



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

**BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS QUE
REDUCEN LA CARGA DE *Salmonella enterica* SEROTIPO Enteritidis
EN CARNE FRESCA DE POLLO EXPERIMENTALMENTE
CONTAMINADA**

Fabiola Alejandra Cruz Castillo

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

PROFESORA GUÍA: CONSUELO BORIE POLANCO.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

PROYECTO FONDECYT 1110038

SANTIAGO, CHILE
2013



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

**BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS QUE
REDUCEN LA CARGA DE *Salmonella enterica* SEROTIPO Enteritidis
EN CARNE FRESCA DE POLLO EXPERIMENTALMENTE
CONTAMINADA**

Fabiola Alejandra Cruz Castillo

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA:	CONSUELO BORIE P.
PROFESOR CONSEJERO:	JAMES ROBESON C.
PROFESORA CONSEJERA:	ANITA SOTO C.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos aquellos que, de un modo u otro, estuvieron presentes durante este proceso de titulación.

A la Doctora Borie, por la paciencia y dedicación, tanto en el laboratorio, como en el desarrollo de esta memoria,

Al Laboratorio de Microbiología y a su personal, Don Humberto, Don Pato, Don Carlos y Paty, por su buena voluntad, ayuda y simpatía,

A mis amigos, por la comprensión durante esos (varios) días en que no había tiempo para la dispersión, y en especial a algunos, por su ayuda y apoyo constante,

Y a mi familia, simplemente por estar ahí siempre.

MEMORIA DE TÍTULO

“BACTERIÓFAGOS LÍTICOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS QUE REDUCEN LA CARGA DE *Salmonella enterica* SEROTIPO Enteritidis EN CARNE FRESCA DE POLLO EXPERIMENTALMENTE CONTAMINADA”

“LYTIC BACTERIOPHAGES AS BIOLOGICAL AGENTS THAT REDUCE THE LOAD OF *Salmonella enterica* SEROTYPE Enteritidis IN EXPERIMENTALLY CONTAMINATED FRESH POULTRY MEAT”.

Fabiola Alejandra Cruz Castillo *

*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, provocadas por el género *Salmonella* spp, son un importante problema de salud pública a nivel mundial, siendo el serotipo *Salmonella* Enteritidis (SE) uno de los principales causantes de gastroenteritis asociadas al consumo de productos de origen aviar. La industria avícola ha implementado diversas medidas para enfrentar esto, tales como probióticos, vacunas y antimicrobianos, pero dado que la enfermedad persiste, las investigaciones actualmente se dirigen, complementariamente, al control del patógeno en el alimento. En este contexto, se está analizando el uso de bacteriófagos líticos en diferentes alimentos como herramienta de biocontrol altamente específica y efectiva. Estos son virus que infectan bacterias, se replican en ellas y las lisan. Son inocuos para las células eucariotas y no alteran la calidad organoléptica de los alimentos. En base a lo anterior, este estudio pretende evaluar la efectividad de una mezcla de cinco bacteriófagos líticos nativos en la reducción del crecimiento de SE en carne fresca de pollo. Para ello, se contaminaron muestras con $5,7 \times 10^3$ UFC/mL de SE y se trataron con 10^7 UFP de cada fago/mL, o con $5,7 \times 10^5$ UFC/mL y 10^9 UFP/mL, e incubaron durante 10 días a temperatura ambiente controlada (18°C) y de refrigeración (2-8°C), respectivamente. Los resultados demostraron que la mezcla de fagos logró reducciones significativas ($p \leq 0,05$) de $0,88 \log_{10}$ UFC/g a temperatura ambiente y $1,66 \log_{10}$ UFC/g a temperatura de refrigeración. Esto evidencia que los bacteriófagos líticos, aplicados con una MOI de 10^4 , pueden controlar eficazmente la presencia de SE en carne fresca de pollo mantenida a distintas temperaturas.

Palabras clave: ETA, *Salmonella* Enteritidis, biocontrol, bacteriófagos líticos.

ABSTRACT

Foodborne disease, caused by *Salmonella* spp, are a worldwide major public health problem, being *Salmonella* serotype Enteritidis (SE) one of the main causes of gastroenteritis associated with consumption of poultry origin products. Poultry industry has implemented several measures to address this, such as probiotics, vaccines and antibiotics, but as the disease persists, current researches are directed, in addition, to the control of the pathogen in the food. In this context, the use of lytic bacteriophages in different foods is being analyzed as a tool for highly specific and effective biocontrol. These are viruses that infect bacteria, replicate in and lyse them. They are harmless to eukaryotic cells and don't alter the organoleptic quality of food. On this basis, this study aims to evaluate the effectiveness of a mixture of five lytic bacteriophages reducing the growth of SE in samples of fresh poultry meat. For this purpose, samples were contaminated with 5.7×10^3 CFU/mL of SE and treated with 10^7 PFU of each phage/mL, or with 5.7×10^5 CFU/mL and 10^9 PFU/mL, and incubated for 10 days at controlled room temperature (18°C) and cooling (2-8°C), respectively. Results showed that the mixture of phages achieved significant reductions ($p \leq 0.05$) of $0.88 \log_{10}$ CFU/g at room temperature and $1.66 \log_{10}$ CFU/g at refrigeration temperature. This shows that lytic bacteriophages, applied with a MOI of 10^4 , can effectively control the presence of SE in fresh poultry meat kept at different temperatures.

Keywords: Foodborne diseases, *Salmonella* Enteritidis, biocontrol, lytic bacteriophages.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas originadas por la ingestión de alimentos y bebidas con presencia de agentes contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud de los consumidores. Estas enfermedades surgen como una de las causas importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, generando problemas digestivos, cutáneos, o incluso neurológicos (MINSAL, 2012).

Las ETA pueden ser generadas por agentes químicos, físicos y biológicos como virus, parásitos y bacterias. Entre estas últimas, *Salmonella* spp es uno de los principales agentes involucrados en estas enfermedades (MINSAL, 2012), siendo junto con *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*, uno de los patógenos alimentarios más frecuentes y ubicuos (Mahony *et al.*, 2011).

