



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



CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL CON  
*Salmonella* Enteritidis EN CARNES CRUDAS DE POLLO, PAVO,  
CERDO Y BOVINO

**KAREN ALEJANDRA ESPINA SUÁREZ**

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

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO

SANTIAGO, CHILE  
2012



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



CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL CON  
*Salmonella* Enteritidis EN CARNES CRUDAS DE POLLO, PAVO,  
CERDO Y BOVINO

**KAREN ALEJANDRA ESPINA SUÁREZ**

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

NOTA FINAL: .....

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

SANTIAGO, CHILE  
2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todos aquellos que han estado presentes de una u otra forma a lo largo de todo este proceso.

A la Doctora Borie, por la confianza, paciencia y dedicación todo este tiempo.

A la Doctora Jara, por ser tan acogedora y por su buen humor siempre.

A todo el Departamento de Preventiva, por su buena disposición.

A Don Humberto, Don Pato, Don Carlos y a Evelyn, por su ayuda y buena voluntad.

A Constanza, Denisse y Gabriel, por ser un apoyo en todo el proceso y por la alegría del día a día, no habría sido lo mismo sin ustedes.

A todos los amigos, que han estado a pesar del tiempo y de la distancia; en especial a Makarena y Paz por estar ahí siempre desde hace mucho. Ya son parte de mi familia.

A mi familia, por su incondicionalidad, sin ustedes nada de esto habría sido posible.

MEMORIA DE TÍTULO

**“CONTAMINACIÓN EXPERIMENTAL CON *Salmonella* Enteritidis EN CARNES CRUDAS DE POLLO, PAVO, CERDO Y BOVINO”.**

**“EXPERIMENTAL CONTAMINATION WITH *Salmonella* Enteritidis IN RAW MEAT OF CHICKEN, TURKEY, PORK AND BEEF”.**

**Karen Alejandra Espina Suárez \***

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

### **Financiamiento**

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FONDECYT 1110038

## RESUMEN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos representan un problema de salud pública creciente, siendo *Salmonella spp.* el patógeno más frecuentemente aislado en los brotes. En Chile, la mayor prevalencia la registra *Salmonella* Enteritidis (SE), aislado principalmente desde productos de origen animal como carnes de diferentes especies. En este trabajo se implementaron protocolos de contaminación experimental con SE en alimentos cárneos crudos de riesgo, como un paso previo para la investigación del uso de bacteriófagos líticos en la disminución de la carga bacteriana en estos alimentos.

Se implementaron cuatro diferentes protocolos de contaminación experimental con SE en productos cárnicos crudos considerados como riesgosos: pollo, pavo, cerdo y bovino. Se determinó la menor dosis de inóculo bacteriano ( $10^2$  hasta  $10^6$  UFC/mL), forma de aplicación del inóculo (goteo con/sin homogeneización) y forma de presentación de las carnes (molido y laminado) con las cuales se logró porcentajes  $\geq 80\%$  de contaminación de las muestras, mantenidas por 10 días a temperatura ambiente y de refrigeración. Además, se estudió la eficiencia del Piruvato de Sodio adicionado a los medios de cultivo en los recuentos de SE en las muestras contaminadas y almacenadas a temperatura de refrigeración.

En la mayoría de los protocolos analizados se obtuvo elevados porcentajes de muestras contaminadas con bajas dosis de SE ( $10^2$  UFC/mL y  $10^3$  UFC/mL) tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, obteniendo recuentos similares entre protocolos. La adición de Piruvato de Sodio no produjo recuentos significativamente mayores ( $p > 0,05$ ) que aquellos obtenidos sin la adición del suplemento.

**Palabras clave:** *Salmonella* Enteritidis, carnes crudas, pollo, pavo, cerdo, bovino, contaminación experimental.

## ABSTRACT

The Foodborne Disease are a growing public health problem, with *Salmonella spp.* the pathogen most frequently isolated outbreaks. In Chile, recorded the highest prevalence of *Salmonella* Enteritidis (SE), isolated mainly from animal products like meat from different species. This work implemented protocols of experimental contamination with SE in meat raw of risk, as a preliminary step to investigating the use of lytic bacteriophages in reducing the bacterial load in these foods.

We implemented four different protocols of experimental contamination with SE in raw meats considered at risk: chicken, turkey, pork and beef. We determined the lowest dose of bacterial inoculums ( $10^2$  to  $10^6$  CFU/mL), mode of application of inoculums (dripping with/without homogenization) and presentation of meat (grinded and laminated) which was achieved with percentages  $\geq 80\%$  contamination of the samples, maintained for 10 days at ambient temperature and refrigeration. Further, we studied the efficiency of Sodium Pyruvate added to the culture media in SE counts in contaminated samples and stored at refrigeration temperature.

In most of the protocols analyzed there was high percentages of samples contaminated with low doses of SE ( $10^2$  CFU/mL and  $10^3$  CFU/mL) to ambient and refrigeration temperatures, obtaining similar counts between protocols. The addition of Sodium Pyruvate was not significantly higher counts ( $p > 0.05$ ) than those obtained without the addition of the supplement.

**Keywords:** *Salmonella* Enteritidis, raw meats, chicken, turkey, pork, beef, experimental contamination.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son un problema de salud pública generalizado y creciente, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. Estas se definen como enfermedades, generalmente de tipo infeccioso o tóxico, causadas por agentes o toxinas que entran en el cuerpo a través de la ingestión de alimentos (WHO 2007). En Chile, los brotes de ETA son de notificación obligatoria, mediante una red de vigilancia de laboratorios dependientes de la Secretaría Regional Ministerial (SEREMI) de Salud y el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Una de las ETA y zoonosis más importante a nivel mundial es Salmonelosis, causada por bacterias pertenecientes al género *Salmonella*. Dentro de este género la mayoría de las infecciones humanas son causadas por la especie *Salmonella enterica*, en la cual han sido identificados más de 2.500 serovares (Jones *et al.* 2008).

