



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



USO DE BACTERIÓFAGOS PARA LA REDUCCIÓN *in vitro* DE
Salmonella Enteritidis EN ALBÚMINA Y YEMA DE HUEVOS SPF

JULIANA PATRICIA ARMIJO DE SOUZA

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

PROFESORA GUÍA: DRA. CONSUELO BORIE POLANCO. M.V., M.Sc.

SANTIAGO, CHILE
2010



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



USO DE BACTERIÓFAGOS PARA LA REDUCCIÓN *in vitro* DE
Salmonella Enteritidis EN ALBÚMINA Y YEMA DE HUEVOS SPF

JULIANA PATRICIA ARMIJO DE SOUZA

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO: DR. HÉCTOR HIDALGO OLATE
PROFESOR CONSEJERO: DR. PATRICIO RETAMAL MERINO

SANTIAGO, CHILE
2010

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	3
FINANCIAMIENTO	5
INTRODUCCIÓN	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. HUEVOS	23
2. CEPA DESAFÍO.....	23
3. DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA INFECTANTE (DMI) EN YEMAS Y ALBÚMINAS	23
4. BACTERIÓFAGOS	24
5. MODELO EXPERIMENTAL	24
6. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO.....	26
6.1 <i>Bacteriología Cualitativa</i>	26
6.2 <i>Bacteriología Cuantitativa</i>	26
7. NORMAS DE BIOSEGURIDAD	27
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	28
RESULTADOS	29
1. DOSIS MÍNIMA INFECTANTE (DMI).	29
2. EFECTIVIDAD DE DISTINTAS DOSIS DE BACTERIÓFAGOS Y DOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN SOBRE LA CONTAMINACIÓN CON S.E. EN YEMAS Y ALBÚMINAS.	29
3. CUANTIFICACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE S.E. EN YEMAS Y ALBÚMINAS CON DISTINTAS DOSIS DE BACTERIÓFAGOS Y DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN.....	30
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXO	62

RESUMEN

Salmonella spp. es uno de los principales patógenos involucrados en enfermedades transmitidas por los alimentos, siendo el serotipo Enteritidis el que más se asocia a productos derivados de la industria avícola, principalmente a los huevos. Es por esto que se han buscado diversas medidas de control en gallinas comerciales de postura, no logrando éstas ser completamente eficientes. Los bacteriófagos podrían ser una potencial alternativa para el control de *Salmonella* Enteritidis (S.E.) en huevos ya que demostraron ser inocuos para las células eucariotas y logran reducir una variedad de patógenos en diversos alimentos. El objetivo del presente trabajo fue determinar *in vitro* la efectividad de una mezcla de bacteriófagos sobre *Salmonella* Enteritidis en yemas y albúminas de huevos.

Se trabajó con tres grupos de huevos SPF: grupo control de infección que sólo recibió S.E. (10^1 UFC/0,1 mL), grupo control de fagos que sólo recibió fagos (10^6 UFP/0,1 mL) y tres grupos que recibieron S.E. (10^1 UFC/0,1 mL) y fagos en distintas concentraciones (MOI de 10^3 , 10^4 y 10^5 /0,1 mL). Albúminas y yemas por separado fueron inoculadas con la cepa desafío S.E. *nal^r rif^r* y luego de dos horas a temperatura ambiente, se les administró la mezcla de tres fagos líticos. Las muestras fueron mantenidas a 37 °C por 24 horas (protocolo de 24 horas) y por 48 horas (protocolo de 48 horas), antes de ser analizadas por bacteriología cualitativa y cuantitativa (recuento bacteriano).

Los fagos no lograron disminuir ($p > 0,05$) la incidencia de S.E. en las muestras de yemas, presentándose un 100% de positividad, tanto para el protocolo de 24 horas como para el de 48 horas, independiente de la MOI utilizada. En las muestras de albúminas, los fagos no lograron disminuir ($p > 0,05$) la incidencia de S.E. en el protocolo de 24 horas, presentándose un 100% de positividad. En el protocolo de 48 horas, los fagos no disminuyeron ($p > 0,05$) la incidencia de S.E. en albúminas tratadas con una MOI de 10^3 (96%) y 10^4 (100%), pero sí lo hicieron ($p \leq 0,05$) en albúminas tratadas con una MOI de 10^5 (68% de positividad).

Los resultados de la bacteriología cuantitativa en los grupos experimentales demostraron que los fagos disminuyen ($p \leq 0,05$) los recuentos de S.E. en yemas en $2,53 \log_{10}$ (MOI 10^5), en $2,26 \log_{10}$ (MOI 10^4) y en $2,32 \log_{10}$ (MOI 10^3) en relación al grupo control de infección, para el protocolo de 24 horas. Para el protocolo de 48 horas, los recuentos disminuyeron ($p \leq 0,05$) en $0,48 \log_{10}$ (MOI 10^3), en $0,35 \log_{10}$ (MOI 10^4) y en $0,25 \log_{10}$ (MOI 10^5), en relación al grupo control de infección. En las muestras de albúminas tratadas con fagos, los recuentos de S.E. aumentaron ($p \leq 0,05$) en $2,4 \log_{10}$ (MOI 10^3) y en $1,55 \log_{10}$ (MOI 10^4) en relación al grupo control de infección, mientras que en el grupo tratado con una MOI 10^5 ($4,49 \log_{10}$), no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en relación al grupo control ($3,07 \log_{10}$), para el protocolo de 24 horas. Para el protocolo de 48 horas, los recuentos de S.E. disminuyeron ($p \leq 0,05$) en $1,81 \log_{10}$ (MOI 10^5) y en $1,35 \log_{10}$ (MOI 10^3) en relación al grupo control de infección, mientras que en el grupo tratado con una MOI 10^4 ($3,00 \log_{10}$), no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en relación al grupo control de infección ($3,55 \log_{10}$).

Con los resultados obtenidos se concluye que el uso de fagos líticos podría ser una herramienta eficaz en la reducción de *Salmonella* Enteritidis en huevos, sin embargo mayores estudios son necesarios para optimizar el modelo experimental.

SUMMARY

Salmonella spp. is one of the main pathogens involved in foodborne diseases, being the Enteritidis serotype the most associated to products derived from the poultry industry, especially eggs. This is why it has been searched various control measures in commercial laying hens, failing to be fully efficient. Bacteriophages could be a potential alternative for the control of *Salmonella* Enteritidis (S.E) in eggs which have proved to be harmless to eukaryotic cells and have controled a variety of pathogens in several foods. The objective of this work was to determine *in vitro* the mixture of bacteriophages effectiveness against *Salmonella* Enteritidis, in yolk and albumen from eggs.

The experimental procedure considered three groups of SPF eggs: an infection control group that received only S.E. (10^1 CFU / 0.1 mL), a phage control group that received only phage (10^6 PFU / 0.1 mL) and three groups that received S.E. (10^1 CFU / 0.1 mL) and phages at different concentrations (MOI of 10^3 , 10^4 , and 10^5 / 0.1 mL). Separately, albumens and yolks were inoculated with the challenge strain S.E. *nal^r rif^r* and after two hours at room temperature, the three lytic phages mixture was administered. The samples were incubated at 37 °C for 24 hours (24 hours protocol) and for 48 hours (48 hours protocol), before being analyzed by qualitative and quantitative bacteriology (bacterial counts).

The phages failed to decrease ($p > 0.05$) the incidence of S.E. in yolk samples, showing 100% positivity, for both the 24 hours protocol as to the 48 hours protocol and it was independent of the MOI utilized. In albumen samples, phages did not decrease ($p > 0.05$) the incidence of S.E. in the 24 hours protocol, showing 100% positivity. In 48 hours protocol, the phage did not decrease ($p > 0.05$) the incidence of S.E. in albumen treated with a MOI of 10^3 (96%) and 10^4 (100%), but decreased ($p \leq 0.05$) in albumen treated with a MOI of 10^5 (68% positivity).

The quantitative bacteriology results in the experimental groups showed that the phages reduced ($p \leq 0.05$) counts S.E. in yolk at 2.53 \log_{10} (MOI 10^5), at 2.26 \log_{10} (MOI 10^4) and 2.32 \log_{10} (MOI 10^3) in relation to infection control group to the 24 hours protocol. For 48 hours protocol, the counts decreased ($p \leq 0.05$) in 0.48 \log_{10} (MOI 10^3), in 0.35 \log_{10} (MOI 10^4) and 0.25 \log_{10} (MOI 10^5), in relation to infection control group. Albumen samples treated with phage, the S.E. counts increased ($p \leq 0.05$) in 2.4 \log_{10} (MOI 10^3) and 1.55 \log_{10} (MOI 10^4) in relation to infection control group, while in the group treated with a MOI 10^5 (4.49 \log_{10}), there were no significant differences ($p > 0.05$) compared to the control group (3.07 \log_{10}), for the 24 hours protocol. For the 48 hours protocol, the S.E. counts decreased ($p \leq 0.05$) in 1.81 \log_{10} (MOI 10^5) and 1.35 \log_{10} (MOI 10^3) in relation to infection control group while in the group treated with MOI 10^4 (3.00 \log_{10}), there were no significant differences ($p > 0.05$) in relation to infection control group (3.55 \log_{10}).

With the results we conclude that the use of lytic phages could be an effective tool to reduce *Salmonella* Enteritidis in eggs, however, further studies are needed to optimize the experimental model.

FINANCIAMIENTO

Este estudio se efectuó como parte del proyecto Fondecyt N° 1080291 “Control de *Salmonella* Enteritidis en avicultura: bacteriófagos en aves de postura y alimentos derivados de la industria avícola”. Se realizó en el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

INTRODUCCIÓN

Desde hace algunas décadas, con la tecnificación e industrialización de los planteles avícolas, *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) ha pasado a ser un problema emergente de salud pública a nivel mundial. En Chile, en la década del '90, las infecciones por *Salmonella* Enteritidis aparecieron en forma dramática y hoy en día es considerada un patógeno endémico que desplazó a *Salmonella* Typhi, enterobacteria no asociada a un reservorio animal.

La epidemiología de la enfermedad indica que se trata de una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA) asociada fuertemente al sector avícola, donde los productos derivados de la carne y, principalmente, el consumo de huevos insuficientemente cocidos, han tenido una importante participación en los brotes humanos. Es por esto que el sector avícola ha intentado diversas medidas de control tales como la vacunación con bacterias vivas o muertas, medidas de bioseguridad como la implementación de control de roedores y aves migratorias, entre otras. Hasta la fecha, ninguna de estas medidas han demostrado ser completamente eficientes. Es por esto que se buscan nuevas estrategias complementarias para el control de *Salmonella* spp. en los productos avícolas.

Actualmente, el uso de biocontroladores tal como los bacteriófagos, es una alternativa que ha demostrado promisorios resultados. Dada la inocuidad que muestran para las células eucariotas y su capacidad de reducir una variedad de patógenos en alimentos, parecieran ser una alternativa para disminuir la presencia de *Salmonella* Enteritidis en alimentos destinados a consumo humano, entre ellos, los huevos.

En Chile, se han aislado bacteriófagos específicos contra *Salmonella* Enteritidis y con ellos, se han realizado estudios sobre su eficacia en modelos aviares *in vivo* obteniendo alentadores resultados. Se ha logrado disminuir la incidencia y recuentos bacterianos cecales en pollos y también, disminuir levemente la colonización en ovario de gallinas adultas. Parece interesante entonces conocer el comportamiento lítico *in vitro* de estos bacteriófagos, tanto en yema como en albúmina de huevos infectados experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis, hecho que podría tener un impacto en el control de la enfermedad.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Salmonella Enteritidis (S.E.) es una bacteria capaz de infectar un amplio rango de hospederos animales incluyendo al ser humano, el cual usualmente manifiesta una enteritis autolimitada (Ohl y Miller, 2001). Frecuentemente, en los animales no causa enfermedad, tal como ocurre en el caso de las aves, dejándolos en un estado de portador. De esta manera, la bacteria puede permanecer en el intestino de las aves o migrar hacia otros órganos como el aparato reproductivo, logrando contaminar, por ambas rutas, los huevos (Callaway *et al.*, 2008).

Este patógeno se encuentra fuertemente asociado a productos derivados de la industria avícola, principalmente el huevo, es así como varios autores concuerdan que S.E. es el patógeno más comúnmente transmitido por este alimento a la población humana (Braden, 2006; Callaway *et al.*, 2008; Greig y Ravel, 2009).

Según un análisis realizado por Greig y Ravel (2009) de 4.093 brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) notificados en la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y otros países, entre los años 1988 y 2007, un 46,9% de estos brotes se atribuyeron a *Salmonella*, de los cuales el serotipo más frecuente fue S.E. (24,1%), seguido por *S. Typhimurium* (6,6%). La principal fuente de diseminación de S.E. fueron los huevos, en el 43,4% de los casos y la carne de pollo en el 9,9%. Por otra parte, cuando se analizaron brotes de ETA ocasionados por consumo de huevos (14,3%), el 73,7% de ellos fue causado por S.E., el 8,4% por *S. Typhimurium* y un 15,3% por otros serotipos de *Salmonella*, mientras que el 2,6% restante fue producido por otras bacterias no pertenecientes al género *Salmonella*.

Cifras similares se presentan en Chile, en donde S.E. es considerada un patógeno endémico, frecuentemente aislado en el ambiente clínico. Entre los años 1975 y 1996, de 47 muestras alimentarias asociadas a brotes, un 6,4% se atribuyó al consumo de carne de ave, mientras que un 38,2% fue asociado al consumo de huevos o alimentos que lo contienen (Prat *et al.*, 2001). En relación a toxiinfecciones causadas por *Salmonella*, un análisis de datos obtenidos desde el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), durante los años 2001 – 2006, concluye que S.E. fue el principal agente involucrado, constituyendo

casi el 50% del total de cepas registradas. Los principales alimentos asociados a dichos brotes fueron los huevos y sus derivados (Figueroa, 2007).

Las infecciones por *Salmonella*, tanto en los animales como en el ser humano, comienzan con la ingestión del patógeno a través del agua o de alimentos contaminados. Una vez ingerido, la primera barrera defensiva inespecífica es el pH ácido del estómago (Ohl y Miller, 2001) sin embargo, *Salmonella* es tolerante a la exposición a un pH ácido, promoviendo su sobrevivencia al pH gástrico. Es así como, Tennant *et al.*, (2008), demostraron *in vitro*, la capacidad de *S. Typhimurium* de resistir por 2 horas en un medio buffer fosfato a distintos pH, con un porcentaje de sobrevivencia de $3,4\% \pm 5,5$ a pH 3.0 y de hasta $80,0\% \pm 20,4$ a pH 3.5.

Una vez superada la barrera del pH gástrico, *Salmonella* coloniza el intestino desde donde puede ser eliminada por las heces contaminando el ambiente, el agua y los alimentos o bien, puede invadir las células epiteliales del íleon. La invasión se realiza mediante un mecanismo conocido como “trigger” que son señales que provocan cambios en la organización del citoesqueleto de la célula hospedera, desencadenando un proceso conocido como “ruffling”, que corresponde a ondulaciones en la superficie del enterocito, que finalmente permiten el ingreso de la bacteria (Figueroa y Verdugo, 2005). Desde ahí, la bacteria coloniza e invade las placas de Peyer y los macrófagos, siendo capaz de migrar hacia otros órganos, como bazo e hígado, para lo cual, se transporta vía macrófagos o células dendríticas a través del sistema linfático (Chappell *et al.*, 2009) o por circulación sanguínea (De Buck *et al.*, 2004a). Esta capacidad de *Salmonella* de llegar a otros órganos, vía macrófagos, se debe a que posee un sistema que le permite sobrevivir al interior de ellos (Isla de Patogenicidad 2) (Chappell *et al.*, 2009).

A partir de una infección sistémica, S.E. puede colonizar todo el tracto reproductivo de gallinas (Keller *et al.*, 1995; Okamura *et al.*, 2001a; De Buck *et al.*, 2004a), donde la infección de ovario, oviducto y vagina puede ocurrir de manera independiente una de otras (Kinde *et al.*, 2000). De la colonización del tracto reproductivo, S.E. puede contaminar la yema y/o albúmina de los huevos en formación.

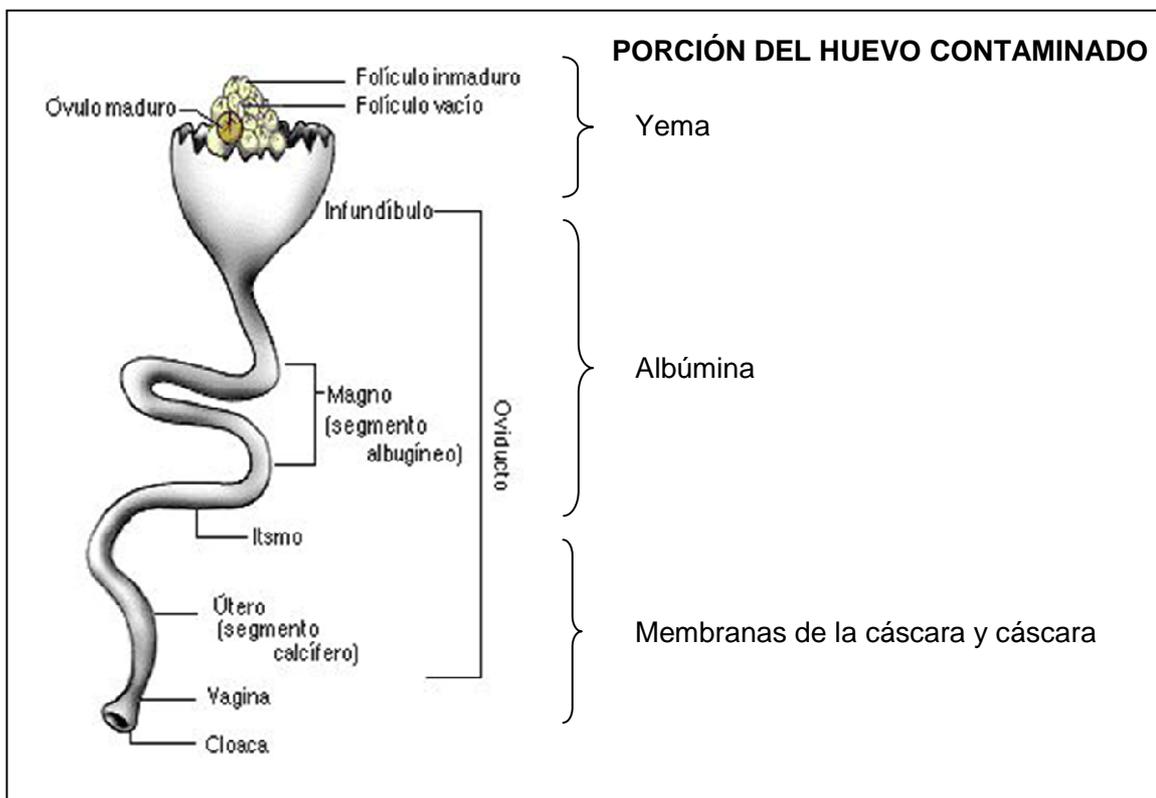
De los serotipos que afectan a las aves, muchos tienen la habilidad de colonizar sus órganos internos, sin embargo, la colonización de órganos reproductivos se atribuye en mayor medida a S.E., *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg*. De estos tres serotipos, S.E. presenta una mayor capacidad de sobrevivencia, lo que explica que sea el principal serotipo transmitido a través de los huevos (Gantois *et al.*, 2008). En un trabajo realizado por Clavijo *et al.*, (2006) se demostró una mejor sobrevivencia de S.E. ($p \leq 0,01$) en albúmina que *S. Typhimurium* y *E. coli*, con tasas de 25,8% para S.E., de 6,5% para *S. Typhimurium* y 1,8% para *E. coli*.

