



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



EFFECTO DE UNA MEZCLA DE BACTERIÓFAGOS SOBRE EL  
RECUENTO DE *Salmonella* Enteritidis EN HUEVOS SPF,  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

**FRANCISCA JAVIERA FARFÁN ORTEGA**

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



EFFECTO DE UNA MEZCLA DE BACTERIÓFAGOS SOBRE EL  
 RECuento DE *Salmonella* Enteritidis EN HUEVOS SPF,  
 EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

**FRANCISCA JAVIERA FARFÁN ORTEGA**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE POLANCO .....		.....
PROFESORA CONSEJERA: DRA. M <sup>a</sup> LUISA SÁNCHEZ CHONG .....		.....
PROFESORA CONSEJERA: DRA. PILAR OVIEDO HANNIG .....		.....

**SANTIAGO, CHILE**  
 2010

## **Agradecimientos**

En primer lugar, a Dios por acompañarme e iluminar mi camino y mente a lo largo de toda la carrera y por llenar mi vida de bendiciones.

A mi familia por su amor, cariño, compañía, comprensión y apoyo.

A mi profesora Guía Dra. Consuelo Borie por haberme permitido formar parte de este proyecto.

A Dra. Sánchez por su ayuda en el laboratorio y por sus consejos llenos de sabiduría.

A Nasrim, Carola, Mirla, Lissette, Juli, M<sup>a</sup> Paz por su amistad, apoyo y ayuda durante el desarrollo de la tesis.

## ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	37
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52
ANEXO N° 1.....	64
ANEXO N° 2.....	66

## RESUMEN

*Salmonella* Enteritidis (S.E.) es una de las principales causas de toxiinfecciones alimentarias en el mundo, además de causar importantes pérdidas económicas a la industria avícola. Dentro de los alimentos implicados en los brotes de salmonelosis humana, el huevo cumple un rol fundamental en la transmisión de este enteropatógeno bacteriano. Debido al surgimiento de multiresistencia a los antimicrobianos, y a que ninguna de las medidas de control aplicadas por la industria avícola ha logrado eliminar esta bacteria del contenido de los huevos, es que nace la idea de utilizar bacteriófagos para el biocontrol de S.E. en huevos.

El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad biocontroladora de una mezcla de tres bacteriófagos líticos, sobre S.E. contenida en huevos permeabilizados. Se analizaron las efectividades tanto de dos vías de administración de estos como de diferentes tiempos, sobre el biocontrol de S.E. en huevos experimentalmente contaminados.

Para ésto, huevos SPF fueron contaminados, a través de la cámara de aire, con una suspensión de S.E. ( $1,28 \times 10^1$  UFC/mL); dos horas después se adicionaron los fagos ( $10^7$  UFP/mL), mediante dos formas de administración: inmersión o aspersión de gota gruesa. Los huevos así tratados fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta por cinco días, divididos según vía de administración en cinco grupos paralelos, se analizaron por bacteriologías cualitativa y cuantitativa (UFC/mL) cada 24 horas (D1 a D5). El diseño experimental incluyó, además, un grupo control de infección, inoculado sólo con S.E. y dos grupos controles de fagos que sólo recibieron la mezcla de fagos en estudio, uno por inmersión y el otro por aspersión.

Los resultados de la bacteriología cualitativa mostraron que los grupos de huevos que recibieron terapia con fagos, tanto por inmersión como por aspersión, en ningún día de los análisis de las muestras (D1 a D5) tuvieron reducciones significativas ( $p > 0,05$ ) en la incidencia de contaminación. Sin embargo, la bacteriología cuantitativa mostró que los fagos fueron capaces de lograr disminuciones significativas ( $p < 0,05$ ) en los recuentos de S.E. de aproximadamente 3 log, independiente de las vías de administración y de los tiempos.

Estos resultados sugieren que los bacteriófagos pueden ser una alternativa efectiva para el control de *Salmonella* Enteritidis en huevos, dosificados tanto por inmersión como por aspersión. Además, se comprobó que la actividad lítica de los bacteriófagos se mantuvo en el tiempo, por hasta 5 días.

## SUMMARY

*Salmonella* Enteritidis is one of the main causes of foodborne diseases in the world, causing important economic losses to the poultry industry. Within food involved in the outbreaks of human salmonellosis, egg plays a fundamental role on this enteropathogen transmission. Due to the rise of multiresistance to antibiotics, and also due to the fact that none of the control measures taken by the poultry industry have been successful in eliminating the bacteria from eggs, it comes the idea of using bacteriophages for biocontrol of S.E. in eggs.

The objective of the present study was to determine the biocontrol capacity of a mixture of three lytic bacteriophages on S.E. in the content of permeabilized eggs, analyzing the effectiveness of two routes of administration and the time effect on the biocontrol of S.E. in experimentally contaminated eggs.

For this purpose, SPF eggs were inoculated, in the air cell area, with a suspension of S.E. ( $1.28 \times 10^1$  UFC/mL), phages were added two hours after the contamination ( $10^7$  UFP/mL) through two routes of administration: aspersion and immersion. Treated eggs were kept at room temperature for five days, samples were analyzed every 24 hours (D1 to D5) through qualitative and quantitative bacteriology (UFC/mL). The experimental design also included a control group of the infection, which was only inoculated with S.E.; and two phages control groups, which were only administered with the mixture of phages in study, one group by immersion and the other by aspersion.

The results showed that the groups of eggs that received therapy with phages, through aspersion and immersion, didn't have significant reductions ( $p > 0.05$ ) of contamination incidence, in none of the days of the samples analysis were made (D1 to D5). Nonetheless, quantitative bacteriology showed that phages were able to lower in a significant manner ( $p < 0.05$ ) the number of S.E. in approximately 3 log, regardless the time and route of administration.

These results suggest that bacteriophages may be an effective alternative for the control of *Salmonella* Enteritidis in eggs, administered by immersion and aspersion. It was also proved that lytic activity of bacteriophages maintained throughout time, up to five days.

## INTRODUCCIÓN:

En la actualidad, la inocuidad alimentaria representa una preocupación de primer orden para el consumidor, es así como la calidad microbiológica de los alimentos cumple un rol de importancia fundamental en el aseguramiento de su calidad.

En Chile y el mundo, una de las causas más importantes de toxiinfecciones alimentarias en los seres humanos es producida por *Salmonella* spp. Dentro de este género bacteriano, el serotipo *Salmonella* Enteritidis se ha señalado como la principal etiología, asociada al consumo de ciertos alimentos como frutas, verduras, leche y, principalmente, derivados de la industria avícola como son los productos cárnicos, huevos y sus derivados. El huevo sería el vehículo de transmisión más importante; es así como en Estados Unidos de América el 75% de los brotes, ocurridos entre los años 1985 – 2003, se asociaron al huevo y/o alimentos que tenían a éste entre sus ingredientes. En Chile, en los dos grandes brotes asociados con esta bacteria (1997 y 1998), se identificó como origen de estos eventos el consumo de mayonesa casera proveniente de huevos contaminados.

En cuanto al impacto económico de la salmonelosis para la industria avícola, este se traduce en pérdidas por destrucción de productos contaminados, sanciones sanitarias y disminución de la confianza del consumidor, que optará por otras proteínas de origen animal. Es así como cualquier esfuerzo, por mejorar la calidad microbiológica de los huevos, permitirá el aprovechamiento de una de las proteínas de origen animal de mayor valor biológico y más bajo costo, dentro de la industria de los alimentos.

A partir del impacto económico que tiene una enfermedad transmitida por los alimentos (ETA), como la salmonelosis, se orientan los esfuerzos de un país en la priorización y diseño de políticas preventivas de investigación. En este contexto, surge nuevamente la idea de utilizar bacteriófagos como una alternativa potencial para controlar la calidad microbiológica de alimentos contaminados con diversos enteropatógenos de interés en salud pública. Es así, como el objetivo de este estudio es determinar el efecto de una mezcla de bacteriófagos, como herramienta biocontroladora, en huevos enteros experimentalmente infectados con *Salmonella* Enteritidis.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### ETA y *Salmonella* Enteritidis

Las enfermedades originadas por el consumo de alimentos contaminados, han surgido como una causa importante de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En América Latina, las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) representan alrededor del 70% de los casos de enfermedades diarreicas agudas, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2003). En Chile, los brotes de ETA, de acuerdo al artículo 1º del decreto N° 158 del Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), son de notificación obligatoria inmediata a través de una red de vigilancia de laboratorio, siendo *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis, uno de los principales agentes bacterianos involucrados (MINSAL, 1999).

La salmonelosis es una de las ETA más frecuentes y más ampliamente distribuida en los países alrededor del mundo. Es así como en Estados Unidos de Norteamérica, el Centro de Control y Prevención de enfermedades (CDC) determinó que, entre los años 1998 – 2002 se produjo un total de 6.647 brotes; de éstos, se determinó la causa en 2.167 brotes (33%), 55% de los cuales tuvieron etiología bacteriana, y dentro de las bacterias involucradas, el serotipo *Salmonella* Enteritidis representó el mayor número de brotes (585 brotes que representaron un 8,8%) (Lynch *et al.*, 2006). En el año 2008, de un total de 18.499 casos confirmados de enfermedades transmitidas por los alimentos, 7.444 casos (incidencia 16,20/100.000 habitantes) se asociaron a brotes por *Salmonella* spp. y de éstos el 20% se atribuyeron a *Salmonella* Enteritidis (CDC, 2009). Similar es la situación que se presentó en la Unión Europea (UE), en el año 2006, donde de un total de 165.023 casos confirmados de salmonelosis, por el sistema de vigilancia europeo, *Salmonella* Enteritidis representó un 62,5% de los casos (EFSA, 2007).

Dentro de los productos de origen animal asociados a los brotes, los productos avícolas son la principal fuente de salmonelosis humana (Gast, 2007). Es así como en el año 2007, el sistema de vigilancia “TESSy” de la Unión Europea informó que de un total de 590 brotes de salmonelosis humana en los que se identificó al alimento implicado, 109 (27%) estaban asociados al consumo de huevos y de productos derivados de éstos, correspondiendo a la fuente más importante de brotes en Europa. Además, de un total de

5.940 casos de salmonelosis causada específicamente por S.E., 1.508 (25,4%) se asociaron al consumo de huevos y de productos derivados de éstos, ocupando el primer lugar dentro de los alimentos implicados en brotes de S.E. (EFSA, 2009).

En Chile, las infecciones por *Salmonella* Enteritidis, aparecieron en forma dramática en el año 1994 en el norte del país (Arica y Antofagasta), con cifras que implicaban un 3.000% de aumento sobre los esporádicos casos registrados históricamente. Las cifras aumentaron de un promedio de 0,35 casos por 100.000 observados entre 1990 y 1993, a valores superiores a 3 casos por 100.000 habitantes en 1994 y sobre 5 por 100.000 en 1998. Esta epidemia se extendió progresivamente hacia el resto del país, abarcando más del 80% de los Servicios de Salud del país en 1998, lo que contrastó con el 19% involucrado en 1994 (Fica *et al.*, 2001).

Prado *et al.*, (2002), analizaron la situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Santiago de Chile, durante el período 1999 – 2000. Para ello, estudiaron retrospectivamente todas las notificaciones de brotes de ETA, ocurridas durante esos dos años en la región Metropolitana y realizaron estudios etiológicos en alimentos y pacientes. Sus resultados mostraron que hubo un aumento en las notificaciones de brotes de ETA, de 190 en 1999 a 260 en el 2000. En cuanto a los agentes causales, los microorganismos más frecuentes fueron *Salmonella* spp. (8,07%) y *Staphylococcus aureus* (5%). Los brotes identificados se produjeron en un 63,5% por alimentos preparados en el hogar y, en menor proporción, por alimentos consumidos en restaurantes, casinos, asadurías de ave y fuentes de soda, que representaron un 33,1%. En cuanto al tipo de alimento asociado a los brotes, los alimentos de mayor riesgo fueron los platos preparados calientes, quesos de cabra, pescados y emparedados, entre otros. Al correlacionar el tipo de alimento con el agente causal del brote, destaca la asociación existente entre el queso de cabra y brotes por diferentes agentes bacterianos como *Salmonella* spp; se asociaron también con esta bacteria, alimentos como mayonesa, platos preparados calientes y cecinas.

A nivel nacional, entre los años 2000 – 2006, a excepción del año 2003, se produjo un aumento constante de los casos de salmonelosis confirmados en el Instituto de Salud Pública (ISP) de Chile (402 casos en el año 2000 v/s 1.177 casos en el año 2006); dentro

de éstos, los aislamientos clínicos de *Salmonella* Enteritidis constituyeron aproximadamente un 50% del total de *Salmonella* (Figuroa, 2007). En el mismo período, el SEREMI de Salud de la Región Metropolitana, mediante el análisis de muestras involucradas en toxiinfecciones alimentarias, determinó que el principal agente involucrado en éstas fue *Salmonella* Enteritidis, con más del 70% de los aislamientos. Al considerar los alimentos involucrados en estos casos, los productos cárnicos fueron los principales implicados, seguidos por los huevos y los productos derivados de éstos (Figuroa, 2007).

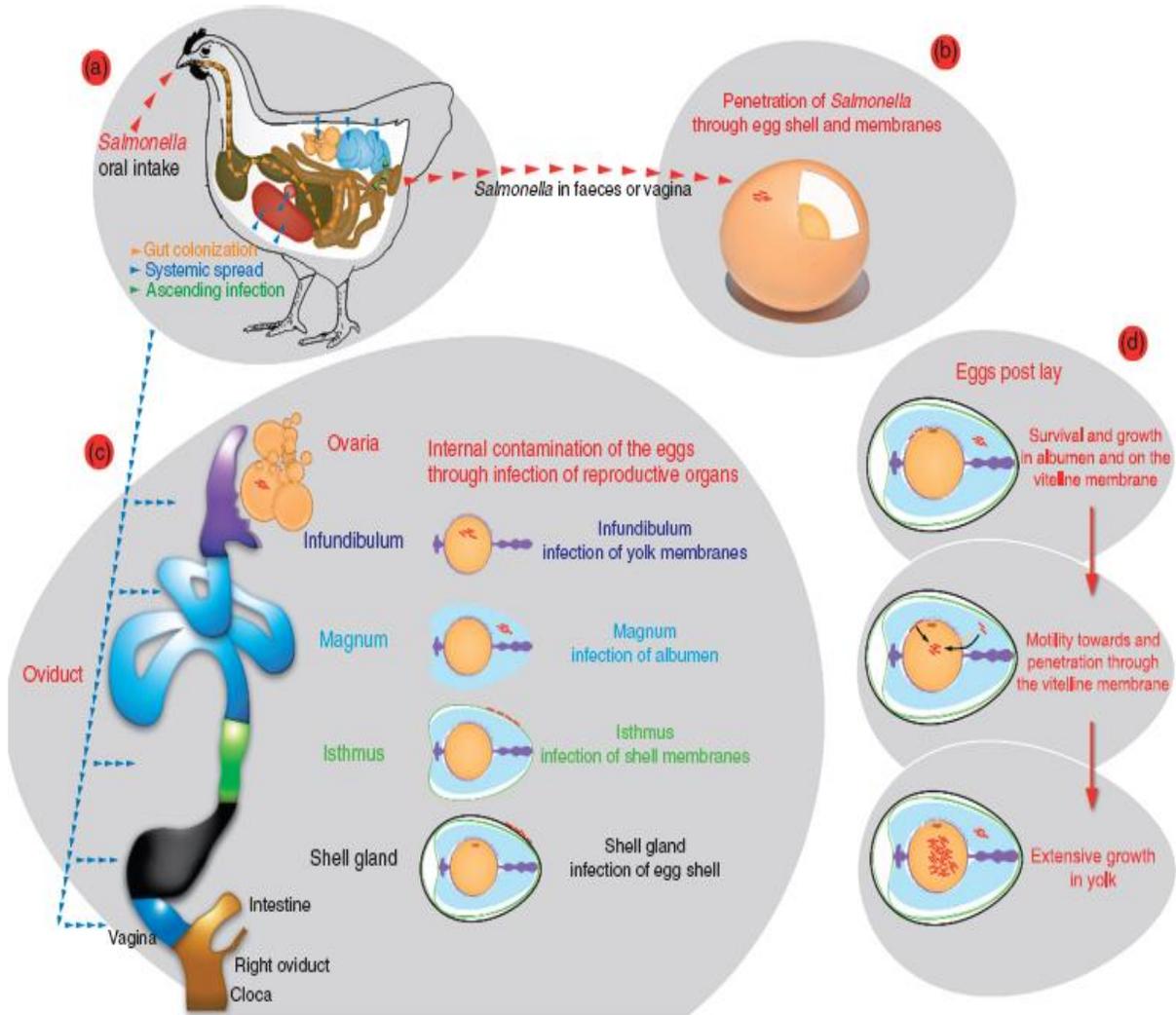
Alexandre *et al.*, (2000), mediante el análisis de un conjunto de 1.000 de huevos, de distintas procedencias de la Región Metropolitana, determinaron que la frecuencia de contaminación con *Salmonella* Enteritidis corresponde a un 0,09%. Esta cifra cobra importancia al considerar que la población del país consume una cantidad de 175 huevos/habitante anualmente (ODEPA, 2008).