Durante el año 2011, en Chile se destaca que de los brotes de ETA, el 10,2% correspondió a infecciones generadas por *Salmonella* (no tíficas), 2,6% a intoxicación alimentaria estafilocócica, un 1% a *Escherichia coli* enteropatógena y un 0,5% a *Vibrio parahaemolyticus* (MINSAL, 2012).

Según estudios de Vaquero (2011), del total de cepas de *Salmonella* tipificadas en Chile, *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (SE) es la que se aisló con mayor frecuencia durante el periodo comprendido entre 2005-2011, correspondiendo un 59,02% a cepas de origen clínico y un 25,33% de origen alimentario.

Este serotipo tiene una gran importancia en los productos de origen aviar siendo la principal fuente de contagio para el humano. En el periodo 2005-2011, su detección se centró principalmente en carne de ave cruda o mal cocida (54%), seguida de huevos y ovoproductos (15%), siendo también detectada, aunque en menor cantidad, en vegetales y platos preparados (5% ambos), mariscos (3%), y otras carnes y productos cárneos (4%) (Vaquero, 2011).

Frente a este problema, la industria avícola ha considerado diversas medidas para el control tanto de SE como de otros agentes, entre las que se encuentran el uso de vacunas atenuadas e inactivadas; control de la colonización gastrointestinal a través de prebióticos y probióticos; medidas de bioseguridad, como por ejemplo la limpieza y desinfección de los planteles entre un lote de aves y otro (“*all in- all out*”); y la utilización de procedimientos y productos certificados (Gast, 2007). Sumado a lo anterior, la industria de alimentos ha implementado diversas técnicas

de control aplicadas en el alimento, como i) gases, por ejemplo oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono, los cuales se utilizan en el envasado y almacenamiento de alimentos, con el fin de destruir o inhibir los microorganismos (García *et al.*, 2006); ii) radiación ultravioleta o ionizante, que sin alterar las características organolépticas del producto elimina las células vegetativas encontradas en la superficie del alimento (Isohanni y Lyhs, 2009); y iii) modificación de la temperatura, que permite disminuir el crecimiento bacteriano a bajas temperaturas, o eliminarlas a altas temperaturas (McCann *et al.*, 2006). Últimamente las investigaciones se han dirigido hacia la utilización de agentes biológicos, como son los bacteriófagos líticos (Goodrige y Bisha, 2011).

Los bacteriófagos líticos son virus que fueron descubiertos independientemente por Twort en 1915 y D'Herelle en 1917. Cada tipo de fago reconoce y ataca en forma específica a determinadas especies y cepas bacterianas, generando la lisis de éstas (Górski y Weber-Dabrowska, 2005). Estos virus son inocuos para las células eucariotas, y además son ubicuos, pudiendo encontrarse prácticamente en todos los lugares donde existan sus hospedadores bacterianos. Por medio de estimaciones cuantitativas de epifluorescencia, se ha determinado que cada mililitro de agua de mar contiene millones de estas partículas, a su vez, algunos investigadores determinaron que la abundancia es aún mayor en sedimentos marinos superficiales cercanos a la costa, encontrándose 10^8 - 10^9 virus por cm^3 (Ceyssens, 2009). Por extrapolación, la población total de fagos se estima en 10^8 especies y 10^{31} partículas en la biosfera, siendo una de las entidades replicantes más abundantes en el mundo (Rohwer, 2003).

Los bacteriófagos líticos son agentes capaces de multiplicarse, utilizando de su hospedero tanto la maquinaria de replicación del ADN, como la de síntesis de proteínas. Para ello, se unen a receptores de la superficie bacteriana e inyectan su material genómico; luego de esto, se expresan los genes denominados fágicos tempranos y ocurre a su vez la síntesis de proteínas tempranas, posteriormente se replica el genoma fágico, y se expresan proteínas fágicas tardías involucradas en la formación de nuevas partículas virales y en la lisis de la bacteria hospedera. Terminando el proceso, se ensamblan las cabezas y colas fágicas, se compacta el genoma viral, y finalmente se genera la lisis de la bacteria con la subsecuente liberación de las nuevas partículas virales, que infectan y destruyen bacterias vecinas. En contraste, hay bacteriófagos que utilizan la vía lisogénica, integrando su genoma en el cromosoma del hospedero, y por tanto, replicándose como parte del genoma bacteriano. Este evento puede facilitar la transferencia horizontal de genes entre

bacterias, además permitir la permanencia en estado de latencia por largos períodos de tiempo como un profago; si la bacteria hospedera se encuentra en condiciones ambientales adversas, este profago puede activarse, retomando el ciclo lítico, pudiendo recuperar así su genoma del hospedero, con la posterior lisis y liberación de nuevas partículas virales (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Hudson *et al.*, 2005). Un ejemplo de transferencia horizontal de genes indeseados es el caso de *Escherichia coli* enterohemorrágica, donde la presencia de factores de virulencia, como toxinas Shiga, se asocia a la codificación de genes previamente transferidos por algunos bacteriófagos lisogénicos (Monk *et al.*, 2010). Debido a esto es que utilizar bacteriófagos lisogénicos como biocontroladores sería un riesgo, por lo cual sólo se utilizan aquellos bacteriófagos líticos, cuyo genoma es ADN.

Entre las ventajas que conlleva la utilización de estos virus se encuentra la ubicuidad, facilidad y bajo costo que existe en su aislamiento, preparación y aplicación, además de ser inocuos para las células eucariotas. Con respecto a los alimentos, se destaca la estabilidad que tienen en estos, y la resistencia al procesamiento de los mismos, además de permanecer activos por largos periodos de tiempo en alimentos refrigerados, y de no alterar su calidad organoléptica (Górski y Weber-Dabrowska, 2005; Greer, 2005).