Gast *et al.*, (2004) inocularon gallinas de postura con distintas cepas de S.E. y *S. Heidelberg*, vía oral, para luego evaluar la colonización de ambas bacterias en distintos órganos, incluyendo el aparato reproductivo y huevos ovipuestos. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la colonización de tracto intestinal, hígado, bazo, ovarios y oviductos de las gallinas inoculadas con ambos serotipos. Todas las cepas de *S. Heidelberg* fueron recuperadas desde el contenido interno de huevos, sin embargo, la frecuencia de contaminación de ellos fue baja, entre un 1,1% y un 4,5% comparado con S.E. cuyos porcentajes de aislamiento fueron de 6,88% a 7,05%, siendo esta diferencia significativa ($p \leq 0,05$).

Se han investigado los factores que podrían proporcionar a S.E. la capacidad de sobrevivir a las propiedades antimicrobianas de la albúmina y convertirla en un patógeno casi exclusivo en lo que a contaminación de huevos se refiere. Algunos estudios han demostrado que S.E. posee determinados genes que le permitirían sobrevivir frente a la acción bactericida de la albúmina del huevo. Así, Lu *et al.*, (2003) realizaron un ensayo en el cual midieron la sobrevivencia de S.E. en albúminas y lograron identificar que el gen *yafD* es necesario para la resistencia de S.E. en albúminas y para la resistencia del ADN frente a la exposición de radiación UV y peróxido de hidrógeno. Por otra parte, Gantois *et al.*, (2009a) determinaron que el gen *rfbH* es un factor esencial para el crecimiento de S.E. en huevos a temperatura ambiente y para su sobrevivencia en la albúmina a 42 °C. Este gen está asociado a la síntesis del lipopolisacárido (antígeno O), que le confiere a la bacteria una protección contra los componentes antimicrobianos de la albúmina.

La colonización del tracto reproductivo por parte de S.E., ha sido reconocida como una forma de **contaminación vertical** hacia los huevos. Que dicha contaminación ocurra en yema o en albúmina va a depender de que porción del tracto reproductivo de la gallina está contaminado; es así como la colonización del ovario va a contaminar la yema, la colonización del tracto superior del oviducto (infundíbulo y magnum) va a contaminar la albúmina y la colonización del tracto inferior del oviducto (istmo y útero) y de la vagina van a contaminar las membranas de la cáscara y la cáscara propiamente tal (Figura N° 1) (De Buck *et al.*, 2004a).

Figura N° 1. Anatomía del aparato reproductivo de la gallina, lugar de formación y contaminación con *Salmonella* spp. de las distintas porciones del huevo.

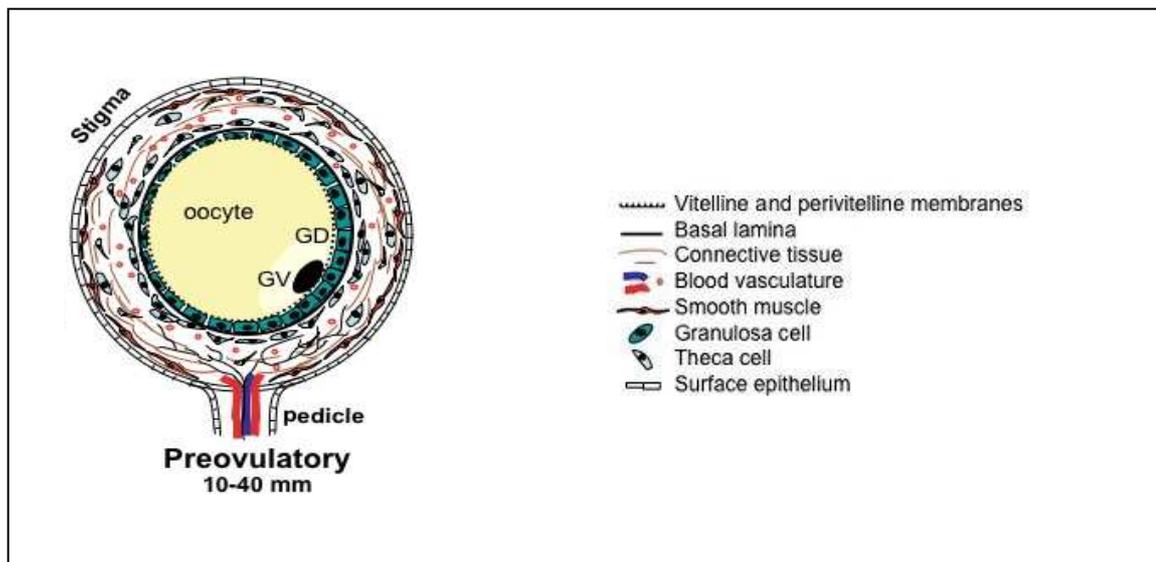


Fuente: <http://www.somosgalleros.com/Articulos/ReproduccionGallina/gallinaRep01.jpg>

[A esta figura se le agregó la porción del huevo contaminado según la estructura colonizada por *Salmonella* spp.]

S.E. llegaría a los folículos ováricos vía hematógica, específicamente por la membrana basal de las células de la teca debido a la presencia de gran cantidad de vasos sanguíneos. La bacteria penetraría la membrana basal, tomando contacto con las células de la granulosa, invadiéndolas y multiplicándose en su interior y a partir de allí sería capaz de penetrar la membrana perivitelina y multiplicarse al interior de la yema (Figura N° 2) (De Buck *et al.*, 2004a).

Figura N° 2. Estructuras del folículo preovulatorio de la gallina.



Fuente: www.nd.edu/~avianova/Images/FollicleDevelop.jpg

Por otra parte, la llegada de S.E. a oviducto, puede ocurrir mediante dos vías de acceso. La primera vía es mediante macrófagos, vía hematógica (De Buck *et al.*, 2004a). Bohez *et al.*, (2008) demostraron, mediante un estudio *in vitro*, que S.E. fagotipo 4 fue capaz de invadir y multiplicarse en macrófagos HD11 de pollos tan rápido como a la primera hora de incubación. Además de la llegada de S.E. en macrófagos vía hematógica, se ha sugerido la traslocación de organismos, también al interior de macrófagos, desde peritoneo a tejido oviductal (De Buck *et al.*, 2004a). Adicionalmente, se ha observado que S.E. induce una menor apoptosis y compromiso de membrana celular de los macrófagos que *S. Typhimurium*, lo que podría estar relacionado con la persistencia de la infección sistémica y la contaminación de los huevos por parte de S.E. (Okamura *et al.*, 2005).

La segunda vía de acceso de S.E. a oviducto es mediante la infección ascendente desde cloaca (Figura N° 1). Okamura *et al.*, (2001b), inocularon distintos serotipos de *Salmonella*, vía intracloacal/intravaginal en gallinas de postura, recuperando S.E. en un 10% de las aves en infundibulum, un 20% en magnum, un 20% en istmo y un 20% en útero. Los otros serotipos analizados, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg* y *S. Hadar*, también lograron colonizar alguna porción del oviducto en porcentajes similares a S.E., sin embargo, sólo S.E. fue recuperada además, desde ovario y bazo luego de 7 días post infección. Los huevos ovipuestos por estas gallinas también fueron analizados. El 27,6% de ellos presentaban S.E., ya sea en la superficie externa o interna de la cáscara o en el contenido líquido del huevo. Este porcentaje fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) en comparación con los otros serotipos de *Salmonella* inoculados. Además, el 70% de las gallinas infectadas con S.E. vía intravaginal pusieron huevos contaminados, mientras que en los otros serotipos, el porcentaje de aves varió entre un 20 y 30%.

Independiente de la vía de llegada de la bacteria al tejido oviductal, el sitio de colonización predominante son las glándulas tubulares de istmo y magnum. Esto se ha establecido mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* en que se observa la invasión, proliferación y replicación de S.E. en cultivos de células glandulares tubulares. Allí se ha determinado que no sólo se logra aislar la bacteria en el intracelular luego de 1 hora post inoculación, sino que también S.E. logra replicarse luego de 4 y 24 horas post invasión (De Buck *et al.*, 2004b).

Una vez que S.E. coloniza oviducto y por ende contamina la albúmina, la bacteria de igual manera puede colonizar los folículos ováricos (yema) gracias a la penetración a través de la membrana perivitelina que protege la yema. Es así como Gast *et al.*, (2005) demostraron que al inocular experimentalmente distintas cepas de S.E. sobre la membrana perivitelina de yemas intactas, todas fueron capaces de atravesarla en 24 horas a 30 °C. El recuento bacteriano realizado a las yemas luego de extraerles la membrana perivitelina demostró que la multiplicación fue modesta en relación al contenido nutricional que la yema proporciona, sugiriendo así que la penetración de la membrana perivitelina ocurrió muy lentamente o que simplemente sucedió al final del periodo de incubación.

Además de la contaminación vertical señalada anteriormente, también existe la **contaminación horizontal**, donde los huevos pueden contaminarse mediante la penetración de S.E. a través de la cáscara durante o después de la oviposición por contacto con las heces (Messens *et al.*, 2005a; De Reu *et al.*, 2006). Muchos factores son los que influyen en que la bacteria pueda penetrar la cáscara y contaminar los componentes internos del huevo. Al momento de la oviposición, el enfriamiento del huevo, que pasa desde una temperatura corporal aproximada a 42 °C, a una temperatura ambiental de 20 °C, genera un efecto de succión por la presión negativa que se produce, lo que ayuda al paso de patógenos al interior del huevo (Messens *et al.*, 2005a). Sin embargo, este no es el único factor que facilita el ingreso de patógenos, también se describe que la deposición de la cutícula, el diámetro de los poros, el tiempo y la temperatura de almacenamiento de los huevos facilitarían el ingreso de patógenos, particularmente de *Salmonella* spp. (Messens *et al.*, 2005b; De Reu *et al.*, 2006).

La penetración a través de la cáscara no es exclusiva de S.E. ni del género *Salmonella*. Así lo demostró De Reu *et al.*, (2006) quienes estudiaron la capacidad de diferentes bacterias (*Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Serratia* spp., *Carnobacterium* spp., *Pseudomonas* spp. y *Salmonella* Enteritidis) de penetrar a través de la cáscara de huevos intactos. Si bien, todas las bacterias fueron capaces de penetrar la cáscara, S.E. fue el patógeno que penetró en mayor proporción, con un 33% de huevos positivos.

Varios autores concuerdan en que lo más probable es que la contaminación ocurra durante la formación del huevo que por penetración a través de la cáscara (Keller *et al.*, 1995; Gast y Holt, 2000; Guard-Petter, 2001; De Reu *et al.*, 2006) ya que no hay concordancia entre los patógenos encontrados en la cáscara del huevo y los encontrados al interior de éste (De Reu *et al.*, 2006). De todas maneras, es imposible discriminar si la contaminación ocurrió durante la formación del huevo o después de la oviposición (De Buck *et al.*, 2004a).

Independiente de la vía de contaminación del huevo, en general, los estudios señalan que un bajo porcentaje de huevos ovipuestos por gallinas infectadas son positivos a *Salmonella*. En el caso de aves naturalmente infectadas, las cifras van hasta 0,6% de huevos positivos a S.E. (Humphrey *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2008), mientras que

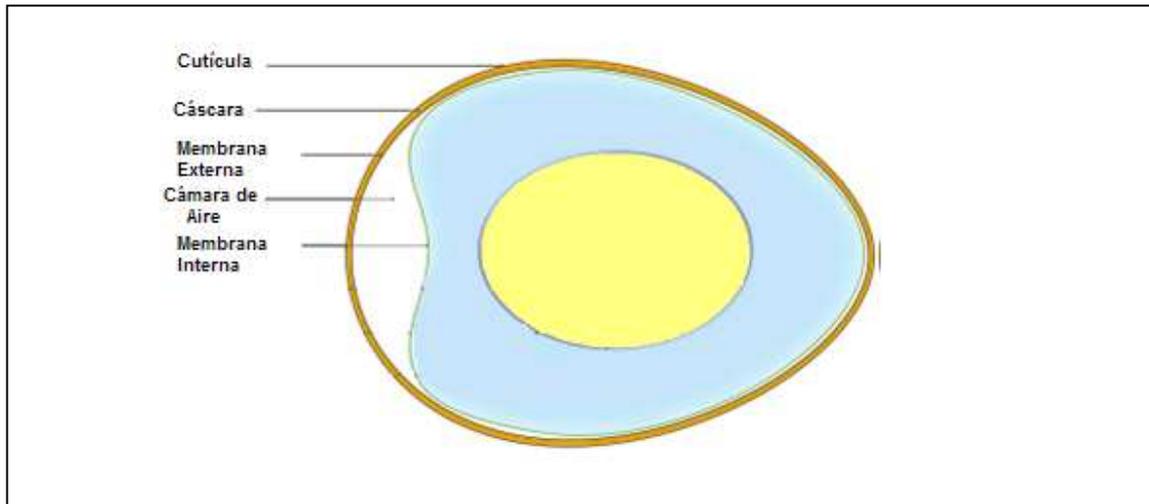
en el caso de gallinas experimentalmente infectadas, los valores van entre un 6,88% a 16,97% (Gast *et al.*, 2003; Gast *et al.*, 2004). Sin embargo, es importante destacar que en los huevos en formación, tomados desde el oviducto de gallinas infectadas experimentalmente, las cifras de infección son mayores, pudiendo alcanzar un 29,25% de positividad a S.E. (Keller *et al.*, 1995).

En la Región Metropolitana, Alexandre *et al.*, (2000) determinaron que de 1.000 huevos obtenidos desde supermercados, el 0,09% de ellos estaba contaminado con S.E.; esto puede considerarse bajo, sin embargo, no lo es si se toma en cuenta que el consumo *per cápita* de huevos en el país es de 180 unidades al año (Asohuevo, 2009) y que más de 1.189 millones de huevos son destinados a consumo humano al año (INE, 2004).

El bajo porcentaje de infección de los huevos se debería, entre otros, a los **mecanismos físicos de protección** (Messens *et al.*, 2005a) y a **factores antimicrobianos** presentes en la albúmina, que impiden la sobrevivencia y multiplicación de patógenos en su interior (Orsi, 2004; Sellier *et al.*, 2007; Wellman-Labadie *et al.*, 2008).

La principal **barrera física** que impide la penetración bacteriana al interior del huevo, es la cáscara, que tiene una cutícula que la recubre externamente, ocluyendo los poros que ésta posee y, las membranas de la cáscara que también actuarían como una barrera de contención (Figura N° 3) (Messens *et al.*, 2005a).

Figura N° 3. Representación esquemática de las estructuras del huevo que actúan como barreras físicas de protección.



Fuente: Gantois *et al.*, 2009b [Traducción]

Entre los **factores antimicrobianos**, se reconoce que la albúmina es restrictiva para el crecimiento y supervivencia de microorganismos, como S.E., debido al pH básico que posee (aproximadamente de 9,0) y gracias a la presencia de proteínas antimicrobianas como la ovotransferrina y la lisozima (Kang *et al.*, 2006; Sellier *et al.*, 2007). El pH básico podría contribuir a la actividad bacteriostática de la albúmina. Para comprobar ello, se utilizaron tres cepas distintas de S.E. para evaluar supervivencia y/o crecimiento de la bacteria en albúmina sin ajuste de pH (pH de 9,0) y en albúmina con pH ajustado (pH de 8,0). Las cepas incubadas en albúmina a pH 9,0, mantuvieron sus recuentos similares al de la concentración inicial, aproximadamente 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, mientras que las cepas incubadas en albúmina a pH 8,0, lograron elevar sus recuentos a 10^4 UFC/mL durante 24 horas (Kang *et al.*, 2006).

La acción de la ovotransferrina consiste en mantener el hierro inaccesible para la bacteria, inhibiendo con ello el crecimiento bacteriano. Esto fue demostrado en el estudio de Kang *et al.*, (2006) quienes detectaron un mayor crecimiento de S.E. en albúminas suplementadas con hierro, de 10 UFC/mL en albúmina sin suplemento a 10^8 UFC/mL en albúmina con suplemento.

La lisozima es otra proteína presente en la albúmina del huevo que tiene un efecto bacteriostático sobre patógenos, incluyendo S.E. Sellier *et al.*, (2007) analizaron el contenido total de lisozima y ovotransferrina en albúminas asociándolo a la inhibición del crecimiento de S.E. Para ello, inocularon albúminas con 10^3 UFC S.E. /mL, y las incubaron a 37 °C por 5 días y luego se realizó recuento de bacterias. Los resultados demostraron una correlación negativa entre la cantidad de lisozima y el número de S.E. en el día 1 post infección ($p \leq 0,01$) y en el día 5 post infección ($p \leq 0,05$), aunque estas correlaciones fueron bajas. En relación a la ovotransferrina que sólo se midió el día 5 post infección, también hubo correlación negativa ($p \leq 0,05$).

