



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



INOCULACIÓN EXPERIMENTAL CON *Salmonella enterica*
SEROTIPO ENTERITIDIS EN DISTINTOS TIPOS DE
CECINAS

GABRIEL ROBERTO LÓPEZ MORALES

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



INOCULACIÓN EXPERIMENTAL CON *Salmonella enterica*
 SEROTIPO ENTERITIDIS EN DISTINTOS TIPOS DE
 CECINAS

GABRIEL ROBERTO LÓPEZ MORALES

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA : CONSUELO BORIE POLANCO
PROFESOR CONSEJERO : CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESORA CONSEJERA: DANIELA IRAGÜEN CONTRERAS

SANTIAGO, CHILE
 2012

MEMORIA DE TÍTULO

“INOCULACIÓN EXPERIMENTAL CON *Salmonella enterica* SEROTIPO ENTERITIDIS EN DISTINTOS TIPOS DE CECINAS”

“EXPERIMENTAL INOCULATION WITH *Salmonella enterica* SEROTYPE ENTERITIDIS IN DIFFERENTS KIND OF SAUSAGES”

Gabriel Roberto López Morales*

*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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas que colaboraron en el proceso de realización de esta memoria, especialmente a:

Dra. Consuelo Borie por el compromiso y la paciencia en la ejecución de los ensayos de laboratorio necesarios para la realización de esta memoria, y por la dedicación en el proceso de redacción de la misma.

Dra. Daniela Iragüen y Dr. Carlos Navarro que en su rol de profesores correctores aportaron nuevas ideas que perfeccionaron el trabajo realizado durante el año.

Dra. Pilar Oviedo por la asesoría especializada y buena disposición al momento de revisar el trabajo final.

Don Patricio y Don Carlos por su ayuda constante en el quehacer diario de las tareas de laboratorio.

A mis compañeras de laboratorio Constanza, Karen y Denisse por los buenos momentos que pasamos en el transcurso de la realización de la memoria.

A mis amigos por todas las cosas que hemos pasado siempre juntos.

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años.

Y a Camila; por todo.

*“Hay hombres que luchan un día y son buenos.
Hay otros que luchan un año y son mejores.
Hay otros que luchan muchos años y son muy buenos.
Pero hay quienes luchan toda la vida, esos son imprescindibles.”*

Bertolt Brecht

RESUMEN

En el mundo, uno de los patógenos más frecuentemente aislado desde brotes causados por Enfermedades Transmitidas por los Alimentos es *Salmonella spp.* En Chile, el serotipo que posee la mayor prevalencia es *Salmonella* Enteritidis (S.E), aislado principalmente desde productos de origen animal como la carne de ave y otros productos cárnicos como las cecinas. Considerando que las medidas para controlar S.E en alimentos son de vital importancia, en este estudio se implementaron cuatro protocolos de inoculación experimental en cecinas, con el fin de disponer previamente de una herramienta fundamental que permita a futuro analizar nuevas tecnologías tendientes a disminuir este patógeno en los alimentos.

Así, en este estudio se presentan los resultados de la inoculación experimental con S.E mediante cuatro protocolos en distintos tipos de cecinas, determinando tanto la dosis mínima ($10^2 - 10^6$ UFC/mL) y la mejor técnica de aplicación del inóculo (con homogeneización/sin homogeneización), como la forma de presentación de las matrices (laminado/molido) para lograr porcentajes de positividad a $S.E \geq 80\%$, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. Adicionalmente se estudia la eficiencia de la adición de Piruvato de Sodio en los medios de cultivo para la recuperación de S.E en cecinas contaminadas y almacenadas a temperatura de refrigeración.

En las cecinas contaminadas se obtuvieron porcentajes de positividad $\geq 80\%$ con la mayoría de los protocolos analizados y con bajas dosis de S.E ($10^2 - 10^3$ UFC/mL). La adición de Piruvato de Sodio no entregó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) al compararlo con medios de cultivo sin suplemento.