Las salmonelas no tíficas tienen un gran impacto en la salud humana; esto se refleja en que cada año se estiman 93,8 millones de enfermos a nivel mundial, de los cuales aproximadamente 80,3 millones son producto de la transmisión de la bacteria por alimentos y 155.000 acaban en muerte (Majowicz *et al.* 2010).

En las últimas décadas, el comportamiento de *Salmonella spp.* en la población ha presentado un cambio epidemiológico, desde *Salmonella Typhi* hacia *Salmonella Enteritidis* (SE), convirtiéndose en el serovar más frecuentemente aislado en Chile y en el mundo. Según Hendriksen *et al.* (2011), a nivel mundial exceptuando Oceanía y Norteamérica, los serovares más prevalentes fueron *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, con 43,5% y 17,1% respectivamente; Chile sigue la tendencia mundial, mostrando en los últimos años una disminución de *Salmonella Typhi* hasta 4,1%, y un aumento de SE hasta 49% en el mismo período. Las infecciones por SE actualmente son endémicas (Solari *et al.* 2011).

En una publicación reciente de Vaquero *et al.* (2011) pertenecientes al Ministerio de Salud de Chile, el serotipo que más se aísla en el ambiente clínico sigue siendo SE; en el periodo comprendido entre 2005 y febrero de 2011, este serotipo fue aislado en un 57,7% de las cepas de origen clínico y 25,3% de aquellas de origen alimentario. Existe una tendencia al

aumento de los casos clínicos asociados a SE desde el año 2008, con una distribución geográfica donde destaca la zona central de Chile (Región Metropolitana y Región de Valparaíso). Las carnes de mayor riesgo y donde se detectó mayormente SE fueron las provenientes de ave (49%), y lejanamente otros productos cárnicos (3%) y carne sin especificar (2%). Estos datos refuerzan la idea de establecer medidas de control que incluyan prevenir la contaminación de las instalaciones, reducir la multiplicación de la bacteria en plantas y matar a los patógenos presentes en los alimentos (Jones 2011), esto a todo nivel, ya sea producción, procesamiento, transporte y almacenamiento en sitios de venta; como asimismo es importante una campaña educativa en la población que enfatice la forma de almacenamiento y cocción de este tipo de productos.

Para disminuir la supervivencia de las bacterias en los alimentos existen diversos factores que pueden modificarse. Los cambios de temperatura son comúnmente usados para disminuir el crecimiento bacteriano (bajas temperaturas) o para eliminar los microorganismos (altas temperaturas) (McCann *et al.* 2006). En el caso de los productos cárneos crudos se utiliza la refrigeración o la congelación. Las radiaciones también son un mecanismo de eliminación de bacterias, ya sea radiación ultravioleta (Isohanni y Lyhs 2009) o ionizante. Estas disminuyen el número de células vegetativas que se encuentren en la superficie del alimento, sin producción de calor, manteniendo los alimentos frescos. La destrucción o inhibición de los microorganismos puede ser producida además por diversos gases usados con frecuencia en el envasado y almacenamiento de los alimentos como: nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono (García *et al.* 2006). Después de estos tratamientos, una población de microorganismos puede morir, sobrevivir y/o presentar lesiones subletales (Wu 2008).

Durante las últimas décadas los esfuerzos se han enfocado en el biocontrol de los alimentos que van a consumo humano, donde se encuentra a los bacteriófagos, o fagos. Estos son virus que destruyen específicamente bacterias, los cuales son considerados como potenciales agentes antibacterianos (Górski *et al.* 2007, Hagens y Loessner 2007). Hagens y Loessner (2007) publicaron una investigación donde se demuestra que estos fagos también pueden ser utilizados exitosamente en el control bacteriano en alimentos contaminados con *Salmonella spp.*

Para evaluar la eficiencia del biocontrol con fagos contra *Salmonella spp.*, es necesario realizar contaminaciones experimentales en los alimentos en estudio, donde se obtenga un alto número de muestras contaminadas con un elevado recuento bacteriano, de lo contrario el efecto de la aplicación de fagos podría ser subestimado. Existen diversos trabajos publicados sobre contaminación experimental de carnes con *Salmonella spp.*, donde se advierten diferentes variables que deben ser estudiadas previamente como **concentración del inóculo**, **forma de inoculación** y **forma de presentación del alimento**.

Higgins *et al.* (2005) contaminaron pechugas de pollo enteras, con un inóculo de escasa concentración que contenía 31 unidades formadoras de colonias (UFC) de SE. Estas muestras fueron almacenadas a 4°C durante dos horas, y luego incubadas a 37°C durante toda la noche, pasado este tiempo se obtuvo un 95% de las muestras positivas a SE. En contraste, Fiorentin *et al.* (2005) contaminaron trozos de pollo por inmersión en una solución de elevada concentración que contenía 10<sup>6</sup> UFC/mL de SE. Se recuperaron bacterias de todos los cortes con una concentración aproximada de 10<sup>8</sup> UFC totales por muestra.

En cuanto a la presentación del alimento al momento de la contaminación, se han realizado experiencias en carnes laminadas; es el caso de McCann *et al.* (2006) quienes usando carne de bovino, cortaron láminas de 20 mm. de espesor, inoculando *Salmonella Typhimurium* en una concentración de 10 Log UFC/mL en un punto central de la muestra, y luego extendieron por toda la superficie. Las muestras fueron mantenidas durante 15 minutos a 4°C, mostrando una concentración constante de aproximadamente 7-8 Log UFC/cm<sup>2</sup>, con bajos niveles de variación entre muestras. Por otro lado, Bigwood *et al.* (2007) usaron láminas de carne de bovino de dos por dos cm., contaminando con dos dosis de *Salmonella Typhimurium* (< 10<sup>2</sup> y 10<sup>4</sup> UFC/mL) y almacenando a dos temperaturas (5°C y 24°C). Luego de 24 horas se logró un crecimiento bacteriano > 3 Log/cm<sup>2</sup> en la carne inoculada con una baja concentración y > 5,9 Log/cm<sup>2</sup> en aquella carne contaminada con una alta concentración de inóculo. En ambos protocolos se obtuvo un 100% de muestras contaminadas.