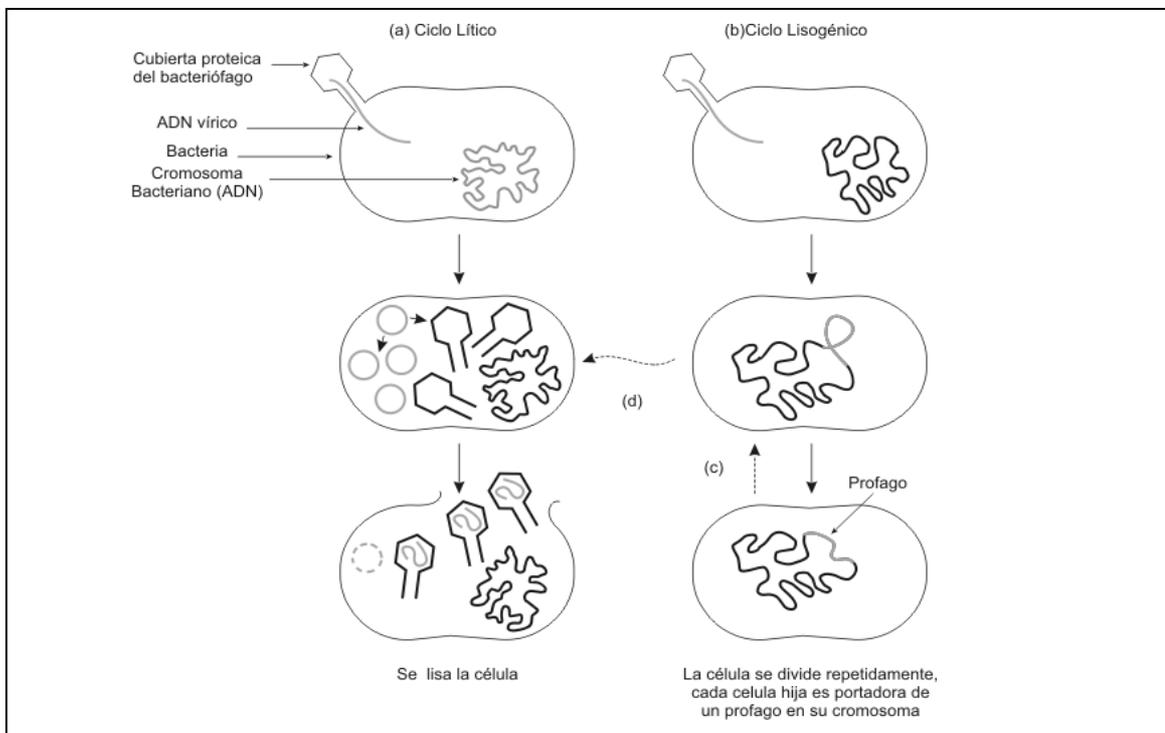
Además de la ovotransferrina y la lisozima, hay otras proteínas presentes en albúmina que participan en el control de patógenos, tales como la lactoferrina, cistaina, ovomacroglobulina y ovoalbúmina (Saxena y Tayyab, 1997; Orsi, 2004; Wesierska *et al.*, 2005; Wellman-Labadie *et al.*, 2008).

Dada la reconocida capacidad de sobrevivir de S.E. en el aparato reproductor de la gallina y en el interior del huevo (Keller *et al.*, 1995; Okamura *et al.*, 2001a; Lu *et al.*, 2003; De Buck *et al.*, 2004a; Gast *et al.*, 2004; Clavijo *et al.*, 2006; Gantois *et al.*, 2008; Gantois *et al.*, 2009a), en Chile, el sector avícola junto al Gobierno, han buscado diversas medidas de control, para las gallinas de postura de planteles avícolas bajo control oficial (PABCO). Entre ellos, el uso de vacunas y medidas básicas de bioseguridad tales como cercos y mallas protectoras que eviten la entrada de aves silvestres, animales de reposición que provengan de planteles sin diagnóstico positivo a S.E., ingreso al plantel sólo de personal autorizado con ropa y calzado limpios, uso de agua de bebida para las aves, potable, potabilizada o microbiológicamente apta para su uso y consumo, planes de limpieza, lavado, desinfecciones y desratizaciones permanentes. En planteles positivos a S.E., se deben incrementar las medidas de bioseguridad para impedir la diseminación a otras unidades, procurar el procesamiento de huevos (huevo en polvo o huevo líquido pasteurizado), lavado y desinfección de la unidad de producción desalojada, eliminación del 100% de las aves positivas a la prueba de aglutinación en placa con antígeno K-polivalente, uso de tratamiento con antibióticos adecuados, en dosis y tiempo correctos; además de la recomendación de pelecha forzada, aplicación de exclusión competitiva, vacunación o revacunación con bacterina (SAG, 2000).

A pesar de las medidas de control utilizadas en la industria avícola, estas no han sido suficientes para controlar la presencia de S.E. en gallinas y en sus huevos. Es por esto que en la última década, se ha evaluado la utilización de bacteriófagos (fagos) líticos como una herramienta para prevenir y controlar *Salmonella* tanto en aves como también en alimentos contaminados.

Los fagos son virus específicos contra bacterias; éstos pueden presentar un ciclo lítico o un ciclo lisogénico. Los fagos con ciclo lítico, se unen a receptores bacterianos de superficie e inyectan su genoma, causando una disrupción en el metabolismo celular para luego producir cientos de partículas virales que son liberadas gracias a la lisis bacteriana. Por otro lado, los fagos con ciclo lisogénico, puede integrar su ADN en el material genético de la bacteria, no afectando la replicación bacteriana, pero de forma espontánea o por inducción, el ADN del fago puede separarse del material genético de la bacteria y de esta manera iniciar un ciclo lítico (Figura N° 4). Los fagos son ubicuos, encontrándose en seres vivos y en el medio ambiente; se ha informado que en agua no contaminada se encuentran en cantidades de 2×10^8 fagos/mL (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Figura N° 4. Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos.



Fuente: <http://www.genomasur.com/lecturas/01-12-G.gif>

Dada la especificidad que presentan los fagos en el reconocimiento de las bacterias, ellos no generan efectos adversos sobre las células eucariotas, al menos descritos hasta la fecha. Se cree que esto se debe a las diferencias en la superficie celular y a la maquinaria intracelular que es esencial para la replicación de los fagos (Dabrowska *et al.*, 2005). Di Giovine *et al.*, (2001), introdujeron el gen de la proteína Ad-Pb de un adenovirus en el genoma de un fago. La proteína Ad-Pb participa en la fijación de los adenovirus a receptores y también en la internalización de partículas virales en células eucariotas. Los fagos híbridos (Ad-Pb+) construidos lograron ingresar e inyectar su genoma en las células eucariotas, sin embargo, no se observó multiplicación de fagos en el interior de éstas, por lo que se concluyó que los fagos no son capaces de utilizar la maquinaria de las células eucariotas sino que requieren de la maquinaria intracelular exclusiva de las bacterias para producir partículas virales.

Desde el punto de vista clínico, los fagos bien purificados parecen ser inocuos. Han sido administrados en seres humanos mediante distintas vías (oral, rectal, local, aerosol, inyecciones intrapleurales e intravenosa) no habiendo prácticamente ningún reporte de complicaciones asociadas a su uso (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Bruttin y Brüssow (2005), administraron fagos T4 contra *Escherichia coli*, a 15 personas voluntarias, en bajas y altas dosis (10^3 y 10^5 unidades formadoras de placas (UFP) /mL). Los voluntarios recibieron los fagos en 150 mL de agua mineral 3 veces al día por 2 días consecutivos, seguidos de 5 días consecutivos sin recibir tratamiento con fagos. Este procedimiento fue repetido por 3 semanas. Se realizó un examen clínico el día 0 y el día 30 del estudio, además, los voluntarios recibieron un cuestionario en el cual podían informar cualquier tipo de eventos adversos. Se presentaron 5 eventos adversos leves, 4 de ellos con síntomas intestinales (dolor estomacal, náuseas, aumento de peristaltismo) y un voluntario presentó dolor de garganta. Ninguno de estos casos necesitó tratamiento.

Los fagos también han sido utilizados en distintos estudios en animales (ovejas, bovinos, pollos), de manera profiláctica o como terapia, no observándose efectos adversos (Fiorentin *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Raya *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2006; Borie *et al.*, 2009). Un estudio de toxicidad en ratas, a las cuales se les aplicó en el alimento el bacteriófago P100 (específico contra *Listeria monocytogenes*), no produjo

ningún cambio histológico anormal ni en la morbilidad y mortalidad de los animales (Carlton *et al.*, 2005).

Dada la especificidad de los fagos hacia su bacteria blanco y a lo inocuo que estos son para las células eucariotas, se ha sugerido su uso en los alimentos. El concepto de combatir patógenos en los alimentos mediante el uso de bacteriófagos, podría ser aplicado en distintas etapas de la cadena de producción de alimentos, es decir, como fagoterapia para la reducción de la colonización de patógenos en los animales, como biosanitización para desinfección de equipos y superficies de contacto, como biocontrol en carcasas, productos crudos y productos listos para consumir y como biopreservación del producto final que llega al consumidor (García *et al.*, 2008).

En agosto de 2006, la FDA (“Food and Drug Administration”) de Estados Unidos de América, aprobó el uso de una preparación de fagos contra *Listeria monocytogenes* en quesos y carnes listos para consumir, considerándolo como un aditivo alimentario generalmente seguro (FDA, 2006).

Se ha evaluado la utilización de fagos contra distintos patógenos (*Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* spp, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp) y en una gran variedad de alimentos (carnes, quesos, frutas, vegetales, leche), obteniendo resultados prometedores en la reducción de dichos patógenos (Hagens y Loessner, 2007; Abuladze *et al.*, 2008; García *et al.*, 2008).

En el caso específico de fagos contra S.E. en alimentos, Modi *et al.*, (2001) analizaron la habilidad de S.E. de sobrevivir durante el proceso de fabricación, maduración y almacenamiento de queso Cheddar, utilizando leches con y sin pasteurización tratadas con fagos. Para ello, tanto leche cruda como pasteurizada fueron inoculadas con 10^4 UFC S.E. /mL y con 10^8 UFP/mL del fago SJ2 y se evaluó el queso durante un periodo de 99 días, para determinar la presencia de la bacteria. El recuento de S.E. disminuyó en 1 a 2 unidades logarítmicas luego de 24 horas en quesos fabricados con leche cruda y pasteurizada que contenía el fago. Mientras que, en los quesos fabricados con leches no tratadas, hubo un aumento aproximado de 1 unidad logarítmica en la cantidad de S.E. Además, *Salmonella* no sobrevivió en queso fabricado con leche

pasteurizada tratada con fagos luego de 89 días de almacenamiento. Este estudio demostró que el fago SJ2 redujo la habilidad de *Salmonella* de sobrevivir en queso Cheddar.

Leverentz *et al.*, (2001) utilizaron una mezcla de fagos líticos específicos para el control de S.E. en cortes de manzanas (2×10^8 UFP/mL) y melones (10^6 UFP/mL). Los cortes de frutas tratados se almacenaron a 5, 10 y 20 °C. Se cuantificó la concentración de S.E. a las 0, 3, 24, 48, 120 y 168 horas post administración de fagos, no existiendo una reducción significativa ($p > 0,0001$) de los recuentos en cortes de manzanas tratadas con fagos. Sin embargo, en cortes de melones, la reducción de la población de S.E. fue significativa ($p \leq 0,0001$). Esta reducción fue independiente de la temperatura de almacenamiento, obteniéndose un recuento promedio de 3,17 unidades logarítmicas de S.E. en el grupo control y 1,38 unidades logarítmicas de S.E. en el grupo tratado con fagos.

Goode *et al.*, (2003) estudiaron la efectividad de fagos líticos contra S.E. en piel de pollo. Para esto, se contaminó piel de pollos con 10^3 UFC S.E. /cm² y luego se trataron con fagos en bajas y altas dosis (multiplicidad de infección o MOI, cantidad de fagos por bacterias inoculadas). Cuando los fagos se aplicaron en una MOI baja (10^3), los recuentos promedios de S.E. bajaron desde $3,91 \log_{10}$ UFC/cm² al tiempo cero a $3,27 \log_{10}$ UFC/cm² luego de 24 horas de la aplicación y a $2,96 \log_{10}$ UFC/cm² a las 48 horas, siendo estas reducciones significativas ($p \leq 0,01$), respecto a la hora cero. Con la MOI elevada (10^6), los recuentos promedios de S.E. del grupo control fueron de $4,66 \log_{10}$ UFC/cm², mientras que con el fago P22, estos disminuyeron a $2,83 \log_{10}$ UFC/cm² y a $1,92 \log_{10}$ UFC/cm² con el fago 29C, siendo estas reducciones significativas ($p \leq 0,01$).

También se han usado fagos frente a *Salmonella* en animales de consumo. Estos estudios se basan principalmente en la reducción de este patógeno a nivel intestinal, en aparato reproductivo y otros órganos, ya sea en forma profiláctica o terapéutica (Fiorentin *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2009; Hauva, 2009; Quiroga, 2009).

En Chile se han realizado experimentos *in vivo* usando bacteriófagos con el fin de prevenir la colonización de S.E. en intestino y “pool” de órganos (bazo, hígado y corazón) de pollos broiler. Para ello se les administró, vía oral, un bacteriófago en dos concentraciones diferentes (10^6 y 10^7 UFP/mL), luego, se infectaron, vía oral, con 10^6 UFC S.E. /mL. Con la concentración de fagos más alta (10^7 UFP/mL) se logró disminuir la incidencia de infección de 86,6% a 46,6% ($p \leq 0,05$) tanto en intestino como en “pool” de órganos” (Borie *et al.*, 2008a).

En un segundo estudio, se aplicó una mezcla de 3 bacteriófagos por dos vías distintas: aerosol y agua de bebida, obteniendo en el grupo control de infección, el 100% de aves positivas, un 72,7% en el grupo tratado vía aerosol y un 90% en el grupo tratado vía agua de bebida. Los resultados señalan que hay una menor incidencia de S.E. en intestino y “pool” de órganos (bazo, hígado, corazón) cuando los fagos son administrados vía aerosol ($p \leq 0,01$) no así en el agua de bebida ($p > 0,01$), lo que también indica que la vía de administración juega un rol importante en el éxito del tratamiento (Borie *et al.*, 2008b). Los mismos autores han concluido que en pollos de 7 días de edad, el uso de una mezcla de bacteriófagos en conjunto con exclusión competitiva logra reducir en mayor proporción la incidencia de S.E. en ciego y órganos internos, que cuando ambas terapias se administraron por separado (Borie *et al.*, 2009). En experiencias recientes, con el fin de disminuir la incidencia de S.E. en tejido reproductivo y con ello disminuir la cantidad de huevos infectados, los autores utilizaron de manera profiláctica una mezcla de 3 bacteriófagos líticos en gallinas de postura experimentalmente infectadas con S.E. En esta ocasión, los fagos no lograron reducir la incidencia de infección ni los recuentos bacterianos a nivel cecal ni en oviductos, sin embargo, en ovarios hubo una disminución significativa de los recuentos de S.E. ($p \leq 0,05$). Además, se determinó la presencia de los fagos en tejido reproductivo, pero en escasa cantidad (Hauva, 2009; Quiroga, 2009).

Dada la escasa actividad lítica de los fagos sobre S.E. en tejidos reproductivos de gallinas comerciales de postura, se plantea la necesidad de investigar su efectividad directamente en huevos contaminados. Si bien no existe literatura publicada al respecto, la buena capacidad lítica demostrada por los bacteriófagos frente a *Salmonella* Enteritidis tanto *in vitro* como *in vivo* en aves (Borie *et al.*, 2008a; Borie *et al.*, 2008b; Borie *et al.*, 2009) se espera que su uso disminuya la incidencia y los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en yemas y albúminas de huevos infectados experimentalmente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* la efectividad de una mezcla de bacteriófagos sobre *Salmonella* Enteritidis en yema y albúmina de huevos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la dosis mínima infectante de *Salmonella* Enteritidis en yemas y albúminas de huevos libre de patógenos específicos (SPF) inoculados experimentalmente.
2. Determinar la efectividad de distintas concentraciones de bacteriófagos y dos tiempos de incubación sobre el porcentaje de contaminación *in vitro* de yemas y albúminas de huevos SPF inoculados experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis.
3. Cuantificar la reducción de *Salmonella* Enteritidis en yemas y albúminas de huevos SPF luego del tratamiento con bacteriófagos en distintas concentraciones y en diferentes tiempos de incubación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Huevos

Se trabajó con huevos SPF, provenientes del Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Los huevos fueron almacenados a temperatura de refrigeración (entre 4 a 8 °C) por no más de 24 horas hasta el inicio del estudio.

2. Cepa desafío

Se utilizó una cepa de *Salmonella* Enteritidis, aislada de una gallina reproductora y donada por el Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola Ganadero. De ésta, se seleccionó en el laboratorio, una cepa mutante espontánea con resistencia al ácido nalidíxico (*nal*) y rifampicina (*rif*), de tal manera de facilitar su búsqueda *in vitro* (Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso). La cepa ha recibido 9 pasajes (P-9) en pollos para exacerbar su virulencia.

3. Determinación de la dosis mínima infectante (DMI) en yemas y albúminas

La dosis mínima infectante para yema y albúmina, fue aquella menor dosis bacteriana con que se pudo recuperar la cepa desafío en el 100% de las muestras contaminadas. Para ello, se realizó una suspensión de *Salmonella* Enteritidis *nal rif* en caldo Luria-Bertani (Difco®) y se incubó a 37 °C por 24 horas. Esta suspensión fue ajustada al tubo 0,5 del Nefelómetro de McFarland ($1,5 \times 10^8$ bacterias/mL) y, mediante adición de suero fisiológico estéril, se realizaron diluciones teóricas, al décimo, hasta alcanzar el valor de 10^2 UFC/mL. Para corroborar esta concentración, se realizó recuento de colonias a la suspensión inicial (Ver punto 6.2. bacteriología cuantitativa).

Se trabajó en un comienzo con diluciones de 10^2 , 10^3 y 10^4 UFC/mL, utilizando 10 huevos por cada dilución. De cada huevo, se separó, en forma aséptica (Poppe *et al.*, 1992) yema de albúmina colocándolas en una bolsa estéril para “Stomacher” (Nasco WHIRL-PAK®). Cada muestra se inoculó con 0,1 mL de la suspensión bacteriana correspondiente, se homogeneizó manualmente y se dejó reposar 2 horas a temperatura ambiente; luego, se adicionó caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) en una razón aproximada de 1:10, se homogeneizó manualmente y se incubó a 37 °C por hasta 72 horas. Se sembró cada 24 horas hasta obtener desarrollo de la cepa desafío, en placas de agar XLD (Difco®) adicionado de ácido nalidíxico (20 µg/mL, Arlab®) y rifampicina (20 µg/mL, Arlab®).