El uso de bacteriófagos también tiene ciertas desventajas, tales como un limitado rango de hospederos bacterianos, la aparición de bacterias mutantes fago-resistentes, el requerimiento de una alta multiplicidad de infección (MOI) por cada bacteria blanco, existencia de barreras físicas en los alimentos, y la percepción que tiene el consumidor con respecto a la incorporación de virus en alimentos, a pesar de ser estos inocuos para ellos (Greer, 2005). Con respecto a la aparición de bacterias resistentes, esta es menor cuando se utiliza una mezcla de fagos (Goodrige y Bisha, 2011). En cuanto al limitado rango de hospederos, esto se soluciona con preparados que incluyen distintos tipos de fagos, por ejemplo, con productos comerciales como ListShield™ (LMP-102™), un producto de la empresa Intralytix, que consta de una mezcla de seis bacteriófagos que cuenta con acción sobre diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* y puede ser utilizado en productos cárnicos y avícolas listos para el consumo (IntraLytix, 2009). La existencia y uso actual de este y otros productos, habla acerca de la aceptabilidad que estarían teniendo los consumidores con respecto a la utilización de los bacteriófagos en los alimentos.

Los bacteriófagos líticos tienen una amplia gama de aplicaciones, además de su uso en los alimentos, pueden ser utilizados como alternativa a los antibióticos en la salud animal, y también como preservantes naturales para extender la vida útil de productos perecibles (García *et al.*, 2008; Mahony *et al.*, 2011). En los alimentos, los bacteriófagos poseen un gran potencial para asegurar la calidad microbiológica de éstos, debido a su fácil manipulación y actividad antimicrobiana específica. Bajo el esquema “de la granja al tenedor”, se pueden utilizar en todas las etapas de la producción del alimento (García *et al.*, 2008).

Es así como en el año 2003, Goode *et al.*, estudiaron la capacidad que tienen los bacteriófagos líticos en reducir recuentos bacterianos, utilizando trozos de piel de aves experimentalmente contaminados con SE. De esto se obtuvo que al contaminar trozos de 60 cm² de piel, con una concentración de 10³ unidades formadoras de colonias (UFC)/cm², y aplicar bacteriófagos a una concentración de 10³ unidades formadoras de placas líticas (UFP)/cm², se logran reducciones significativas en los recuentos de SE de un 22% y un 11%, a las 24 y 48 horas, respectivamente. Además, se logró que las muestras fueran negativas frente a la presencia de la bacteria al utilizar un tratamiento con altas dosis de bacteriófagos (MOI 10⁵), demostrándose su eficacia en la reducción de la contaminación bacteriana de las canales. A su vez, en el estudio realizado por Higgins *et al.*, en 2005, en carcasas de pollo contaminadas con 20 UFC/mL de SE, e inoculadas artificialmente con 5,5 x 10⁸ y 10¹⁰ UFP/mL, estos virus lograron reducir significativamente el recuento bacteriano, causando una disminución de un 93%, en comparación con los controles. Bigwood *et al.*, en el año 2008 aplicaron, en carne cruda y cocida, fagos contra *Salmonella* Typhimurium y *Campylobacter jejuni*, lográndose en el primer caso una reducción del orden de dos a tres unidades logarítmicas (log) a 5°C y mayor a 5,9 log a 24°C.

En Chile también se han realizado estudios. Farfán (2010) analizó la efectividad que tiene la utilización de una mezcla de bacteriófagos líticos nativos con una MOI de 10⁷ aplicados por inmersión y aspersion sobre huevos libres de patógenos específicos (huevos SPF) previamente contaminados en forma experimental con 10² UFC/mL de SE. Como resultado obtuvo una reducción aproximada en el recuento bacteriano de tres unidades logarítmicas, en comparación a un grupo control, detectándose actividad lítica incluso hasta cinco días post inoculación.

Todos estos prometedores resultados hacen necesaria la realización de más estudios referentes a la utilización de bacteriófagos nativos como una opción de control biológico para SE en los

alimentos, específicamente en la carne de pollo, por ser uno de los alimentos mayormente involucrados en los brotes.

En base a estos antecedentes, es factible plantear que la administración de una mezcla de bacteriófagos líticos nativos en carne fresca de pollo contaminada con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (SE) reduce los recuentos de ésta. Este planteamiento se sustenta en el conocimiento previo que se tiene sobre la actividad lítica de bacteriófagos nativos sobre SE en condiciones de laboratorio, siendo estables en distintas matrices alimentarias, a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento.

La presente memoria pretende evaluar la efectividad de una mezcla de bacteriófagos líticos en la reducción de los recuentos de SE en carne fresca de pollo contaminada en forma experimental, teniendo como objetivos específicos (1) Determinar el número de muestras de carne fresca de pollo que mantienen su contaminación con SE a pesar de haber recibido la administración de una mezcla de bacteriófagos nativos líticos, y (2) Cuantificar el grado de contaminación con SE en carne fresca de pollo, a los 10 días de ser tratada con bacteriófagos líticos y mantenida a temperatura ambiente y de refrigeración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepa desafío

Se utilizó una cepa mutante espontánea de origen aviar de *Salmonella* Enteritidis con resistencia al Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*), como marcadores que faciliten su aislamiento e identificación en el laboratorio. La doble mutante fue obtenida en el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

2.2 Bacteriófagos

Se utilizó una mezcla de cinco bacteriófagos líticos aislados y seleccionados por el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Los fagos fueron aislados del estero Marga-Marga, Viña del Mar, Región de Valparaíso, mientras que la selección se realizó en base a sus características líticas frente a la cepa desafío, estabilidad en la matriz cárnea

en estudio, tolerancia al pH y a temperaturas entre -20°C y 25°C, y por su rango de hospederos¹. Se le aplicó a los alimentos una multiplicidad de infección (MOI) de 10⁴.

2.3 Matriz alimentaria

Como matriz se utilizó pollo fresco refrigerado, obtenido desde un supermercado de Santiago, Región Metropolitana, en un envase sellado con fecha de elaboración cercana al día de la adquisición. Se transportó al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en una caja isotérmica con refrigerantes en un plazo menor a cuatro horas. El tipo de corte comercial utilizado fueron filetes de pechuga de pollo, y su marca comercial fue confidencial.