Los estudios presentados demuestran que es posible realizar contaminaciones experimentales exitosas en matrices cárneas, con diversas presentaciones de alimentos, con diferentes concentraciones y formas de aplicación de las bacterias. Es por esto que esta investigación propone implementar protocolos de contaminación de alimentos cárneos

utilizando una dosis mínima de una cepa nativa de SE, con el fin de obtener un  $\geq 80\%$  de muestras positivas y un elevado recuento. Estos protocolos serán utilizados posteriormente en el Proyecto FONDECYT N° 1110038 donde se aplicarán fagos contra SE a las matrices alimenticias contaminadas para evaluar su efecto en la disminución de la contaminación inicial.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Financiamiento.**

El presente trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT N° 1110038: “Biocontrol de *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis en alimentos de origen animal que representan un riesgo en Salud Pública: Uso de Bacteriófagos”. Se realizó en los Laboratorios de Microbiología y de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **2. Matrices cárneas.**

Se utilizaron carnes crudas de pollo, pavo, cerdo y bovino, cuyas marcas fueron confidenciales. En el caso de pollo y pavo se usó Músculo Pectoral (corte Pechuga), en cerdo el corte elegido fue Pulpa proveniente de los músculos de la parte alta de la pierna y por último, Músculo Semimembranoso (corte Posta Negra) en el bovino.

Todos los alimentos se adquirieron en fecha lo más cercana posible a su fecha de elaboración, en envases sellados, desde un supermercado de la Región Metropolitana (Chile). El transporte al Laboratorio de Microbiología se realizó en una caja isotérmica con refrigerante en un máximo de cuatro horas, e inmediatamente los alimentos fueron procesados en el Laboratorio.

De todos los alimentos se tomó una muestra representativa, a la cual se le hizo un análisis bacteriológico cualitativo e identificación de *Salmonella spp.* mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para evidenciar alguna contaminación previa. Toda muestra positiva fue eliminada del estudio.

### **3. Cepa desafío.**

Se utilizó una cepa nativa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis de origen aviar donada por la Dra. Irma Acevedo González (SAG). A partir de esta, fue seleccionada una cepa mutante espontánea, con resistencia a Ácido Nalidíxico (*nal*) y Rifampicina (*rif*) en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

#### **4. Diseño Experimental.**

##### **4.1 Dosis, presentación del alimento y forma de inoculación de *Salmonella* Enteritidis.**

Los protocolos analizados se observan en la Tabla 1.

El tamaño muestral de este estudio preliminar fue definido mediante el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.* 2008) para un nivel de confianza de un 95%, resultando 20 muestras para cada protocolo experimental y para cada temperatura de almacenamiento post contaminación. Entonces, de cada matriz se tomaron 40 muestras de 25 gramos cada una, laminadas (láminas de aproximadamente 20 mm) o molidas en Moulinex®. Estas muestras fueron colocadas en una bolsa (Whirl-Pak®) para equipo triturador homogeneizador y luego bajo un gabinete de bioseguridad se aplicó el inóculo por goteo con una micropipeta, con y sin homogeneización mediante un asa de Digrafsky (Tabla 1). El volumen de inóculo correspondió aproximadamente a 250 µL, equivalente al 1% del peso de las muestras. Se consideraron dos muestras controles (sin contaminar), una para cada temperatura.

La contaminación se realizó con diferentes dosis de SE *nal rif*, desde una concentración de 10<sup>2</sup> a 10<sup>6</sup> UFC/mL. Para ello se obtuvieron inóculos preparados a partir de un cultivo puro de SE en caldo común incubado a 35°C ± 1°C por 18-24 horas. A partir de este cultivo, se obtuvo un tubo con aproximadamente 1,5 x 10<sup>8</sup> bacterias/mL mediante la comparación con el tubo 0,5 del nefelómetro de McFarland. Desde este tubo inicial se prepararon diluciones al décimo con Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco®), hasta llegar al valor teórico de 10<sup>2</sup> hasta 10<sup>6</sup> bacterias/mL. Estas concentraciones fueron corroboradas mediante recuento bacteriano tradicional (UFC/mL) sembrando en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Difco®) adicionados de Ácido Nalidíxico (Arlab®, 50 µg/mL) y Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL).

Luego de la contaminación, las muestras se dejaron reposar durante dos horas a temperatura ambiente, para la adaptación y adhesión de la bacteria a la superficie del alimento. La mitad de las muestras (20) se mantuvieron a temperatura ambiente y las muestras restantes (20) a temperatura de refrigeración por 10 días. Después de este tiempo, todas las muestras fueron analizadas por Bacteriología Cualitativa para la detección de SE.