Palabras claves: *Salmonella* Enteritidis, cecinas, protocolos de inoculación experimental.

ABSTRACT

Worldwide, one of the pathogens most frequently isolated from outbreaks of Foodborne Disease is *Salmonella spp.* In Chile, serotype Enteritidis (S.E) is the most prevalent, isolated mainly from animal products as poultry meat and other meat products such as sausages. Considering that the measures to control S.E in food are of vital importance, in this study were implemented four protocols of experimental inoculation in sausages with the purpose of having previously an essential tool that will allow future analysis of new technologies aimed at reducing this pathogen in foods.

Thus, this study presents the results of experimental inoculation with S.E using four protocols in different kind of sausages, to determine the minimum dose ($10^2 - 10^6$ CFU/mL), the best technique of application of inoculum (with homogenization/without homogenization) and the best presentation of the matrices (rolled/ground) to achieve a percentage of positive S.E $\geq 80\%$ both at room temperature as refrigerated. Additionally, the efficiency of the addition of Sodium Pyruvate in the culture media for recovery of S.E from contaminated sausages stored at refrigeration temperature was studied.

With most of the protocols analyzed was obtained a percentage of positive $\geq 80\%$ and with low doses of S.E ($10^2 - 10^3$ CFU/mL) in all sausages. The addition of Sodium Pyruvate did not show statistically significant differences ($p > 0.05$) when compared with culture media without supplement.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, sausages, experimental inoculation protocols.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, tanto en Chile como en el mundo, la preocupación por la inocuidad de los alimentos ha tomado cada vez mayor importancia, debido principalmente al aumento de brotes de infecciones causados por la ingesta de productos que contienen agentes biológicos (virus, hongos, parásitos y bacterias) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor; a este tipo de patologías se les denomina enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica (CDC) estiman que cada año, 48 millones de personas se enferman (al menos uno de cada seis estadounidenses), 128.000 son hospitalizados y 3.000 mueren por enfermedades transmitidas por los alimentos; además establece que el principal patógeno bacteriano es *Salmonella spp.* el cual provoca alrededor de 1.027.561 personas enfermas, 19.336 hospitalizaciones y 378 muertes en este país (CDC 2011). En Chile, el año 2010 las ETA provocaron 4.794 enfermos de los cuales cinco fallecieron y se registra que en 2011 existe una tendencia al aumento de brotes según información entregada por el Departamento de Estadística e Información de Salud (DEIS) (Dünner 2011). En cuanto a los patógenos bacterianos causantes de ETA en Chile, *Salmonella spp.* es uno de los principales, causando 2.728 casos confirmados por el Instituto de Salud Pública (ISP) en 2010 (ISP 2010).

Los serotipos de *Salmonella spp.* que existen en el mundo son alrededor de 2.600 (Guibourdenche *et al.* 2010) y en Chile, *Salmonella* Enteritidis (S.E) posee la mayor prevalencia, lo que queda de manifiesto en investigaciones realizadas por el ISP que demuestran que del total de tipificaciones de *Salmonella spp.*, el 59% de los aislamientos clínicos realizados en humanos y el 25% de las identificaciones en alimentos correspondieron a S.E (Vaquero *et al.* 2011).

De acuerdo a datos entregados por el DEIS sobre alimentos involucrados en brotes de ETA, en el año 2009 las carnes y productos cárneos (bovino, cerdo, ave,

hamburguesas y cecinas) se asociaron a un 9% de los brotes, siendo la carne de ave y las cecinas las que ocuparon el primer lugar en importancia con un 26% cada una (DEIS 2009). En cuanto a la asociación entre un determinado alimento y un patógeno específico, se observó que los productos cárneos representaron aproximadamente el 63% de los alimentos positivos a *S.E* registrados por el DEIS entre 2005 y agosto de 2011 en Chile (Vaquero *et al.* 2011), lo que concuerda con datos, tanto nacionales como internacionales, que sitúan a los productos de origen animal como una de las principales fuentes desde las cuales se puede contraer esta bacteria (Figuroa 2007, FSIS 2010, Yang *et al.* 2010).