4. Bacteriófagos

Se utilizó una mezcla de 3 bacteriófagos líticos nativos denominados Est2, Est16 y F18α, cuya caracterización fue descrita por Robeson *et al.*, (2008). La preparación de los bacteriófagos fue realizada por el Dr. James Robeson, perteneciente al Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Los bacteriófagos se utilizaron en una multiplicidad de infección (MOI) de 10^3 , 10^4 y 10^5 / cada fago / dosis, correspondiendo esta a la relación de concentración entre bacteriófagos y cepa desafío.

5. Modelo experimental

Se trabajó con huevos SPF, separados en 3 grupos (Cuadro N° 1), siendo el grupo 1 el control de infección, el grupo 2, el control de inocuidad de fagos y el grupo 3 el que recibió la terapia con fagos. En cada grupo se trabajó con yema y albúmina obtenidas de manera aséptica, según metodología descrita por Poppe *et al.*, (1992); para esto, la superficie externa de la cáscara se desinfectó con etanol al 70% mediante inmersión del huevo por 2 minutos, dejándolo secar a T° ambiente. Los huevos se abrieron individualmente sobre el borde de un vaso precipitado estéril cubierto con papel aluminio desinfectado con alcohol yodado. Cada yema y cada albúmina fueron colocadas individualmente en una bolsa estéril para “Stomacher” (Nasco WHIRL-PAK®) para su posterior inoculación con la cepa desafío.

Cuadro Nº 1. Diseño experimental

GRUPOS MATRIZ	GRUPO 1 S.E. (n)	GRUPO 2 BF (n)	GRUPO 3 S.E. + BF (n)
YEMA	1 DMI (25)	10 ⁶ UFP (15)	a) DMI + MOI 10 ³ (25) b) DMI + MOI 10 ⁴ (25) c) DMI + MOI 10 ⁵ (25)
ALBÚMINA	1 DMI (25)	10 ⁶ UFP (15)	a) DMI + MOI 10 ³ (25) b) DMI + MOI 10 ⁴ (25) c) DMI + MOI 10 ⁵ (25)

S.E.: *Salmonella* Enteritidis. BF: bacteriófagos. DMI: dosis mínima infectante. MOI: multiplicidad de infección.

Los grupos 1 (S.E.) y 3 (S.E. + BF) fueron inoculadas con una dosis mínima infectante (1 DMI) de S.E., suspendida en 0,1 mL de agua fosfatada tamponada (Oxoid®), mientras que el grupo 2 recibió 0,1 mL de suero fisiológico estéril; los tres grupos fueron homogeneizados manualmente y se dejaron reposar a T° ambiente por 2 horas. Posteriormente, los grupos 2 (BF) y 3 (S.E. + BF) fueron inoculados con 0,1 mL de la mezcla de bacteriófagos, y el grupo 1 recibió 0,1 mL de suero fisiológico estéril. Todas las bolsas se homogeneizaron manualmente y fueron incubadas a 37 °C por 24 horas (protocolo de incubación de 24 horas) para luego ser analizadas por bacteriología cualitativa y cuantitativa.

Este protocolo fue repetido utilizando el mismo número de huevos, pero considerando un tiempo de incubación de 48 horas (protocolo de incubación de 48 horas). Durante esta segunda experiencia, no se consideró el grupo 2, control de inocuidad de bacteriófagos.

Para evitar la contaminación bacteriana y viral entre grupos, se utilizaron laboratorios y estufas diferentes según grupo experimental.

6. Análisis bacteriológico

El procedimiento para el reisolamiento de la cepa desafío se realizó según las pautas australianas de diagnóstico de *Salmonella* (Murray y Barton, 1993), considerando algunas sugerencias de Gast *et al.*, (2005).

6.1 Bacteriología Cualitativa

Cada muestra se pesó y, a la bolsa, se le adicionó caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) en una razón de 1:10 (Gast *et al.*, 2005), mezclando manualmente hasta lograr la homogeneización de la muestra. La bolsa fue incubada a 37 °C por hasta 72 horas, resemebrando a las 48 y 72 horas, en placas de agar XLD (Difco®) adicionado de ácido nalidíxico (20 µg/mL, Arlab®) y rifampicina (20 µg/mL, Arlab®). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas y las colonias sospechosas (transparentes con centro negro) se identificaron por aglutinación con suero anti-*Salmonella* grupo D1 (Difco®).

Todas las muestras negativas por cultivo a S.E., fueron analizadas por la prueba de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en el servicio de Microbiología (FAVET, Universidad de Chile) para detectar genoma de S.E. (*inv A*) (Sánchez, 2007).

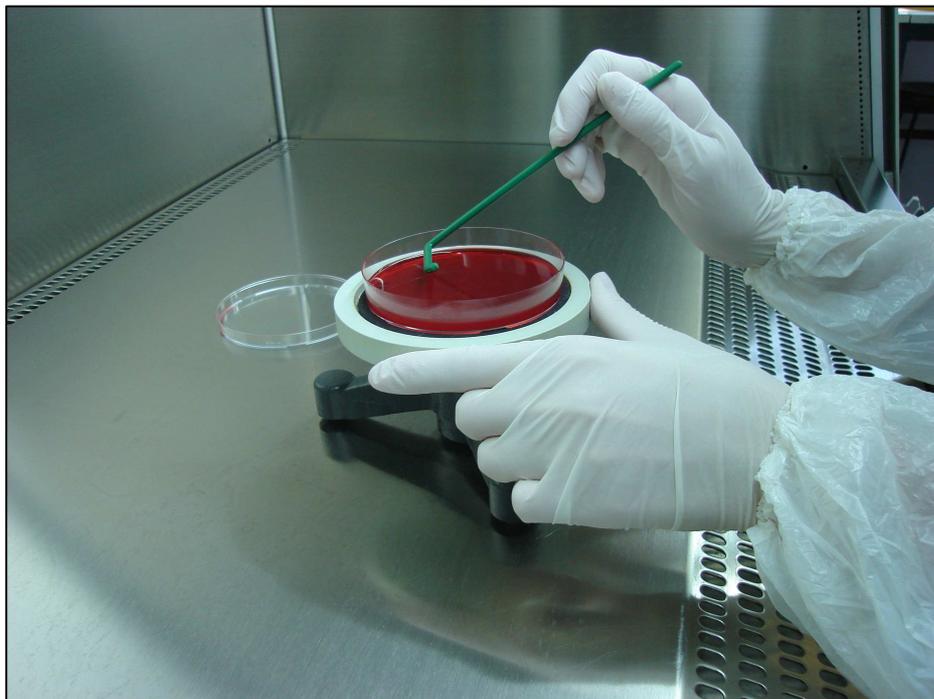
6.2 Bacteriología Cuantitativa

Para el recuento de colonias en yemas, se extrajo 1 mL del homogeneizado en caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) sin incubar. De allí, se realizaron 4 diluciones al centésimo en agua fosfatada tamponada (Oxoid®) y de cada dilución, se sembró 0,1 mL en superficie de placas de agar XLD (Difco®) adicionado de ácido nalidíxico (20 µg/mL, Arlab®) y rifampicina (20 µg/mL, Arlab®) (Fotografía N° 1). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas para realizar el recuento de colonias.

Para el recuento de colonias en albúminas, se extrajo 1 mL del homogeneizado en caldo Rappaport-Vassiliadis (Difco®) previamente incubado a 37 °C por 24 horas. De allí, se realizaron 2 diluciones al décimo en agua fosfatada tamponada (Oxoid®) y de cada dilución, se sembraron 0,5 mL en superficie de placas de agar XLD (Difco®) adicionado de

ácido nalidíxico (20 µg/mL, Arlab®) y rifampicina (20 µg/mL, Arlab®). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas para realizar el recuento de colonias (UFC/mL).

Fotografía N° 1. Siembra por extensión con asa de Digrafsky, de una muestra de yema diluida.



7. Normas de Bioseguridad

En este estudio se trabajó con las recomendaciones entregadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos de América, para un nivel 2 de bioseguridad, correspondiente a *Salmonella* no Typhi (Richmond y McKinney, 1999).

Se utilizó delantal, guantes, mangas plásticas y gabinete de bioseguridad clase A II (Heal Force®). Los mesones y pisos de los laboratorios fueron desinfectados con alcohol yodado y cloro (5.000 ppm). Todos los residuos orgánicos fueron incinerados o autoclavados, según el caso.

8. Análisis de Resultados

Los resultados de la bacteriología cualitativa se expresaron como proporciones de yemas y albúminas positivas y las diferencias entre grupos experimentales se determinaron por la prueba de independencia de Chi cuadrado (χ^2) (InfoStat, 2004).

Para el análisis bacteriológico cuantitativo en yemas y albúminas, los valores de los recuentos (UFC/mL) se transformaron a unidades logarítmicas (\log_{10}) y luego se sometieron a análisis de varianza (ANDEVA) (InfoStat, 2004). Todas las muestras en donde no se observó desarrollo bacteriano al momento del recuento, pero que resultaron positivas a la bacteriología cualitativa, se les asignó arbitrariamente un valor de 1, mientras que a las muestras que fueron incontables al momento del recuento, se les asignó un valor de 10 y, a aquellas que fueron negativas en ambas bacteriologías se les asignó valor 0.

RESULTADOS

1. Dosis mínima infectante (DMI).

Con todas las dosis analizadas previamente se logró un 100% de reisolamiento de la cepa desafío, por lo que se decidió seleccionar como DMI de *S.E. naf rif^r*, la concentración de 10^1 UFC (0,1 mL de la suspensión de 10^2 UFC/mL). Se trabajó con $1,05 \times 10^1$ UFC para el protocolo de incubación de 24 horas y $1,25 \times 10^1$ UFC para el protocolo de incubación de 48 horas.

2. Efectividad de distintas dosis de bacteriófagos y dos tiempos de incubación sobre la contaminación con S.E. en yemas y albúminas.

La bacteriología cualitativa determinó, para el protocolo de incubación de 24 horas, un 100% de positividad a S.E., tanto en yemas como en albúminas en el grupo que sólo recibió la cepa desafío (grupo 1) y en aquellos que recibieron S.E. y bacteriófagos (grupos 3a, 3b y 3c). Para el protocolo de incubación de 48 horas, en las yemas no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) mientras que en las albúminas se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el grupo tratado con la MOI más alta (10^5), donde sólo un 68% de las albúminas fueron positivas (Cuadro N° 2).

Cuadro N° 2. Recuperación de S.E. en yemas y albúminas experimentalmente contaminadas y tratadas con distintas concentraciones de bacteriófagos para el protocolo de incubación de 48 h.

Grupo	Nº de yemas positivas a S.E. (%)	Nº de albúminas positivas a S.E. (%)
1 (S.E.)	25 (100%)	25 (100%) ^a
3a (MOI 10^3)	25 (100%)	24 (96%) ^a
3b (MOI 10^4)	25 (100%)	25 (100%) ^a
3c (MOI 10^5)	25 (100%)	17 (68%) ^b

^{a, b} Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

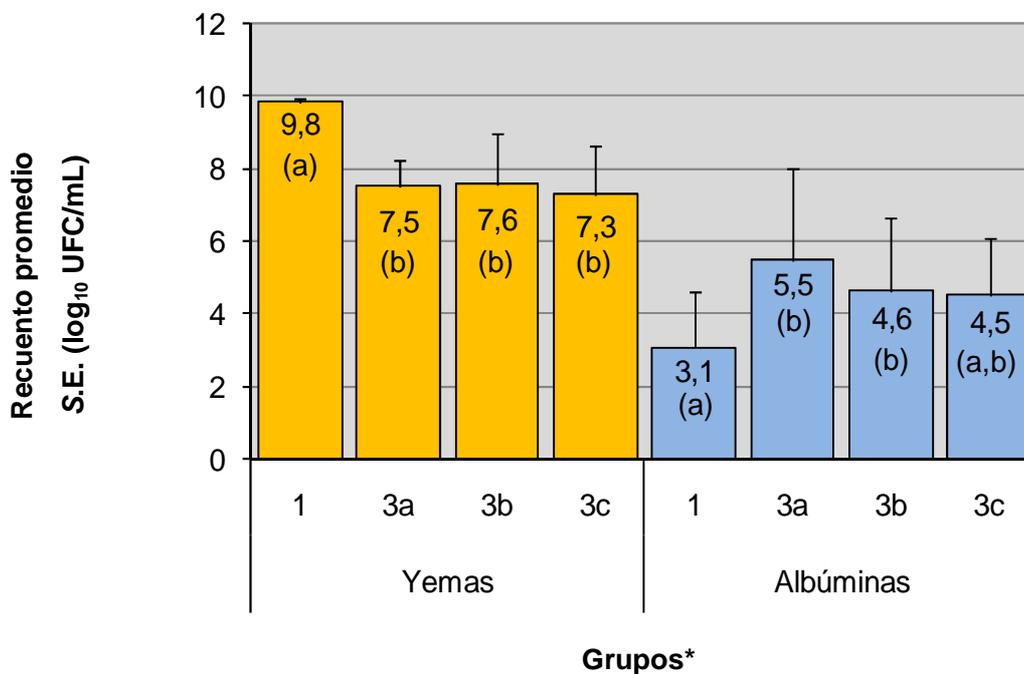
Todas aquellas muestras negativas por cultivo a S.E., fueron analizadas por la prueba de reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en el servicio de Microbiología (FAVET, Universidad de Chile) para detectar genoma de S.E. (*inv A*) (Sánchez, 2007), no encontrándose muestras positivas adicionales.

3. Cuantificación de la reducción de S.E. en yemas y albúminas con distintas dosis de bacteriófagos y diferentes tiempos de incubación.

Los resultados obtenidos en el protocolo de incubación de 24 horas, determinaron que en la matriz yema (Gráfico N° 1), hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el grupo 1 (S.E.) y los grupos 3a (MOI 10^3), 3b (MOI 10^4) y 3c (MOI 10^5), que recibieron S.E. y tratamiento con bacteriófagos; siendo el grupo 1 el que tuvo los recuentos de S.E. más altos. Al comparar los recuentos entre los grupos que recibieron distintas concentraciones de bacteriófagos (grupo 3), no hubo diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

En la matriz albúmina (Gráfico N° 1), las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) se observaron entre el grupo 1 (S.E.), y los grupos 3a (MOI 10^3) y 3b (MOI 10^4), que recibieron S.E. y el tratamiento con bacteriófagos; esta vez, el grupo 1 obtuvo los recuentos de S.E. más bajos. Entre el grupo 1 (S.E.) y el grupo 3c (MOI 10^5), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Al comparar los recuentos entre los grupos que recibieron distintas concentraciones de bacteriófagos (grupo 3), no hubo diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

Gráfico N° 1. Recuentos promedio de S.E. (\log_{10} UFC) en yemas y albúminas tratadas con distintas concentraciones de bacteriófagos, para el protocolo de incubación de 24 h.



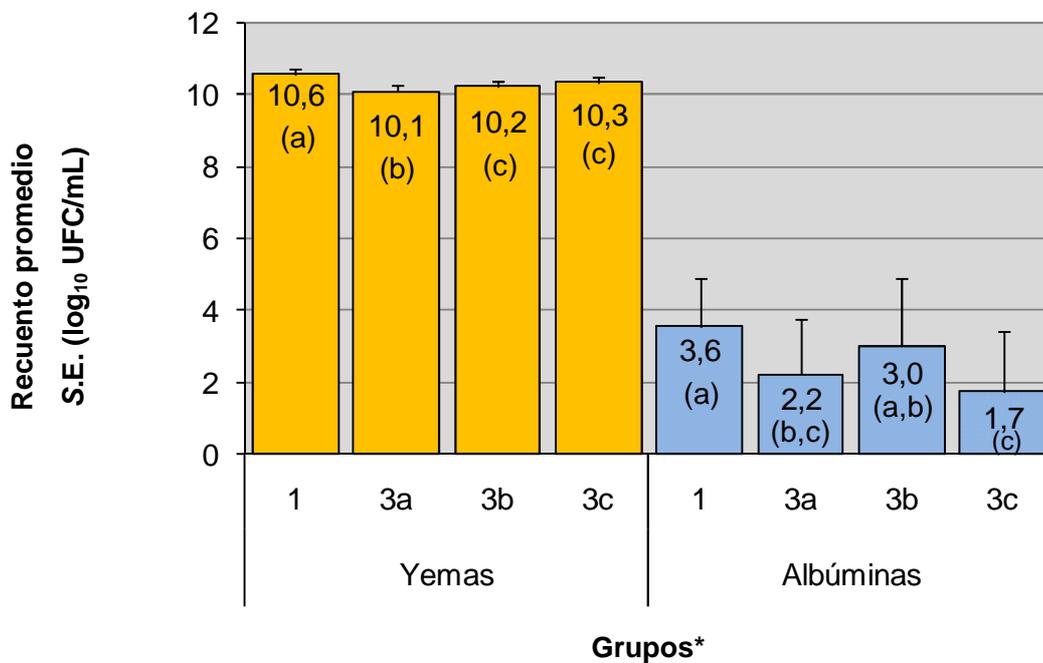
*Grupo 1: S.E.; Grupo 3a: S.E. + BF (MOI 10^3); Grupo 3b: S.E. + BF (MOI 10^4); Grupo 3c: S.E. + BF (MOI 10^5).

(a), (b) Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) dentro de cada grupo.

Al analizar los resultados del protocolo de incubación de 48 horas, para las yemas (Gráfico N° 2), los recuentos de S.E. en el grupo 1 (S.E.), fueron significativamente ($p \leq 0,05$) más elevados que los recuentos observados en los grupos 3a (MOI 10^3), 3b (MOI 10^4) y 3c (MOI 10^5), que recibieron S.E. y tratamiento con bacteriófagos. A su vez, los recuentos del grupo 3a (MOI 10^3) fueron significativamente ($p \leq 0,05$) menores que los observados en los grupos 3b (MOI 10^4) y 3c (MOI 10^5), cuyos valores fueron iguales entre ellos ($p > 0,05$).

En el caso de las muestras de albúminas (Gráfico N° 2), los recuentos de S.E. en el grupo 1 (S.E.), fueron significativamente ($p \leq 0,05$) más elevados que los recuentos observados en los grupos 3a (MOI 10^3) y 3c (MOI 10^5). No hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) en los recuentos observados entre el grupo 1 y el grupo 3b (MOI 10^4). A su vez, el recuento promedio del grupo 3b (MOI 10^4) fue significativamente ($p \leq 0,05$) mayor que el observado en el grupo 3c (MOI 10^5), mientras que el grupo 3a (MOI 10^3) no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) con los grupos 3b (MOI 10^4) y 3c (MOI 10^5).