**Tabla 1.** Protocolos experimentales de contaminación con SE para cada alimento en estudio.

<b>Alimento</b>	<b>Presentación</b>	<b>Forma de Inoculación</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Código Protocolo</b>
<b>Pollo</b>	Molido	Homogeneizado	Ambiente	PMHA
			Refrigeración	PMHR
		Sin Homogeneizado	Ambiente	PMSA
			Refrigeración	PMSR
	Laminado	Homogeneizado	Ambiente	PLHA
			Refrigeración	PLHR
Sin Homogeneizado		Ambiente	PLSA	
		Refrigeración	PLSR	
<b>Pavo</b>	Molido	Homogeneizado	Ambiente	TMHA
			Refrigeración	TMHR
		Sin Homogeneizado	Ambiente	TMSA
			Refrigeración	TMSR
	Laminado	Homogeneizado	Ambiente	TLHA
			Refrigeración	TLHR
		Sin Homogeneizado	Ambiente	TLSA
			Refrigeración	TLSR
<b>Cerdo</b>	Molido	Homogeneizado	Ambiente	CMHA
			Refrigeración	CMHR
		Sin Homogeneizado	Ambiente	CMSA
			Refrigeración	CMSR
	Laminado	Homogeneizado	Ambiente	CLHA
			Refrigeración	CLHR
		Sin Homogeneizado	Ambiente	CLSA
			Refrigeración	CLSR
<b>Bovino</b>	Molido	Homogeneizado	Ambiente	BMHA
			Refrigeración	BMHR
		Sin Homogeneizado	Ambiente	BMSA
			Refrigeración	BMSR
	Laminado	Homogeneizado	Ambiente	BLHA
			Refrigeración	BLHR
		Sin Homogeneizado	Ambiente	BLSA
			Refrigeración	BLSR

#### **4.2 Bacteriología Cualitativa (Detección de SE).**

Se realizó según la Norma Chilena Oficial 2675 Of 2002 sobre “Productos hidrobiológicos – Detección de *Salmonella*” (INN 2002). Para ello, pasados los 10 días de almacenamiento de las muestras contaminadas, se hizo un pre-enriquecimiento adicionando 225 mL de APT (Difco®) a la muestra (25 g) y, posteriormente se homogeneizó en el equipo triturador homogeneizador (Masticator®, IUL Instruments) por no más de un minuto. Estas muestras fueron incubadas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 20 horas. Para el enriquecimiento selectivo se transfirió 0,1 mL a un tubo con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco®) y un mL a un tubo con 10 mL de caldo Selenito-Cistina (SC, Difco®), incubados a  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas y a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas, respectivamente. Como medios selectivos se utilizaron los agares XLD (Difco®) y *Salmonella-Shigella* (SS, Difco®) adicionando Ácido Nalidíxico (Arlab®, 50 µg/mL) y Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL). Las placas sembradas se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h  $\pm$  2 h. Cuando el crecimiento en la placa fue escaso o si ninguna colonia típica fue observada, las placas se reincubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  hasta completar 48 h  $\pm$  2 h.

#### **5. Selección mejor protocolo.**

Se seleccionó la menor dosis bacteriana, asociada a aquella forma de inoculación y presentación del alimento que ofrecieron en conjunto un 80% o más de muestras positivas a SE (Bacteriología Cualitativa). Cuando existieron dos o más protocolos que con la misma dosis lograron un porcentaje de positividad igual o superior a 80, se seleccionó aquel que entregó el mayor recuento (Bacteriología Cuantitativa).

#### **5.1 Bacteriología Cuantitativa (Recuento).**

Pasados 9 días de almacenamiento post contaminación, se adicionó a la muestra (25 g), 225 mL de APT (Difco®), y se homogeneizó en el equipo triturador homogeneizador (Masticator®, IUL Instruments) en no más de un minuto. Las muestras se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Al completar este tiempo (día 10), desde la bolsa Whirl-Pak® se tomaron 100 µL y se prepararon cuatro diluciones, en APT (Difco®). De ellas se extrajeron 100 µL, los que fueron sembrados en superficie mediante asa de Digralsky en placas de agar XLD (Difco®) con Ácido Nalidíxico (Arlab®, 50 µg/mL) y Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL). Las placas se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas para realizar el recuento de colonias. Los recuentos se realizaron en grupos con un tamaño de 10 muestras cada uno, y se contaron sólo aquellas

placas con hasta 150 colonias. Si la placa no evidenció crecimiento bacteriano (placa negativa) se realizó bacteriología cualitativa desde la muestra inicial.

## **5.2 Recuperación de SE usando el suplemento Piruvato de Sodio.**

*Salmonella spp.* al igual que otras bacterias, sufren estrés térmico al estar sometidas a temperatura de refrigeración, lo cual se traduce en una disminución del crecimiento bacteriano, y con ello una subestimación en los recuentos. Este efecto puede ser contrarrestado *in vitro* por la adición de Piruvato de Sodio como suplemento al medio de cultivo (Gurtler y Kornacki 2009, Wu 2008).

Por esta razón, una vez que se seleccionó el protocolo óptimo, todas las muestras mantenidas a temperatura de refrigeración fueron analizadas por Bacteriología Cuantitativa en medios de agar Tripticasa de Soya (TS, Difco®) adicionados de Ácido Nalidíxico (Arlab®, 50 µg/mL) y Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL), con y sin la adición de Piruvato de Sodio (Merck®) al 1%. Los recuentos fueron realizados en grupos con un tamaño de 10 muestras.

## **6. Análisis Estadístico.**

El análisis de los datos se realizó mediante el programa computacional InfoStat® (Di Rienzo *et al.* 2008). Para determinar el mejor protocolo, los resultados del análisis cualitativo (detección de SE) se expresaron como porcentaje de positividad a *Salmonella* y sus diferencias analizadas mediante la Prueba de Diferencia de Proporciones.

Los resultados de los recuentos, tanto para la selección de protocolos de similar eficiencia como para analizar el efecto de la adición de Piruvato de Sodio a un medio no selectivo, se expresaron en unidades logarítmicas (Log UFC/g) y con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA).

Valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados de significancia estadística.

## **7. Normas de Bioseguridad.**

Este estudio contó con un Certificado de Bioseguridad otorgado por el Comité local de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Se trabajó con

estándares para el nivel dos de bioseguridad según el Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina (CDC 1999).