Todas las muestras fueron sometidas, por el Laboratorio de Microbiología, a un cultivo cualitativo tradicional según la Norma Chilena Oficial 2675 Of 2002 (INN, 2002), y detección genómica de *Salmonella* spp mediante PCR tradicional (Sánchez, 2007), trabajándose sólo con aquellas muestras que resultaron negativas, las cuales fueron mantenidas en refrigeración, entre 2-8°C, por no más de 72 horas, hasta el momento de su análisis.

2.4 Diseño Experimental

a) Protocolo de contaminación con SE

La matriz fue contaminada de acuerdo a lo señalado en un protocolo previamente establecido por Espina (2012), aumentándose diez veces la dosis de contaminación para las muestras mantenidas a temperatura ambiente, y cien veces en las muestras refrigeradas (Tabla nro. 1).

Tabla nro. 1: Protocolo de contaminación con SE y título de la mezcla de fagos, según matriz y temperatura de mantención.

Matriz	T° Ambiente			T° Refrigeración		
	Protocolo	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL	Protocolo	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL
Pollo	MH	10 ³	10 ⁷	MH	10 ⁵	10 ⁹

MH: Molido (en Moulinex®), inóculo homogeneizado; **UFC:** Unidades formadoras de colonias; **UFP:** unidades formadoras de placas líticas.

¹Robeson, James. 2012. [Comunicación personal]. Laboratorio de Bacteriología. Instituto de Biología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Campus Curauma.

b) Preparación del inóculo bacteriano

El inóculo se elaboró a partir de un cultivo de SE *nal^r* y *rif^r* en caldo Luria Bertani (Difco®), incubado a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. A partir de éste se preparó un tubo con titulación aproximada de 10^8 UFC/mL, a través de la comparación con el tubo 0,5 del nefelómetro de McFarland ($1,5\times 10^8$ bacterias/mL). Luego, se prepararon diluciones al décimo con Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco ®) hasta llegar a las concentraciones establecidas para cada temperatura (Tabla nro. 1), corroborándose la concentración a través de recuento bacteriano en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Difco®) adicionadas con Ácido Nalidíxico (Arlab®, $50\mu\text{g/mL}$) y Rifampicina (Caisson®, $50\mu\text{g/mL}$).

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

Se utilizaron 25 muestras, valor previamente establecido por Espina (2012), individualizadas en bolsas Whirl-Pak®, con 25 gramos de pollo molido cada una. Estas fueron contaminadas con SE *nal^r* *rif^r* según protocolo (Tabla nro. 1).

La inoculación se realizó en un gabinete de bioseguridad clase II A (Heal Force®), utilizando un volumen aproximado al 10% del tamaño total de la muestra. Una vez inoculadas, estas fueron dejadas en reposo por dos horas, para permitir la adaptación de SE al medio y su adhesión a la superficie de la matriz.

Luego, a cada muestra contaminada se le agregó una alícuota de la mezcla de bacteriófagos, suspendidos en suero fisiológico estéril, en un volumen del 10% del peso de la muestra, y utilizando una MOI de 10^4 . Estas muestras fueron mantenidas en cajas herméticamente cerradas por 10 días a temperatura ambiente controlada (estufa a 18°C) y de refrigeración ($2-8^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, a cada muestra se le aplicaron 225 mL de APT y se homogeneizaron por un minuto en un equipo triturador homogeneizador (Masticator®), sometiéndose finalmente a un Análisis cuantitativo y cualitativo.

Para cada temperatura se estableció un grupo control de 25 muestras contaminadas sólo con SE. Los grupos control y experimental fueron mantenidos y procesados en distintos laboratorios, previniendo toda posibilidad de contaminación cruzada. Además, se dispuso de un grupo blanco que no fue contaminado con SE ni tratado con fagos, manteniéndose cinco muestras junto con

cada grupo control, siendo sometidas a un Análisis cualitativo al término del estudio, con el fin de comprobar la ausencia de contaminación intralaboratorio.

a) Análisis cuantitativo

Para realizar el recuento de SE, de cada muestra homogeneizada se tomaron 1000µL y se prepararon diluciones al décimo en APT. Posteriormente, 100µL de cada dilución se transfirieron a una placa de agar XLD, adicionada con Rifampicina y Ácido Nalidíxico, y se sembraron en superficie con un asa de Digrafsky. Las placas se incubaron a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h, realizando el recuento sólo en aquellas que presentaron 150 colonias o menos. Las placas con resultado negativo se repitieron a partir de la muestra incubada.

b) Análisis cualitativo

Para la detección de SE se utilizó la Norma Chilena Oficial 2675 Of 2002: “Detección de *Salmonella* en Productos Hidrobiológicos” (INN, 2002), y las sugerencias de Espina (2012), que indican la utilización de solo un medio de enriquecimiento selectivo, Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco®), y de un medio selectivo, correspondiente al agar XLD.

Luego de extraer los 1000 µL para el análisis cuantitativo, la muestra homogeneizada restante se incubó a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 ± 2 horas. Posteriormente se transfirieron 100 µL a un tubo con 10 mL de caldo RV, incubándose luego en un baño termorregulado a $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas. A partir de este, se sembró en placas con agar XLD, adicionado con Rifampicina y Ácido Nalidíxico, utilizando un asa calibrada de 10µL (tres asas por muestra), incubándose a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 h.

2.6 Análisis estadístico

Los resultados que se obtuvieron de cada grupo experimental con su respectivo control en el Análisis cualitativo, fueron expresados como porcentaje de positividad, analizándose sus diferencias mediante X^2 (chi cuadrado), como prueba de diferencia de proporciones.