Existen abundantes publicaciones que vinculan al consumo de huevos o productos derivados de éstos con brotes de salmonelosis en seres humanos. En el año 2001 en Estados Unidos de Norteamérica, se produjo un brote que involucró a cuatro prisiones del Departamento Correccional de Carolina del sur (SCDC), el que afectó a 688 reclusos que presentaron signos gastrointestinales luego de comer ensalada de atún preparada con huevos; el análisis microbiológico, tanto de las muestras fecales como de los huevos utilizados en la preparación, reveló la presencia de los mismos fagotipos de S.E., confirmando el origen del brote (CDC, 2003). En el año 2002, en Austria, se produjo un brote que afectó a dos localidades vecinas; la investigación de los casos orientó, como origen, el consumo de huevos que provenían de una misma granja, implicada en un brote en el año 1999). El análisis microbiológico de las gallinas y de los huevos que provenían de éstas fueron positivos a S.E. (Berghold *et al.*, 2003). En mayo del año 2005 en Austria, 85 personas presentaron síntomas gastrointestinales luego de consumir, en una feria, ensaladas preparadas con huevos. El análisis microbiológico de las muestras fecales de estas personas fue positivo a *Salmonella* Enteritidis fagotipo 21, además, se tomaron muestras de los huevos con los que se preparó la ensalada, cuyo análisis reveló la presencia de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 21, confirmándose así la fuente del brote (Schmid *et al.*, 2006).

## **Contaminación de los huevos con *Salmonella* Enteritidis**

En general, hay dos rutas posibles de contaminación natural del huevo con *Salmonella* (Esquema N° 1). Los huevos pueden ser contaminados por penetración bacteriana a través de la cáscara, es decir, transmisión horizontal de la bacteria. O bien, por contaminación directa de la yema, albúmina, membranas de la cáscara o de la cáscara del huevo en formación, es decir, transmisión vertical (Gantois *et al.*, 2009).

**Esquema N° 1. Contaminación del huevo por *Salmonella* spp.**



(a) *Salmonella* ingresa oralmente en la gallina y entra al tracto intestinal. Las bacterias que colonizan el lumen intestinal son capaces de invadir las células epiteliales intestinales (colonización del intestino). Como consecuencia, células inmunes, más específicamente macrófagos, son atraídos al sitio de la invasión y encierran a las bacterias *Salmonella*. Esto le permite a la bacteria sobrevivir y multiplicar en el ambiente intracelular del macrófago. Estos macrófagos infectados migran a los órganos internos tales como los órganos reproductivos (propagación sistémica). Además de la propagación sistémica, la bacteria puede también llegar al oviducto a través de infecciones ascendentes desde la cloaca. (b) Una ruta de posible contaminación del huevo es por la penetración de la *Salmonella* a través de la cáscara y membranas de la cáscara después de la contaminación externa. La contaminación de la superficie puede ser el resultado tanto de la infección de la vagina o por contaminación fecal. (c) La segunda ruta posible es por contaminación directa de la yema, membranas de la yema, albúmina, membranas de la cáscara y cáscara originada por la contaminación del ovario, infundíbulo, magnum, istmos y glándulas de la cáscara, respectivamente. (d) *Salmonella* depositada en la albúmina y sobre la membrana vitelina es capaz de sobrevivir y crecer en el ambiente antibacterial. Ellas son también capaces de migrar y penetrar en la membrana vitelina a fin de llegar a la yema. Después de llegar a este entorno rico pueden crecer extensamente (Fuente: Gantois *et al.*, 2009, traducido por: F. Farfán).

## Contaminación horizontal del huevo

La contaminación del contenido del huevo por *Salmonella* Enteritidis puede ser causada por la penetración de esta bacteria, a través de la cáscara del huevo, por la presencia de heces contaminadas con S.E. sobre la cáscara, durante o después de la oviposición (De Buck *et al.*, 2004a). Messens *et al.*, (2006), estudiaron la influencia del grado de contaminación de la cáscara del huevo en la penetración de *Salmonella* Enteritidis a través de ésta. Para ello, utilizaron huevos rellenos con agar, los que fueron inoculados mediante una inmersión de un minuto en una suspensión de S.E. ( $5,3 \times 10^6$  unidades formadoras de colonia UFC/mL), luego, los huevos fueron almacenados a 20 °C por 20 días. Al analizar los resultados, los autores demostraron que mientras mayor era la contaminación de la cáscara al final del período de almacenamiento, mayor era la probabilidad de que S.E. llegara al contenido del huevo. Es así, como contaminaciones de la cáscara mayores a 4 log<sub>10</sub> UFC tenían un 90% de probabilidad de contaminar el interior de los huevos en cambio, las cáscaras contaminadas con cantidades inferiores a 1 log<sub>10</sub> UFC, tenían un 50% de probabilidad de ser contaminados en su interior.

Existen una serie de factores que favorecen la penetración de S.E. y otras bacterias a través de la cáscara del huevo. El primero de estos factores, es el diferencial de temperatura que ocurre al momento de la oviposición: los huevos al salir de la gallina poseen la misma temperatura del cuerpo de ella (42° C), temperatura que disminuye bruscamente al salir al medio ambiente, creando una presión negativa que provoca un efecto de succión del material que se encuentra en la cáscara, hacia el interior del contenido del huevo (Gantois *et al.*, 2009).

Forsythe *et al.*, 1953 (citado por Bruce y Drysdale, 1994) señalaron que un segundo factor implicado es la humedad o la condensación existente en la superficie de la cáscara del huevo. Por ejemplo, cuando el huevo se mantiene a temperatura de refrigeración y luego es almacenado a temperatura ambiente, se acelera el proceso de penetración bacteriana a través de la cáscara. Sin embargo, está bien establecido que la penetración puede aumentar cuando el huevo, además de tener humedad, es expuesto a cambios de temperatura, lo que lleva a que el contenido del huevo se retraiga y succione el agua a través de los poros.

La porosidad de la cáscara del huevo es otro de los factores que estaría relacionado con la penetración bacteriana a través de la cáscara. Los poros del huevo son la única ruta disponible para que las bacterias penetren la cáscara, ya que cada poro tiene un diámetro promedio de 11,9  $\mu\text{m}$ ; la estructura de los poros es similar a la de un embudo abierto formando canales que penetran la cáscara creando con ello una grieta entre botones mamilares adyacentes. Existen alrededor de 7.000 – 14.000 poros en la cáscara del huevo, siendo más abundantes en el extremo romo del huevo. Con el aumento de la edad de la gallina, el número de poros aumenta pero sus dimensiones se mantienen relativamente constantes (Bruce y Drysdale, 1994). Drysdale, 1985 (citado por Bruce y Drysdale, 1994), estudió la relación existente entre la porosidad y la incidencia de contaminación de los huevos con *S.E.*, con el fin de establecer si los huevos con una alta porosidad eran más susceptibles a la penetración bacteriana bajo condiciones comerciales. En este estudio se midió la porosidad de más de 3.000 huevos incubables de broiler y se determinó que no existía una relación directa entre la porosidad, medida como la conductancia de vapor de agua, y la susceptibilidad a la penetración bacteriana. Estos resultados pueden ser explicados por la existencia de la cutícula que es una capa capaz de cubrir la mayoría de los poros impidiendo la penetración bacteriana.

Similares fueron los resultados obtenidos por Messens *et al.*, (2005), quienes también estudiaron una serie de características de la cáscara del huevo (peso del huevo, grosor de la cáscara, porosidad, disposición de la cutícula), en relación a la edad de la gallinas y a la penetración de *Salmonella* Enteritidis. Estos autores, basados en sus resultados, concluyeron que no hay relación significativa entre las características de la cáscara estudiadas y la penetración de *Salmonella* Enteritidis. También concluyeron que la penetración bacteriana fue mayor en el polo romo del huevo con un 72,9% de los huevos penetrados en esta zona y que esto se debía a la mayor abundancia de poros en el extremo romo del huevo ( $32 \pm 22$  poros/ $\text{cm}^2$ ), en relación al apex ( $26 \pm 19$  poros/ $\text{cm}^2$ ). En cuanto a la edad de las gallinas, concluyeron que en las gallinas de 42, 65 y 69 semanas de edad, la contaminación de las cáscaras de sus huevos fue significativamente menor que en las gallinas más jóvenes (26 semanas).

De Reu *et al.*, (2006), estudiaron la capacidad de siete bacterias diferentes, incluyendo *S.E.*, de atravesar la cáscara de los huevos y contaminar el contenido de éstos. Para cumplir con sus objetivos, realizaron inmersiones de un minuto de huevos en

las suspensiones bacterianas ( $10^5 - 10^6$  UFC/mL), para luego dejar los huevos a 20 °C y 60% de HR, por 3 semanas. Los resultados de sus investigaciones mostraron que ni el área de la superficie, ni el grosor ni la porosidad de la cáscara tenían influencia en la penetración de las bacterias a través de la cáscara. Sin embargo, para todas las cepas bacterianas utilizadas, la deposición de la cutícula fue significativamente menor en aquellas cáscaras que fueron penetradas por las bacterias comparadas con las cáscaras que no fueron penetradas. Sus resultados también mostraron que las bacterias Gram negativas, móviles y que no forman “clusters” son capaces de penetrar la cáscara más frecuentemente, especialmente después de 4 – 5 días de almacenamiento.

Para evitar el ingreso de microorganismos a su contenido, los huevos poseen barreras físicas y químicas (Board *et al.*, 1994). Las barreras físicas desde el exterior al interior son tres: la cutícula, que es una capa proteica hidrofóbica que cubre la cáscara y los poros de la cáscara, la cáscara propiamente tal y, las membranas de la cáscara (membrana interna, membrana externa y membrana limitante) (Gantois *et al.*, 2009).

En relación a la cutícula, en un estudio realizado por Drysdale, 1985 (citado por Bruce y Drysdale, 1994), se concluyó que la incidencia de contaminación bacteriana, fue significativamente mayor en los huevos que tenían una cutícula pobre (40%), comparados con aquellos huevos con una mediana o buena calidad (26%). Esto confirmó que la capa cuticular es de gran importancia en la prevención de transmisión a través de la cáscara del huevo. El factor crucial que determina cual huevo es susceptible de ser penetrado por bacterias a través de la cáscara, no es el número de poros, sino que el número de poros que no se encuentra cubierto por cutícula, a través de los cuales la bacteria puede pasar y contaminar el contenido del huevo. En general, el número de poros descubiertos es bajo.

Sparks y Board, 1985 (citado por Bruce y Drysdale, 1994), demostraron que el estado físico de la cutícula cambia inmediatamente después de que el huevo es ovipuesto, desde un aspecto “húmedo” a “seco”, en no más de 3 minutos. Este cambio, puede tener importancia en la susceptibilidad de los huevos a las infecciones microbianas en esta etapa. Para demostrarlo, se llevaron a cabo estudios de penetración bacteriana, en áreas de la cáscara que estaban “húmedas” y “secas”, y se demostró que hay una mayor incidencia de contaminación en las cáscaras que aún tenían una cutícula húmeda. Este estudio demuestra que sumado al diferencial de temperatura, que actúa como una

fuerza impulsora de la penetración de la cáscara, las características físicas de la cutícula están fuertemente asociadas con la contaminación microbiana del contenido del huevo.

A pesar del escaso conocimiento sobre el modo de penetración bacteriana a través de las membranas de la cáscara, los microorganismos son recuperados de la superficie interna en sólo unos pocos minutos. Estudios *in vitro*, han demostrado que las membranas de las cáscaras de huevos con diferentes porosidades, no varían en su capacidad de resistir a la penetración por *Pseudomonas fluorescens*. Sin embargo, se ha descrito que las membranas que derivan de huevos más viejos, tienen grados de penetración bacteriana mayores, al compararlos con huevos recién puestos (Bruce y Drysdale, 1994).

Las barreras químicas del contenido del huevo, están formadas por una serie de proteínas con propiedades antibacteriales, que se encuentran en su mayoría en la albúmina y también se han asociado con la cáscara y las membranas de la cáscara del huevo. Entre ellas, la lisozima es abundante en la membrana limitante, estando presente también en las membranas de la cáscara, en la matriz y en la cutícula de la cáscara del huevo. La ovotransferrina también ha sido identificada en las membranas de la cáscara y en la capa basal calcificada, probablemente actuando como un filtro bacteriostático. También se ha identificado otra proteína como la ovocalyxina – 36 en la cáscara y en las membranas de la cáscara (Arias *et al.*, 2007; Gantois *et al.*, 2009).

## Contaminación vertical del huevo

Para que ocurra la contaminación interna de los huevos, primero debe ocurrir la colonización de los tejidos reproductivos de las gallinas, consecuencia de la diseminación sistémica de *Salmonella* desde el intestino. La invasión de las células epiteliales intestinales desencadena la infiltración de células inmunes, principalmente macrófagos, que capturan a S.E. en su interior. Debido a la capacidad de sobrevivir y replicarse en las células inmunes, las bacterias transportadas en el interior de los macrófagos son diseminadas en el organismo del huésped, resultando en la colonización de los órganos reproductivos. La isla de patogenicidad 2 de la bacteria le otorga a ésta la capacidad de causar la diseminación sistémica (Gantois *et al.*, 2009).

La diseminación sistémica de S.E. puede llevar a la colonización del ovario o del oviducto, de manera independiente, al mismo tiempo o consecutivamente uno después del otro (De Buck *et al.*, 2004a). Gast *et al.*, (2004), estudiaron la capacidad de *Salmonella* Enteritidis de colonizar los órganos reproductivos de las gallinas de postura y de producir la contaminación del contenido de los huevos. Para lograr sus objetivos, infectaron experimentalmente gallinas de postura (28 y 33 semanas de edad), a través de inoculación oral con *Salmonella* Enteritidis ( $1,5 \times 10^9$  UFC). Las aves fueron sacrificadas en los días 7 y 21 posteriores a la infección, para obtener muestras de ovario y oviducto. Los resultados de esta experiencia mostraron que, al séptimo día post infección, S.E. se aislaba en alta frecuencia a partir de los ovarios y oviductos (66,7%), sin embargo, en el día 21 después de la inoculación, el aislamiento de S.E. desde los ovarios era infrecuente, y nunca sobrepasó un 16,7% y además, no se logró aislamiento a partir de los oviductos. En cuanto a la contaminación interna de los huevos, se logró aislar S.E. en un 6,88% (28 semanas de edad) y 7,05% (33 semanas de edad). Esto sugiere que, la presencia del patógeno en los tejidos reproductivos no garantiza, que la contaminación de los huevos vaya a ocurrir en una alta frecuencia, incluso cuando se infecta con dosis muy altas.

La colonización de S.E. en ovario, sería consecuencia de la diseminación por la vía hematógona, donde las bacterias se depositan cerca de la membrana basal de las células de la teca, caracterizada por su elevada irrigación. A partir de este sitio, S.E. puede penetrar la membrana basal y la yema, después de invadir las células de la granulosa (Thiagarajan *et al.*, 1994) o por migración a través de la células cruzando la

membrana perivitelina (De Buck *et al.*, 2004a). Thiagarajan *et al.*, (1996), demostraron que S.E. no sólo es capaz de invadir las células de la granulosa, sino que además, es capaz de multiplicarse en el interior de estas células.