## RESULTADOS

Los resultados de la bacteriología cualitativa para los protocolos con muestras contaminadas y mantenidas a temperatura ambiente se observan en la Tabla 2 y a temperatura de refrigeración en la Tabla 3.

**Tabla 2.** Detección de SE en diferentes matrices cárneas contaminadas y mantenidas a temperatura ambiente según protocolo de contaminación.

Matriz	Dosis Inóculo (UFC/mL)	Protocolo*	Muestras Positivas	Porcentaje
Pollo	10 <sup>2</sup>	PMHA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	PMSA	14	70%
	10 <sup>2</sup>	PLHA	11	55%
	10 <sup>2</sup>	PLSA	16	80%
Pavo	10 <sup>2</sup>	TMHA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	TMSA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	TLHA	13	65%
	10 <sup>2</sup>	TLSA	7	35%
Cerdo	10 <sup>2</sup>	CMHA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	CMSA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	CLHA	19	95%
	10 <sup>2</sup>	CLSA	20	100%
Bovino	10 <sup>2</sup>	BMHA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	BMSA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	BLHA	20	100%
	10 <sup>2</sup>	BLSA	20	100%

\*P: pollo; T: pavo; C: cerdo; B: bovino; M: molido; L: laminado; H: homogeneizado; S: sin homogeneizar; A: temperatura ambiente.

**Tabla 3.** Detección de SE en diferentes matrices cárneas contaminadas y mantenidas a temperatura de refrigeración según protocolo de contaminación.

Matriz	Dosis Inóculo (UFC/mL)	Protocolo*	Muestras Positivas	Porcentaje
<b>Pollo</b>	10 <sup>3</sup>	PMHR	18	<b>90%</b>
	10 <sup>2</sup>	PMHR	2	10%
	10 <sup>3</sup>	PMSR	7	35%
	10 <sup>3</sup>	PLHR	14	70%
	10 <sup>3</sup>	PLSR	20	<b>100%</b>
<b>Pavo</b>	10 <sup>3</sup>	TMHR	20	<b>100%</b>
	10 <sup>2</sup>	TMHR	6	30%
	10 <sup>3</sup>	TMSR	18	<b>90%</b>
	10 <sup>3</sup>	TLHR	10	50%
	10 <sup>3</sup>	TLSR	8	40%
<b>Cerdo</b>	10 <sup>2</sup>	CMHR	19	<b>95%</b>
	10 <sup>2</sup>	CMSR	20	<b>100%</b>
	10 <sup>2</sup>	CLHR	20	<b>100%</b>
	10 <sup>2</sup>	CLSR	19	<b>95%</b>
<b>Bovino</b>	10 <sup>3</sup>	BMHR	20	<b>100%</b>
	10 <sup>2</sup>	BMHR	14	70%
	10 <sup>3</sup>	BMSR	20	<b>100%</b>
	10 <sup>3</sup>	BLHR	19	<b>95%</b>
	10 <sup>3</sup>	BLSR	14	70%

\*P: pollo; T: pavo; C: cerdo; B: bovino; M: molido; L: laminado; H: homogeneizado; S: sin homogeneizar; R: temperatura refrigeración.

Se observó que la mayoría de los protocolos, en cada matriz, cumplieron con la contaminación de 80% o más de muestras con las más bajas dosis bacterianas analizadas (10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup> UFC/mL). En la Tabla 4 se resumen aquellos protocolos preseleccionados de acuerdo a la dosis de SE. Es interesante hacer notar que en las muestras de una misma matriz mantenidas a temperatura de refrigeración, la dosis mínima fue 10 veces mayor (10<sup>3</sup> UFC/mL) que la dosis mínima a temperatura ambiente (10<sup>2</sup> UFC/mL), excepto en cerdo, donde se mantuvo la misma dosis infectante tanto a temperatura ambiente como a temperatura de refrigeración (10<sup>2</sup> UFC/mL).

**Tabla 4.** Protocolos de contaminación experimental preseleccionados según la mínima dosis de SE.

Matriz	AMBIENTE			REFRIGERACIÓN		
	Dosis (UFC/mL)	Protocolo*	Positividad (%)	Dosis (UFC/mL)	Protocolo*	Positividad (%)
Pollo	10 <sup>2</sup>	PMHA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>3</sup>	PMHR	90 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	PLSA	80 <sup>a</sup>	10 <sup>3</sup>	PLSR	100 <sup>a</sup>
Pavo	10 <sup>2</sup>	TMHA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>3</sup>	TMHR	100 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	TMSA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>3</sup>	TMSR	90 <sup>a</sup>
Cerdo	10 <sup>2</sup>	CMHA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	CMHR	95 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	CMSA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	CMSR	100 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	CLHA	95 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	CLHR	100 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	CLSA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>2</sup>	CLSR	95 <sup>a</sup>
Bovino	10 <sup>2</sup>	BMHA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>3</sup>	BMHR	100 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	BMSA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>3</sup>	BMSR	100 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	BLHA	100 <sup>a</sup>	10 <sup>3</sup>	BLHR	95 <sup>a</sup>
	10 <sup>2</sup>	BLSA	100 <sup>a</sup>			

<sup>a</sup>: Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ).

\*P: pollo; T: pavo; C: cerdo; B: bovino; M: molido; L: laminado; H: homogeneizado; S: sin homogeneizar; A: temperatura ambiente; R: temperatura refrigeración.

Como se observa en la Tabla 4, los porcentajes de positividad a SE en los protocolos ensayados para cada matriz no arrojaron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ), por lo que se les hizo un recuento bacteriano para poder definir cuál es el mejor de ellos. En el caso del cerdo y bovino se compararon solo dos protocolos preseleccionados por cada temperatura, discriminando por la facilidad de procesamiento. Los promedios de los recuentos de los protocolos en comparación se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Recuentos bacterianos promedios en protocolos de contaminación experimental con SE según matriz y temperatura.