Gráfico N° 2. Recuentos promedio de S.E. (\log_{10} UFC) en yemas y albúminas tratadas con distintas concentraciones de bacteriófagos, para el protocolo de incubación de 48 h.

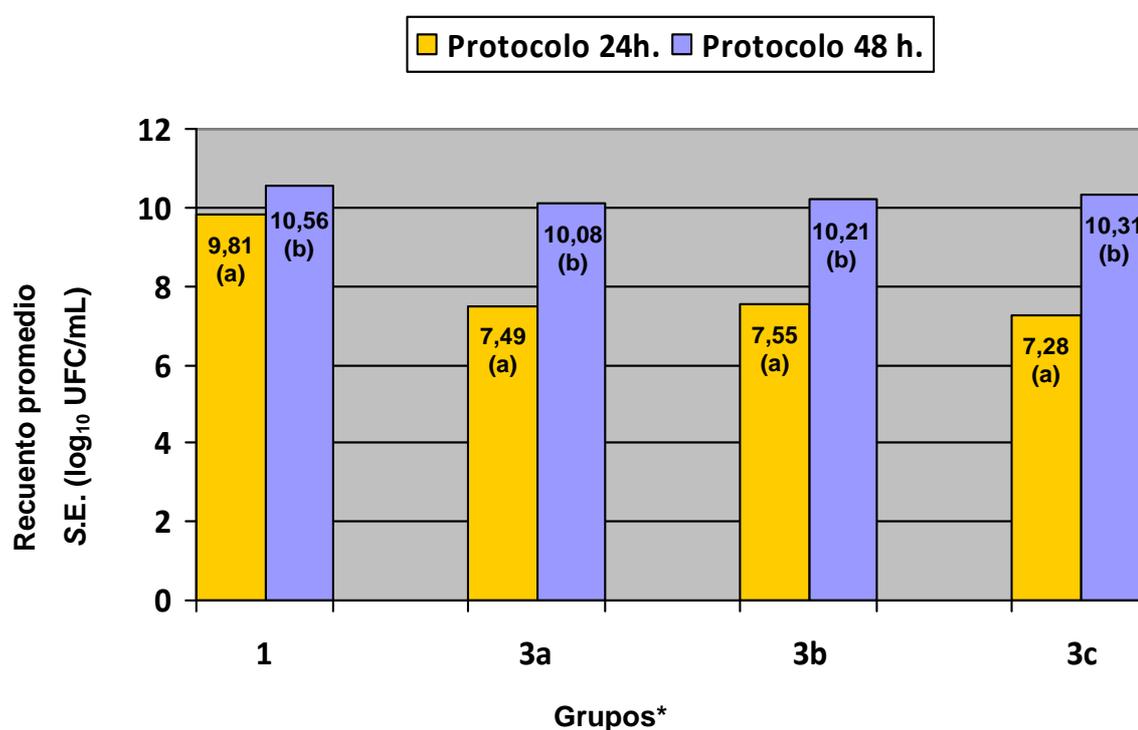


*Grupo 1: S.E.; Grupo 3a: S.E. + BF (MOI 10^3); Grupo 3b: S.E. + BF (MOI 10^4); Grupo 3c: S.E. + BF (MOI 10^5).

(a), (b), (c) Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) dentro de cada grupo.

Para establecer posibles diferencias del tiempo de incubación sobre la actividad lítica de los bacteriófagos, se compararon separadamente los resultados de cada grupo para los protocolos de 24 y 48 horas. Así, en yemas, los recuentos fueron significativamente ($p \leq 0,05$) menores en todos los grupos del protocolo de incubación de 24 horas (Gráfico N° 3).

Gráfico N° 3. Recuentos promedio de S.E. (\log_{10} UFC) en yemas tratadas con distintas concentraciones de bacteriófagos, según protocolo de incubación.

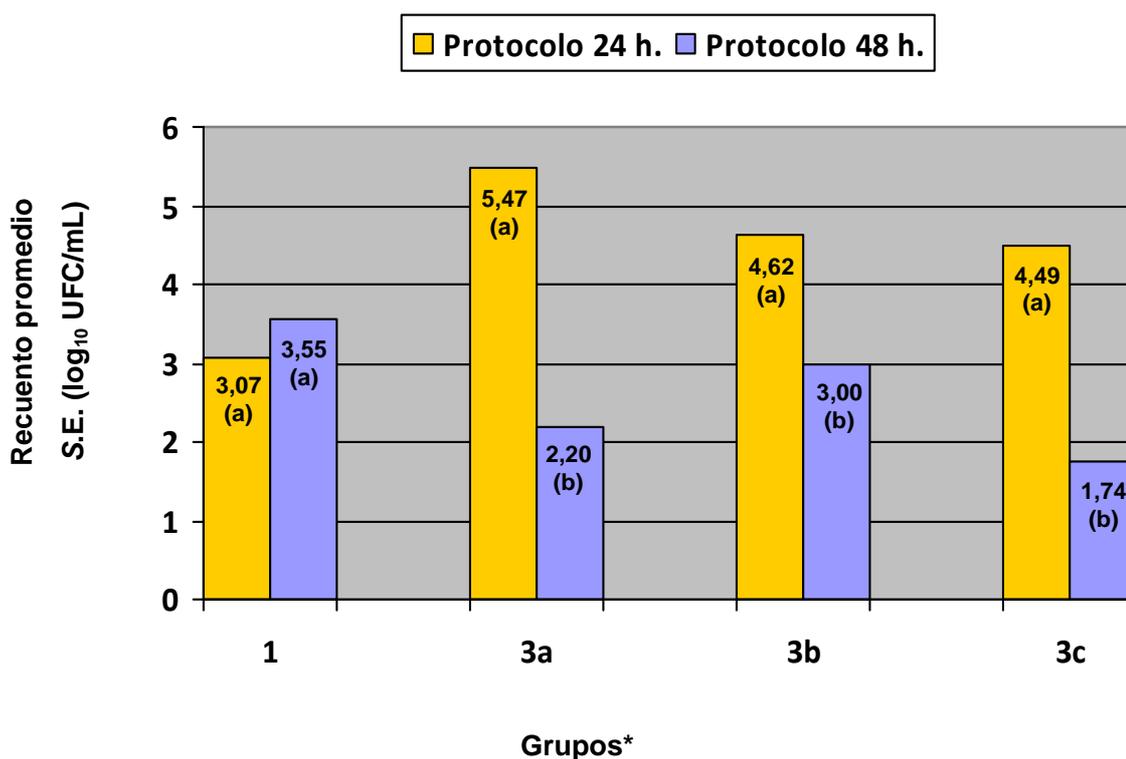


*Grupo 1: S.E.; Grupo 3a: S.E. + BF (MOI 10^3); Grupo 3b: S.E. + BF (MOI 10^4); Grupo 3c: S.E. + BF (MOI 10^5).

(a), (b) Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) dentro de cada grupo.

En el caso de las albúminas, los recuentos fueron significativamente ($p \leq 0,05$) menores para el protocolo de incubación de 48 h, sólo en los grupos que recibieron S.E. y el tratamiento con bacteriófagos, es decir, entre los grupos 3a (MOI 10^3), 3b (MOI 10^4) y 3c (MOI 10^5) (Gráfico N° 4).

Gráfico N° 4. Recuentos promedios de S.E. (\log_{10} UFC) en albúminas tratadas con distintas concentraciones de bacteriófagos, según protocolo de incubación.



*Grupo 1: S.E.; Grupo 3a: S.E. + BF (MOI 10^3); Grupo 3b: S.E. + BF (MOI 10^4); Grupo 3c: S.E. + BF (MOI 10^5).

(a), (b) Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) dentro de cada grupo.

Los recuentos mínimos y máximos observados para los distintos grupos experimentales, según el protocolo de incubación, se detallan en el Cuadro N° 3. En general se observa que los recuentos mínimos y máximos son más elevados en el grupo que sólo recibió S.E. (grupo 1), en comparación con los grupos que recibieron la terapia con bacteriófagos (grupos 3a, 3b y 3c). En cuanto al tipo de muestra, las albúminas presentaron, usualmente, menores recuentos mínimos y máximos comparados con las yemas. En relación al tiempo de incubación (protocolos de 24 y 48 horas), en yemas, el protocolo de incubación de 24 horas presentó recuentos mínimos y máximos más bajos que el protocolo de 48 horas, mientras que en las albúminas, los recuentos máximos fueron más bajos en el protocolo de incubación de 48 horas, comparado con el protocolo de 24 horas.

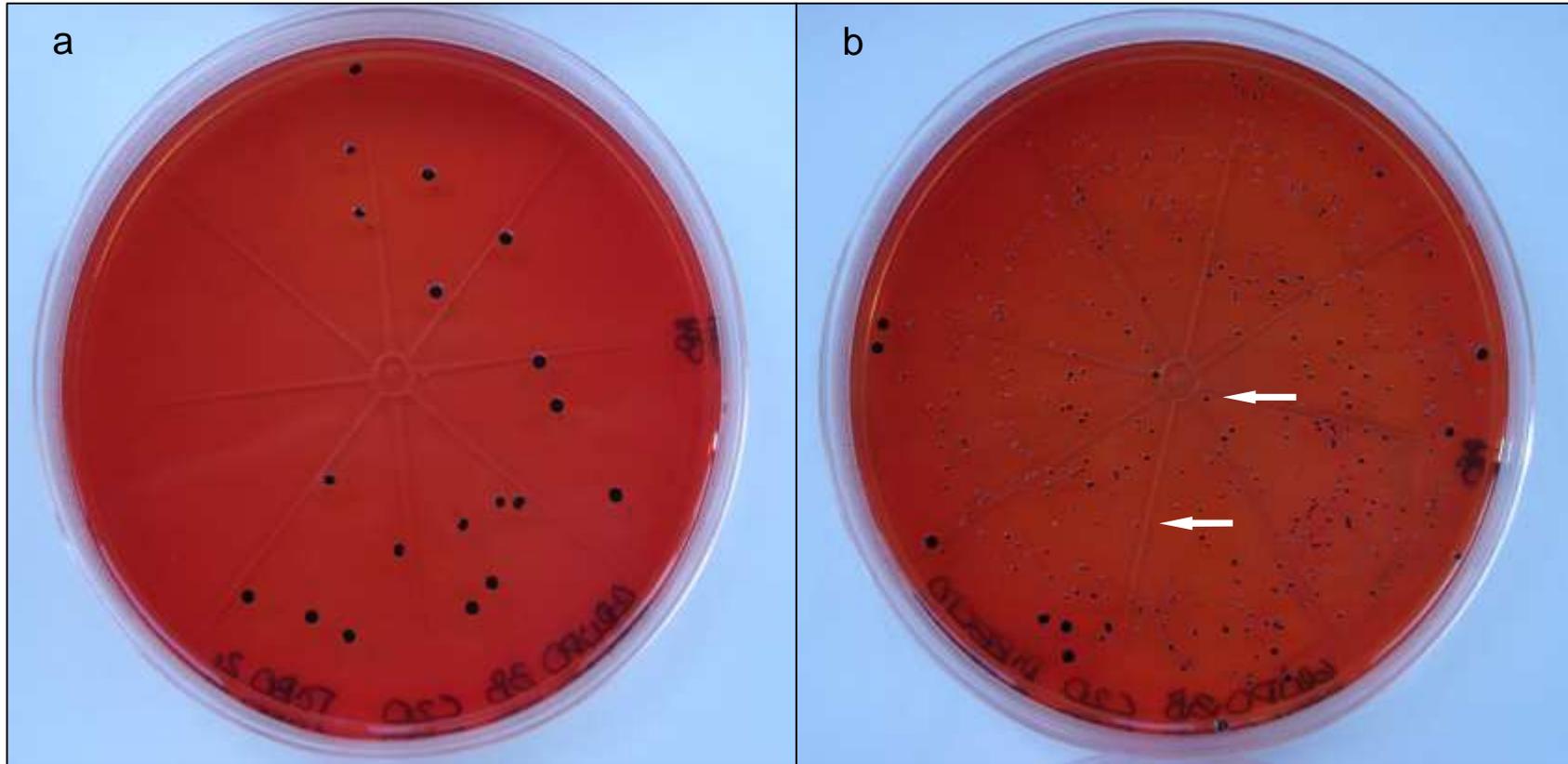
Cuadro N° 3. Recuentos mínimos y máximos de S.E. (\log_{10} UFC) en yemas y albúminas para los protocolos de incubación de 24 h. y 48 h.

Matriz Grupo	Recuentos mínimos y máximos de S.E. en yemas (\log_{10} UFC)		Recuentos mínimos y máximos de S.E. en albúminas (\log_{10} UFC)	
	Protocolo 24 h.	Protocolo 48 h.	Protocolo 24 h.	Protocolo 48 h.
1 (S.E.)	9,59 – 9,99	10,26 – 10,82	1,00* – 7,01	1,00* – 5,54
3a (MOI 10^3)	5,04 – 8,35	9,76 – 10,40	1,00* – $\geq 10^{**}$	0,00 – 5,26
3b (MOI 10^4)	1,00* – 8,51	9,81 – 10,41	1,00* – $\geq 10^{**}$	1,00* – 5,84
3c (MOI 10^5)	1,00* – 8,13	10,03 – 10,65	1,00* – 7,30	0,00 – 4,66

*Muestras sin recuentos bacterianos, pero positivas a la bacteriología cualitativa, se les asignó arbitrariamente un valor de 1. **Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Respecto al grupo control de inocuidad de fagos, que sólo recibió la mezcla de bacteriófagos en la concentración más elevada (10^6 UFP), no se aisló S.E., descartando así la posibilidad de contaminación cruzada entre los grupos experimentales. Es importante señalar que a la observación macroscópica de las muestras de yemas, no se observaron cambios físicos, sin embargo, en el caso de las albúminas, estas presentaron una consistencia más líquida, que lo observado en albúminas provenientes de huevos comerciales no experimentales.

En general, tanto en albúminas como en yemas contaminadas y tratadas con fagos, las colonias de S.E. reisladas se presentaron de una morfología diferente a la de la cepa inicialmente inoculada y recuperada en los grupos controles sin terapia. Esta diferencia se tradujo en disminución del tamaño de la colonia y aparente menor producción de ácido sulfídrico (Fotografía N° 2).



Fotografía Nº 2. (a) Colonias típicas de *S.E. nal rif* en placas de agar XLD obtenidas del procesamiento de albúminas del grupo control. (b) Colonias típicas de *S.E. nal rif* en placas de agar XLD obtenidas del procesamiento de albúminas contaminadas y tratadas con fagos (las flechas muestran dos colonias de *S.E.* de menor tamaño).

DISCUSIÓN

Para determinar la efectividad *in vitro* de la mezcla de bacteriófagos sobre *Salmonella* Enteritidis en las matrices alimentarias, yema y albúmina, se estableció una dosis mínima infectante (DMI) de 10^1 UFC en 0,1 mL, que fue inoculada directamente sobre ambas matrices. Esta dosis, que pareciera ser baja, es igual a la utilizada por Gast y Holt (2000), Gast y Holt (2001) y Gürtler y Fehlhaber (2004) en yemas, quienes también lograron un 100% de contaminación de las muestras. En el caso de las albúminas, esta DMI es menor a la utilizada por otros autores, cuyos valores oscilan entre 10^2 a 10^7 UFC/mL (Gast y Holt, 2000; Gast y Holt, 2001; Lu *et al.*, 2003; Clavijo *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Howard *et al.*, 2007 y Gantois *et al.*, 2009a).

Los estudios que han utilizado DMI mayores a la presente (10^1 UFC) han realizado la inoculación de S.E. sobre la membrana perivitelina de yemas intactas usando dosis que variaron desde 10^2 UFC a 10^6 UFC/mL, obteniendo porcentajes de contaminación no superiores a 56,25% (Gast *et al.*, 2005; Murase *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2006; Gast *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2007). La razón de usar DMI elevadas en esos estudios se debió a que al inocular sobre la membrana perivitelina se asume que no todas las bacterias son capaces de llegar al interior de la yema, por lo que fue necesaria una dosis más alta.

En conocimiento de que las DMI para albúmina, en general suelen ser mayores (Gast y Holt, 2000; Gast y Holt, 2001; Lu *et al.*, 2003; Clavijo *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006; Howard *et al.*, 2007 y Gantois *et al.*, 2009a) que aquellas utilizadas para contaminar yemas (Gast y Holt, 2000; Gast y Holt, 2001 y Gürtler y Fehlhaber, 2004), en el presente estudio se decidió mantener la misma DMI para ambas matrices porque se asemeja a la cantidad de bacterias encontradas en huevos naturalmente infectados por *Salmonella* (1 a $2,4 \times 10^2$ UFC/g) (Humphrey *et al.*, 1989; Ohtsuka *et al.*, 2005). El procesamiento de las albúminas contaminadas con bajas dosis consideró la utilización de una etapa de enriquecimiento previo (Rappaport-Vassiliadis a 37 °C por 24 horas) de tal manera de estimular el desarrollo de la bacteria, haciéndola detectable por la metodología de cultivo tradicional. La aplicación de este procedimiento se debió a los resultados de un ensayo preliminar en que se analizaron tres dosis de S.E.

(10^1 , 10^2 y 10^3 UFC/0,1 mL) en albúminas procesadas sin enriquecimiento, no siendo posible reaislar la cepa inoculada. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Gast y Holt (2000) quienes también inocularon albúminas con bajas dosis (10^1 y 10^2 UFC) y procesaron las muestras sin enriquecimiento, no detectando la presencia de S.E. en el caso de la dosis 10^1 UFC y en casi ninguna de las albúminas inoculadas con dosis de 10^2 UFC. De manera similar, otras investigaciones demuestran que S.E. no logra multiplicarse en albúmina cuando las dosis de contaminación son tan bajas, como las analizadas en este estudio, aunque logran mantener la concentración inicialmente inoculada (Gast y Holt, 2001; Murase *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2006). En el presente estudio, probablemente el hecho de no reaislar S.E. de las albúminas contaminadas y procesadas sin enriquecimiento pudo deberse a la sensibilidad de la técnica microbiológica utilizada ($\geq 10^3$ UFC/mL; Borie, 2010¹), de tal manera que para lograr reaislarla sin enriquecimiento sería necesario inocular una cantidad superior de bacterias (10^3 a 10^7 UFC/mL) como lo demuestran los estudios de Gast y Holt (2001), Lu *et al.*, (2003), Clavijo *et al.*, (2006), Kang *et al.*, (2006), Howard *et al.*, (2007) y Gantois *et al.*, (2009a).