A su vez, los resultados del Análisis cuantitativo de cada grupo se expresaron en unidades logarítmicas, analizándose las diferencias mediante un Análisis de Varianza, utilizando el análisis estadístico Student-Newman-Keuls en caso de existir diferencias entre las medias ($p\leq 0,05$). Cuando la muestra resultó negativa en el Análisis cuantitativo, y positiva en el Análisis cualitativo, se le otorgó un valor de 10^2 UFC/mL. A su vez, cuando no se logró contar bacterias

por el exceso de colonias en las placas correspondientes a la mayor dilución, se le otorgó un valor de 10^7 UFC/mL.

Todos los datos obtenidos en la investigación se analizaron con el programa computacional para análisis estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008).

2.7 Normas de Bioseguridad

El proyecto cuenta con un Certificado de bioseguridad local (FAVET), el cual permite la realización de éste. Para llevarlo a cabo se utilizó la siguiente protección: delantal, mascarillas, guantes y mangas desechables, gabinete de bioseguridad para la contaminación y procesamiento de las muestras, alcohol yodado como desinfectante/antiséptico, y cloro para la desinfección de los mesones.

Con respecto a la eliminación de residuos contaminados, aquellos de tipo sólido se esterilizaron y/o incineraron en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, y los residuos líquidos fueron clorados (5.000 ppm), previo a su descarga. La eliminación de todos los residuos químicos tóxicos, líquidos y sólidos fue llevada a cabo por una compañía externa.

3. RESULTADOS

La concentración obtenida del inóculo bacteriano fue de $5,7 \times 10^8$ UFC/mL. De acuerdo a esto, y basado en el protocolo de Espina (2012), se utilizó una concentración de SE de $5,7 \times 10^3$ UFC/mL en aquellas muestras mantenidas a temperatura ambiente, y de $5,7 \times 10^5$ UFC/mL en aquellas mantenidas a temperatura de refrigeración.

3.1 Análisis cualitativo

Los resultados obtenidos en el análisis cualitativo (Tabla nro. 2) demuestran que el total de muestras inoculadas con SE de ambos grupos, luego de 10 días posterior a la contaminación, resultaron positivas para esta cepa, independiente de la temperatura.

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

Grupo	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL	Muestras contaminadas con SE	Muestras positivas en análisis cualitativo	Porcentaje de positividad
PAC	10 ³	-	25	25	100 ^a
PAF	10 ³	10 ⁷	25	25	100 ^a
PRC	10 ⁵	-	25	25	100 ^a
PRF	10 ⁵	10 ⁹	25	25	100 ^a

PAC-PRC: Grupo control, muestras contaminadas con SE mantenidas a T° ambiente (T°A) y refrigeración (T°R). **PAF-PRF:** Grupo experimental, muestras contaminadas con SE e inoculadas con una mezcla de fagos, mantenidas a T°A y T°R. ^{a, a}: letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas (p>0,05).

Al analizar estos resultados, se observa que no existe una diferencia significativa (p>0,05) en la cantidad de muestras contaminadas entre el grupo experimental y el control, lo cual demuestra que la aplicación de fagos no logró reducir el número de muestras de carne fresca de pollo contaminadas con *Salmonella* Enteritidis.

3.2 Análisis cuantitativo

El análisis de varianza realizado a los recuentos promedio de SE (log₁₀ UFC/g) de los distintos grupos (Tabla nro. 3 y 4), muestra que existe una diferencia significativa (p≤0,05) entre el grupo experimental y su respectivo control, en ambas temperaturas.

Tabla nro. 3: Recuentos promedio (log₁₀ UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de pollo, con y sin administración de fagos, mantenidos a temperatura ambiente por diez días.

Grupo	Recuento promedio (log ₁₀ UFC/g) ± D.E.*	Recuentos mínimos - máximos de SE (log ₁₀ UFC/g).
PAC	3,76 ^a ± 0,48	2,81 – 4,96
PAF	2,88 ^b ± 0,72	0,64 - 3,54

D.E.: Desviación Estándar. ^{a, b}: letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas (p≤0,05).

Tabla nro. 4: Recuentos promedio (log₁₀ UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de pollo, con y sin administración de fagos, mantenidos a temperatura de refrigeración por diez días.

Grupo	Recuento promedio (log ₁₀ UFC/g) ± D.E.*	Recuentos mínimos - máximos de SE (log ₁₀ UFC/g).
PRC	3,34 ^a ± 0,09	3,09 – 3,53
PRF	1,68 ^b ± 0,43	0,64 - 2,18

D.E.: Desviación Estándar. ^{a, b}: letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas (p≤0,05).

En el análisis estadístico realizado a las muestras almacenadas por diez días a temperatura ambiente y de refrigeración, se puede observar que los resultados obtenidos presentan valores estadísticamente mayores ($p \leq 0,05$) en los recuentos del grupo control, en comparación al grupo que recibió fagos, lográndose reducciones del orden de $0,88 \log_{10}$ UFC/g y de $1,66 \log_{10}$ UFC/g para cada temperatura, respectivamente.

En el caso de las muestras pertenecientes al grupo blanco, todas fueron negativas frente a la presencia de SE, lo cual demuestra ausencia de contaminación intralaboratorio con la cepa en estudio.