AMBIENTE			REFRIGERACIÓN		
Protocolo*	Dosis Inicial UFC/mL (Log UFC/g)	Recuento Promedio (Log UFC/g)	Protocolo*	Dosis Inicial UFC/mL (Log UFC/g)	Recuento Promedio (Log UFC/g)
PMHA	2,2 x 10 <sup>2</sup> (0,3424)	2,8461 <sup>a</sup>	PMHR	6,6 x 10 <sup>3</sup> (1,8195)	1,6696 <sup>a</sup>
PLSA	1,05 x 10 <sup>2</sup> (0,0212)	1,8005 <sup>b</sup>	PLSR	8,825 x 10 <sup>3</sup> (1,9457)	2,0687 <sup>a</sup>
TMHA	2,2 x 10 <sup>2</sup> (0,3424)	2,5220 <sup>a</sup>	TMHR	1,05 x 10 <sup>3</sup> (1,0212)	1,1258 <sup>a</sup>
TMSA	1,05 x 10 <sup>2</sup> (0,0212)	2,5401 <sup>a</sup>	TMSR	8,825 x 10 <sup>3</sup> (1,9457)	0,9122 <sup>a</sup>
CMHA	2,2 x 10 <sup>2</sup> (0,3424)	5,7254 <sup>a</sup>	CMHR	2,2 x 10 <sup>2</sup> (0,3424)	2,9254 <sup>a</sup>
CMSA	6,6 x 10 <sup>2</sup> (0,8195)	5,6498 <sup>a</sup>	CMSR	6,6 x 10 <sup>2</sup> (0,8195)	2,0673 <sup>b</sup>
BMHA	2,2 x 10 <sup>2</sup> (0,3424)	4,6289 <sup>a</sup>	BMHR**	6,6 x 10 <sup>3</sup> (1,8195)	4,4863 <sup>a</sup>
BMSA	6,6 x 10 <sup>2</sup> (0,8195)	4,465 <sup>a</sup>	BMSR	1,05 x 10 <sup>3</sup> (1,0212)	4,3286 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas (p>0,05).

<sup>a-b</sup>: Letras distintas indican que hay diferencias estadísticas (p≤0,05).

\*P: pollo; T: pavo; C: cerdo; B: bovino; M: molido; L: laminado; H: homogeneizado; S: sin homogeneizar; A: temperatura ambiente; R: temperatura refrigeración.

\*\*Promedio realizado con nueve muestras ya que una de ellas no se contaminó.

Al confrontar los recuentos, se encontró diferencias estadísticas sólo en la matriz pollo, entre los protocolos PMHA y PLSA (p = 0,0001) a temperatura ambiente, mientras que en aquellos a temperatura de refrigeración, hubo diferencias estadísticas sólo en la matriz cerdo entre los protocolos CMHR y CMSR (p = 0,006).

Finalmente, los resultados de los recuentos bacterianos, realizados a aquellas muestras mantenidas a temperatura de refrigeración con y sin la adición del suplemento Piruvato de Sodio, arrojaron en promedio resultados sin diferencias estadísticas (p > 0,05) entre ellos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Recuentos promedio de protocolos de contaminación experimental a temperatura de refrigeración en medios de cultivo con y sin la adición del suplemento Piruvato de Sodio.

<b>Protocolo*</b>	<b>Recuento Promedio con Piruvato de Sodio (Log UFC/g)</b>	<b>Recuento Promedio sin Piruvato de Sodio (Log UFC/g)</b>
PLSR	1,1561 <sup>a</sup>	1,1497 <sup>a</sup>
TMHR	2,1754 <sup>a</sup>	2,1089 <sup>a</sup>
CMHR	3,7398 <sup>a</sup>	3,6613 <sup>a</sup>
BMHR	1,8399 <sup>a</sup>	1,7555 <sup>a</sup>

\*P: pollo; T: pavo; C: cerdo; B: bovino; M: molido; L: laminado; H: homogeneizado; S: sin homogeneizar; R: temperatura refrigeración.

<sup>a</sup>: Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se implementaron protocolos de contaminación experimental con una cepa nativa de SE, en los cuales se utilizaron bajas dosis bacterianas ( $10^2$  UFC/mL y  $10^3$  UFC/mL), logrando un alto porcentaje de muestras positivas (80% y más), en todas las matrices en estudio. Esto deja de manifiesto la facilidad con que se contamina este tipo de alimentos, siendo el ambiente y los nutrientes los necesarios para el favorable desarrollo bacteriano. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores en donde las dosis utilizadas de *Salmonella spp.*, si bien comprenden un amplio rango, desde concentraciones menores a  $10^2$  UFC/mL hasta  $10^{10}$  UFC/mL, los resultados finales han sido exitosos en cuanto a porcentajes de contaminación (Bigwood *et al.* 2007, Fiorentin *et al.* 2005, Higgins *et al.* 2005, McCann *et al.* 2006).

En el análisis cualitativo (detección) se observó que para obtener un alto porcentaje de muestras positivas a SE, en general, las muestras mantenidas durante 10 días a temperatura ambiente necesitaron una menor concentración de inóculo en comparación a las muestras mantenidas en refrigeración. Esto está dentro de lo esperado, ya que el efecto de la temperatura de refrigeración genera un estrés térmico en la bacteria que, sumado con el prolongado tiempo de almacenamiento desencadena la muerte de una cierta cantidad de *Salmonella* (Wu 2008). Esta situación se observó en todas las matrices, excepto en la carne de cerdo que logró ser contaminada con una concentración de  $10^2$  UFC/mL en ambas temperaturas. Algunos investigadores han descrito que al aumentar el contenido graso en el sustrato, la resistencia térmica de *Salmonella* tiende a aumentar, confiriéndole mayor resistencia y con ello, aumentando su sobrevivencia (Juneja y Eblen 2000, Orta-Ramírez *et al.* 2005). Esto podría explicar el caso de la carne de cerdo, donde a pesar que se le extrajo la grasa más evidente antes de su procesamiento, este corte en particular (Pulpa) tiene una mayor infiltración grasa comparada con otras matrices más magras como pollo y pavo.