El hecho de que *Salmonella* posea la capacidad de interactuar con componentes celulares de los folículos preovulatorios, plantea la hipótesis de que el serotipo S. Enteritidis presenta características intrínsecas que le permiten interactuar con estas células, y como consecuencia de lo anterior, el hecho de ser transmitida al huevo. En un estudio, Gantois *et al.*, (2008), compararon la capacidad de 5 serotipos de *Salmonella* (S. Enteritidis, S. Typhimurium, S. Heidelberg, S. Hadar y S. Virchow) de colonizar los órganos reproductivos y de contaminar los huevos de las gallinas de postura, para lo cual, se inocularon por vía intravenosa gallinas de postura adultas (22 semanas), con 1 mL de las suspensiones de *Salmonella* ( $1 \times 10^8$  UFC). Las aves fueron sacrificadas los días 4, 7 y 14 post infección, para la obtención de muestras de ovario y oviducto. Los resultados mostraron que en el día 14 post infección, el recuento promedio de S. Enteritidis (cepa S1400) en oviducto fue de  $4,96 \pm 1,53$  UFC/g, valor significativamente mayor que el obtenido con el resto de los serotipos, cuyos recuentos iban desde  $1,66 \pm 1,52$  UFC/g hasta  $2,99 \pm 2,99$  UFC/g. En cuanto a la infección del ovario, los serotipos S.E. (cepas S1400 y 147) y S. Typhimurium, presentaban una significativa mayor colonización que S. Hadar y que S. Heidelberg en los días 4 y 7 post infección. En relación a la contaminación de los huevos, recolectados durante toda la experiencia, ambas cepas de S.E. sumaron un 70% de huevos contaminados (7 de 10), S. Typhimurium 40% (2 de 5), S. Virchow 6,25% (1 de 16), mientras que los serotipos S. Heidelberg y S. Hadar no fueron aislados de los huevos.

Cuando S.E. coloniza el oviducto, puede ser incorporada en las distintas estructuras del huevo dependiendo de la porción de tejido infectado (Esquema N° 1). Dentro de las estructuras del huevo, la albúmina es el punto que se contamina con mayor frecuencia (De Buck *et al.*, 2004a).

Poco se sabe acerca del mecanismo de colonización de *Salmonella* en el oviducto de las gallinas de postura. Se ha investigado el rol de la fimbria tipo 1 en la interacción de S.E. con el oviducto de las gallinas. Así De Buck *et al.*, (2004b), inocularon por vía intravenosa ( $2 \times 10^7$  UFC) a dos grupos de gallinas de postura comercial, el primer grupo

con una cepa salvaje de S.E. y el otro con una cepa mutante de S.E. defectuosa en la producción de la fimbria tipo 1. Las gallinas fueron sacrificadas en diferentes días post inoculación, para la obtención de: sangre, los 5 segmentos del oviducto (hisopados), y el ovario. Los resultados de este estudio mostraron que ambas cepas fueron capaces de colonizar el oviducto a partir del día 1 post infección. La frecuencia de hisopados de istmo positivos, fue significativamente mayor para el caso de la cepa mutante en relación con la cepa salvaje, asimismo, el promedio de los recuentos de oviducto fue significativamente mayor en el caso de las gallinas infectadas con la cepa mutante (recuentos desde  $1,4 \pm 0,7$  UFC/g hasta  $3,1 \pm 2,3$  UFC/g), en relación al promedio de los recuentos de la cepa parental (recuentos desde  $0,3 \pm 0,6$  UFC/g hasta  $1,5 \pm 0,9$  UFC/g). En cuanto a la infección de los ovarios, no existieron diferencias entre ambos grupos de gallinas (cepa mutante y cepa parental de S.E.). En relación a la incidencia de contaminación en los huevos, fue mayor para la cepa parental (31,9% de huevos contaminados), en comparación con la cepa mutante (10,4% de los huevos contaminados). Los autores concluyeron que, si bien la cepa mutante logró colonizar un mayor número de oviductos, esto se debería a su mayor tiempo de permanencia en sangre.

La colonización del oviducto no está limitada a la adhesión a la superficie epitelial y a las secreciones. De Buck *et al.*, (2004c), estudiaron la interacción de S.E. con las células epiteliales de las glándulas del istmo y magnum en gallinas de postura. Los resultados de sus experimentos *in vitro*, mostraron que S.E. es capaz de ubicarse intracelularmente en las células glandulares tubulares del istmo y magnum, siendo significativamente mayor en istmo. Cuando utilizaron un modelo *in vivo*, en gallinas de postura inoculadas por vía intravenosa, con S.E. ( $5 \times 10^7$  UFC), corroboraron que la tasa de infección intracelular del istmo ( $2,1 \times 10^{-4}$  UFC/cél) fue significativamente mayor que la del magnum ( $4,8 \times 10^{-5}$  UFC/cél).

Numerosos autores (Barrow & Lovell, 1991; Keller *et al.*, 1995; Reiber *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1999; Okamura *et al.*, 2001; Mizumoto *et al.*, 2005) han centrado sus investigaciones en el rol de la vagina sobre la contaminación de los huevos. Okamura *et al.*, (2001), estudiaron la vía intravaginal, como modelo de infección ascendente, de diferentes serotipos de *Salmonella*, tanto *in vivo* como *in vitro*. Para lo cual inocularon gallinas de postura de 35 semanas de edad, mediante hisopados vaginales

( $5 \times 10^8$  UFC S.E.) y sacrificaron a las aves a los 7 días post infección. En las muestras de tejidos reproductivos, S.E. fue aislada de infundíbulo (10%), magnum (20%), istmo (20%) y útero (20%); también fue aislada de bazo (30%), ciego (20%) y huevos (27,6%), demostrando la infección ascendente. En el estudio *in vitro*, demostraron que S.E. se adhiere a las vellosidades de las células epiteliales vaginales, corroborando entonces la capacidad de la bacteria de ubicarse en estas células, y así, de contaminar la superficie de los huevos. Al respecto, Mizumoto *et al.*, (2005), sugirieron que el tipo de lipopolisacárido (LPS de alto peso molecular), tendría un rol importante en el tropismo hacia el tracto reproductivo de la gallina.

Actualmente es ampliamente aceptado que las infecciones ascendentes desde cloaca pueden resultar en infección del tracto reproductivo de la gallina (Rieber *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1998a) y, por lo tanto, en la contaminación de los huevos en formación (Shivaprasad *et al.*, 1990).

## **Medidas de control de *Salmonella* en los huevos**

La asociación entre la infección por S.E. del tracto reproductivo, la contaminación del huevo y de los alimentos de consumo humano, es un fuerte incentivo para el desarrollo de programas de control directamente relacionados con la reducción de la infección en gallinas de postura. Esto se puede lograr mediante la reducción de la infección en el ambiente de la gallina, control de la infección de los huevos, o a través del aumento de la resistencia de la gallina frente a las infecciones (De Buck *et al.*, 2004a).

En Chile, producto de los brotes producidos durante el año 1998, se creó un plan nacional de control de *Salmonella*, que incluye el monitoreo bacteriológico y serológico en plantales de reproductoras y ponedoras, medidas de control básicas como bioseguridad, uso de exclusión competitiva, vacunación, eliminación y tratamiento con antimicrobianos a lotes positivos, entre otras (SAG, 2006).

Una de las estrategias a través de las cuales se aumenta la resistencia de las gallinas frente a las infecciones es la vacunación. El objetivo de la vacunación es reducir o incluso suprimir completamente la contaminación del huevo. Actualmente, existen dos tipos de vacunas contra *Salmonella*: vacunas atenuadas (vivas) y bacterinas (muertas) (De Buck *et al.*, 2004a). Se ha demostrado que ambos tipos disminuyen la frecuencia de infección con S.E. en las gallinas de postura, disminuyendo la eliminación fecal de la bacteria, invasión sistémica y contaminación de los huevos. Sin embargo, ninguno de los dos tipos han sido capaces de prevenir la infección completamente, especialmente cuando la dosis infectante de *Salmonella* es muy alta (Gast, 2007).

En relación a las vacunas atenuadas, es aceptado que éstas presentan ventajas como fácil administración (generalmente agua de bebida) y que son capaces de inducir una respuesta inmune marcada y prolongada. Sin embargo, podrían presentar problemas de seguridad relacionados con inestabilidad genética. En cuanto a las bacterinas, éstas presentan ventajas como: reducción de la diseminación fecal, reducción de la invasión hacia órganos internos, incluso pueden disminuir la contaminación de los huevos. Entre las desventajas, muchas veces estas vacunas no son capaces de inducir respuesta inmune celular protectora (Gast, 2007). Es así, como Okamura *et al.*, (2007) estudiaron la capacidad de una bacterina bivalente (serotipos *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) para

disminuir la infección en gallinas de postura, evitando la contaminación de los huevos con S.E. La bacterina administrada vía subcutánea, logró reducir significativamente el porcentaje de huevos contaminados en las gallinas desafiadas, tanto por la vía intravenosa como por la vía intraperitoneal, a niveles de 1,9% y <30%, respectivamente; en relación a los grupos controles (25% y 88,9%, respectivamente).

En cuanto al manejo del medio ambiente en el que se encuentran las gallinas y sus huevos, se utilizan medidas sanitarias recomendadas para minimizar la contaminación de los planteles, entre ellas se encuentran: limpieza de los galpones y del equipamiento utilizado incluyendo el sistema de suplementación del agua, remover el material fecal, eliminar vectores de *Salmonella* (aves silvestres y ratas), minimizar el tráfico de personas al interior de los galpones, desinfección de los vehículos y personal (cambio de vestimenta, pediluvios), limpiar las cajas de huevos y jaulas de gallinas después de cada uso, además de la utilización de alimento de buena calidad microbiológica (Doyle y Erickson, 2006).

En relación al control de la contaminación y disminución de los niveles de *Salmonella* en la cáscara de los huevos, estudios han demostrado que inmersiones de los huevos en desinfectantes, como el peróxido de hidrógeno al 5%, reduce los recuentos de microorganismos del orden de  $5,3 \log_{10}$  (Berrang *et al.*, 2000). Padrón *et al.*, 1995 (citado por Berrang *et al.*, 2000), demostraron que haciendo dipping de los huevos, dos veces, en peróxido de hidrógeno al 6%, se reducían los recuentos bacterianos totales en las membranas de la cáscara del orden de 95%, y en el caso de huevos positivos a *Salmonella*, los recuentos se reducían en un 55%. Utilizando derivados de amonio cuaternario, se han visto reducciones del total de microorganismos de la cáscara del orden de  $4 \log_{10}$ , que al considerar sólo coliformes, las reducciones son del orden de  $1,4 \log_{10}$  (Berrang *et al.*, 2000). Cox *et al.*, (2002), llevaron a cabo un estudio para determinar si tres inmersiones consecutivas, en peróxido de hidrógeno al 1,4% o fenol al 0,39%, eran más efectivas que una inmersión única, para lograr la eliminación de *S. Typhimurium* de huevos incubables. Si bien en todos los huevos se lograron reducciones de los recuentos, al realizar tres inmersiones en los desinfectantes, se logró un 22% adicional de reducción de los recuentos.

A pesar de estos resultados, ninguno de estos métodos es capaz de eliminar en un 100% la contaminación de la cáscara, ni tampoco son capaces de eliminar la contaminación de los huevos adquirida por la vía vertical o la contaminación del contenido del huevo, una vez que los microorganismos ya fueron capaces de penetrar la cáscara (Berrang *et al.*, 2000).

Recientemente, producto de la emergencia de cepas de *Salmonella* multiresistentes, la administración de antimicrobianos preventivos y curativos es una práctica cada vez menos utilizada. Debido a lo anterior, surge el uso de los bacteriófagos como una alternativa potencial y promisoría en el control de este patógeno. Los bacteriófagos son virus que invaden las células bacterianas y, en el caso de los bacteriófagos líticos, interrumpen el metabolismo de la bacteria y producen la lisis de ésta. Fueron descubiertos por Frederick Twort en 1915 quien describió su actividad antibacteriana, sin embargo, Felix d'Herelle en 1919 fue probablemente el primer científico que utilizó bacteriófagos para tratar la disentería severa (Sulakvelidze *et al.*, 2001). En varias compañías iniciaron la producción comercial de fagos contra agentes bacterianos que afectaban al ser humano. Sin embargo, la producción fue rápidamente desplazada por el descubrimiento de los antibióticos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

En general el ciclo infeccioso de los fagos líticos empieza cuando éstos se unen a un receptor en la superficie de la célula bacteriana, insertan su ADN y secuestran la maquinaria celular para la replicación de su propio material genético y posterior síntesis de las proteínas fágicas. Luego ocurre un proceso de ensamblado, se forma la progenie fágica para después ser liberada produciendo la lisis de la célula bacteriana (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Estos agentes son extremadamente específicos, capaces de invadir especies bacterianas específicas o incluso cepas específicas. Otras características de los bacteriófagos que los convierten en atractivos agentes terapéuticos para el control de patógenos en animales, son las siguientes: ser altamente efectivos en la producción de lisis en su célula bacteriana blanco, encontrarse de manera natural en el medio ambiente, autoreplicarse, sin efectos adversos descritos, la selección de nuevos fagos es un proceso rápido (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

En los alimentos, los bacteriófagos poseen un gran potencial para lograr asegurar la calidad microbiológica de éstos, debido a su larga historia de uso, fácil manipulación y su actividad antimicrobiana específica. El concepto de combatir con bacteriófagos los patógenos de los alimentos, puede ser aplicado en todas las etapas de la producción de éstos, en el clásico esquema “de la granja al tenedor”. En primer lugar, los bacteriófagos pueden prevenir o reducir la colonización y las enfermedades en el ganado (fagoterapia); en segundo lugar, pueden ser utilizados para la descontaminación de carcasas y otros tipos de productos crudos, como frutas frescas y vegetales, y para desinfectar equipos y superficies de contacto (biosanitización y biocontrol) y, en tercer lugar, para extender la vida útil de productos finales perecibles como preservantes naturales (biopreservación) (García *et al.*, 2008).

Entre las ventajas de la utilización de los bacteriófagos en los alimentos se describen: capacidad de autoreplicarse, modificación de manera selectiva de la flora bacteriana (especificidad), ser estables en los alimentos, ser capaces de sobrevivir a los procesamientos de los alimentos, ser agentes naturales, ubicuos y fácilmente aislables, baratos de producir, de fácil aplicación y preparación, no tóxicos para las células eucariotas, y sin efectos en la calidad (calidad organoléptica) de los alimentos (Greer, 2005).

En cuanto a las desventajas de la utilización de los bacteriófagos, en el control de bacterias patógenas presentes en los alimentos se encuentran: un limitado rango de hospederos, aparición de bacterias mutantes fago-resistentes, se requiere un alto número de fagos por cada bacteria blanco, presencia de barreras en los alimentos, y la percepción del consumidor en relación a la incorporación de virus en las comidas (Greer, 2005).

Se han realizado una serie de estudios que evalúan la actividad biocontroladora de los bacteriófagos sobre patógenos que producen ETA. Uno de estos estudios fue llevado a cabo por Modi *et al.*, (2001), quienes analizaron el efecto de los fagos en la sobrevivencia de *Salmonella* Enteritidis en quesos Cheddar fabricados tanto con leche cruda como pasteurizada. La leche fue inoculada con  $10^4$  UFC/mL de una cepa luminiscente de S.E. y treinta minutos después, se adicionó 1 mL de la suspensión del fago en estudio ( $10^{11}$  UFP/mL). Los recuentos de *Salmonella* luego de 24 horas a 8° C, disminuyeron entre 2 y 3  $\log_{10}$  UFC/mL, en los quesos fabricados con leches tratadas con

fagos, tanto cruda como pasteurizada. Durante la maduración del queso, los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en los quesos de ambos tipos de leches se redujeron entre 1 y 2  $\log_{10}$  UFC/mL. La bacteria en estudio sobrevivió en los quesos de leches no adicionadas del fago, tanto cruda como pasteurizada después de 99 días a 8° C; en cambio, no fue capaz de sobrevivir después de 89 días en quesos hechos de leche pasteurizada (recuento <50 UFC/g) adicionada del fago. Sin embargo, recuentos de aproximadamente 50 UFC/g de S.E. se encontraron en los quesos fabricados con la leche cruda adicionada de fagos luego de 99 días de almacenamiento a 8° C. Esta diferencia es significativa al considerar los resultados obtenidos en los quesos fabricados a partir de leche pasteurizada adicionada de fagos, lo que sugiere que el fago es más efectivo en quesos hechos a partir de leche pasteurizada.

