2,8x10 ⁸	2x10 ⁸	2,2x10 ⁸	3x10 ⁸	3,4x10 ⁸

ANEXO 2

1. Composición nutricional según etiquetado oficial del producto.

	Salmón trozo con piel y sin espinas 100 g.	Salmón Ahumado en frío laminado 100g.
Energía (kcal)	129,00	143,00
Proteínas (g)	21,00	21,79
Hidratos de Carbono disponible	0,00	0,00
Grasa Total (g)	5,10	6,23
Grasa Saturada (g)	1,10	1,37
Acido Grasos trans (g)	0,10	0,00
Grasa Monoinsaturada (g)	1,70	1,81
Grasa Poliinsaturada (g)	2,30	3,05
Colesterol (mg)	37,00	44,00
Sodio (mg)	43,00	1.426,00
Omega 3 (mg)	1.100,00	0,27
pH	6,10-6,30	6,13
a_w*	0,99	0,90

*a_w: Actividad de agua.