Respecto de la presentación y forma de inoculación de las muestras a la misma dosis contaminante, si bien se observaron ciertas diferencias en el porcentaje de contaminación final en los protocolos exitosos (desde 80% hasta 100%), éstas no resultaron ser significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). En un principio se pensó que el protocolo más exitoso resultaría ser molido/homogeneizado, por la facilidad que representaría para esta bacteria adherirse al

alimento, situación que no se observó. Algunos autores reportaron contaminaciones igualmente exitosas con *Salmonella spp.* en carnes laminadas a diferentes grosores, utilizando inóculos tan variables como  $10^2$  UFC/mL hasta  $10^4$  UFC/mL (Bigwood *et al.* 2007, McCann *et al.* 2006).

Parece interesante señalar que en la metodología seleccionada para la detección de SE en las diferentes carnes, se observó que en todas las matrices almacenadas a temperatura ambiente, la combinación de medios de cultivo que entregó una mayor cantidad de muestras positivas fue caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y agar XLD. Esta fue la mejor dupla también en refrigeración, aunque en las muestras de pollo y cerdo se observó un buen rendimiento también con caldo Selenito-Cistina (SC) y agar *Salmonella-Shigella* (SS) (datos no mostrados). Este menor rendimiento del caldo SC y agar SS puede deberse a algún tipo de inhibición en el crecimiento de este serotipo y cepa en particular (Banwart y Ayres 1953, Koneman *et al.* 1988). Con resultados similares a los obtenidos en este estudio, Rall *et al.* (2005) encontraron que usando caldo RV se aísla un mayor porcentaje de *Salmonella* que usando SC desde alimentos contaminados y, en cuanto a los agares, XLD fue también el mejor, seguido por SS.

En relación al análisis cuantitativo (recuentos) realizado a las muestras almacenadas a temperatura ambiente, los resultados obtenidos manifiestan recuentos con valores mayores a la dosis inicial inoculada, lo que confirma que luego de 10 días de almacenamiento a temperatura ambiente existe una adecuada multiplicación bacteriana. Este crecimiento podría explicarse por las condiciones favorables con que contaría la bacteria, tanto de temperatura como de nutrientes. Al comparar los recuentos de distintos protocolos pero de una misma matriz, no se observaron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ), excepto en pollo.

En el caso de las muestras contaminadas y mantenidas a temperatura de refrigeración, los recuentos bacterianos fueron bastante variables según la matriz, así en las matrices cerdo y bovino se observó multiplicación bacteriana; en pollo y pavo el recuento fue similar a la dosis inicial, y se observó disminución de la población inicial de SE sólo en las muestras de Pollo Molido Homogeneizado (PMH) y de Pavo Molido Sin homogeneizar (TMS) después de 10 días de almacenamiento. Esta situación difiere parcialmente de lo expuesto por Wu (2008), quien asevera que producto del estrés que representa una baja temperatura, como la de refrigeración, por lo menos una parte de las bacterias morirían produciendo recuentos bajos. Entonces, el crecimiento o multiplicación de las bacterias en los alimentos refrigerados podría ser explicado

por la curva de crecimiento en estrés, donde existe un periodo de adaptación, luego del cual los microorganismos activan una serie de mecanismos que les permite sobrevivir al efecto estresante y prepararse para volver a tener sus funciones normales (Wesche *et al.* 2009). Según Wesche *et al.* (2009) existen diferentes grados de estrés, considerándose como un estrés moderado a un proceso continuo de injurias, como lo sería mantener a las bacterias a una temperatura de refrigeración continua durante 10 días. Si bien la habilidad de las bacterias para adaptarse bajo esas condiciones estresantes no está bien definida, se ha reportado que *Salmonella spp.* puede sobrevivir durante un máximo de ocho meses a una temperatura de almacenamiento de 5°C, presentando inicialmente un shock por frío y posteriormente una adaptación. Además, mediciones hechas en medios selectivos sugieren que, bajo condiciones óptimas, los microorganismos injuriados, en este caso por la baja temperatura, pueden llegar a ser reparados entre cuatro y cinco horas, aunque si el daño es severo podría requerir un tiempo mayor de reparación (Wesche *et al.* 2009). En esta experiencia las muestras contaminadas y almacenadas por 10 días fueron incubadas durante máximo 18 horas antes de la siembra, lo que ayudaría a la reparación de las bacterias dañadas, al igual que el uso de un agar selectivo para *Salmonella*.

Como era de esperar, los recuentos observados a temperatura ambiente fueron mayores que a temperatura de refrigeración, luego de 10 días de almacenamiento, en todas las matrices y en todos los protocolos.

En cuanto a la efectividad del Piruvato de Sodio, se esperaba que hubiese diferencias estadísticas al comparar con los recuentos realizados sin el suplemento (Gurtler y Kornacki 2009, Wu 2008), lo que no sucedió con las muestras analizadas ( $p > 0,05$ ). El Piruvato de Sodio al adicionarse a un agar no selectivo como Tripticasa de Soya (TS) ayudaría a contrarrestar el efecto que produce en la bacteria el estrés térmico (refrigeración), aumentando considerablemente la recuperación de estas bacterias y con ello, evitando la subestimación en el recuento (Wu 2008). El modo de acción propuesto para el Piruvato de Sodio es a través de la degradación del agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) y otras especies reactivas del oxígeno, que son subproductos metabólicos bacterianos (Gurtler y Kornacki 2009, Wu 2008). Como se indicó anteriormente, la mantención de *Salmonella* durante 10 días a temperatura de refrigeración podría considerarse como un estrés moderado, donde las bacterias tendrían tiempo suficiente para adaptarse a estas nuevas condiciones (Wesche *et al.* 2009). En este estudio no se

observó el efecto benéfico de la adición del suplemento Piruvato de Sodio en la recuperación de SE, lo que podría atribuirse, además de lo anterior, a un efecto intrínseco de estos alimentos en el grado de lesión en la bacteria y también en la sobrevivencia de esta cepa en particular frente al estrés por frío (Wesche *et al.* 2009).