4. DISCUSIÓN

Con respecto a las dosis de SE utilizadas en este estudio para contaminar las muestras en las distintas temperaturas, se modificó el protocolo de Espina (2012), elevándose las dosis sugeridas en 10 veces para las muestras mantenidas a temperatura ambiente ($5,7 \times 10^3$ UFC/mL) y en 100 veces para aquellas que fueron mantenidas a temperatura de refrigeración ($5,7 \times 10^5$ UFC/mL). Dicha modificación se realizó con la finalidad de obtener una mayor cantidad de muestras que presentaran recuentos factibles de contar (hasta 150 colonias por placa), y proporcionar una mayor concentración inicial de bacterias para optimizar la acción de los fagos, dado que, tal como se señala en diversos estudios (i.e Goode *et al.*, 2003; Guenther *et al.*, 2009), se requiere de una concentración bacteriana adecuada que permita el contacto de estas con los fagos, logrando de este modo, una adecuada acción lítica de la mezcla de fagos. La dosis bacteriana para contaminar las muestras que permanecieron en refrigeración se aumentaron 100 veces, producto de la disminución esperada en el crecimiento bacteriano inicial que ocurre a bajas temperaturas (Wesche *et al.*, 2009). De todos modos, las dosis utilizadas se encuentran dentro de rangos utilizados en investigaciones similares, tales como el de Goode *et al.* (2003), que contaminaron trozos de piel de pollo con una concentración de 10^3 UFC/cm² de SE, o como en el caso de Farfán (2010), quién contaminó huevos SPF con 10^2 UFC/mL de SE. Recientemente, en un estudio similar realizado por Guenther *et al.* (2012), se contaminaron muestras de leche chocolatada, pechuga de pavo cocida, *hot-dog*, mariscos y yema de huevo, utilizando concentraciones de 10^3 UFC/g de *Salmonella* Typhimurium.

Con relación a los resultados del Análisis cualitativo, dado que no se observaron diferencias ($p > 0,05$) entre la cantidad de muestras contaminadas en el grupo experimental y el control,

independiente de la temperatura, se concluye que los fagos no fueron capaces de disminuir la incidencia de contaminación en las muestras de carne fresca de pollo. Esto coincide con lo observado en la mayoría de los estudios en que se utilizan bacteriófagos como agentes de biocontrol en alimentos, como por ejemplo aquel realizado por Bigwood *et al.* (2008) en carne cocida y cruda contaminada con *Salmonella* Typhimurium; Higgins *et al.* (2005), contaminando carcasas de pollo con SE; y por Farfán (2010) en huevos SPF experimentalmente contaminados con SE.

Por otro lado, son escasos los estudios donde se demuestra que los fagos son capaces de reducir el número de muestras contaminadas. Un ejemplo corresponde al realizado por Goode *et al.* (2003), donde se logró que de un total de nueve trozos de piel de pollo contaminados con 10^3 UFC/mL de SE, tres resultaran negativos frente a la presencia de la bacteria, al utilizar en ellos un tratamiento con altas dosis de fagos (MOI 10^5). A su vez, O'Flynn *et al.* (2004), contaminaron trozos de carne con una suspensión de *E. coli* O157:H7 (2×10^3 UFC/mL), luego les adicionaron una suspensión de fagos (2×10^8 UFP/mL) y los mantuvieron a 37°C por una hora, obteniendo como resultado que en el 78% de las muestras no se obtuvo desarrollo bacteriano post aplicación de fagos, es decir, se logró disminuir el porcentaje de muestras contaminadas. Al respecto, parece interesante señalar que este resultado considera sólo la contaminación superficial de la carne, no evaluando el efecto de los fagos en la contaminación profunda de los cortes.

Un estudio que habla acerca de la reducción total del número de muestras contaminadas es el realizado por Guenther *et al.* (2012), donde se señala que al contaminar diversas matrices alimentarias con 10^3 UFC/g de *Salmonella* Typhimurium, agregarles una concentración del fago FO1-E2 a 3×10^8 UFP/g, y mantenerlas durante seis días a temperaturas de 8°C, se logró que la bacteria no fuera capaz de crecer en un 100% de las muestras experimentales, lo cual corresponde a una reducción de aproximadamente 3log. Sin embargo, estos resultados fueron cuestionados por los mismos autores, dado que en aquellas muestras contaminadas que no recibieron fagos, tampoco la bacteria fue capaz de crecer, disminuyendo entonces el recuento bacteriano durante este período entre 0,5 y 1,4 log. Otro factor que pudo influir en los resultados habla acerca de la sensibilidad de la técnica utilizada para detectar *Salmonella* Typhimurium, ya que al someter el grupo experimental que recibió fagos, a un protocolo de enriquecimiento, se demostró que la bacteria se encontraba presente.

En el caso de la presente memoria, el que no disminuyera el número de muestras contaminadas con SE se pudo deber a diversos factores, por ejemplo, al tipo de matriz. Guenther *et al.* (2009), evaluaron el efecto de un bacteriófago como agente de biocontrol en diversas matrices de alimentos contaminadas con *Listeria monocytogenes*, y concluyeron que en alimentos líquidos, la suspensión de bacteriófagos difunde libremente, lo cual permite lograr más fácilmente el efecto deseado, a diferencia de lo que ocurre en alimentos sólidos, donde se ve disminuida la difusión del fago y la habilidad de la matriz para adsorberlo. Otro ejemplo, donde la matriz influye en los resultados, es el señalado por Guenther *et al.* (2012), quienes observaron en yema de huevo pasteurizada una reducción significativa de 2,6 log después de dos días del tratamiento, pero no se observó efecto del fago después de cinco o seis días de incubación, probablemente producto de la difusión reducida y la distribución no homogénea de las partículas de fago en la matriz altamente viscosa de yema de huevo, o con otros compuestos que interfieren con la interacción fago-hospedador, tal como la adsorción y la infección. Se menciona que la carne es una de las matrices más difíciles de tratar con fagos, debido a la superficie irregular que tiene, esta limita la distribución de los fagos en ella, influyendo en el contacto entre los fagos y las bacterias, implicando una menor efectividad de los mismos (Guenther *et al.*, 2009). Por otro lado, también se podría explicar que en el presente estudio no disminuyeran las muestras contaminadas producto de la MOI utilizada de 10^4 , a diferencia de aquellos estudios donde se logró una disminución al utilizar una MOI de 10^5 (Goode *et al.*, 2003; O'Flynn *et al.*, 2004). Esto permite inferir que si se aumenta la concentración de fagos en un futuro estudio, y por ende la MOI, podría eventualmente disminuir el número de muestras contaminadas.