Otra posible causa del no reaislamiento de la bacteria en albúminas contaminadas y procesadas sin enriquecimiento pudo deberse a que la actividad bactericida de la albúmina fuera capaz de controlar la pequeña dosis de S.E. inoculada (Orsi, 2004; Sellier *et al.*, 2007; Wellman-Labadie *et al.*, 2008). Esto fue demostrado experimentalmente por Kang *et al.*, (2006), quienes evaluaron el efecto de la concentración inicial de S.E. en su sobrevivencia en muestras de albúmina. Para ello inocularon albúminas con distintas dosis, 10^3 , 10^5 y 10^7 UFC/mL, las incubaron a 37 °C y evaluaron el recuento de bacterias luego de 24 y 48 horas post contaminación. Los recuentos obtenidos con la mayor dosis de S.E. inoculada (10^7 UFC/mL) se elevaron por sobre 10^8 UFC/mL, mientras que no hubo recuentos con la menor dosis (10^3 UFC/mL) luego de 48 horas post contaminación. Por otro lado, la temperatura de incubación (37 °C) también pudo influenciar la actividad bactericida de la albúmina, aumentándola en forma directamente proporcional. Al respecto, Kang *et al.*, (2006), determinaron que al inocular albúminas con 10^3 UFC S.E./mL e incubarlas por 24 y 48 horas a distintas temperaturas (4, 25, 37 y 42 °C), la bacteria mantuvo sus recuentos luego de 24 y 48 horas de

¹ BORIE, C. 2010 [Comunicación Personal]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Laboratorio de Microbiología Veterinaria.

incubación a 4 y 25 °C, en cambio, a 37 °C, los recuentos disminuyeron gradualmente hasta llegar a cero luego de 48 horas de incubación.

En relación a la efectividad de distintas dosis de fagos (MOI 10^3 , 10^4 y 10^5) sobre S.E. en las muestras de **yemas** y **albúminas** analizadas en el protocolo de incubación de 24 horas, la incidencia de contaminación (bacteriología cualitativa) no fue reducida, siendo estas iguales a la de sus respectivos grupos controles de infección (100%). Esta situación ocurrió independiente de las MOI analizadas. En el caso de las **albúminas**, una posible explicación sería la baja dosis de S.E. inoculada (10^1 UFC) que sumada a la actividad bactericida propia de la albúmina (Orsi, 2004; Sellier *et al.*, 2007; Wellman-Labadie *et al.*, 2008) disminuirían la concentración bacteriana, alterando con ello el equilibrio fago/bacteria (MOI) y reduciendo la probabilidad de colisiones efectivas entre ambos (Greer, 2005). En el caso particular de la **yema**, la incapacidad de los fagos para disminuir la incidencia de contaminación podría deberse al alto contenido nutricional que esta proporciona y que contribuye a que S.E. tenga un crecimiento exponencial rápido (Gast y Holt, 2000; Gast y Holt, 2001; Gürtler y Fehlhaber, 2004; Guan *et al.*, 2006). De hecho, esto fue observado en el grupo control de infección (grupo 1) cuyos recuentos se elevaron 8,81 veces en 24 horas a 37 °C (de $1 \log_{10}$ UFC a $9,81 \log_{10}$ UFC). Dado este crecimiento exponencial, es factible que al perderse la relación fago/bacteria, los títulos fágicos no fueran suficientes como para producir una gran cantidad de lisis bacteriana con la consecuente disminución de la contaminación de las yemas; si éste fuese el caso, tal vez lo óptimo hubiese sido utilizar MOI superiores (Goode *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006; Borie *et al.*, 2008a; Bigwood *et al.*, 2009 y Guenther *et al.*, 2009). De todas maneras, estos resultados son similares a los obtenidos en investigaciones internacionales en los que la fagoterapia no ha logrado disminuir la incidencia de algún patógeno, sino más bien han disminuido los recuentos bacterianos en distintas matrices alimentarias. Esto se debería a que los alimentos proporcionan a las bacterias un ambiente favorable para su crecimiento (Leverentz *et al.*, 2001; Modi *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2003; Leverentz *et al.*, 2003; O'Flaherty *et al.*, 2005; Abuladze *et al.*, 2008; Bigwood *et al.*, 2009; Kocharunchitt *et al.*, 2009). Hasta la fecha, son escasas las investigaciones sobre biocontrol con fagos que han logrado la erradicación completa de patógenos desde alimentos contaminados, tal como lo presentado por Carlton *et al.*, (2005) en quesos y Kim *et al.*, (2007) en leche reconstituida.

Aún cuando los fagos no lograron disminuir la incidencia de contaminación en las **yemas**, en el análisis de recuentos bacterianos (bacteriología cuantitativa) en el protocolo de 24 horas, se observó una disminución ($p \leq 0,05$) de aproximadamente $2 \log_{10}$ UFC en los recuentos promedios de los tres grupos tratados con distintas dosis de fagos (MOI 10^3 : $7,49 \log_{10}$ UFC; MOI 10^4 : $7,55 \log_{10}$ UFC y MOI 10^5 : $7,28 \log_{10}$ UFC) en relación al grupo control de infección ($9,81 \log_{10}$ UFC). Si bien no existen estudios publicados que utilicen fagos en huevos para la reducción de algún patógeno, estos resultados se podrían comparar con los obtenidos por Modi *et al.*, (2001), quienes adicionaron un fago lítico en leche cruda y pasteurizada contaminada con 10^4 UFC/mL de S.E., logrando una disminución de 1 a $2 \log_{10}$ UFC luego de 24 horas de incubación en los quesos producidos con estas leches.

Al analizar la disminución de los recuentos en yemas según las distintas dosis de fagos administradas, lo esperable era que a medida en que aumentara la MOI, se obtuvieran mejores resultados, es decir, recuentos más bajos en el grupo tratado con la MOI 10^5 (Goode *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006; Borie *et al.*, 2008a; Bigwood *et al.*, 2009 y Guenther *et al.*, 2009). Esta situación no ocurrió ya que las tres concentraciones estudiadas fueron capaces de reducir los recuentos de S.E. de manera similar ($p \leq 0,05$) (aproximadamente $2 \log_{10}$ UFC). Esto podría atribuirse al alto contenido nutritivo de la yema que favorece un rápido crecimiento exponencial de S.E., hecho observado en el grupo control de infección (sin fagos) que presentó un aumento de $8,81 \log_{10}$ UFC en sólo 24 horas de incubación a 37°C . Este rápido aumento de la concentración bacteriana puede permitir entonces que se pierda la relación fago/bacteria impidiendo observar el efecto del aumento del título de fagos.

En relación a la efectividad de los fagos en **albúminas** analizadas por recuento bacteriano en el protocolo 24 horas, se observó un aumento ($p \leq 0,05$) en los recuentos promedios de los grupos tratados con una MOI de 10^3 ($5,47 \log_{10}$ UFC) y 10^4 ($4,62 \log_{10}$ UFC) en relación al grupo control de infección ($3,07 \log_{10}$ UFC) y al grupo tratado con una MOI de 10^5 ($4,49 \log_{10}$ UFC). Estos inesperados resultados podrían deberse a varios factores, uno de ellos sería la posible presencia de bacterias resistentes a los fagos inoculados. Éste fenómeno está descrito por varios autores tanto *in vitro*, *in vivo* (animales) como en alimentos (Greer y Dilts, 2002; O'Flynn *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Robeson *et al.*, 2008), sin embargo se ha demostrado que la resistencia

disminuye cuando se utilizan mezclas de fagos (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Tanji *et al.*, 2004; Hagens y Loessner, 2007); por esta razón en la presente investigación se utilizó una mezcla de tres bacteriófagos. Tanji *et al.*, (2004) demostraron *in vitro* que el uso de dos fagos por separado favorecen la aparición de bacterias resistentes en pocas horas (6 horas), sin embargo, al usarlos juntos, la aparición de bacterias resistentes a ambos fagos es más tardía (30 horas). Si bien en el presente estudio no se corroboró la resistencia de las bacterias reaisladas de las muestras, se debe considerar que la suspensión madre de S.E. fue la misma que se utilizó para contaminar yemas en donde los fagos lograron reducir significativamente ($p \leq 0,05$) el recuento bacteriano, hecho que descartaría la posibilidad de haber utilizado una suspensión madre con alto porcentaje de S.E. resistentes a los fagos.

El aumento de los recuentos bacterianos ocurridos en albúminas tratadas con fagos, no así en yemas, permite suponer que el factor matriz juega un rol fundamental en la efectividad de ellos. Se sabe que la albúmina, a diferencia de la yema, presenta proteínas con propiedades antimicrobianas, tales como la cistatina, lisozima, ovoalbúmina, ovomacroglobulina, ovotransferrina y la lactoferrina (Saxena y Tayyab, 1997; Orsi, 2004; Wesierska *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006; Sellier *et al.*, 2007; Wellman-Labadie *et al.*, 2008). La lactoferrina, es capaz de dañar el lipopolisacárido (LPS) presente en la pared celular de bacterias Gram (-), disminuyendo con ello su virulencia, pero sin ser letal para éstas (Orsi, 2004). El LPS es uno de los posibles receptores bacterianos para fagos, por tanto es factible que al dañar el LPS de S.E. se altere el receptor de fagos impidiendo con ello la actividad lítica sobre la bacteria. Así fue demostrado por Kawaura *et al.*, (2000), quienes señalan que el bacteriófago ØX174 reconoce el LPS de algunas cepas de *E. coli* y *S. Typhimurium* y que si éste se pierde, la bacteria se hace resistente a dicho fago. Éste fenómeno también fue observado por Santander y Robeson, (2007) quienes detectaron *in vitro* la aparición de cepas de S.E. mutantes resistentes a fagos debido a cambios en la superficie bacteriana (LPS), específicamente por la pérdida del polisacárido O (PS-O), que es utilizado por los fagos para reconocer y adherirse a la bacteria.

Otro factor que pudo haber contribuido al aumento de los recuentos bacterianos en albúminas es la escasa o nula colisión entre fagos y bacterias debido a la baja concentración bacteriana tanto en el inóculo inicial ($1 \log_{10}$ UFC), como al cabo de 24 horas de incubación a 37°C ($3,07 \log_{10}$ UFC). Greer, (2005) describe que es necesario una concentración inicial mínima de células bacterianas para que se produzcan colisiones con los fagos de manera eficiente, señalando que se requieren 3 a $5 \log_{10}$ UFC en alimentos para que esto ocurra. Por lo general, las investigaciones que evalúan el efecto de fagos en alimentos utilizan dosis bacterianas que van desde 3 a $8 \log_{10}$ UFC (Leverentz *et al.*, 2001; Modi *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2003; Leverentz *et al.*, 2003; Bigwood *et al.*, 2008; Guenther *et al.*, 2009; Kocharunchitt *et al.*, 2009). La viscosidad que presenta la albúmina también pudo haber influido en la escasa o nula colisión fago/bacteria, ya que podría otorgar una protección física a las bacterias ante la acción de los fagos de manera similar a lo observado por O'Flaherty *et al.*, (2005) en fagoterapias contra *Staphylococcus aureus* en leche cruda bovina. Adicionalmente, las colisiones podrían declinar aún más si la homogeneización de las muestras contaminadas al momento de la administración de los fagos no ha sido exhaustiva. En el presente estudio no se pudo utilizar el equipo triturador y homogeneizador ("Stomacher") ya que numerosas bolsas se rompieron con su uso, por ello, se realizó homogeneización manual, que evidentemente no es tan eficiente.

En relación a la efectividad de los fagos de acuerdo a las MOI dosificadas en albúminas en el protocolo de 24 horas, no hubo diferencias ($p > 0,05$) entre los tres grupos (MOI 10^3 , 10^4 y 10^5), mientras que lo esperable era que la MOI más alta (10^5) originara recuentos bacterianos más bajos (Goode *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006; Borie *et al.*, 2008a; Bigwood *et al.*, 2009 y Guenther *et al.*, 2009). A la luz de estos resultados pareciera ser que el equilibrio fagos/bacterias en albúminas no sigue los parámetros teóricos esperados para un alimento, por lo que se requieren más estudios para determinar la actividad de los bacteriófagos en albúmina.

Uno de los objetivos del presente estudio fue determinar si el aumentar el tiempo efectivo de colisiones entre los fagos y S.E. era un factor que mejorase la efectividad. Para ello se realizó un estudio con 48 horas de incubación (protocolo de 48 horas) determinando incidencia y recuentos bacterianos de igual manera que para el protocolo de 24 horas. La incidencia de contaminación en **yemas** no fue diferente a lo observado a las 24 horas ya que todos los grupos presentaron un 100% de contaminación. Al igual que lo señalado para las 24 horas, esto se debería al rápido crecimiento exponencial de S.E. producto del alto contenido nutricional que la yema proporciona (Gast y Holt, 2000; Gast y Holt, 2001; Gürtler y Fehlhaber, 2004; Guan *et al.*, 2006). Es importante destacar que el recuento promedio de S.E. en el grupo control del protocolo de 48 horas ($10,36 \log_{10}$ UFC) fue levemente superior al grupo control del protocolo de 24 horas ($9,81 \log_{10}$ UFC) a pesar de tener el doble de tiempo de incubación a 37 °C. En el caso de las **albúminas**, a las 48 horas se observó una disminución ($p \leq 0,05$) de 32% en la incidencia de contaminación del grupo que recibió la MOI más alta (10^5) en relación al grupo control de infección (100%). En los otros dos grupos (MOI 10^3 y 10^4) no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con el grupo control. Estos resultados permiten suponer que en la matriz albúmina es necesario trabajar con elevadas MOI y también aumentar el tiempo efectivo de colisiones para observar algún efecto sobre la incidencia de contaminación, a diferencia de la yema. Es probable que si se aumentara más la MOI ($> a 10^5$), el efecto habría sido mejor aún.

La disminución de la incidencia en albúminas, lograda con la MOI 10^5 , probablemente se deba a que la matriz no representa un medio altamente nutritivo que permita a S.E. replicarse (Gast y Holt, 2000, Kang *et al.*, 2006), y por ende, pasado 48 horas la bacteria no lograría mantenerse en número (Kang *et al.*, 2006). En efecto, en este estudio se observó que a las 24 horas en los grupos controles, S.E. en albúminas aumenta sólo $2,07 \log_{10}$ UFC al contrario de lo que ocurre en yemas que aumenta en $8,81 \log_{10}$ UFC. A las 48 horas de incubación en albúminas, el aumento es de aproximadamente $0,5 \log_{10}$ UFC ($2,07$ a $2,55 \log_{10}$ UFC) mientras que en yemas aumenta aproximadamente $1 \log_{10}$ UFC ($8,81$ a $9,56 \log_{10}$ UFC). La actividad bactericida de la albúmina (Orsi, 2004; Sellier *et al.*, 2007; Wellman-Labadie *et al.*, 2008) y la acción propia de los fagos, serían factores adicionales que permiten explicar la disminución de la contaminación en esta matriz. Parece interesante destacar que los fagos utilizados en este estudio logran mantener su título y actividad lítica luego de 144 horas de incubación

en albúminas de huevos SPF (Valencia *et al.*, 2009), lo que permite inferir que en muestras de albúminas contaminadas con S.E., los fagos permanecerán activos, al menos, hasta las 48 horas de incubación.

Para descartar la posibilidad de que el no reaislar S.E. en albúminas fuese debido a una baja sensibilidad de la técnica empleada ($\leq 10^3$ UFC/mL; Borie 2010²) y no por efecto de los fagos, todas las muestras negativas fueron sometidas a PCR, no detectando genoma de S.E. en dichas muestras.

En relación a la bacteriología cuantitativa en el protocolo de 48 horas, en **yemas** hubo una disminución ($p \leq 0,05$) de los recuentos en los tres grupos tratados (MOI 10^3 : $10,08 \log_{10}$ UFC; MOI 10^4 : $10,21 \log_{10}$ UFC y MOI 10^5 : $10,31 \log_{10}$ UFC) en comparación con el grupo control de infección ($10,56 \log_{10}$ UFC). Esta reducción también se observó a las 24 horas de incubación demostrando con ello que la mezcla de fagos mantiene su efectividad al menos hasta 48 horas. A diferencia de lo sucedido en el protocolo de 24 horas, la disminución de los recuentos bacterianos fue dosis dependiente, donde el grupo que recibió la MOI 10^3 logró una mayor reducción ($p \leq 0,05$), mientras que lo esperado era que el grupo que recibió una concentración más alta de fagos (MOI 10^5) obtuviese recuentos de S.E. más bajos (Goode *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006; Borie *et al.*, 2008a; Bigwood *et al.*, 2009 y Guenther *et al.*, 2009).

En **albúminas**, al aumentar el tiempo de incubación a 48 horas, los recuentos bacterianos de los grupos tratados fueron menores ($p \leq 0,05$) con las MOI 10^3 ($2,20 \log_{10}$ UFC) y 10^5 ($1,74 \log_{10}$ UFC) en relación al control de infección ($3,55 \log_{10}$ UFC), y al grupo tratado con una MOI 10^4 ($3,00 \log_{10}$ UFC), cuando lo esperado era que a medida que aumentara la MOI, menores fueran los recuentos (Goode *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2006; Borie *et al.*, 2008a; Bigwood *et al.*, 2009 y Guenther *et al.*, 2009).

² BORIE, C. 2010 [Comunicación Personal]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Laboratorio de Microbiología Veterinaria.

Independiente de las dosis de fagos administradas, si se comparan ambos protocolos de incubación en **yemas**, los recuentos bacterianos siempre fueron menores ($p \leq 0,05$) en todos los grupos experimentales a las 24 horas de incubación, aunque lo esperado era que los recuentos fuesen más bajos en el protocolo de incubación de 48 horas ya que los fagos tendrían más tiempo para producir colisiones efectivas con las bacterias. Esto ha sido señalado en diversos trabajos que evalúan el tiempo de acción de los fagos, concluyendo que a mayor tiempo de acción menores recuentos de bacterias (Modi *et al.*, 2001; Leverentz *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; Guenther *et al.*, 2009). Pese a lo anterior, se debe considerar que existe un tiempo efectivo de acción de los fagos, por lo que pasado el cual, los recuentos bacterianos vuelven a aumentar, lo que coincide con lo sucedido en esta investigación (Leverentz *et al.*, 2001; Carlton *et al.*, 2005; O'Flaherty *et al.*, 2005; Guenther *et al.*, 2009).