El mismo año, Leverentz *et al.*, (2001), estudiaron el efecto de una mezcla de bacteriófagos líticos en la reducción de *Salmonella* Enteritidis en cortes de melones y manzanas mantenidos a diferentes temperaturas (5, 10 y 20 °C). Los cortes de frutas fueron experimentalmente contaminados con 25  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de la cepa desafío; diez minutos después de la contaminación, se agregaron 25  $\mu$ L de la mezcla de fagos en una concentración de  $2 \times 10^8$  UFP/mL. Los recuentos de *Salmonella* fueron realizados a las 0, 3, 24, 48, 120 y 168 horas después de la aplicación de los fagos. A los 5° C y 10° C, en los cortes de melón, la mezcla de fagos logró reducir los recuentos de *Salmonella* en aproximadamente 3,5  $\log_{10}$  UFC/g y a 20° C en aproximadamente 2,5  $\log_{10}$  UFC/g. Por el contrario, en los cortes de manzana, la mezcla de los fagos no logró una reducción significativa de los recuentos de la bacteria en estudio a ninguna de las tres temperaturas, atribuyéndose principalmente al bajo pH (4,2) que posee de manera natural esta fruta. Los mismos autores en el año 2003, analizaron el efecto de la aplicación conjunta de una bacteriocina (nisina) y de una mezcla de bacteriófagos en el control de *Listeria monocytogenes*, en las mismas frutas anteriormente mencionadas. En los melones tratados con 200 y 400 UI de nisina los recuentos bacterianos se redujeron entre 2,8 a 3,2  $\log_{10}$  después de siete días; si a la nisina se le adicionaba la mezcla de fagos, los recuentos bacterianos se reducían entre 4,3 y 5,7  $\log_{10}$ . En cuanto a las manzanas, el tratamiento con 200 y 400 UI de nisina redujo los recuentos bacterianos en aproximadamente 0,9 a 2 log y en combinación con el tratamiento con fagos los recuentos se redujeron en 1,5 a 2,3 log. A modo de conclusión, en ambos tipos

de frutas, la combinación fago-nisina redujo los recuentos bacterianos en niveles significativamente mayores que el tratamiento sólo con nisina.

Frente al problema de contaminación de las carcasas de pollos, Goode *et al.*, (2003) estudiaron la capacidad de bacteriófagos líticos de reducir los recuentos de *Salmonella* Enteritidis, utilizando trozos de piel de aves experimentalmente contaminados. Trozos de 60 cm<sup>2</sup> de piel, se contaminaron con S.E. en una concentración de 10<sup>3</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, luego una vez seco, se aplicó el fago a una concentración de 10<sup>3</sup> UFP/cm<sup>2</sup>, y, se dejaron a 4 °C por 24 y 48 horas. Los resultados fueron reducciones significativas de los recuentos de S.E. de un 22% y un 11%, a las 24 y 48 horas, respectivamente. Cuando analizaron el efecto de un tratamiento con altas dosis de bacteriófagos (MOI 10<sup>5</sup>), lograron que las muestras fueran negativas a la presencia de la bacteria. Con este estudio los autores demostraron que los fagos son efectivos en la reducción de la contaminación bacteriana de las carcasas, especialmente cuando se aplica una MOI elevada.

En la búsqueda de la eliminación de *Escherichia coli* O157:H7 de la superficie de carnes contaminadas con esta bacteria, O' Flynn *et al.*, (2004), evaluaron la habilidad de una mezcla de tres bacteriófagos de lisar la bacteria *in vitro*. Utilizaron 18 piezas de carne, nueve que recibieron la bacteria y el fago y nueve que sirvieron como grupos controles. Todos los trozos de carne, fueron inoculados en diferentes puntos con un total 100 µL de una suspensión de *E. coli* O157:H7 (2 x 10<sup>3</sup> UFC), fueron mantenidos a 37 °C por 1 hora y luego, se les adicionó 1 mL (en varios puntos) de la suspensión de bacteriófagos (2 x 10<sup>8</sup>). Las muestras se mantuvieron a 37 °C por 1 hora, al término de este período cada una de las muestras fueron enriquecidas con caldo infusión cerebro corazón (BHI), y se incubaron a 37 °C por 2 horas, para posteriormente realizar los recuentos. Todas las piezas de carne de los grupos controles, tuvieron recuentos aproximados de 10<sup>5</sup> UFC/mL, en cambio, en el grupo que recibió la terapia, siete de las nueve piezas fueron negativas a la presencia de la bacteria y las dos muestras positivas tuvieron recuentos menores de 10 UFC/mL.

Con el mismo objetivo Fiorentin *et al.*, (2005), utilizaron bacteriófagos para reducir los recuentos de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 4 en piernas de gallinas experimentalmente infectadas, por inmersión en una suspensión que contenía

aproximadamente  $10^6$  UFC/mL de S.E. La inoculación con bacteriófagos también se realizó por inmersión en una suspensión que contenía  $10^9$  UFP/mL, con lo que se logró una MOI de  $10^3$ . Luego de ser ubicados en bolsas estériles, las piernas fueron mantenidas a 5 °C por 15 días, realizando análisis bacterianos cada tres días. Los recuentos en el grupo control (sólo S.E.), fueron desde  $0,66 \times 10^8$  UFC/mL a  $4,84 \times 10^8$  UFC/mL, en cambio, el grupo que fue tratado con bacteriófagos tuvo recuentos que iban desde  $0,29 \times 10^8$  UFC/mL a  $3,92 \times 10^8$  UFC/mL. El análisis estadístico mostró reducciones significativas, en el grupo tratado, en los días 3, 6 y 9 de análisis de las muestras.

Higgins *et al.*, (2005), estudiaron el efecto de la aplicación de un bacteriófago (PHL4) en la reducción de *Salmonella* Enteritidis en carcasas de pollo. En los experimentos uno y dos se tomaron alícuotas de agua del lavado de las carcasas y se le adicionó 0,5 mL de una suspensión de S.E. que contenía  $0,92 \times 10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$  UFC/mL, respectivamente, en estos ensayos se utilizó un bacteriófago único (PHL 4) del cual se adicionaron 0,5 mL para lograr una concentración final de  $10^6$  y  $10^{10}$  UFP/mL, las muestras se mantuvieron por 24 horas en hielo húmedo. Los resultados de estos experimentos, mostraron reducciones de los recuentos de la bacteria entre 50 y 100%, dependiendo de la concentración de fagos. Para los experimentos tres y cuatro, carcasas de broiler se colocaron en bolsas de autoclave y fueron inoculadas con 100  $\mu$ L de una suspensión de S.E. por toda el área de la pechuga, que contenía 31 o 20 UFC, respectivamente para cada experimento. Luego, las carcasas fueron almacenadas por 2 horas a 4 °C. Luego se extrajeron de las bolsas y por aspersion se les inoculó 5,5 mL/carcasa de la suspensión de bacteriófago (experimento 3:  $10^{10}$  UFP/mL; experimento 4:  $0,53 \times 10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  o  $10^{10}$  UFP/mL). Los resultados de estos experimentos mostraron reducciones de los recuentos del orden de un 85% y 93%, respectivamente, cuando el bacteriófago fue aplicado en elevadas concentraciones ( $10^8$  o  $10^{10}$  UFP/mL).

Carlton *et al.*, (2005), analizaron la capacidad de un bacteriófago (P100) en el control de *Listeria monocytogenes* en queso fresco, para lo cual, simularon un proceso de manufacturación. La bacteria se adicionó en la superficie del queso fresco en una concentración que varió de 1 a 10 UFC/g. En una primera experiencia, se aplicó una concentración de bacteriófagos de  $1,5 \times 10^8$  UFP/mL, lo que logró reducir los recuentos de *Listeria* en 2 – 3  $\log_{10}$ . Aunque esto representó una gran reducción, no logró la completa eliminación de la bacteria. Sin embargo, cuando se utilizó una concentración más alta del

fago ( $3 \times 10^9$  UFP/mL), se observó la completa eliminación de *Listeria monocytogenes*. Los resultados de este experimento mostraron que el efecto inhibitorio del bacteriófago sobre *Listeria* fue claramente dosis dependiente. Con estos valores, los autores concluyeron que el bacteriófago P100, puede ser una herramienta efectiva y segura para el control de *Listeria* en alimentos y equipamiento contaminado.

En el año 2006, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de Norteamérica (FDA) aprobó el uso, como aditivo comercial, de una mezcla de 6 bacteriófagos líticos, como agentes antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, en carnes listas para servir y productos avícolas, siendo éste el primer antecedente de aprobación legal del uso de bacteriófagos en alimentos de manera comercial (Lang, 2006).

En la búsqueda de nuevos medios para la desinfección de la superficie de vegetales frescos y alimentos cárnicos, Abuladze *et al.*, (2008), estudiaron el efecto de una mezcla de tres bacteriófagos líticos (ECP-100) sobre tomates, hojas de espinaca, brócoli y carne molida, experimentalmente contaminados con *Escherichia coli* O157:H7. El brócoli fue contaminado con  $7,1 \times 10^2$  UFC/g, los tomates con  $6,5 \times 10^2$  UFC/g, las espinacas con  $1,4 \times 10^4$  UFC/g y la carne molida con  $3,4 \times 10^3$  UFC/g; luego, las muestras fueron mantenidas a 20-22 °C por 60 minutos. Posteriormente se les adicionó la mezcla de fagos ( $10^8$  UFP/mL) mediante aspersion; las muestras fueron mantenidas a 10 °C y analizadas a las 24, 120 y 168 horas. Los resultados de todas las muestras evidenciaron reducciones de *E. coli* O157:H7 viable entre 94 y 100%. Estos resultados apoyan la idea de que los fagos pueden ser utilizados en la prevención de enfermedades transmitidas por la presencia de bacterias en los alimentos.

Guenther *et al.*, (2009), analizaron la capacidad biocontroladora de dos bacteriófagos líticos sobre *Listeria monocytogenes* en diferentes alimentos listos para servir. Estos alimentos fueron inoculados con la bacteria ( $1 \times 10^3$  UFC/g) y dos horas después, se les adicionó los fagos ( $3 \times 10^6$  a  $3 \times 10^8$  UFP/g); las muestras fueron almacenadas por seis días a 6 °C. En los alimentos líquidos como leche chocolatada y salmuera de queso mozzarella, los recuentos bacterianos disminuyeron rápidamente por debajo de los niveles de detección directa. En alimentos sólidos (hot dogs, cortes de carne de pavo, salmón ahumado, mariscos, repollos cortados, hojas de lechugas), los

fagos redujeron los recuentos bacterianos en cinco o más unidades logarítmicas. Los resultados no se modificaron al almacenar por 13 días a 20 °C. En general, cuando se aplicaron mayores concentraciones de fagos se obtuvieron mejores resultados.

En cuanto a la experiencia nacional en el empleo de bacteriófagos, se han aislado bacteriófagos líticos contra S.E. y se han utilizado como terapia preventiva en pollos y gallinas de postura. Es así como Borie *et al.*, (2008a), evaluaron el efecto del bacteriófago F3αSE en la prevención de la colonización intestinal de pollas White Legorn de 10 días de edad; para ello, inocularon dos grupos de aves, por vía oral con 1 mL de una suspensión de bacteriófagos ( $10^6$  y  $10^7$  UFP, respectivamente); dos horas después ambos grupos de aves fueron desafiados, vía oral, con 1 mL de una suspensión de S.E. ( $4 \times 10^6$  UFC). Los resultados mostraron una reducción en la incidencia de infección, en ambos grupos tratados con BF (33,3% y 40% v/s 86,6% en el grupo control de infección), sin embargo, sólo se consideró significativa la reducción lograda en el grupo que recibió la MOI del fago más elevada.

En el mismo año, Borie *et al.*, (2008b), midieron la eficacia preventiva de una mezcla de bacteriófagos en la reducción de la colonización con *Salmonella* Enteritidis. Para lograr ésto, pollas White Legorn fueron desafiadas con S.E. ( $9,6 \times 10^5$  UFC), y tratadas vía aspersión de gota gruesa o por agua de bebida con la mezcla de bacteriófagos en estudio (MOI  $10^3$  UFP), 24 horas antes de la infección. La bacteriología cualitativa, mostró reducción en la incidencia de infección en los grupos tratados con BF por ambas vías, en relación al grupo control; sin embargo, sólo se consideró significativa la reducción de la incidencia de infección obtenida en el grupo tratado por aspersión (72,7% v/s 100% en el grupo control de infección). En cuanto a la bacteriología cuantitativa, tanto los resultados de los recuentos del grupo que recibió los bacteriófagos por aspersión ( $\log_{10}$  4,04 UFC), como por agua de bebida ( $\log_{10}$  4,25 UFC), fueron significativamente más bajos que los del grupo control ( $\log_{10}$  5,67 UFC).

Con el fin de evaluar la eficacia de una terapia combinada entre bacteriófagos y exclusión competitiva (EC), Borie *et al.*, (2009a), utilizaron pollos comerciales, distribuidos en tres grupos: un grupo tratado sólo con EC, otro grupo tratado sólo con BF y un tercer grupo tratado con EC y BF. La bacteriología cualitativa, mostró que el grupo que recibió ambas terapias (EC más BF) tuvo una incidencia de infección (38,7%) significativamente

menor que la del grupo control de infección (100%), y que los de los grupos tratados sólo con EC (75,7%) y sólo con BF (80%). En cuanto a la bacteriología cuantitativa, se consideraron significativas las reducciones de los recuentos cecales promedio, entre el grupo que recibió ambas terapias ( $1,6 \times 10^2$  UFC/g), comparado con el grupo control ( $1,56 \times 10^5$  UFC/g), con el grupo tratado con EC ( $4,23 \times 10^3$  UFC/g) y con el grupo tratado con BF ( $9,48 \times 10^3$  UFC/g).

En Chile los estudios realizados en gallinas de postura, sobre el uso de bacteriófagos líticos como profilaxis, no han tenido los prometedoros resultados logrados en pollos. En un estudio realizado por Borie *et al.*, (2009b), se evaluó la capacidad de una mezcla de tres bacteriófagos de disminuir la incidencia de infección y los recuentos de S.E. en el tracto reproductivo de gallinas. Los resultados de la bacteriología cualitativa mostraron que, a pesar de que los bacteriófagos son capaces de llegar a ovario y oviducto, éstos no logran reducir la incidencia de colonización (del orden de 13,3% en los grupos control y terapia). En cuanto a la bacteriología cuantitativa, sólo se logró una disminución significativa de los recuentos a nivel del tejido ovárico (recuento promedio de  $\log 0,31$  UFC/g), comparado con los recuentos del grupo control (recuento promedio de  $\log 0,95$  UFC/g). En el estudio, no se logró aislar bacteriófagos en los huevos de las gallinas infectadas y tratadas, por lo que aún no está clara su efectividad al ser dosificados por la vía oral. Es así, como en busca de mejores resultados en el control de S.E. del huevo, parece interesante analizar la efectividad de una mezcla de tres bacteriófagos líticos administrados directamente a través de la cáscara de huevos experimentalmente contaminados con S.E.

## **HIPÓTESIS:**

El uso de una combinación de tres bacteriófagos, logra una disminución de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en el contenido de huevos libres de patógenos específicos (SPF), experimentalmente infectados.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar la actividad biocontroladora de una mezcla de bacteriófagos contra *Salmonella* Enteritidis, sobre el contenido de huevos frescos, experimentalmente infectados

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Desarrollar un protocolo para la permeabilización de la cáscara del huevo
- Establecer la mejor vía de administración de bacteriófagos en huevos frescos permeabilizados
- Determinar la efectividad de la administración de una combinación de tres bacteriófagos en la disminución de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en huevos experimentalmente infectados

## MATERIALES y MÉTODOS

**1. Financiamiento:** El presente trabajo fue financiado por el proyecto Fondecyt N° 1080291 “Control de *Salmonella* Enteritidis en avicultura: Bacteriófagos en aves de postura y alimentos derivados de la industria avícola”. El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

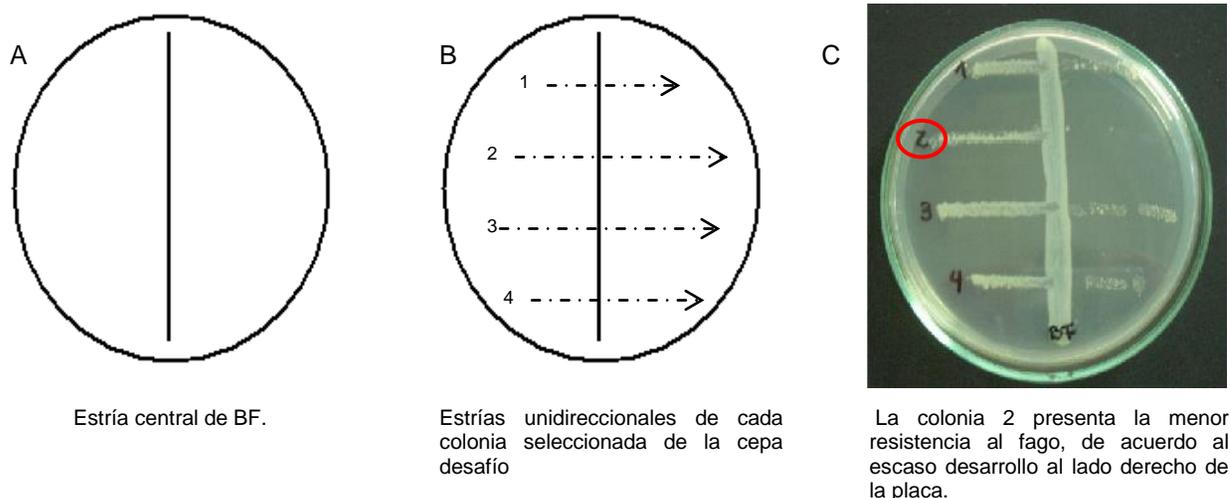
**2. Huevos:** Se utilizaron huevos libres de patógenos específicos (SPF), provenientes de la Universidad Austral de Chile. Se descartaron, mediante observación con ovoscopio, los huevos trizados y rotos. Luego de esto, los huevos fueron pesados y divididos en grupos, cuidando que en todos ellos existiera un número similar de huevos de diferentes pesos. Previo al ensayo, los huevos de todos los grupos experimentales fueron permeabilizados mediante un método químico (descrito en punto 6).