Con los resultados se puede concluir que es posible implementar protocolos de contaminación experimental con dosis tan bajas como  $10^2$  UFC/mL o  $10^3$  UFC/mL de una cepa nativa de SE en carnes crudas, obteniendo más del 80% de muestras positivas, independiente de la forma de presentación y tipo de inoculación. El uso del suplemento Piruvato de Sodio adicionado a un agar no selectivo, no mejora los recuentos en matrices contaminadas con SE y mantenidas durante 10 días a temperatura de refrigeración.

## REFERENCIAS

1. **BANWART G., AYRES J.** Effect of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. Applied and Environmental Microbiology. 1953; 1(6):296-301.
2. **BIGWOOD T., HUDSON J., BILLINGTON C., CAREY-SMITH G., HEINEMANN J.** Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. Food Microbiology. 2007; 25:400-406.
3. **CDC. CENTRO DE CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES.** Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. 4º ed. Public Health Services: Washington D.C.; 1999.
4. **DI RIENZO J., CASSANOVES F., BALZARINI M., GONZÁLEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.** InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba; 2008.
5. **FIorentin L., VIEIRA N., BARIONI W.** Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts. Brazilian Journal of Poultry Science. 2005; 7(4):255-260.
6. **GARCÍA E., GAGO L., FERNÁNDEZ J.** Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. Elecé Industria Gráfica: Madrid; 2006.
7. **GÓRSKI A., BORYSOWSKI J., MIĘDZYBRODZKI R., WEBER-DĄBROWSKA B.** Bacteriophages in Medicine. In: Bacteriophage genetics and molecular biology. Caister Academic Press: Norfolk; 2007.
8. **GURTler J., KORNACKI J.** Comparison of supplements to enhance recovery of heat-injured *Salmonella* from egg albumen. Letters in Applied Microbiology. 2009; 49:503-509.
9. **HAGENS S., LOESSNER M.** Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007; 76(3):513-519.

10. **HENDRIKSEN R., VIEIRA A., KARLSMOSE S., LO FO WONG D., JENSEN A., WEGENER H., et al.** Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the world health organization global foodborne infections network country data bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2011; 8(8):887-900.
11. **HIGGINS J., HIGGINS S., GUENTHER K., HUFF W., DONOGHUE A., DONOGHUE D., et al.** Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*. 2005; 84:1141-1145.
12. **INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** Productos hidrobiológicos- Detección de *Salmonella*. Norma Chilena Oficial NCh 2675. Of2002: Santiago; 2002.
13. **ISOHANNI P., LYHS U.** Use of ultraviolet irradiation to reduce *Campylobacter jejuni* on broiler meat. *Poultry Science*. 2009; 88:661-668.
14. **JONES F.** A review of practical *Salmonella* control measures in animal feed. *Journal of Applied Poultry*. 2011; 20:102-113.
15. **JONES T., INGRAM L., CIESLAK P., VUGIA D., TOBIN-D'ANGELO M., HURD S., et al.** Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008; 198:109-114.
16. **JUNEJA V., EBLEN B.** Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content. *Letters in Applied Microbiology*. 2000; 30(6):461-467.
17. **KONEMAN E., ALLEN S., DOWELL V., JANDA W., SOMMERS H., WINN W.** Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 3° ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1988.

18. **MAJOWICZ S., MUSTO J., SCALLAN E., ANGULO F., KIRK M., O'BRIEN S., et al.** The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 50:882-889.
19. **McCANN M., McGOVERN A., McDOWELL D., BLAIR I., SHERIDAN J.** Surface decontamination of beef inoculated with *Salmonella* Typhimurium DT104 or *Escherichia coli* O157:H7 using dry air in a novel heat treatment apparatus. *Journal of Applied Microbiology*. 2006; (101):1177-1187.
20. **ORTA-RAMÍREZ A., MARKS B., WARSOW C., BOOREN A., RYSER E.** Enhanced thermal resistance of *Salmonella* in whole muscle compared to ground beef. *Journal of Food Science*. 2005; 70(7):359-362.
21. **RALL V., RALL R., CASALE L., GIMARÃES M.** Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005; 36:147-150.
22. **SOLARI V., DÍAZ J., FERNÁNDEZ A.** Epidemiología de la salmonelosis en Chile. Ministerio de Salud Chile [Internet]. 2011. Disponible en: <[http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones\\_microbiologia\\_cli\\_2011/7\\_dra\\_Solari.pdf](http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones_microbiologia_cli_2011/7_dra_Solari.pdf)> [citado en Oct 2011].
23. **VAQUERO A., FERNÁNDEZ A., DÍAZ J.** Informe *Salmonella* Enteritidis. Ministerio de Salud Chile [Internet]. 2011. Disponible en: <<http://www.slideshare.net/SSMN/informe-salmonella>> [citado en Oct 2011].
24. **WESCHE A., GURTLER J., MARKS B., RYSER E.** Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 2009; 72(5):1121-1138.
25. **WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Food safety and foodborne illness Fact sheet N° 237 [Internet]. 2007. Disponible en: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>> [citado en Oct 2011].

26. **WU, V.** A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. 2008; 25:735-744.