Al comparar los recuentos de S.E. en **albúminas** entre los dos protocolos de incubación, tal como se esperaba todos los grupos tratados con fagos e incubados por 48 horas tuvieron recuentos menores ($p \leq 0,05$) que los incubados por 24 horas. Es factible que esta diferencia no sólo se deba a que el mayor tiempo de incubación favoreció la colisión entre fagos y bacterias, sino también a que el medio restrictivo e inhibidor de la albúmina limita el crecimiento de la bacteria (Orsi, 2004; Sellier *et al.*, 2007; Wellman-Labadie *et al.*, 2008). Si bien es cierto, el efecto de la lactoferrina pudo haber inducido inicialmente la aparición de bacterias resistentes por la pérdida de sus receptores (LPS), es factible también que los otros inhibidores presentes en la albúmina ejercieran una actividad bactericida contra las bacterias resistentes que no fueron lisadas por los fagos.

Es importante señalar que, al igual que lo observado por Robeson (2010³), en los grupos tratados con fagos se apreció un cambio en la consistencia de las albúminas, que se tradujeron en una albúmina más líquida, a diferencia de la consistencia normal de las albúminas de los grupos controles que no recibieron tratamiento. Estudios internacionales que utilizan fagos como biocontrol en alimentos no describen cambios físicos o químicos (Leverentz *et al.*, 2001; Modi *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2003; Leverentz *et al.*, 2003; Carlton *et al.*, 2005; O'Flaherty *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Abuladze *et al.*, 2008; Bigwood *et al.*, 2008).

³ ROBESON, J. 2010 [Comunicación Personal]. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Instituto de Biología.

De acuerdo a los resultados del reisolamiento y titulación de fagos informados por la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Robeson, 2010⁴), en todas las muestras, independiente de la dosis de fagos y del protocolo de incubación, se lograron detectar fagos. El grupo que sólo recibió fagos presentó un título promedio de 5,75 UFP/mL de albúmina y 5,55 UFP/mL de yema a las 24 horas, mientras que en los grupos que recibieron la bacteria y la terapia, los títulos de fagos fueron mayores a 9,77 UFP/mL, demostrando así que los virus se replicaron en su bacteria blanco (Anexo N° 1 a, b, c y d). En el grupo control de contaminación, en ambas matrices, no fue posible reaislar el fago, lo que descarta una posible contaminación de las muestras procesadas.

Es importante recordar que durante el transcurso de la experiencia, las colonias de S.E. aisladas desde las muestras tratadas con fagos, presentaron diferencias macroscópicas (menor tamaño y menor producción de ácido sulfhídrico), en comparación con las colonias aisladas desde los grupos controles de infección. Al respecto, O'Flynn *et al.*, (2004), también observaron que colonias de *E. coli* presentaron una morfología diferente en comparación con la cepa parental, resultando ser resistentes a una mezcla de fagos. Dado que en este estudio no se corroboró la presencia de S.E. resistentes, sería interesante investigar si estos cambios visuales también se traducen en cambios funcionales como resistencia de la bacteria hacia los fagos o cambios en la patogenicidad, entre otros.

Finalmente, los resultados generales obtenidos en esta investigación, permiten pensar que el biocontrol con fagos líticos podrían ser una herramienta eficaz en el control de este patógeno en huevos destinados a consumo humano, sin embargo se requieren más estudios que avalen esta posibilidad.

⁴ ROBESON, J. 2010 [Comunicación Personal]. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Instituto de Biología.

CONCLUSIONES

1. Se logra contaminar la totalidad de yemas y albúminas con 10^1 UFC de S.E. *nal rif*.
2. La administración de una mezcla de tres bacteriófagos en distintas proporciones (MOI 10^3 , 10^4 y 10^5) no reduce el porcentaje de contaminación (incidencia) en yemas ni albúminas inoculadas con S.E. a las 24 horas de incubación.
3. La mezcla de tres bacteriófagos reduce los recuentos de S.E. en yemas contaminadas e incubadas por 24 horas, independiente de las dosis administradas (MOI 10^3 , 10^4 y 10^5), mientras que en albúminas no se observó tal efecto.
4. La utilización de un tiempo de incubación de 48 horas no cambia la incidencia de contaminación en las yemas, sin embargo en albúminas la disminuye sólo cuando se usa la MOI más elevada.
5. El aumento del tiempo de incubación si bien permite la disminución de los recuentos bacterianos en yemas y albúminas, es mucho más evidente en esta última.
6. La aplicación de esta mezcla de bacteriófagos produce un cambio en la viscosidad de la albúmina.

BIBLIOGRAFÍA

ABULADZE, T.; LI, M.; MENETREZ, M.; DEAN, T.; SENEAL, A.; SULAKVELIDZE, A. 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. Applied and Environmental Microbiology. 74(20): 6230 – 6238.

ALEXANDRE, M.; POZO, C.; GONZÁLEZ, V.; MARTÍNEZ, M.; PRAT, S. 2000. Detección de *Salmonella* Enteritidis en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. Revista Médica de Chile. 128(10): 1075 – 1083.

ASOHUEVO. ASOCIACIÓN DE PRODUCTORES DE HUEVO. 2009. Inician campaña pro huevo [consulta en línea]. <<http://www.asohuevo.cl/consumidores/noticias/noticia.php?id=96>> [consulta: 11 enero 2010].

ATTERBURY, R.; VAN BERGEN, M.; ORTIZ, F.; LOVELL, M.; HARRIS, J.; DE BOER, A.; WAGENAAR, J.; ALLEN, V.; BARROW, P. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology. 73(14): 4543 – 4549.

BIGWOOD, T.; HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; HEINEMANN, J. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. Food Microbiology. 25(2): 400 – 406.

BIGWOOD, T.; HUDSON, J.; BILLINGTON, C. 2009. Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages. Federation of European Microbiological Societies Letters. 291(1): 59 – 64.

BOHEZ, L.; GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; DEWULF, J.; HAESBROUCK, F.; VAN IMMERSSEEL, F. 2008. The *Salmonella* pathogenicity island 2 regulator *ssrA* promotes reproductive tract but not intestinal colonization in chickens. Veterinary Microbiology. 126(1–3): 216 – 224.

BORIE, C.; ZURITA, P.; SÁNCHEZ, M.L.; ROJAS, V.; SANTANDER, J.; ROBESON, J. 2008a. Prevención de la infección por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) en pollos mediante un bacteriófago. Archivos de Medicina Veterinaria 40(2): 197 – 201.

BORIE, C.; ALBALA, I.; SÁNCHEZ, P.; SÁNCHEZ, M.L.; RAMÍREZ, S.; NAVARRO, C.; MORALES, M.A.; RETAMALES, J.; ROBESON, J. 2008b. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. Avian Diseases 52(1): 64 – 67.

BORIE, C.; SÁNCHEZ, M.L.; NAVARRO, C.; RAMÍREZ, S.; MORALES, M.A.; RETAMALES, J.; ROBESON, J. 2009. Aerosol spray treatment with bacteriophages and competitive exclusion reduces *Salmonella* Enteritidis infection in chickens. Avian Diseases. 53(2): 250 – 254.

BRADEN, C. 2006. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. Clinical Infectious Diseases. 43(4): 512 – 517.

BRUTTIN, A.; BRÜSSOW, H. 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* Phage T4 orally: a safety test of phage therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(7): 2874 – 2878.

CALLAWAY, T.; EDRINGTON, T.; ANDERSON, R.; BYRD, J.; NISBET, D. 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. Journal of Animal Science. 86(14 Suppl): E163 – E172.

CARLTON, R.; NOORDMAN, W.; BISWAS, B.; DE MEESTER, E.; LOESSNER, M. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 43(3): 301 – 312.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. 2009. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 128(1 – 3): 53 – 59.

CLAVIJO, R.; LOUI, C.; ANDERSEN, G.; RILEY, L.; LU, S. 2006. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(2): 1055 – 1064.

DABROWSKA, K.; SWITALA-JELEN, K.; OPOLSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.; GORSKI, A. 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*. 98(1): 7 – 13.

DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. 2004a. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology*. 97(2): 233 – 245.

DE BUCK, J.; PASMANS, F.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. 2004b. Tubular glands of the isthmus are the predominant colonization site of *Salmonella* Enteritidis in the upper oviduct of laying hens. *Poultry Science*. 83(3): 352 – 358.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRIKX, M.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*. 112(3): 253 – 260.

DI GIOVINE, M.; SALONE, B.; MARTINA, Y.; AMATI, V.; ZAMBRUNO, G.; CUNDARI, E.; FAILLA, C.; SAGGIO, I. 2001. Binding properties, cell delivery, and gene transfer of adenoviral penton base displaying bacteriophage. *Virology*. 282(1): 102 – 112.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2006. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption; bacteriophage preparation. *Federal Register* 62: 18939 – 18964.

FIGUEROA, I.; VERDUGO, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1-2): 24 – 42.

FIGUEROA, J. 2007. Descripción y análisis de las acciones realizadas por los servicios públicos (salud animal y salud pública), frente a salmonelosis humana. Memoria Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 98 p.

FILHO, R.; HIGGINS, J.; HIGGINS, S.; GAONA, G.; WOLFENDEN, A.; TELLEZ, G.; HARGIS, B. 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. Poultry Science. 86(9): 1904 – 1909.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.; BARIONI, W. 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. Avian Pathology. 34(3): 258 – 263.

GANTOIS, I.; EECKHAUT, V.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. 2008. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. Avian Pathology. 37(4): 399 – 406.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. 2009a. The *Salmonella* Enteritidis lipopolysaccharide biosynthesis gene *rfbH* is required for survival in egg albumen. Zoonoses and Public Health. 56(3): 145 – 149.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T. J.; VAN IMMERSEEL, F. 2009b. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiology Reviews. 33(4): 718 – 738.

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.

GAST, R.; HOLT, P. 2000. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. Poultry Science. 79(4): 559 – 563.

GAST, R.; HOLT, P. 2001. Multiplication in egg yolk and survival in egg albumen of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains of phage types 4, 8, 13a, and 14b. Journal of Food Protection. 64(6): 865 – 868.

GAST, R.; GUARD-PETTER, J; HOLT, P. 2003. Effect of prior serial *in vivo* passage on the frequency of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs from experimentally infected laying hens. Avian Diseases. 47(3): 633 – 639.

GAST, R.; GUARD-BOULDIN, J; HOLT, P. 2004. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis. Avian Diseases. 48(4): 863 – 869.

GAST, R.; HOLT, P.; MURASE, T. 2005. Penetration of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg into egg yolks in an in vitro contamination model. Poultry Science. 84(4): 621 – 625.

GAST, R.; GURAYA, R.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P. 2007. In vitro penetration of egg yolks by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg strains during thirty-six-hour ambient temperature storage. Poultry Science. 86(7): 1431 – 1435.

GOODE, D.; ALLEN, V.; BARROW, P. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology. 69(8): 5032 – 5036.

GREER, G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. Journal of Food Protection. 68(5): 1102 – 1111.

GREER, G.; DILTS, B. 2002. Control of brochothrix thermosphacta spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages. Journal of Food Protection. 65(5): 861 – 863.

GREIG, J.; RAVEL, A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. International Journal of Food Microbiology. 130(2): 77-87.

GUAN, J.; GRENIER, C.; BROOKS, B. 2006. In vitro study of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium definitive type 104: survival in egg albumen and penetration through the vitelline membrane. *Poultry Science*. 85(9): 1678 – 1681.

GUARD-PETTER, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environmental Microbiology*. 3(7): 421 - 430

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.

GÜRTLER, M.; FEHLHABER, K. 2004. Growth of *Salmonella* Enteritidis in yolk from eggs laid by immunized hens. *International Journal of Food Microbiology*. 90(1): 107 – 113.

HAGENS, S.; LOESSNER, M. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(3): 513 – 519.

HAUVA, C. 2009. Bacteriófagos: profilaxis en gallinas comerciales de postura infectadas experimentalmente con *Salmonella* Enteritidis. Memoria Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 58 p.

HIGGINS, J.; HIGGINS, S.; GUENTHER, K.; HUFF, W.; DONOGHUE, A.; DONOGHUE, D.; HARGIS, B. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*. 84(7): 1141 – 1145.

HOWARD, Z.; MOORE, R.; ZABALA DIAZ, I.; KIM, W.; BIRKHOOLD, S.; BYRD, J.; KUBENA, L.; NISBET, D.; RICKE, S. 2007. Inoculation of a poultry isolate *Salmonella* Enteritidis on egg vitelline membrane: survival and growth in egg components after different refrigeration storage times. *American Journal of Agricultural and Biological Science*. 2(2): 123 – 129.

HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; DONOGHUE, A. 2006. Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poultry Science*. 85(8): 1373 – 1377.

HUMPHREY, T.; BASKERVILLE, A; MAWER, S.; ROWE, B.; HOPPER, S. 1989. *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from the contents of intact eggs: a study involving naturally infected hens. *Epidemiology and Infection*. 103(3): 415 – 423.

HUMPHREY, T.; WHITEHEAD, A.; GAWLER, A.; HENLEY, A.; ROWE, B. 1991. Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiology and Infection*. 106(3): 489 – 496.

INE. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. 2004. Consumo de carnes hacia un nuevo registro histórico [en línea].
<http://www.ine.cl/canales/sala_prensa/noticias/2004/nov/not051104.php> [consulta: 11 enero 2010].

INFOSTAT. 2004. InfoStat, versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat. FCA. Universidad de Córdoba. 1 ed. Editorial Brujas. Argentina. 314 pp.

KANG, H.; LOUI, C.; CLAVIJO, R. ; RILEY, L.; LU, S. 2006. Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Epidemiology and Infection*. 134(5): 967 – 976.

KAWAURA, T.; INAGAKI, M.; KARITA, S.; KATO, M.; NISHIKAWA, S.; KASHIMURA, N. 2000. Recognition of receptor lipopolysaccharides by spike G protein of bacteriophage ØX174. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 64(9): 1993 – 1997.

KELLER, L.; BENSON, C.; KROTEK, K.; ECKROADE, R. 1995. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*. 63(7): 2443 – 2449.

KIM, K.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M. 2007. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. International Journal of Food Microbiology. 115(2): 195 – 203.

KINDE, H.; SHIVAPRASAD, H.; DAFT, B.; READ, D.; ARDANS, A.; BREITMEYER, R.; RAJASHEKARA, G.; NAGARAJA, K.; GARDNER, I. 2000. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella Enteritidis*, phage type 4. Avian Diseases 44(2): 239 – 248.

KOCHARUNCHITT, C.; ROSS, T.; McNEIL, D. 2009. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control *Salmonella* associated with seed sprouts. International Journal of Food Microbiology. 128(3): 453 – 459.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W.; FUCHS, Y.; CAMP, M.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. Journal of Food Protection. 64(8): 1116 – 1121.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.; CAMP, M.; JANISIEWICZ, W.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. Applied and Environmental Microbiology. 69(8): 4519 – 4526.

LU, S.; KILLORAN, P.; RILEY, L. 2003. Association of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *yafD* with resistance to chicken egg albumen. Infection and Immunity. 71(12): 6734 – 6741.

MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. 2005a. Eggshell penetration by *Salmonella*: a review. World's Poultry Science Journal. 61: 71 – 85.

MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. 2005b. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. British Poultry Science. 46(6): 694 – 700.

MODI, R.; HIRVI, Y.; HILL, A.; GRIFFITHS, M. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*. 64(7): 927 – 933.

MURASE, T.; HOLT, P.; GAST, R. 2005. Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in albumen and yolk contents of eggs inoculated with this organism onto the vitelline membrane. *Journal of Food Protection*. 68(4): 718 – 721.

MURRAY, C.; BARTON, M. 1993. Salmonellosis bacteriology. *In*: Corner, L. and Bagust, T. (Eds). *Australian Standard Diagnostic Techniques For Animal Diseases*. Australia. Pp. 3 – 8.

O'FLAHERTY, S.; COFFEY, A.; MEANEY, W.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. 2005. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in Applied Microbiology*. 41(3): 274 – 279.

O'FLYNN, G.; ROSS, R.; FITZGERALD, G.; COFFEY, A. 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *American Society for Microbiology*. 70(6): 3417 – 3424.

OHL, M.; MILLER, S. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*. 52: 259 – 274.

OHTSUKA, K.; YANAGAWA, K.; TAKATORI, K.; HARA-KUDO, Y. 2005. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11): 6730 – 6735.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. 2001a. Differences among six *Salmonella* Serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*. 45(1): 61 – 69.

OKAMURA, M.; MIYAMOTO, T.; KAMIJIMA, Y.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. 2001b. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and *in vitro* adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* Serovars. *Avian Diseases*. 45(4): 962 – 971.

OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H.; RAYBOURNE, R.; BABU, U.; HECKERT, R.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E.; LILLEHOJ, E. 2005. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 107(3 – 4): 327 – 335.

ORSI, N. 2004. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals: an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*. 17(3): 189 – 196.

PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, M.; HENAO, S.; CARDONA-CASTRO, N. 2008. Estandarización y evaluación de dos pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en huevos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 40(3): 235 – 342.

POPPE, C.; JOHNSON, R.; FORSBERG, C.; IRWIN, J. 1992. *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 56(3): 226 – 232.

PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J.; ALEXANDRE, M.; HEITMANN, I. 2001. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 9(1): 7 – 12.

QUIROGA, J. 2009. Fagoterapia preventiva como biocontrol de *Salmonella* Enteritidis en gallinas de postura experimentalmente infectadas. Memoria Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 81 p.

RAYA, R.; VAREY, P.; OOT, R.; DYEN, M.; CALLAWAY, T.; EDRINGTON, T.; KUTTER, E.; BRABBAN, A. 2006. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(9): 6405 – 6410.

RICHMOND, J.; McKINNEY, R. 1999. Section II: principles of biosafety. *In*: Centers for disease control and prevention, CDC. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 4^a ed. U.S. Government printing office. Washington, United States. Pp. 8 – 16.

ROBESON, J.; RETAMALES, J.; BORIE, C. 2008. Genomic variants of bacteriophages against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with potential application in the poultry industry. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 10(3): 173 – 178.

SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2000. Planteles avícolas de postura bajo control oficial (PABCO) [consulta en línea]. <<http://beta1.indap.cl/Docs/Documentos/Plan%20Ganadero/Aves/PABCO%20POSTURA.pdf>> [consulta: 15 diciembre 2009].

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 Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 69 p.

SANTANDER, J.; ROBESON, J. 2007. Phage-resistance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and pathogenesis in *Caenorhabditis elegans* is mediated by the lipopolysaccharide. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10(4): 627 – 632.

SAXENA, I.; TAYYAB, S. 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 53(1): 13 – 23.