**3. Cepa desafío:** Se utilizó una cepa nativa de *Salmonella* Enteritidis (S.E.) de origen aviar, donada por el Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Desde entonces la cepa se ha sometido a 9 pasajes en pollos para exacerbar su virulencia. Se seleccionó una mutante espontánea resistente al Ácido nalidíxico (*nal*) y Rifampicina (*rif*) (Dr. James Robeson, Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso).

Previo a la realización del ensayo propiamente tal, se seleccionó la colonia de S.E. con menor resistencia a la actividad lítica de los bacteriófagos (BF) en estudio. Para ello, en una placa de Agar común (*Difco*®), se colocó mediante una tórula estéril la mezcla de BF ( $10^{11}$  UFP/mL), en una estría vertical central que abarcó toda la placa (ver esquema N° 1A). Perpendicular y pasando por sobre esta línea central, se sembraron en estrías unidireccionales, de izquierda a derecha (ver esquema N° 1B), diferentes colonias de la cepa desafío (5 por placa) y se incubaron a 37° C por 24 horas. La colonia con menor resistencia a la actividad lítica de los BF (ver esquema N° 1C), fue aquella que produjo escaso o nulo desarrollo bacteriano al lado derecho de la estría (después de contactar los BF) y abundante desarrollo en la porción izquierda (antes de contactar los BF).

**4. Bacteriófagos:** Para el estudio se utilizó una mezcla de 3 bacteriófagos (BF) nativos líticos denominados F18 $\alpha$ , EST2 y EST16 y caracterizados previamente (Robeson *et al.*, 2008). Estos fueron suspendidos en buffer BM (0,3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> por litro de agua destilada) y posteriormente diluidos en agua peptonada fosfatada (APF, Oxoid®), para ser administrados con una multiplicidad de infección (MOI, cantidad de bacteriófagos ofrecidos por bacteria inoculada) de 10<sup>7</sup> unidades formadoras de placa (UFP)/ dosis. Los fagos fueron preparados por el Dr. James Robeson de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y fueron administrados por inmersión y aspersión a los huevos SPF en estudio (descrito en punto 8).

**Esquema N° 2.** Determinación de resistencia a la actividad lítica de bacteriófagos en diferentes colonias de *Salmonella* Enteritidis.



**5. Dosis mínima infectante (DMI):** definida como la menor dosis de *S.E. nal rif* que permitió su reaislamiento en el 100% del contenido de los huevos experimentalmente infectados.

Para determinar esta dosis, se utilizaron grupos de 10 huevos SPF, los que se inocularon con la cepa desafío de la siguiente manera: en un punto de la cámara de aire (extremo romo) se procedió a desinfectar dos veces con etanol 70° y, utilizando un taladro Dremel 300 (*Dremel*®), la cáscara fue abierta, haciendo un orificio de aproximadamente 2 mm, sin dañar las membranas internas (Adam *et al.*, 2002).

Para la inoculación del huevo, se trabajó con un cultivo de *Salmonella* Enteritidis *naf rif* incubado a 37° C por 24 horas en caldo Luria Bertani (*Difco*®). De este caldo se traspasó una alícuota a un tubo con suero fisiológico estéril (S.F.E.), al que se le ajustó la turbidez de acuerdo al tubo 0, 5 del Nefelómetro de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/mL). A partir de esta suspensión se realizaron diluciones al décimo, desde  $10^8$  UFC/mL hasta  $10^2$  UFC/mL. La concentración de la cepa desafío fue corroborada mediante recuento bacteriano (descrito en bacteriología cuantitativa punto 9.2).

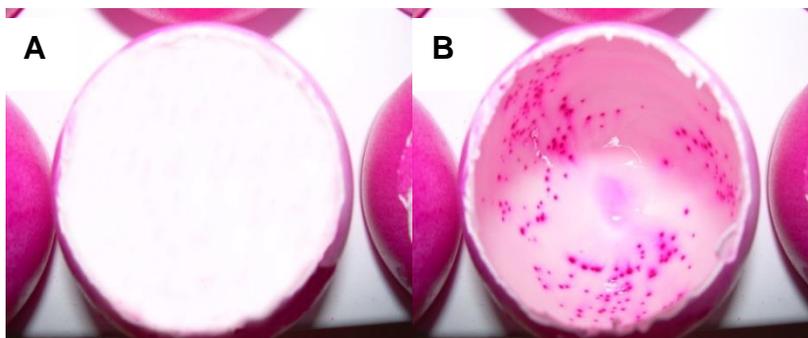
Grupos de 10 huevos por cada dilución preparada, se inocularon con una jeringa de tuberculina (por el orificio previamente abierto) con 0,1 mL de la cepa desafío. Luego, los huevos fueron sellados con silicona líquida (*Artel*®) e incubados a 37° C por 24 horas. Después de la incubación, los huevos fueron asépticamente abiertos: se tomó al huevo con guantes y se quebró en el borde de un vaso de precipitado estéril, recolectándose en bolsas de Stomacher (*Whirl Pak, Nasco*®) las muestras del contenido de cada huevo (yema y albúmina juntas). Cada muestra fue pesada y luego analizada por bacteriología cualitativa (descrito en punto 9.1).

**6. Protocolos de permeabilización de la cáscara del huevo:** Para lograr remover la cutícula de la superficie de los huevos, y con ello facilitar la entrada de los bacteriófagos, se procedió a realizar varios ensayos para así determinar un protocolo óptimo. Se analizaron los siguientes reactivos, en distintas concentraciones: Ácido ascórbico (*Merck*®), EDTA (*Merck*®), NaOH (*Merck*®), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Hofsa*®), Ácido Cítrico (*Merck*®), Ácido Succínico (*Merck*®), Hipoclorito de Sodio (*Clorinda*®) y Urea 8M disuelta en Tris HCl 50 mM (*Merck*®).

Con los reactivos se realizaron soluciones, frías o templadas, y se procedió a colocar los huevos (10 por grupo) en inmersión por periodos de tiempo variable (2 minutos – 60 minutos), según el tipo de solución empleada. Luego, los huevos se dejaron secar y, para visualizar el grado de permeabilización lograda, se procedió a teñirlos mediante inmersión, por un tiempo variable (15 minutos – 180 minutos) en una solución de fucsina disuelta en agua destilada (4g/L). Para la lectura se abrió el huevo en la cámara de aire, se vació el contenido evidenciando la presencia de colorante en la superficie interna de la cáscara del huevo y sus membranas (Foto N° 1). Se seleccionó

aquel reactivo con el que se logró la mayor permeabilización a más bajas concentraciones y, que a su vez, no tuviese propiedades bactericidas sobre la cepa desafío.

**Foto N° 1.** Visualización de la permeabilización de los huevos.



A: Huevo no permeabilizado donde no se evidencia presencia del colorante en la superficie interna de la cáscara; B: Huevo permeabilizado donde se evidencia presencia del colorante en la superficie interna de la cáscara.

#### **7. Evaluación del efecto bactericida del método de permeabilización seleccionado:**

Luego de permeabilizar la cáscara del huevo con el protocolo seleccionado, se procedió a la inoculación de 0,1 mL de una suspensión de S.E. ( $10^2$  UFC/mL) en la cámara de aire, dejando reposar por 2 horas a temperatura ambiente e incubando a  $37^{\circ}$  C por 24 h. Posteriormente, los huevos fueron asépticamente abiertos (punto 5) y se colocaron en una bolsa plástica para Stomacher (*Whirl Pak, Nasco*®), con medio de enriquecimiento Rappaport - Vassiliadis (RV, *Difco*®), en razón aproximada de 1:10. Posteriormente, cada muestra se analizó por bacteriología cualitativa y cuantitativa (Punto 9.0). Se consideró un grupo de huevos SPF control, los que fueron inoculados con 0,1 mL de la misma suspensión de S.E. ( $10^2$  UFC/mL), no permeabilizados.

**8. Efectividad de bacteriófagos dosificados por aspersión e inmersión sobre el contenido de huevos contaminados con S.E.:** se formaron seis grupos de huevos SPF para la realización del ensayo (Tabla N° 1).

**Tabla N° 1.** Grupos experimentales de huevos SPF.

Grupos	Nº de huevos	Dosis de bacteriófagos (MOI)*	Dosis S.E. **** <i>nal' rif</i>
(1) Control negativo	10	--	--
(2) Control de infección (S.E)	50	--	1 DMI**
(3) Control BF *** por inmersión	10	10 <sup>7</sup>	--
(4) Control BF por aspersión	10	10 <sup>7</sup>	--
(5) S.E. + BF inmersión	50	10 <sup>7</sup>	1 DMI
(6) S.E. + BF aspersión	50	10 <sup>7</sup>	1 DMI

\*MOI: multiplicidad de infección

\*\*DMI: dosis mínima infectante

\*\*\*BF: Bacteriófago

\*\*\*\*S.E.: *Salmonella* Enteritidis

Este estudio se realizó en las siguientes etapas:

8.1. Permeabilización de la cáscara de la totalidad de los huevos con el método previamente seleccionado (descrito en punto 6).

8.2. Selección de colonias de S.E. con baja resistencia a la actividad lítica de los bacteriófagos en estudio (descrito en punto 4).

8.3. Contaminación de los huevos permeabilizados (descrito en punto 5): Se procedió a inocular los huevos de los grupos 2, 5 y 6 en la cámara de aire con una dosis mínima infectante de S.E. (10<sup>2</sup> UFC/0,1 mL) y se dejaron a temperatura ambiente por 2 horas. El resto de los grupos (1, 3 y 4) recibió un placebo que consistió en 0,1 mL de suero fisiológico estéril.

8.4. Administración de Bacteriófagos: A los grupos 4 y 6, se les aplicó dos veces la mezcla de bacteriófagos (10<sup>8</sup> UFP/mL) por aspersión mediante gota gruesa, realizando dos aspersiones con un lapso de 120 minutos entre ambas. En los grupos 3 y 5, se aplicó la mezcla de bacteriófagos por inmersión en una solución fría durante 3 horas.

Luego de estas etapas, los huevos de todos los grupos fueron mantenidos a temperatura ambiente por 5 días, en laboratorios diferentes, para evitar contaminación cruzada con BF y la cepa desafío. Durante los 5 días (D1, D2, D3, D4 y D5), 10 huevos de los grupos experimentales 2, 5 y 6 fueron analizados cada 24 horas, por bacteriología cualitativa y cuantitativa. Los grupos controles 1, 3 y 4 fueron analizados solo al final de la experiencia (D5).

**9. Bacteriología:** Se realizó siguiendo las pautas recomendadas por Murray y Barton (1993):

9.1 Bacteriología Cualitativa: Cada muestra del contenido total del huevo (yema y albúmina) fue pesada y colocada individualmente en una bolsa plástica para Stomacher (*Whirl Pak, Nasco®*), a la cual se le adicionó 250 mL de caldo Rappaport - Vassiliadis (R – V, *Difco®*), independiente del peso de los contenidos (razón entre 1:3 a 1:5). Posteriormente, cada muestra se homogeneizó por 180 segundos en un equipo Stomacher 300 (*Arquimed®*) y se incubó a 37° C por 72 horas. La siembra a partir de estas bolsas homogeneizadas se efectuó a las 48 y 72 horas sobre placas de agar XLD (*Difco®*) con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/mL, *Arlab®*), las que fueron incubadas a 37° C durante 24 horas. Las colonias sospechosas (centro negro y halo transparente), se sometieron a una aglutinación con suero anti-*Salmonella* grupo D1 (*Difco®*), según las recomendaciones del fabricante.

9.2 Bacteriología Cuantitativa: Para realizar el recuento de la cepa desafío en el contenido del huevo, se extrajo de manera individual, 1 mL de cada homogeneizado en caldo Rappaport-Vassiliadis incubado por 15 horas y se le realizaron 4 diluciones al centésimo en agua peptonada fosfatada (APF, *Oxoid®*). Posterior a ello, se obtuvieron 100 µL del homogeneizado inicial y de cada una de sus diluciones, que se sembraron por extensión con asas de Digrafsky, en la superficie de placas de agar XLD (*Difco®*) adicionado con Ácido Nalidíxico y Rifampicina (20 µg/ml, *Arlab®*). Dichas placas fueron incubadas por 24 horas a 37° C y luego, se procedió al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

**10. Normas de Bioseguridad:** *Salmonella* Enteritidis corresponde a un patógeno de nivel de bioseguridad 2, correspondiente a *Salmonella* no tíficas. Dentro de las normas que se implementaron se incluyen: entrada restringida al área de manipulación de la bacteria, uso de vestimenta desechable (guantes, mangas, trajes), uso de delantal, uso de mecheros y gabinete de bioseguridad clase IIA (*Heal Force*®), utilización de desinfectantes para la limpieza del laboratorio y descontaminación de material mediante el uso de autoclave y/o incineración según corresponda (CDC, 2007).

**11. Análisis Estadístico;** Los resultados de la bacteriología cualitativa se expresaron como proporciones de positividad y las diferencias entre grupos experimentales (2, 5 y 6), fueron sometidas a la prueba de independencia con  $\chi^2$ . Los resultados de la bacteriología cuantitativa (recuentos) de los grupos experimentales, se expresaron como unidades logarítmicas ( $\log_{10}$ ) y sus diferencias se estudiaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de un criterio (Infostat, 2004).

## RESULTADOS

La dosis con la cual se obtuvo un 100% de los huevos positivos a *Salmonella* Enteritidis, correspondió a  $1,28 \times 10^1$  UFC/mL (DMI). Por lo anterior, la concentración de bacteriófagos utilizada fue de  $10^8$  UFP/mL (MOI  $10^7$ ) (descrito en punto 4).

### 1. Permeabilización de la cáscara del huevo

Luego de realizar una serie de ensayos, en los que se utilizaron distintos protocolos de permeabilización (Anexo N° 1) se optó por Hipoclorito de Sodio en una concentración de 0,00825% (0,825 mL de Hipoclorito de Sodio al 5% en 499,2 mL de agua destilada), solución que logró la permeabilización del 100% de los huevos.

En cuanto al grado de permeabilización alcanzado, los resultados fueron variables pero en todos los huevos analizados se pudo observar la penetración del colorante en la parte interna de la cáscara (Tabla N° 2).

**Tabla N° 2.** Nivel de penetración de fucsina en huevos permeabilizados con Hipoclorito de Sodio 0,00825%.

Huevo	Grado de permeabilización alcanzado*
1	+++
2	+++ <sup>c</sup>
3	++ <sup>b</sup>
4	+++
5	++
6	+++
7	++
8	++
9	+++
10	+ <sup>a</sup>

\*+<sup>a</sup>: < de 10 puntos de fucsina distribuidos en la parte interna de la cáscara del huevo; ++<sup>b</sup>:  $\geq 10$  y < 15 puntos de fucsina en la parte interna de la cáscara del huevo; +++<sup>c</sup>:  $\geq 15$  puntos de fucsina distribuidos en la parte interna de la cáscara del huevo.

## 2. Evaluación del efecto bactericida de la permeabilización con Hipoclorito de Sodio al 0,00825%.

Los resultados cualitativos y cuantitativos de la evaluación del efecto bactericida se resumen en el Tabla N° 3. En relación a la bacteriología cualitativa, tanto en el grupo de huevos no permeabilizados (control de infección) como en el grupo de huevos permeabilizados con hipoclorito 0,00825% se obtuvo un porcentaje de contaminación con S.E. del 100% de los huevos.