En cuanto al Análisis cuantitativo, se observa una disminución bacteriana significativa ($p \leq 0,05$) en los grupos dosificados con fagos con respecto a los controles, independiente de la temperatura. La disminución en los recuentos bacterianos fluctuó entre $0,88 \log_{10}$ UFC/g a temperatura ambiente y $1,66 \log_{10}$ UFC/g a temperatura de refrigeración. Dicha disminución era esperable, dada la buena actividad de los cinco fagos *in vitro*, y las características en base a las cuales se realizó su selección². Estos resultados fueron similares a lo observado internacionalmente, tales como los obtenidos por Goode *et al.* (2003), quienes lograron reducciones significativas en los

²Robeson, James. 2012. [Comunicación personal]. Laboratorio de Bacteriología. Instituto de Biología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Campus Curauma.

recuentos bacterianos de un 22% y un 11%, a las 24 y 48 horas, respectivamente; O'Flynn *et al.* (2004), quienes lograron reducciones del orden de 5 log. Por otro lado, en el estudio realizado por Guenther *et al.* (2012), donde se señala que al ser mantenidas las muestras a 15°C, se observaron reducciones entre 1,9 y 5 log, según la matriz.

En Chile, estudios realizados recientemente en matrices cárneas también lograron resultados favorables. Jorquera *et al.* (2012) y Aguirre (2013) contaminaron carne de bovino y cerdo respectivamente con *Salmonella* Enteritidis, y adicionaron una mezcla de cinco fagos nativos, logrando reducciones significativas en los recuentos bacterianos. Jorquera *et al.* (2012) determinaron reducciones de 3,65 log₁₀ UFC/g en las muestras mantenidas a temperatura ambiente y de 3,54 log₁₀ UFC/g en aquellas mantenidas a temperatura de refrigeración, mientras que Aguirre (2013) logró reducciones significativas sólo en temperatura ambiente, de 3,56 log₁₀ UFC/g, no observando el mismo resultado en aquellas muestras mantenidas a temperatura de refrigeración, donde el recuento promedio en las muestras del grupo control llegó sólo a 2,81±0,99 log₁₀ UFC/g, y en las experimentales a 2,81±0,58 log₁₀ UFC/g. Esto se explicaría, según la autora, por el escaso desarrollo que presentó SE a temperatura de refrigeración, situación que hizo perder la relación fago:bacteria, y con ello, disminuir las posibilidades de colisión entre ambos.

A diferencia de lo observado por Aguirre (2013), en la presente memoria sí se observa un efecto de los fagos a temperatura de refrigeración, lo cual se puede deber a que SE habría tenido una mayor capacidad de replicarse a dicha temperatura en la matriz de pollo, a diferencia del cerdo. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados en condiciones semejantes de temperatura, donde se lograron reducciones significativas en los recuentos bacterianos, entre estos se señala por ejemplo lo realizado por Leverentz *et al.* (2001), quienes contaminaron trozos de melón con *Salmonella* Enteritidis (1x10⁶UFC/mL), y evaluaron el efecto de una mezcla de bacteriófagos (2x10⁸ UFP/mL de cada fago), considerando incubación de estos trozos a 5°C y 20°C por siete días. Los autores señalan haber obtenido mayores reducciones a los 5°C que a los 20°C, siendo de 3,5 log y 2,5 log, respectivamente.

Se sabe que las bajas temperaturas tienen un efecto estresante en las bacterias, entre ellas, *Salmonella* spp, y se describe que esto, sumado a un prolongado tiempo de almacenamiento, corresponde a un nivel de estrés moderado, el cual desencadenaría la muerte de una cierta

cantidad de SE (Wesche *et al.*, 2009). A su vez, se menciona que existe una adaptación de las bacterias a estas bajas temperaturas, la que se manifiesta por ejemplo: i) sintetizando transitoriamente proteínas protectoras llamadas *cold shock proteins*, las cuales desempeñarían un papel fundamental en diversas funciones celulares y fisiológicas, y ii) activando al menos una enzima constitutiva, que tiene relación con el mantenimiento en la fluidez de la membrana, necesaria para adaptarse al frío. Dicha adaptación sumada a características intrínsecas de la matriz alimentaria tales como la actividad de agua, pH, potencial oxido-reducción, entre otros, pueden influir negativamente en el crecimiento bacteriano (Wesche *et al.*, 2009), explicando de esta forma la distinta respuesta que tuvo SE en las matrices de pollo y cerdo a temperatura de refrigeración. Esto se puede aseverar al no observar una diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los recuentos promedios obtenidos del grupo control, entre la temperatura ambiente ($3,76 \pm 0,48$) y temperatura de refrigeración ($3,34 \pm 0,09$), lo que a su vez, indicaría que la disminución significativa ocurrida en ambas temperaturas del grupo experimental, ocurrió mayormente producto del efecto de los fagos, sugiriendo que la actividad lítica de la mezcla de cinco bacteriófagos es efectiva en la reducción de la contaminación de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de pollo mantenida durante diez días tanto a temperatura ambiente, como de refrigeración.

Cabe señalar que en el grupo experimental hubo cinco muestras, dos en temperatura ambiente y tres en temperatura de refrigeración, donde no se observó crecimiento bacteriano en la placa de agar utilizada para el recuento, sin embargo, luego de realizar un enriquecimiento, estas muestras resultaron positivas en el Análisis cualitativo. Esto probablemente ocurrió debido a la menor sensibilidad de la técnica utilizada para hacer recuentos, comparada con aquella para detectar SE, de una forma similar a lo señalado en el caso de Guenther *et al.* (2012), donde luego de un enriquecimiento, aumentó la sensibilidad de la detección de *Salmonella* Typhimurium.

Finalmente, todos estos resultados ponen en evidencia que la mezcla de bacteriófagos utilizada resultó ser eficaz como agente de biocontrol en la reducción de la contaminación de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de pollo, tanto a temperatura ambiente como de refrigeración. Esto tiene gran importancia, no solo por abrir una puerta para continuar investigando al respecto, sino porque además, permite pensar que en un futuro, esta mezcla podría ser una alternativa para ser utilizada comercialmente por la industria alimentaria.