SELLIER, N.; VIDAL, M.; BARON, F.; MICHEL, J.; GAUTRON, J.; PROTAIS, M.; BEAUMONT, C.; GAUTIER, M.; NYS, Y. 2007. Estimations of repeatability and heritability of egg albumen antimicrobial activity and of lysozyme and ovotransferrin concentrations. *British Poultry Science*. 48(5): 559 – 566.

SHENG, H.; KNECHT, H.; KUDVA, I.; HOVDE, C. 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* 72(8): 5359 – 5366.

SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(3): 649 – 659.

TANJI, Y.; SHIMADA, T.; YOICHI, M.; MIYANAGA, K.; HORI, K.; UNNO, H. 2004. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64(2): 270 – 274.

TENNANT, S.; HARTLAND, E.; PHUMOONNA, T.; LYRAS, D.; ROOD, J.; ROBINS-BROWNE, R.; VAN DRIEL, I. 2008. Influence of gastric acid on susceptibility to infection with ingested bacterial pathogens. *Infection and Immunity*. 76(2): 639 – 645.

TORO, H.; PRICE, S.; McKEE, A.; HOERR, F.; KREHLING, J.; PERDUE, M.; BAUERMEISTER, L. 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Diseases*. 49(1): 118 – 124.

VALENCIA, M.; RETAMALES, J.; BORIE, C.; ROBESON, J. 2009. Persistencia de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en huevos de gallina. *In: XXXI Congreso Chileno de Microbiología*. Santa Cruz, Chile. 1 – 4 diciembre 2009. P-143.

WELLMAN-LABADIE, O.; PICMAN, J.; HINCKE, M. 2008. Comparative antibacterial activity of avian egg white protein extracts. *British Poultry Science*. 49(2): 125 – 132.

WESIERSKA, E.; SALEH, Y.; TRZISZKA, T.; KOPEC, W.; SIEWINSKI, M.; KORZEKWA, K. 2005. Antimicrobial activity of chicken egg white cystatin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21(1): 59 – 64.

XIE, H.; ZHUANG, X.; KONG, J.; MA, G.; ZHANG, H. 2005. Bacteriophage Esc-A is an efficient therapy for *Escherichia coli* 3-1 caused diarrhea in chickens. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 51(3): 159 – 163.

ANEXO Nº 1 a) Recuentos de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC/mL) y Bacteriófagos (\log_{10} UFP/mL), en yemas en grupos controles y tratados con distintas MOI, protocolo de incubación 24 horas.

GRUPO	YEMA	S.E. \log_{10} UFC/mL	FAGOS \log_{10} UFP/mL
1	1	8,98	N.D.
1	2	8,94	N.D.
1	3	8,85	N.D.
1	4	8,67	N.D.
1	5	8,90	N.D.
1	6	8,77	N.D.
1	7	8,95	N.D.
1	8	8,81	N.D.
1	9	8,77	N.D.
1	10	8,84	N.D.
1	11	8,83	N.D.
1	12	8,82	N.D.
1	13	8,76	N.D.
1	14	8,78	N.D.
1	15	8,90	N.D.
1	16	8,96	N.D.
1	17	8,77	N.D.
1	18	8,70	N.D.
1	19	8,78	N.D.
1	20	8,69	N.D.
1	21	8,73	N.D.
1	22	8,91	N.D.
1	23	8,59	N.D.
1	24	8,68	N.D.
1	25	8,80	N.D.
2	1	N.D.	5,30
2	2	N.D.	5,30
2	3	N.D.	5,60
2	4	N.D.	5,78
2	5	N.D.	5,78
2	6	N.D.	5,60
2	7	N.D.	5,60
2	8	N.D.	5,60
2	9	N.D.	5,30
2	10	N.D.	5,30
2	11	N.D.	5,30
2	12	N.D.	5,60
2	13	N.D.	5,60
2	14	N.D.	5,60
2	15	N.D.	5,90

N.D.: No detectado.

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 1: sólo S.E.

Grupo 2: sólo Bacteriófagos (10^6 UFP).

GRUPO	YEMA	S.E. log ₁₀ UFC/mL	FAGOS log ₁₀ UFP/mL
3a	1	7,11	10,30
3a	2	7,06	10,60
3a	3	7,20	10,78
3a	4	6,92	10,90
3a	5	7,14	10,00
3a	6	6,95	11,08
3a	7	4,93	11,15
3a	8	6,74	11,20
3a	9	6,81	11,26
3a	10	7,34	11,30
3a	11	6,87	11,34
3a	12	6,92	11,38
3a	13	6,25	11,41
3a	14	6,68	11,45
3a	15	6,14	11,48
3a	16	6,36	11,51
3a	17	6,39	11,53
3a	18	6,27	11,56
3a	19	4,04	11,58
3a	20	5,95	11,60
3a	21	6,30	11,62
3a	22	6,20	11,64
3a	23	6,71	11,66
3a	24	6,57	11,68
3a	25	6,27	11,70
3b	1	7,30	11,97
3b	2	7,20	11,56
3b	3	7,00	12,21
3b	4	6,90	11,63
3b	5	6,97	11,93
3b	6	6,88	11,79
3b	7	6,74	11,85
3b	8	6,78	12,30
3b	9	7,04	11,90
3b	10	6,30	11,23
3b	11	6,74	11,96
3b	12	6,71	11,74
3b	13	0,00	12,17
3b	14	6,50	12,39
3b	15	6,65	12,18
3b	16	6,98	11,91
3b	17	6,77	11,72
3b	18	6,69	12,07
3b	19	6,69	11,85
3b	20	6,36	11,79
3b	21	6,53	11,74
3b	22	6,55	12,11
3b	23	7,50	11,40
3b	24	7,09	11,93
3b	25	6,79	12,04

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 3a: MOI 10³.

Grupo 3b: MOI 10⁴.

GRUPO	YEMA	S.E. log ₁₀ UFC/mL	FAGOS log ₁₀ UFP/mL
3c	1	6,78	11,04
3c	2	6,23	11,34
3c	3	6,30	11,08
3c	4	6,43	11,87
3c	5	6,67	11,75
3c	6	0,00	11,78
3c	7	6,36	11,70
3c	8	5,69	11,00
3c	9	7,04	11,83
3c	10	6,07	11,83
3c	11	6,14	11,30
3c	12	6,49	10,90
3c	13	6,07	11,20
3c	14	6,50	11,63
3c	15	6,47	11,36
3c	16	7,04	11,36
3c	17	6,89	11,75
3c	18	6,23	11,48
3c	19	6,76	11,66
3c	20	6,23	10,95
3c	21	6,88	11,65
3c	22	6,50	11,30
3c	23	7,13	11,62
3c	24	7,11	11,64
3c	25	6,96	11,61

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.
Grupo 3c: MOI 10⁵.

b) Recuentos de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC/mL) y Bacteriófagos (\log_{10} UFP/mL), en albúminas en grupos controles y tratados con distintas MOI, protocolo de incubación 24 horas.

GRUPO	ALBÚMINA	S.E. \log_{10} UFC/mL	FAGOS \log_{10} UFP/mL
1	1	1,30	N.D.
1	2	2,38	N.D.
1	3	2,56	N.D.
1	4	2,54	N.D.
1	5	2,54	N.D.
1	6	3,79	N.D.
1	7	1,30	N.D.
1	8	2,57	N.D.
1	9	1,30	N.D.
1	10	0,00	N.D.
1	11	3,39	N.D.
1	12	2,47	N.D.
1	13	2,94	N.D.
1	14	0,00	N.D.
1	15	6,00	N.D.
1	16	0,00	N.D.
1	17	0,00	N.D.
1	18	2,71	N.D.
1	19	2,07	N.D.
1	20	4,41	N.D.
1	21	0,00	N.D.
1	22	0,00	N.D.
1	23	1,90	N.D.
1	24	3,39	N.D.
1	25	2,00	N.D.
2	1	N.D.	5,30
2	2	N.D.	5,90
2	3	N.D.	5,30
2	4	N.D.	6,00
2	5	N.D.	6,70
2	6	N.D.	6,20
2	7	N.D.	5,60
2	8	N.D.	5,90
2	9	N.D.	5,60
2	10	N.D.	5,30
2	11	N.D.	5,60
2	12	N.D.	5,78
2	13	N.D.	5,78
2	14	N.D.	6,00
2	15	N.D.	5,30

N.D.: No detectado.

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 1: sólo S.E.

Grupo 2: sólo Bacteriófagos (10^6 UFP).

GRUPO	ALBÚMINA	S.E. log ₁₀ UFC/mL	FAGOS log ₁₀ UFP/mL
3a	1	4,20	10,30
3a	2	3,97	10,60
3a	3	0,00	10,78
3a	4	3,99	10,90
3a	5	2,00	11,00
3a	6	6,41	11,08
3a	7	3,68	11,15
3a	8	2,49	11,20
3a	9	10,00	11,26
3a	10	2,85	11,30
3a	11	6,11	11,34
3a	12	5,70	11,38
3a	13	5,18	11,41
3a	14	5,19	11,45
3a	15	2,69	11,48
3a	16	3,19	11,51
3a	17	3,13	11,53
3a	18	3,40	11,56
3a	19	10,00	11,58
3a	20	2,30	11,60
3a	21	3,44	11,62
3a	22	3,30	11,64
3a	23	10,00	11,66
3a	24	5,16	11,68
3a	25	3,42	11,70
3b	1	3,76	11,48
3b	2	4,56	9,580
3b	3	4,68	10,00
3b	4	3,30	10,90
3b	5	3,20	10,60
3b	6	4,57	10,60
3b	7	4,21	11,58
3b	8	6,01	10,78
3b	9	5,03	10,30
3b	10	4,53	8,300
3b	11	1,30	10,78
3b	12	2,20	10,30
3b	13	4,08	10,78
3b	14	0,00	10,60
3b	15	3,23	10,90
3b	16	2,64	8,300
3b	17	2,07	10,30
3b	18	4,77	10,78
3b	19	2,50	9,510
3b	20	0,00	10,90
3b	21	3,02	9,080
3b	22	4,46	11,15
3b	23	0,00	9,200
3b	24	2,74	10,60
3b	25	3,54	10,90

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 3a: MOI 10³.

Grupo 3b: MOI 10⁴.

GRUPO	ALBÚMINA	S.E. log ₁₀ UFC/mL	FAGOS log ₁₀ UFP/mL
3c	1	1,30	9,260
3c	2	3,21	10,30
3c	3	2,90	10,90
3c	4	5,38	10,78
3c	5	2,88	11,15
3c	6	4,88	10,30
3c	7	5,38	10,30
3c	8	3,07	10,90
3c	9	2,34	11,15
3c	10	1,30	8,780
3c	11	3,51	11,26
3c	12	1,90	8,300
3c	13	3,57	11,82
3c	14	6,26	11,00
3c	15	4,74	11,15
3c	16	6,30	10,30
3c	17	4,74	9,380
3c	18	4,08	8,300
3c	19	3,24	9,410
3c	20	2,51	9,000
3c	21	3,28	10,30
3c	22	4,94	10,78
3c	23	2,55	9,200
3c	24	2,86	10,30
3c	25	0,00	10,60

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 3c: MOI 10⁵.

c) Recuentos de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC/mL) y Bacteriófagos (\log_{10} UFP/mL), en yemas en grupos controles y tratados con distintas MOI, protocolo de incubación 48 horas.

GRUPO	YEMA	S.E. \log_{10} UFC/mL	FAGOS \log_{10} UFP/mL
1	1	9,49	N.D.
1	2	9,48	N.D.
1	3	9,43	N.D.
1	4	9,68	N.D.
1	5	9,34	N.D.
1	6	9,45	N.D.
1	7	9,71	N.D.
1	8	9,26	N.D.
1	9	9,81	N.D.
1	10	9,55	N.D.
1	11	9,50	N.D.
1	12	9,55	N.D.
1	13	9,64	N.D.
1	14	9,53	N.D.
1	15	9,66	N.D.
1	16	9,61	N.D.
1	17	9,62	N.D.
1	18	9,65	N.D.
1	19	9,54	N.D.
1	20	9,51	N.D.
1	21	9,58	N.D.
1	22	9,54	N.D.
1	23	9,65	N.D.
1	24	9,37	N.D.
1	25	9,79	N.D.
3a	1	9,04	11,62
3a	2	8,92	11,83
3a	3	9,35	11,62
3a	4	8,86	11,28
3a	5	8,97	11,41
3a	6	9,03	11,43
3a	7	9,40	11,28
3a	8	9,24	11,30
3a	9	9,25	11,43
3a	10	9,33	11,36
3a	11	9,14	11,76
3a	12	9,02	11,34
3a	13	9,20	11,11
3a	14	9,04	11,18
3a	15	8,90	11,56
3a	16	8,79	11,83
3a	17	8,89	11,74
3a	18	8,92	11,66
3a	19	8,97	11,54
3a	20	8,92	11,60
3a	21	9,35	11,81
3a	22	9,19	11,32
3a	23	9,20	11,62
3a	24	9,10	11,95
3a	25	8,75	12,28

N.D.: No detectado.

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 1: sólo S.E.

Grupo 3a: MOI 10^3 .

GRUPO	YEMA	S.E. log ₁₀ UFC/mL	FAGOS log ₁₀ UFP/mL
3b	1	9,08	11,83
3b	2	8,89	11,74
3b	3	9,27	11,87
3b	4	9,33	11,93
3b	5	9,37	11,85
3b	6	8,81	12,13
3b	7	9,17	12,08
3b	8	9,41	11,72
3b	9	9,38	11,76
3b	10	9,28	11,86
3b	11	9,07	11,91
3b	12	9,34	11,65
3b	13	9,23	11,83
3b	14	9,04	11,86
3b	15	9,20	11,78
3b	16	9,33	11,86
3b	17	9,38	11,36
3b	18	9,08	11,97
3b	19	9,19	11,72
3b	20	9,10	11,88
3b	21	9,26	11,75
3b	22	9,23	11,83
3b	23	9,20	11,96
3b	24	9,25	12,00
3b	25	9,36	11,78
3c	1	9,29	11,61
3c	2	9,28	11,43
3c	3	9,38	11,43
3c	4	9,14	11,60
3c	5	9,05	11,60
3c	6	9,36	11,60
3c	7	9,32	11,82
3c	8	9,49	11,49
3c	9	9,30	11,57
3c	10	9,14	11,63
3c	11	9,27	11,41
3c	12	9,35	11,46
3c	13	9,06	11,59
3c	14	9,27	11,76
3c	15	9,10	11,41
3c	16	9,02	11,63
3c	17	9,51	11,28
3c	18	9,36	11,57
3c	19	9,57	11,57
3c	20	9,35	11,46
3c	21	9,30	11,67
3c	22	9,36	11,43
3c	23	9,64	11,51
3c	24	9,39	11,40
3c	25	9,28	11,48

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 3b: MOI 10⁴.

Grupo 3c: MOI 10⁵.

d) Recuentos de *Salmonella* Enteritidis (\log_{10} UFC/mL) y Bacteriófagos (\log_{10} UFP/mL), en albúminas en grupos controles y tratados con distintas MOI, protocolo de incubación 48 horas.

GRUPO	ALBÚMINA	S.E. \log_{10} UFC/mL	FAGOS \log_{10} UFP/mL
1	1	2,35	N.D.
1	2	4,53	N.D.
1	3	0,00	N.D.
1	4	3,11	N.D.
1	5	2,92	N.D.
1	6	4,41	N.D.
1	7	3,06	N.D.
1	8	2,64	N.D.
1	9	2,22	N.D.
1	10	2,40	N.D.
1	11	2,72	N.D.
1	12	0,00	N.D.
1	13	3,80	N.D.
1	14	3,58	N.D.
1	15	3,44	N.D.
1	16	2,86	N.D.
1	17	3,71	N.D.
1	18	0,00	N.D.
1	19	2,63	N.D.
1	20	2,84	N.D.
1	21	1,92	N.D.
1	22	1,90	N.D.
1	23	2,29	N.D.
1	24	3,80	N.D.
1	25	0,00	N.D.
3a	2	2,70	10,60
3a	3	2,35	10,54
3a	4	0,00	10,95
3a	5	4,26	11,00
3a	6	0,00	10,48
3a	7	3,86	10,48
3a	8	0,00	9,110
3a	9	3,70	10,00
3a	10	0,00	8,900
3a	11	1,92	10,30
3a	12	0,00	11,48
3a	13	0,00	8,600
3a	14	0,00	10,48
3a	15	0,00	10,00
3a	16	2,04	10,30
3a	17	0,00	10,00
3a	18	3,44	10,30
3a	19	0,00	10,00
3a	20	0,00	9,400
3a	21	0,00	10,00
3a	22	1,60	9,710
3a	23	0,00	10,00
3a	24	1,44	10,30
3a	25	1,60	10,00

N.D.: No detectado.

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 1: sólo S.E.

Grupo 3a: MOI 10^3 .

GRUPO	ALBÚMINA	S.E. log ₁₀ UFC/mL	FAGOS log ₁₀ UFP/mL
3b	1	0,00	10,85
3b	2	0,00	10,00
3b	3	0,00	10,48
3b	4	0,00	9,450
3b	5	0,00	8,900
3b	6	0,00	10,00
3b	7	0,00	9,150
3b	8	0,00	9,570
3b	9	4,42	11,73
3b	10	0,00	9,760
3b	11	4,58	11,30
3b	12	0,00	10,30
3b	13	4,50	10,70
3b	14	1,74	10,00
3b	15	4,15	10,00
3b	16	2,22	11,18
3b	17	4,83	10,70
3b	18	1,44	11,15
3b	19	3,61	10,30
3b	20	4,29	11,15
3b	21	3,44	11,11
3b	22	1,44	10,60
3b	23	1,92	10,78
3b	24	3,49	10,90
3b	25	3,86	11,43
3c	1	0,00	10,78
3c	2	3,55	11,96
3c	3	3,66	10,78
3c	4	0,00	10,00
3c	5	0,00	8,300
3c	6	2,79	11,20
3c	7	0,00	8,480
3c	8	2,84	11,49
3c	9	0,00	8,000
3c	10	0,00	8,300
3c	11	0,00	9,540
3c	12	0,00	8,480
3c	13	2,14	10,60
3c	14	1,44	10,30
3c	15	0,00	10,60
3c	16	0,00	8,300
3c	17	2,29	10,85
3c	18	0,00	8,700
3c	19	0,00	10,00
3c	20	0,00	8,480
3c	21	2,04	11,11
3c	22	2,70	11,34
3c	23	0,00	8,600
3c	24	3,00	9,480
3c	25	0,00	8,480

Muestras incontables al recuento, se les asignó arbitrariamente un valor 10.

Grupo 3b: MOI 10⁴.

Grupo 3c: MOI 10⁵.