En relación a la bacteriología cuantitativa, al comparar las medias aritméticas del grupo control de infección con el grupo de huevos permeabilizados, se observaron valores similares de recuentos bacterianos, incluso, la media del grupo de huevos permeabilizado fue levemente mayor que la del grupo control. Mediante un análisis de varianza, fue posible determinar que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) de los recuentos entre ambos grupos.

**Tabla N° 3.** Huevos contaminados (%) y recuentos bacterianos ( $\log_{10}$  UFC/mL) de huevos SPF permeabilizados con Hipoclorito de Sodio 0,00825% y experimentalmente contaminados con *Salmonella* Enteritidis.

Grupos	Nº de huevos	Porcentaje de contaminación con S.E.	Recuento promedio de S.E. ( $\log_{10}$ UFC/mL) $\pm$ D.E.*	Recuentos mínimos y máximos de S.E. (UFC $\log_{10}$ )
Control**	20	100	7,86 <sup>a</sup> $\pm$ 0,53	7,00 – 8,76
Permeabilizado	20	100	8,14 <sup>a</sup> $\pm$ 0,41	7,34 – 8,89

\*D.E.: desviación estándar

\*\*Huevos no permeabilizados e inoculados con 1 DMI de S. E. en cámara de aire

Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ )

### 3. Efectividad de bacteriófagos sobre el contenido de huevos SPF experimentalmente contaminados con S. E.

#### 3.1. Bacteriología cualitativa:

Los resultados de la bacteriología cualitativa (Tabla N° 4) muestran que la incidencia de contaminación al día 1 (D1) fue igual en los grupos control de infección, grupo tratado con BF por aspersión y grupo tratado con BF por inmersión, correspondiendo a un 100% en todos ellos. En los días 2, 3, 4 y 5 (D2, D3, D4 y D5) la incidencia de contaminación de los huevos fue igual en los grupos control y en el grupo tratado con BF por aspersión, alcanzando un 100% en ambos grupos, mientras que la contaminación del grupo que recibió BF por inmersión, fue de un 90% en todos los días (D2 a D5). Estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 4.** Contaminación de huevos SPF con S.E. y tratados con BF por inmersión y aspersión, según el día de obtención de la muestra.

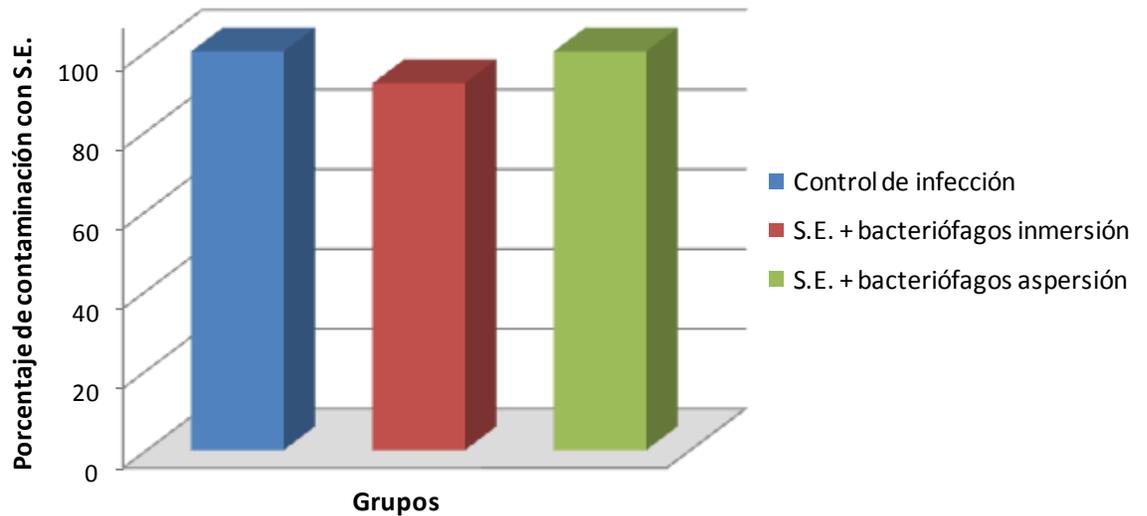
Grupo	Porcentaje de contaminación de huevos				
	D*1	D2	D3	D4	D5
Control de infección	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
S.E. + BF inmersión	100 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
S.E. + BF aspersión	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

\*D: día

Letras iguales señalan que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0, 05$ )

Al analizar el porcentaje de contaminación de la totalidad de los huevos de cada grupo ( $n = 50$ ), independiente del día, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos control de infección, grupo de BF dosificados por inmersión y grupo de bacteriófagos dosificados por aspersión (Gráfico N° 1).

**Gráfico N° 1.** Contaminación de huevos SPF con S. E. y tratados con BF por inmersión y aspersion, independiente del día.



En los grupos control negativo (huevos no contaminados ni tratados con BF), grupo dosificado sólo con bacteriófagos por inmersión y grupo dosificado sólo con bacteriófagos por aspersion no fue posible detectar *Salmonella* Enteritidis, lo que descarta la posibilidad de contaminación cruzada entre los grupos experimentales, demostrando con ésto, que los huevos fueron manipulados de manera apropiada.

### 3.2. Bacteriología cuantitativa:

Al analizar los resultados de la bacteriología cuantitativa (Tabla N° 5), es decir, los recuentos promedios ( $\log_{10}$  UFC/mL) de los distintos grupos de acuerdo al día en el que se obtuvo la muestra (D2 al D5), el análisis de varianza mostró que las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ), entre el grupo dosificado con BF por inmersión y el grupo control de infección en todos los días, así como también, entre el grupo dosificado con BF por aspersión y el grupo control de infección. El análisis de las diferencias entre el grupo dosificado con BF por inmersión y el grupo dosificado con BF por aspersión, determinó que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ambos, para ninguno de los días (D2 a D5).

**Tabla N° 5.** Recuentos promedios ( $\log_{10}$  UFC/mL) de *Salmonella* Enteritidis, en huevos dosificados con BF por inmersión y por aspersión, según día (D1 al D5).

Grupo	Recuentos promedio ( $\log_{10}$ UFC/mL) $\pm$ D.E.*				
	D**1	D2	D3	D4	D5
Control de infección	NR***	9,31 <sup>a</sup> $\pm$ 0,24	9,13 <sup>a</sup> $\pm$ 0,18	9,16 <sup>a</sup> $\pm$ 0,29	9,12 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23
S.E.+ BF inmersión	NR	6,54 <sup>b</sup> $\pm$ 2,49	5,13 <sup>b</sup> $\pm$ 2,23	5,74 <sup>b</sup> $\pm$ 2,38	7,19 <sup>b</sup> $\pm$ 2,67
S. E.+ BF aspersión	NR	7,39 <sup>b</sup> $\pm$ 0,79	6,57 <sup>b</sup> $\pm$ 1,42	6,82 <sup>b</sup> $\pm$ 2,67	7,08 <sup>b</sup> $\pm$ 1,71

\*D.E.: Desviación estándar

\*\*D: día

\*\*\*NR: no realizado por razones ajenas a la experiencia

a, b: letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0, 05$ )

Al analizar la bacteriología cuantitativa de la totalidad de los huevos (Tabla N° 6) de cada grupo, independiente del día, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos control de infección y los grupos de huevos tratados con BF, tanto por inmersión como por aspersión. La dosificación por inmersión y aspersión no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellas.

**Tabla Nº 6.** Recuentos ( $\log_{10}$  UFC/mL) de *Salmonella* Enteritidis desde huevos SPF experimentalmente infectados y tratados con BF por inmersión y aspersión.

<b>Grupos</b>	<b>Nº de huevos</b>	<b>Recuento promedio S.E. (<math>\log_{10}</math> UFC*/mL) <math>\pm</math> D.E.</b>	<b>Recuentos mínimos y máximos S.E. (<math>\log_{10}</math> UFC)</b>
Control de infección	40	9,18 <sup>a</sup> $\pm$ 0,24	8,57 – 9,64
S.E. + BF inmersión	40	6,15 <sup>b</sup> $\pm$ 2,48	3,45 – 8,78
S.E. + BF aspersión	40	6,96 <sup>b</sup> $\pm$ 1,74	3,46 – 8,88

<sup>a, b</sup>: letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0, 05$ )

## DISCUSIÓN

En la presente investigación, se debió determinar la DMI de S.E. capaz de contaminar la totalidad de los huevos, de tal forma de asemejar el bajo nivel de contaminación natural en los huevos. Esta dosis fue  $1,28 \times 10^1$  UFC/mL, concentración bastante menor a la utilizada por Adam *et al.*, (2002), quienes también inocularon a través de la cámara de aire pero con una dosis de  $2 \times 10^7$  UFC/mL de *Salmonella Typhimurium* C17 en huevos embrionados. Pese a las diferencias de concentración bacteriana, el presente estudio logró un 100% de contaminación a las 72 horas post inoculación, comparado con el 100% obtenido por Adam *et al.*, (2002), 42 horas post inoculación.

Para analizar la actividad biocontroladora de la mezcla de bacteriófagos sobre S.E. en el contenido de los huevos y, en ausencia de un modelo experimental similar, se decidió contaminar los huevos vía cámara de aire y administrar los bacteriófagos por inmersión y aspersion en huevos previamente permeabilizados.

Las razones por la cuales se optó por la inoculación de S.E. a través de la cámara de aire, fueron fundamentalmente dos: en primer lugar, para imitar la forma natural de contaminación horizontal del huevo, en la cual la bacteria tiene que pasar a través de la albúmina para ubicarse en la membrana vitelina y luego pasar a la yema (Gast y Holt, 2000). En segundo lugar, porque esta vía permite conocer la cantidad exacta de bacterias inoculadas inicialmente a los huevos, y con ello, calcular previamente la concentración de fagos a preparar para lograr la MOI establecida. Generalmente, la ruta de contaminación de huevos utilizada por la mayoría de los investigadores, es la inmersión en suspensiones bacterianas altamente concentradas (desde  $10^3$  UFC/mL hasta  $10^9$  UFC/mL), sin embargo, los porcentajes de contaminación logrados son bajos o nulos ( $\leq 53\%$ ). (Rizk *et al.*, 1966; Fajardo *et al.*, 1995; Schoeni *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998b; Wang y Slavik., 1998; Chen *et al.*, 2002; Messens *et al.*, 2006). Otra desventaja que presenta la contaminación vía inmersión, es que se desconoce la cantidad exacta de bacterias que atraviesan la cáscara y que contaminan el contenido de los huevos. Así por ejemplo, Jones *et al.*, (2002), inocularon vía inmersión huevos con una suspensión de S.E. ( $6 \log_{10}$  UFC/mL), los que posteriormente se mantuvieron a 26 °C por 5 semanas. Sus resultados mostraron que en la primera semana post inoculación, los recuentos del contenido de los huevos iban desde  $0,9 \log_{10}$  UFC/mL hasta  $3,6 \log_{10}$

UFC/mL, es decir, el número de bacterias que logró penetrar la cáscara y contaminar el contenido del huevo fue muy bajo, y además, el nivel de contaminación de los huevos tuvo un amplio rango de variación.

Dado que en la literatura revisada no existen estudios publicados sobre la capacidad de penetración de bacteriófagos a través de la cáscara de los huevos, se planteó la necesidad de permeabilizarla, mediante métodos químicos que fueran capaces de remover la cutícula y facilitar la penetración de las partículas fágicas a través de la cáscara, logrando altos títulos de bacteriófagos en el contenido de los huevos. La permeabilización se basó en estudios realizados por Board y Halls (1973), Shafey (2002) y Wellman-Labadie *et al.*, (2008), quienes lograron la permeabilización de la cáscara con EDTA y NaOH, Ácido ascórbico y Urea 8M disuelta en Tris 50 mM, respectivamente. De los seis reactivos químicos analizados (Anexo N° 1), se decidió utilizar Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 0,00825%, fundamentalmente por cuatro razones: porque con este reactivo se lograron altos porcentajes de permeabilización de los huevos (100%), altos grados de permeabilización (dos o más cruces en un 90% de los huevos), fácil preparación y utilización y no produce cambios macroscópicos en la cáscara del huevo (descalcificación). Adicionalmente, se comprobó que este reactivo en la concentración seleccionada, no presentó efecto bactericida residual sobre S.E. ( $p < 0,05$ ), ya que no se observó reducción en la población bacteriana inoculada. Según la literatura investigada, este es el primer estudio que realiza permeabilización de los huevos para incrementar el paso de virus a través de la cáscara de estos.

En este estudio la terapia con fagos no redujo la incidencia de contaminación del contenido de los huevos ( $p > 0,05$ ); similares resultados, han sido obtenidos por la mayoría de los investigadores, que han trabajado con diferentes alimentos tratados con fagos contra diferentes enteropatógenos, entre ellos, Leverentz *et al.*, en cortes de melones y manzanas contaminados con *Salmonella* Enteritidis (2001) y *Listeria monocytogenes* (2003), Fiorentin *et al.*, (2005) en piernas de gallina contaminadas con *Salmonella* Enteritidis, Carlton *et al.*, (2005) en queso fresco contaminado con *Listeria monocytogenes* y Bigwood *et al.*, (2008) en carne cruda y cocida contaminada con *Salmonella* Typhimurium. Por el contrario, O' Flynn *et al.*, (2004), mediante el uso de una mezcla de tres bacteriófagos específicos frente a *Escherichia coli* O157:H7 en trozos de

carne, lograron una reducción significativa de la incidencia de contaminación, en un 78% de las muestras en estudio. Sin embargo, al analizar sus resultados hay que considerar que esta disminución de la incidencia, se refiere solo a la contaminación de la superficie de los trozos de carne, ya que para el estudio bacteriológico sólo se analizó el buffer (agua peptonada fosfatada) adicionado a la muestra, lo que no permite evaluar el efecto de los fagos sobre el grado de contaminación en el interior de la carne.

Entre las razones por las cuales no se habría logrado una disminución en la incidencia de contaminación de los huevos, se encuentra la no penetración de los fagos a través de la cáscara y, por lo tanto, su ausencia en el contenido de los huevos contaminados con S.E. Al respecto, Greer (2005) señaló que existen una serie de barreras físicas presentes en las plantas, animales y alimentos, que impiden la interacción inicial fago-bacteria, es decir, las colisiones que permiten la adsorción del fago en los receptores de superficie de la bacteria. En la presente investigación, al analizar los títulos de bacteriófagos en los huevos que sólo recibieron fagos ya sea por inmersión o aspersión (grupos control BF) ( $10^8$  UFP/mL), se pudo observar que los valores máximos fueron de  $1,1 \times 10^4$  UFP/mL para inmersión y de  $3,1 \times 10^3$  UFP/mL para aspersión (Robeson., 2010)<sup>1</sup>. Dado que estos títulos están muy por debajo de lo administrado a los huevos inicialmente ( $10^8$  UFP/mL) se podría inferir, que gran parte de los fagos no penetraron a través de las cáscaras. Lo anterior está corroborado por Valencia *et al.*, (2009), quienes determinaron la persistencia en albúmina del fago f18, uno de los fagos empleados en el presente estudio. Sus resultados mostraron que este fago es capaz de mantener sus títulos, en ausencia de su bacteria hospedera, durante 144 horas, tiempo similar al empleado en el desarrollo de esta investigación, lo que descarta la posibilidad de disminución de los títulos de fagos después de la penetración.

La presencia de enzimas con propiedades antivirales, como la lisozima y la ovotransferrina en el contenido de los huevos, podría ser otra de las razones por las cuales los fagos no habrían logrado reducir la incidencia de contaminación. Se ha comprobado que la ovotransferrina, posee propiedades antivirales capaces de proteger al

---

<sup>1</sup> Robeson, James. 2010. [comunicación personal]. Pontificia Universidad Católica Valparaíso, Instituto de Biología, Lab. de Bacteriología.

polluelo en desarrollo del virus de la enfermedad de Marek (Giansanti *et al.*, 2002), evento que puede ser extrapolado a los bacteriófagos. Como estas enzimas están presentes también en las membranas de la cáscara (Gantois *et al.*, 2009), probablemente podrían influir de manera negativa en la penetración de los fagos hacia el contenido de los huevos.