5. CONCLUSIONES

Los resultados observados permiten concluir que bajo las condiciones de este estudio, la mezcla de bacteriófagos nativos aplicada en carne fresca de pollo, si bien no logra disminuir el número total de muestras contaminadas con SE, logra reducir significativamente el recuento de SE en esta matriz, independiente de la temperatura a la cual es estudiada.

BIBLIOGRAFÍA

- **AGUIRRE, M.** 2013. Biocontrol mediante la aplicación de una mezcla de bacteriófagos en carne fresca de cerdo contaminada con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 22p.
- **BIGWOOD, T.; HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.V.; HEINEMANN, J.A.** 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.* 25(2):400–406.
- **CEYSSENS, P.J.** 2009. Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para lograr el grado de Doctor en Bioingeniería. Lovaina, Bélgica. Facultad de Bioingeniería, U. Católica de Lovaina. 150p.
- **DI RIENZO J., CASSANOVES F., BALZARINI M., GONZÁLEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.** 2008. InfoStat *Software* estadístico, versión 2008. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- **ESPINA, K.** 2012. Contaminación experimental con *Salmonella* Enteritidis en carnes crudas de pollo, pavo, cerdo y bovino. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 25p.
- **FARFÁN, F.** 2010. Efecto de una mezcla de tres bacteriófagos en la reducción de *Salmonella* Enteritidis en huevos SPF experimentalmente infectados. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.
- **GARCÍA, E.; GAGO, L.; FERNÁNDEZ, J.** 2006. Tecnologías de envasado en atmósfera protectora: Gases empleados en el envasado en atmósfera protectora. **In:** Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. Fundación para el conocimiento Madri+d. Madrid, España. 19-26.
- **GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Lett Appl Microbiol.* 47(6):479-85.
- **GAST, R. K.** 2007. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis.* 51: 817–828.
- **GOODE, D.; ALLEN, V.; BARROW, P.** 2003. Reduction of Experimental *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 69(8):5032-5036.
- **GOODRIGE, L.; BISHAR, B.** 2011. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3):130-137.
- **GÓRSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.** 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 62(5):511-519.
- **GREER, G.** 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot.* 68(5):1102-1111.
- **GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.** 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol* 75(1): 93–100.

- **GUENTHER, S.; HERZIG, O.; FIESELER, L.; KLUMPP, J.; LOESSNE, M.** 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int J Food Microbiol.* 154(1-2):66-72.
- **HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; GUENTHER, K.L.; HUFF, W.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; HARGIS, B.M.** 2005. Use of a Specific Bacteriophage Treatment to Reduce *Salmonella* in Poultry Products. *Poult Sci.* 84(7):1141–1145.
- **HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G.** 2005. Bacteriophage as Biocontrol Agents in Food. *J Food Prot.* 68(2):426-437.
- **INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2002. Norma Chilena Oficial NCh 2675. Of2002. Productos hidrobiológicos-Detección de *Salmonella*. 05 abril 2002. 31p.
- **INTRALYTIX.** 2009. *ListShield™* (LMP-102™) *Listeria monocytogenes* Specific Phage Preparation. [en línea] <[http://www.intralytix.com/Certificates and MSDSs/MSDS%20ListShield%20final.pdf](http://www.intralytix.com/Certificates_and_MSDSs/MSDS%20ListShield%20final.pdf)> [consulta: 10-04-2013].
- **ISOHANNI, P.; LYHS, U.** 2009. Use of ultraviolet irradiation to reduce *Campylobacter jejuni* on broiler meat. *Poult Sci.* 88(3):661-668.
- **JORQUERA, D.; OVIEDO, P.; ESPINA, K.; PRIETO, G.; TURRA, G.; ROBESON, J.; BORIE, C.** 2012. Reducción de *Salmonella* Enteritidis en carne fresca de bovino mediante la aplicación de una mezcla de bacteriófagos. **In:** XIV Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos; XXIX Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Puerto Vallarta, México. 8-10 noviembre, 2012. Laboratorio de Microbiología, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, U. Chile; Laboratorio de Bacteriología, Instituto de Biología, Pont. Univ. Católica de Valparaíso. R 130.
- **LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W.; FUCHS, Y.; CAMP, M.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A.** 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Prot.* 64(8):1116-1121.
- **MAHONY, J.; McAULIFFE, O.; ROSS, R.; VAN SINDEREN, D.** 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr Opin Biotechnol.* 22(2):157-163.
- **McCANN, M.; McGOVERN, A.; McDOWELL, D.; BLAIR, I.; SHERIDAN, J.** 2006. Surface decontamination of beef inoculated with *Salmonella* Typhimurium DT104 or *Escherichia coli* O157:H7 using dry air in a novel heat treatment apparatus. *J Appl Microbiol.* 101(5):1177-1187.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2012. Informe de Brotes por Enfermedades Transmitidas por Alimentos (Hasta semana 8, año 2012). [en línea]. <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/ETA/ETA_SE82012.pdf> [consulta: 06-06-2012].
- **MONK, A.; REES, C.; BARROW, P; HAGENS, S.; HARPER, D.** 2010. Bacteriophage applications: where are we now?. *Lett Appl Microbiol.* 51(4):363-369.

- **O'FLYNN, G.; ROSS, R.; FITZGERALD, G.; COFFEY, A.** 2004. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 70(6):3417-3424.
- **ROHWER, F.** 2003. Global Phage Diversity. *Cell*, 113(2):141.
- **SÁNCHEZ, P.** 2007. Uso de reacción de polimerasa en cadenas en el diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en tejidos y contenido intestinal de pollos experimentalmente infectados. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.
- **SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(3): 649-659.
- **VAQUERO, A.** 2011. Informe *Salmonella* Enteritidis 7 de noviembre 2011. [en línea]. <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Salmonella/Informe_SalmonellaNov2011%20.pdf>. [consulta: 06-06-2012].
- **WESCHE A., GURTNER J., MARKS B., RYSER E.** 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *J Food Prot.* 72(5):1121-1138.