Es factible que el fenómeno de resistencia bacteriana pudiera explicar en parte la inefectividad del tratamiento con fagos. Es bien conocido que muchas bacterias dentro de una población se pueden hacer resistentes a la acción lítica de los fagos. En el caso de los fagos f18 y EST2, empleados en la presente investigación, Robeson *et al.*, (2008) detectaron *in vitro* mutantes resistentes en una frecuencia de  $10^1$  mutantes/mL y  $10^3$  mutantes/mL, respectivamente. Es por esto que en este estudio se optó por utilizar una mezcla de tres bacteriófagos, ya que se ha demostrado que esta estrategia reduce la tasa de resistencia bacteriana, en comparación a la utilización de los fagos por separado (Leverentz *et al.*, 2001, O' Flynn *et al.*, 2004, Fiorentin *et al.*, 2005, Toro *et al.*, 2005, Huff *et al.*, 2005, Filho *et al.*, 2007, Borie *et al.*, 2008b, Abuladze *et al.*, 2008, Borie *et al.*, 2009b). Adicionalmente, para minimizar la posibilidad de resistencia bacteriana de la cepa desafío, en el desarrollo de la presente investigación se seleccionaron colonias de S.E. que *in vitro* demostraron ser sensibles a la actividad lítica de la mezcla de bacteriófagos en estudio.

Si bien la fagoterapia no logró reducir la incidencia de contaminación de los huevos, sí logró reducir los recuentos de S.E. ( $p < 0,05$ ), independientemente de los días analizados (D2 a D5), y de la vía de administración. Es así, como al comparar los recuentos promedio de S.E. del grupo control de infección, con los de los grupos tratados ya sea por inmersión como por aspersion, se observan reducciones del orden de 2,9 y 2,4  $\log_{10}$  UFC/mL, respectivamente. Estos resultados favorables fueron similares a los obtenidos por Guenther *et al.*, (2009), quienes analizaron la efectividad de dos bacteriófagos en el control de *Listeria monocytogenes* en leche chocolatada. Los resultados de ese estudio mostraron que los fagos eran capaces de lograr reducciones de los recuentos bacterianos del orden de 7,6  $\log_{10}$  UFC/mL, 48 horas después de haber inoculado los bacteriófagos. En general, el relativo éxito de los bacteriófagos en matrices alimentarias líquidas se debería a que este estado físico favorece las colisiones entre los fagos que difunden prácticamente libres y sus bacterias hospederas. Esta situación es

diferente en el caso de los alimentos sólidos, en los cuales la superficie total y su capacidad de absorber el inóculo de fagos, son los parámetros decisivos para el éxito de la fagoterapia (Guenther *et al.*, 2009).

En el caso de los alimentos líquidos, otro de los factores que determina el éxito de la fagoterapia, es la viscosidad. Al respecto, Joerger (2003), señaló que en ambientes relativamente fluidos como los caldos de cultivo o incluso en sangre, la mezcla y difusión de los bacteriófagos se realizan prácticamente sin problemas, y que la viscosidad, por ejemplo, del contenido gastrointestinal de las aves, reduciría el número de colisiones entre las bacterias y los bacteriófagos. Esta es una de las razones por las cuales en la presente investigación, debido a que la albúmina y la yema son matrices más densas que el agua, se optó por la utilización de altos títulos de bacteriófagos ( $MOI = 10^7$  UFP), para así lograr un incremento en las colisiones entre los fagos y S.E. El desarrollo de futuras investigaciones con MOI más altas probablemente logren mejores resultados en cuanto a la disminución de la incidencia de contaminación y/o mayores reducciones de los recuentos de S.E.

La actividad lítica de los fagos pudo verse favorecida por el pH que posee la albúmina de los huevos que varía entre pH 9,0 y 9,5 (Board y Fuller, 1994; Kang *et al.*, 2006). El rango de tolerancia de los bacteriófagos utilizados en el presente estudio, va desde 4,0 a 11,0 (Robeson, 2010)<sup>2</sup>, por lo tanto, el pH del contenido del huevo lo hace un ambiente bastante favorable para los fagos, los cuales fueron capaces de permanecer viables y de conservar su actividad lítica durante toda la experiencia.

Esto se corrobora al observar los títulos de bacteriófagos en el contenido de los huevos en los grupos tratados ya sea por inmersión como por aspersión, en los que se observaron incrementos de hasta  $11 \log_{10}$  UFP/mL, respecto a los grupos control (Robeson, 2010)<sup>3</sup>, situación que concuerda con la disminución de los recuentos ( $p < 0,05$ ) de S.E. en el contenido de los huevos de ambos grupos.

---

<sup>2, 3</sup> Robeson, James. 2010. [comunicación personal]. Pontificia Universidad Católica Valparaíso, Instituto de Biología, Lab. de Bacteriología.

En relación a la vía de administración de los bacteriófagos, son pocos los estudios en los que se ha realizado la administración de fagos por **inmersión**. Fiorentin *et al.*, (2005), inocularon bacteriófagos por esta vía en piernas de pollo contaminadas con S.E. y lograron reducciones significativas de los recuentos bacterianos ( $p < 0,05$ ) en los días 3, 6 y 9 post tratamiento, sin evidenciar reducción de la incidencia de contaminación (100%). En la presente investigación, se seleccionó esta vía por dos motivos: debido a que permite un mayor tiempo de contacto entre el huevo y los fagos en suspensión, y porque esta es una vía más práctica, por ejemplo, que la administración de los fagos vía cámara de aire. En cuanto a la administración de bacteriófagos por **aspersión** en alimentos, ha sido empleada por: Leverentz *et al.*, (2003), para el control de *Listeria monocytogenes* en cortes de frutas y Abuladze *et al* (2008), para el control de *Escherichia coli* O157:H7 en tomates, espinaca, brócoli y carne molida. En esta investigación se empleó esta vía de administración, debido a que su utilización es rápida y simple, pensando en una futura aplicabilidad por parte de la industria avícola. Ambas vías de administración resultaron ser exitosas, de acuerdo a los títulos de bacteriófagos determinados en el contenido de los huevos tratados (Robeson, 2010)<sup>4</sup>, que tuvieron un máximo de  $1,4 \times 10^{13}$  UFP/mL. Además hay que considerar el buen resultado en cuanto a reducción de los recuentos de S.E., logrado en ambos grupos tratados, en relación al grupo control.

En sólo tres muestras de huevos, tratados con bacteriófagos por inmersión, se observaron títulos de fagos inferiores a  $10^{10}$  UFP/mL (Anexo N° 2), en los cuales se determinaron bajos o nulos recuentos de S.E. Basado en el modelo de cinética de agentes biológicos autoreplicativos señalado por Payne y Jansen, (2000), la fagoterapia se asemeja al modelo ecológico depredador-presa. En este modelo la población bacteriana en aumento colisiona con la población fágica, la cual prolifera y lisa a la bacteria produciendo una disminución abrupta de esta población; el decaimiento de los números bacterianos lleva, a su vez, a una marcada desaceleración del número de fagos y, finalmente, el ciclo termina con el resurgimiento del crecimiento exponencial de este bajo número de bacterias que no parecen ser susceptibles a los fagos (Cairns *et al.*, 2009). Esta cinética de aumento y disminución de los recuentos de bacterias y de los títulos de bacteriófagos, explicaría en la presente investigación los niveles mínimos de ambas poblaciones observados dentro del desarrollo de la experiencia.

---

<sup>4</sup> Robeson, James. 2010. [comunicación personal]. Pontificia Universidad Católica Valparaíso, Instituto de Biología, Lab. de Bacteriología.

De la misma manera, la diferencia de títulos de fagos existente entre los grupos tratados sólo con fagos (sin S.E.) y los grupos con S.E. y tratados con fagos, se debería a la presencia de la bacteria hospedera, la cual dio lugar a la formación y liberación de nuevas partículas fágicas.

En la presente investigación el estudio de las muestras durante 5 días tuvo por objetivo determinar la actividad lítica de la mezcla de fagos en el tiempo. Guenther *et al.*, (2009), estudiaron el biocontrol de *Listeria monocytogenes* en mariscos y cortes de pechuga de pavo cocida a través de dos bacteriófagos, con análisis de las muestras a las 24, 120 y 168 horas. Sus resultados mostraron que en el caso de los cortes de pechuga de pavo cocida, se produjeron disminuciones de los recuentos del orden de  $1,5 \log_{10}$  UFC/g durante las primeras 24 horas de estudio, y luego de ésto se produjo un incremento sostenido de los recuentos de *Listeria* hasta prácticamente llegar a los niveles de las muestras control, en las cuales no se adicionaron fagos ( $6 \log_{10}$  UFC/g). En el caso de los mariscos, se produjo una reducción de los recuentos del orden de  $2,5 \log_{10}$  UFC/g durante las primeras 24 horas de estudio, para posteriormente aumentar en aproximadamente  $2 \log_{10}$  UFC/g a las 168 horas de estudio. Estos autores determinaron que los títulos de fagos eran bastante estables en estos alimentos, sin embargo, a pesar de que los fagos no habían sido inactivados, estos se volvían inmóviles al poco tiempo de ser aplicados en las muestras de alimento, lo que se tradujo en inactividad debido a su limitada difusión.

En el caso de la presente investigación, se demostró que el efecto lítico de los fagos sobre los recuentos de S.E. en huevos, fue el mismo tanto el segundo como el último día de análisis de las muestras (D2 v/s D5). Son pocas las publicaciones acerca de la estabilidad en el tiempo de los fagos en los alimentos. Estudios como el de Leverentz *et al.*, (2001), mostraron rápidas disminuciones de los títulos de fagos en la superficie de melones, del orden de  $3 \log_{10}$  en 168 horas y en el caso de las manzanas, descensos mucho más marcados hasta niveles no detectables en 48 horas. Mientras que en otros estudios, como el realizado por Modi *et al.*, (2001) se han reportado incrementos de los títulos de fagos de aproximadamente  $2 \log_{10}$  en muestras de quesos fabricados tanto con leche cruda como pasteurizada, en un período de 90 días (proceso manufacturación queso). Al respecto, Guenther *et al.*, (2009), señalaron que los fagos son bastante estables en alimentos de origen animal, mientras que en alimentos de origen vegetal se

producen disminuciones de los títulos del orden de  $1 \log_{10}$ , una vez que han transcurrido entre 2 – 3 días de la aplicación del fago. Esta disminución se acompaña con incrementos en los recuentos de las bacterias hospederas.

El día uno (D1) de análisis de muestras, no se obtuvieron valores de recuentos de S.E., debido a que la bacteria no se encontraba en niveles detectables por la técnica utilizada ( $\leq 10^3$  UFC/mL), es por esto que se optó por incubar las muestras adicionadas con caldo Rappaport-Vassiliadis. Se ha descrito en la literatura que la detección de S.E. en el contenido de los huevos es dificultosa, debido principalmente al bajo número de *Salmonella* presente en el contenido de los huevos. Humphrey *et al.*, (1989), estimaron que en huevos contaminados de manera natural los niveles de S.E. son muy bajos, a menudo con valores de menos de 10 células bacterianas por huevo. Además hay que considerar la presencia de una serie de enzimas con reconocidas propiedades bactericidas, ubicadas en los diferentes componentes del huevo, especialmente en albúmina, entre las que se encuentran: Lisozima, Ovotransferrina y Ovocalixina-36 (Arias *et al.*, 2007; Gantois *et al.*, 2009), que se cree son las responsables de limitar la contaminación bacteriana inicial en los huevos (Board, 1964, citado por Solomon *et al.*, 1994).

A título complementario, parece interesante destacar que al realizar los recuentos de S.E., se observó un cambio en la morfología de las colonias, respecto de la cepa inoculada, las cuales se presentaron como colonias pequeñas con una cantidad reducida de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ). O' Flynn *et al.*, (2004), describieron este mismo evento al comparar colonias de *Escherichia coli* resistentes a un cocktail de fagos en relación a su cepa parental, donde las primeras fueron también de morfología diferente (cambio global en el aspecto de la colonia). En este estudio no se corroboró la resistencia de las cepas aisladas después de ser tratadas con fagos.

Finalmente, los resultados de este trabajo sugieren que la actividad lítica de la mezcla de tres bacteriófagos estudiada es efectiva en la reducción de la contaminación con *Salmonella* Enteritidis del contenido de los huevos. Es así como este tipo de biocontrol puede ser una alternativa que en un futuro podría ser utilizada por la industria comercial, sola o asociada a otras medidas de control, para la reducción y/o eliminación de la contaminación de *Salmonella* Enteritidis en huevos frescos.

## CONCLUSIONES

- El Hipoclorito de Sodio (NaClO), en una concentración de 0,00825%, logra permeabilizar la cáscara de huevos SPF.
- La administración de una mezcla de tres bacteriófagos líticos en una MOI de  $10^7$  UFP, no reduce la incidencia de contaminación de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF experimentalmente contaminados.
- La mezcla de los tres bacteriófagos líticos en estudio, disminuye significativamente los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF, experimentalmente contaminados, tanto por inmersión como por aspersión.
- La forma de administración de los bacteriófagos ya sea vía inmersión o aspersión, no presenta diferencias en su efectividad (reducción S.E.).
- La actividad lítica de los bacteriófagos en estudio se mantuvo en el contenido de los huevos por hasta 5 días.

## BIBLIOGRAFÍA

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

**ADAM, R.; MUSSA, S.; LINDERMANN, D.; OELSCHLAEGER, T.; DEADMAN, M.; FERGUSON, D.; MOXON, R.; SCHROTEN, H.** 2002. The avian chorioallantoic membrane in ovo - a useful model for bacterial invasion assays. International Journal of Medical Microbiology. 292:267-275.

**ALEXANDRE, M.; POZO, C.; GONZALEZ, V.; MARTINEZ, M.; PRAT, S.; FERNANDEZ, A.; FICA, A.; FERNANDEZ, J.; HEITMANN, I.** 2000. Detección de *Salmonella Enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. Revista Médica de Chile. 128:1075-1083.

**ARIAS, J.; MANN, K.; NYS, Y.; GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, S.** 2007. Eggshell growth and matrix macromolecules. *In*: Bäuerlein, E.; Behrens, P.; Epple, M.; Pickett-Heaps, J.; Mann, S.; Pompe, W. (Eds). Handbook of Biomineralization. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Alemania. pp.309-327.

**BARROW, P.; LOVELL, M.** 1991. Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4. Avian Pathology. 20:335-348.

**BERGHOLD, C.; KORNSCHÖBER, C.; WEBER, S.** 2003. A regional outbreak of *S. Enteritidis* phage type 5, traced back to the flocks of an egg producer, Austria. [en línea] <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=428>> [consulta: 20 noviembre 2009].

**BERRANG, M.; COX, N.; FRANK, J.; BUHR, R.; BAILEY, J.** 2000. Hatching egg sanitization for prevention or reduction of human enteropathogens: a review. Journal of Applied Poultry Research. 9:279-284.

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

**BOARD, R.; CLAY, C.; LOCK, J.; DOLMAN, J.** 1994. The egg : a compartmentalized, aseptically packaged food. *In* : Board, R. ; Fuller, R. (Eds.). *Microbiology of the Avian Egg*. Chapman y Hall. Londres, Inglaterra. pp. 43-61.

**BOARD, R. ; FULLER, R.** 1994. *Microbiology of the avian egg*. Chapman y Hall. Londres, Inglaterra. 181p.

**BOARD, R.; HALLS, N.** 1973. The cuticle : A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *British Poultry Science*. 14:69-97.

**BORIE, C.; ZURITA, P.; SANCHE, M.; 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*. 40:197-201.

**BORIE, C.; ALBALA, I.; SANCHEZ, P.; SANCHEZ, M.; RAMIREZ, S.; NAVARRO, C.; MORALES, M.; RETAMALES, J.; ROBESON, J.** 2008b. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Diseases*. 52:64-67.

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

**BORIE, C.; HAUVA, C.; QUIROGA, J.; RETAMAL, P.; SÁNCHEZ, M.; ROJAS, V.; RETAMALES, J.; ROBESON, J.** 2009b. Biocontrol de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis mediante bacteriófagos líticos en gallinas comerciales de postura. *In*: XXXI Congreso Chileno de Microbiología. Santa Cruz, Chile. 1-4 Diciembre 2009. Sociedad de Microbiología de Chile. pp. 165-166.

**BRUCE, J.; DRYSDALE, E.** 1994. Trans-shell transmission. *In*: Board, R.; Fuller, R. (Eds.). Microbiology of the Avian Egg. Chapman y Hall; Londres, Inglaterra. pp. 63-86.

**CAIRNS, B.; TIMMS, A.; JASEN, V.; CONNERTON, I.; PAYNE, R.** 2009. Quantitative models of In Vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy. Public Library of Science, Pathogens. 5:1-10.

**CARLTON, R.; NOORDMAN, W.; BISWAS, B.; 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. 43:301-312.

**CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.** 2003. Outbreaks of Salmonella Serotype Enteritidis Infection Associated with Eating Shell Eggs --- United States, 1999—2001. [en línea] <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5151a1.htm>> [consulta: 25 noviembre 2009].

**CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.** 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. [en línea] <[http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/BMBL\\_5th\\_Edition.pdf](http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl5/BMBL_5th_Edition.pdf)> [consulta: 20 noviembre 2009].

**CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH.** 2009. Preliminary foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food, 10 states, 2008. [en línea] <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm>> [consulta: 16 noviembre 2009].

**CHEN, H.; ANANTHESWARAN, R.; KNABEL, S.** 2002. Effect of rapid cooling on the growth and penetration of *Salmonella enteritidis* into egg contents. Journal of Food Safety. 22:255-271.

**COX, N.; BERRANG, M.; BAILEY, J.; STERN, N.** 2002. Bactericidal treatment of hatching eggs V: efficiency of repetitive immersions in hydrogen peroxide or phenol to eliminate *Salmonella* from hatching eggs. *Journal of Applied Poultry Research*. 11: 328-331.

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

**DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.** 2004b. Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. *Avian Pathology*. 33:314-320

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

**DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, 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*. 112:253-260.

**DOYLE, M.; ERICKSON, M.** 2006. Reducing the Carriage of Foodborne Pathogens in Livestock and Poultry. *Poultry Science*. 85:960-973.

**EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** 2007. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*. 130:23-105.

**EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** 2009. The Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*. 271: 29-41.

**FAJARDO, T.; ANANTHESWARAN, R.; PURI, V.; KNABEL, S.** 1995. Penetration of *Salmonella enteritidis* into eggs subjected to rapid cooling. *Journal of Food Protection*. 58:473-477.

**FICA, A.; ALEXANDRE, M.; PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; HEITMANN, I.** 2001. Cambios epidemiológicos de las salmonelosis en Chile. Desde *Salmonella typhi* a *Salmonella enteritidis*. *Revista Chilena de Infectología*. 18:85-93.

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

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

**FIORENTIN, L.; VIEIRA, N.; JUNIOR, B.** 2005. Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella Enteritidis* in experimentally contaminated chicken cuts. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 7:255-260.

**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*. 37:399-406.

**GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T.; VAN IMMERSEEL, F.** 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *Federation of European Microbiological Societies Reviews*. 33:718-738.

**GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*. 47:479-485.

**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*. 79:559-563.

**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*. 48:863-869.

**GAST, R.** 2007. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Diseases*. 51:817-828.

**GIANSANTI, F.; ROSSI, P.; MASSUCCI, M.; BOTTI, D.; ANTONINI, G.; VALENTI, P.; SEGANTI, L.** 2002. Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. *Biochemistry and Cell Biology*. 80:125-130.

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

**GREER, G.** 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*. 68:1102-1111.

**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*. 75:93-100.

**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*. 84:1141-1145.

**HUFF, W.; HUFF, G.; RATH, N.; BALOG, J.; DONOGHUE, A.** 2005. Alternatives to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. *Poultry Science*. 84:655-659.

**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*. 103:415-423.

**INFOSTAT.** 2004. InfoStat, versión 2004. Manual del usuario. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Editorial Brujas. Argentina. 314 p.

**JOERGER, R.** 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*. 82:640-647.

**JONES, D.; ANDERSON, K.; CURTIS, P.; JONES, F.** 2002. Microbial contamination in inoculated shell eggs: effects of layer strain and hen age. *Poultry Science*. 81:715-720.

**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*. 134:967-976.

**KELLER, L.; BENSON, CH.; KROTEC, K.; ECKROADE, R.** 1995. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*. 63:2443-2449.

**LANG, L.** 2006. FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. *Gastroenterology*. 131:1370.

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

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

**LYNCH, M.; PAINTER, J.; WOODRUFF, R.; BRADEN, C.** 2006. Surveillance for foodborne diseases outbreaks, United States 1998-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 55:1-34.

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

**MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L.** 2006. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science*. 47:554-560.

**MINSAL. MINISTERIO DE SALUD CHILE.** 1999. Decreto Supremo N° 158 Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. [en línea] <<http://epi.minsal.cl/epi/html/normas/decreto158-editado.pdf>> [consulta: 11 noviembre 2009].

**MIYAMOTO, T.; BABA, E.; TANAKA, T.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A.** 1997. *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. *Avian Diseases*. 41:296-303.

**MIYAMOTO, T.; HORIE, T.; FUKATA, T.; SASAI, K.; BABA, E.** 1998a. Changes in microflora of the cloaca and oviduct of hens after intracloacal or intravaginal inoculation with *Salmonella enteritidis*. *Avian Diseases*. 42:536-544.

**MIYAMOTO, T.; HORIE, T.; BABA, E.; SASAI, K.; FUKATA, T.; ARAWAKA, A.** 1998b. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*. 61:350-353.

**MIYAMOTO, T.; KITAOKA, D.; WITHANAGE, G.; FUKATA, T.; SASAI, K.; BABA, E.** 1999. Evaluation of the efficacy of *Salmonella enteritidis* oil-emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. *Avian Diseases*. 43:497-505.

**MIZUMOTO, N.; SASAI, K.; TANI, H.; BABA, E.** 2005. Specific adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis in the vagina of laying hens. *Veterinary Microbiology*. 111:99-105.

**MODI, R.; HIRVI, Y.; GRIFFITHS, M.** 2001. Effects of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*. 64:927-933.

**MURRAY, C.; BARTON, M.** 1993. Salmonellosis bacteriology *In*: Australian standard diagnostic techniques for animals disease. L.A. Corner and T.J. Baugust (Eds). Australia. 3-8 p.

**ODEPA. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS.** 2008. Producción de huevos (situación actual y perspectivas). [en línea] <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/2109.pdf>> [consulta: 21 noviembre 2009].

**O'FLYNN, G.; ROSS, R.; FITZGERALD, G.; COFFEY, A.** 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:3417-3424.

**OKAMURA, M.; MIYAMOTO, T.; KAMIJIMA, Y.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E.** 2001. 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*. 45:962-971.

**OKAMURA, M.; TACHIZAKI, H.; KUBO, T.; KIKUCHI, S.; SUZUKI, A.; TAKEHARA, K.; NAKAMURA, M.** 2007. Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models. *Vaccine*. 25:4837-4844.

**PAYNE, R.; JANSEN, V.** 2000. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 68:225-230.

**PRADO, V.; SOLARI, V.; ALVAREZ, I.; ARELLANO, C.; VIDAL, R.; CARREÑO, M.; MAMANI, N.; FUENTES, D.; O'RYAN, M.; MUÑOZ, V.** 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile período 1999-2000. *Revista Médica de Chile.* 130:495-501.

**REIBER, M.; CONNER, D.; BILGILI, S.** 1995. Salmonella colonization and shedding patterns of hens inoculated via semen. *Avian Diseases.* 39:317-322.

**RIZK, S.; AYRES, J.; KRAFT, A.** 1966. Effect of holding condition on the development of Salmonellae in artificially inoculated hen's eggs. *Poultry Science.* 45:825-829.

**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.* 10:173-178.

**SAG. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO, CHILE.** 2006. Bioseguridad en planteles de ponedoras comerciales de huevos. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagVerRegistro.asp?argInstanciald=49&argRegistr old=2602>> [consulta: 27 noviembre 2009].

**SCHMID, D.; SCHANDL, S.; PICHLER, A.; KORNSCHOBBER, C.; BERGHOLD, C.; BERANEK, A.; NEUBAUER, G.; NEUHOLD-WASSERMANN, M.; SCHWENDER, W.; KLAUBER, A.; DEUTZ, A.; PLESS, P.; ALLERBERGER, F.** 2006. Salmonella Enteritidis phage type 21 outbreak in Austria, 2005. [en línea] <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=600>> [consulta: 20 noviembre 2009].

**SCHOENI, J.; GLASS, K.; MC DERMOTT, J.; WONG, A.** 1995. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. *International Journal of Food Microbiology.* 24:385-396.

**SHAFEY, T.** 2002. Eggshell conductance, embryonic growth, hatchability and embryonic mortality of broiler breeder eggs dipped into ascorbic acid solution. *British Poultry Science.* 43:135-140.

**SHIVAPRASAD, H.; TIMONEY, J.; MORALES, S.; LUCIO, B.; BAKER, R.** 1990. Pathogenesis of *Salmonella enteritidis* infection in laying chickens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serologic responses. *Avian Diseases*. 34: 548-557.

**SOLOMON, S.; BAIN, M.; CRANSTOUN, S.; NASCIMENTO, V.** 1994. Hen's egg shell structure and function. *In*: Board, R. ; Fuller, R. (Eds.). *Microbiology of the Avian Egg*. Chapman y Hall. Londres, Inglaterra. pp. 1-24.

**SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, G.;** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45:649-659.

**THIAGARAJAN, D.; SAEED, M.; ASEM, E.** 1994. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. *Poultry Science*. 73:89-98.

**THIAGARAJAN, D.; SAEED, M.; TUREK, J.; ASEM, E.** 1996. In vitro attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella enteritidis* phage type 8. *Infection and Immunity*. 64:5015-5021.

**TORO, H.; PRICE, S.; MC KEE, S.; 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*. 49:118-124.

**VALENCIA, M.; RETAMALES, J.; BORIE, C.; ROBESON, J.** 2009. Persistencia de bacteriófagos líticos de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en huevos de gallinas. *In*: XXXI Congreso Chileno de Microbiología. Santa Cruz, Chile. 1-4 Diciembre 2009. Sociedad de Microbiología de Chile. pp. 147.

**WANG, H.; SLAVIK, M.** 1998. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. *Journal of Food Protection*. 61:276-279.

**WELLMAN-LABADIE, O.; PICMAN, J.; HINCKE, M.** 2008. Antimicrobial activity of cuticle and outer eggshell protein extracts from three species of domestic birds. *British Poultry Science*. 49:133-143.

**WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2003. Propuesta de plan de acción del instituto panamericano de protección de alimentos y zoonosis (inppaz), 2004-2005. [en línea] <<http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/rimsa13-05-s.pdf>> [consulta 20 Octubre 2009].

## **ANEXO N° 1. Protocolos de permeabilización ensayados.**

### **1. Ácido ascórbico 0,5%:**

- Huevos previamente calentados a 37° C por 12 horas
- Ácido ascórbico frío, protegido de la luz
- Inmersión de los huevos por 40 minutos
- Una vez lavados con agua de la llave, inmersión en fucsina por 90 minutos
- Resultado: 100% huevos permeabilizados, 60% con bajo nivel de permeabilización (+).

### **2. EDTA 5%:**

- Huevos y la solución a temperatura ambiente, solución protegida de la luz
- Inmersión de los huevos por 15 minutos
- Una vez lavados con agua de la llave, un grupo recibió una inmersión en fucsina por 90 minutos, otro grupo 2 aspersiones de fucsina (gota gruesa)
- Resultado: 40% de los huevos permeabilizados en la de aspersiones de fucsina, 80% de huevos permeabilizados por inmersión en fucsina, cáscara descalcificada

### **3. NaOH 5%:**

- Huevos y la solución a temperatura ambiente, solución protegida de la luz
- Inmersión de los huevos por 15 minutos
- Una vez lavados con agua de la llave, un grupo recibió inmersión en fucsina por 90 minutos, otro grupo aspersiones de fucsina (gota gruesa)
- Resultado: 20% de los huevos permeabilizados en la aspersiones de fucsina, 40% de huevos permeabilizados por inmersión en fucsina, cáscara descalcificada

### **4. Ácido cítrico, ácido succínico 1%:**

- Huevos y la solución a temperatura ambiente
- Inmersión de los huevos en la solución por 15 minutos
- Una vez lavados con agua de la llave, un grupo recibió inmersión en fucsina por 30 minutos, otro grupo aspersiones de fucsina (gota gruesa)

- Resultado: ninguno de los huevos permeabilizados en la aspersion ni inmersión de fucsina en el ácido succínico, 20% de huevos permeabilizados por inmersión en fucsina en el ácido cítrico, ninguno por aspersion de fucsina.

**5. Hipoclorito de Sodio 0, 00825%:**

- Huevos previamente calentados a 37° C por 12 horas
- Solución de Hipoclorito fría
- Inmersión de los huevos por 30 minutos
- Una vez lavados con agua de la llave, inmersión en fucsina por 90 minutos
- Resultado: 100% huevos permeabilizados, con un buen nivel de penetración en 90% de estos.

**6. Urea 8M disuelta en 50 mM de Tris HCl pH 7, 5:**

- Huevos previamente calentados a 37° C por 12 horas, solución fría
- Inmersión de los huevos por 60 minutos
- Una vez lavados con agua de la llave, inmersión en fucsina por 90 minutos
- Resultado: 90% huevos permeabilizados, con niveles variables de penetración.

**ANEXO N° 2.** Recuentos de *Salmonella* Enteritidis ( $\log_{10}$  UFC/mL) y Bacteriófagos ( $\log_{10}$  UFP/mL), en grupos tratados por inmersión (G5) y aspersión (G6).

Día	Huevo	Fagos $\log_{10}$ UFP/mL	S.E. $\log_{10}$ UFC/mL
1	1	11,4771	NR*
1	2	11,4771	NR
1	3	11,5440	NR
1	4	11,6989	NR
1	5	12,9395	NR
1	6	13,1461	NR
1	7	11,3979	NR
1	8	11,3979	NR
1	9	11,6020	NR
1	10	10,2900	NR
2	11	5,10000	0**
2	12	11,6532	6,9856
2	13	12,1300	7,7481
2	14	12,1461	5,4593
2	15	11,6989	8,6801
2	16	11,7781	7,5224
2	17	12,1461	6,3070
2	18	11,4771	7,4828
2	19	12,0200	6,7176
2	20	11,8129	8,5027
3	21	11,4771	7,2966
3	22	11,0000	4,1122
3	23	11,0000	4,2232
3	24	11,8450	6,9152
3	25	11,3010	3,8102
3	26	4,44710	0
3	27	11,8750	5,8325
3	28	11,3979	6,3873
3	29	11,6532	5,3926
3	30	11,4771	7,3471
4	31	11,7781	7,2016
4	32	11,6020	6,4620
4	33	11,5440	6,1619
4	34	11,8129	7,9786
4	35	11,5440	6,5658
4	36	10,8325	0
4	37	11,6989	5,2826
4	38	11,3010	6,9637
4	39	11,7403	7,3384
4	40	11,5440	3,4593
5	41	11,7781	8,5970
5	42	11,6020	8,6708
5	43	11,9542	8,6748
5	44	11,5440	8,3891
5	45	11,8750	8,4409
5	46	11,1760	8,7825
5	47	4,27870	6,4122
5	48	11,3979	0
5	49	11,3979	7,1112
5	50	11,3979	6,8187

\*NR: sin resultados (D1)

\*\*0: placas sin recuento bacteriano (UFC/mL) y negativas a la bacteriología cualitativa

Día	Huevo	Fagos log <sub>10</sub> UFP/mL	S.E. log <sub>10</sub> UFC/mL
1	1	10,6989	NR*
1	2	11,0000	NR
1	3	12,0791	NR
1	4	11,3010	NR
1	5	12,0000	NR
1	6	12,1600	NR
1	7	11,6989	NR
1	8	11,4771	NR
1	9	10,7993	NR
1	10	11,9542	NR
2	11	11,9294	7,8987
2	12	12,0791	7,7323
2	13	11,6989	8,2253
2	14	12,2900	8,0755
2	15	12,2304	7,7442
2	16	11,9542	8,0034
2	17	12,1300	6,2464
2	18	11,8750	6,5797
2	19	12,1300	7,3117
2	20	12,1461	6,1283
3	21	12,3100	7,2430
3	22	11,8750	8,0354
3	23	11,9542	6,2669
3	24	12,6232	7,9951
3	25	12,2400	6,6884
3	26	11,7781	6,4058
3	27	12,3617	3,4683
3	28	12,4913	7,9132
3	29	12,0200	6,5051
3	30	11,7403	5,1456
4	31	11,9542	8,6334
4	32	12,3300	8,4805
4	33	11,8450	7,4082
4	34	12,1000	5,2838
4	35	11,6989	7,3816
4	36	12,4471	8,7909
4	37	12,4623	5,9777
4	38	12,0000	0**
4	39	11,6532	7,6434
4	40	12,2552	8,5976
5	41	12,3617	5,9849
5	42	11,9030	8,7423
5	43	12,0000	4,9065
5	44	12,2200	3,9956
5	45	11,9030	8,0334
5	46	12,2304	8,8820
5	47	11,6532	7,7259
5	48	11,3979	6,1245
5	49	12,0413	8,5263
5	50	12,1000	7,8325

\*NR: sin resultados (D1)

\*\*0: placa sin recuento bacteriano (UFC/mL) pero positiva a la bacteriología cualitativa