En la mayoría de los países, el porcentaje de cecinas positivas a *Salmonella spp.* es muy bajo, principalmente debido a las adecuadas medidas de producción y de seguridad alimentaria por las cuales se rigen. Pero aún cuando se cumplen adecuadamente todas las prácticas de elaboración e higiene, siguen existiendo brotes de salmonelosis en el mundo por consumo de estos productos. Por ejemplo, se han registrado brotes en Francia por consumo de salchichas de cerdo (Bone *et al.* 2010) o por consumo de salame en Italia (Luzzi *et al.* 2007), Estados Unidos de Norteamérica (Julian *et al.* 2010) y Dinamarca (Kuhn *et al.* 2011).

Aunque en Chile los registros sobre brotes de salmonelosis atribuidos al consumo de cecinas son escasos (Prado *et al.* 2002), no se descarta que estos podrían aumentar, debido a que se debe considerar el alza que ha experimentado el consumo de cecinas en Chile (cerca a 15 kg. por habitante al año), así como también el aumento en la elaboración de estos productos, cercana a un 5% con respecto a años anteriores (INE 2010).

De lo descrito, se desprende que la mejor forma de cuidar la salud es consumiendo alimentos cuya carga bacteriana sea nula o tan baja que no sea capaz de producir un cuadro patológico en las personas. Es por esto que las medidas que se tomen para proteger a los alimentos de la contaminación con bacterias patógenas no deben ser

subestimadas. Para lograr este propósito se han generado distintas formas de protección de los alimentos, como la radiación ultravioleta, aplicación de ozono, ultrasonido y ciertos agentes biológicos entre otras medidas (Mukhopadhyay y Ramaswamy 2011). Dentro de la última categoría descrita, cabe destacar el uso de bacteriófagos como controladores bacterianos en productos listos para su consumo. La capacidad biocontroladora de estos virus ha quedado demostrada frente a distintas bacterias como *Salmonella spp.* además de diferentes matrices alimentarias como carcasas de pollo, quesos, frutas y salchichas entre otras (García *et al.* 2008). A la fecha, existen productos elaborados con bacteriófagos que se comercializan para controlar bacterias en los alimentos, tanto en los Estados Unidos de Norteamérica aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), como también en Suiza aceptados por la legislación europea de seguridad alimentaria (Mahony *et al.* 2010).

Las medidas para disminuir la presencia de *Salmonella spp.* en los alimentos se perfilan como un propósito que se debe alcanzar. Para esto, la implementación de protocolos experimentales de contaminación con cepas nativas de S.E en cecinas, son una herramienta esencial para la generación de grupos controles donde posteriormente poder realizar estudios destinados a generar tecnologías que controlen ésta y otras bacterias en los alimentos.

En este trabajo, se implementaron protocolos de contaminación con S.E en cecinas crudas (salame y longaniza) y cecinas cocidas (vienesas y jamón de pavo) considerando determinar la **dosis mínima de S.E, la técnica de aplicación del inóculo** bacteriano y la **forma de presentación** de las diferentes matrices que permitieran lograr porcentajes de positividad a S.E $\geq 80\%$ en los alimentos analizados tanto a temperatura ambiente como en refrigeración. Adicionalmente, se estudió la **eficiencia de la adición de un suplemento en los medios de cultivo para la recuperación de S.E** en cecinas contaminadas y almacenadas a temperatura de refrigeración.

Esta investigación se realizó con el propósito de generar los grupos controles necesarios para implementar un estudio posterior (FONDECYT 1110038) destinado a demostrar la aplicabilidad de bacteriófagos específicos contra *S.E* en distintos alimentos de origen animal que representan un riesgo en salud pública.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de alimentos: Las distintas matrices fueron adquiridas desde un supermercado de la ciudad de Santiago de Chile, en envases sellados y lo más cercano a su fecha de elaboración. En la Tabla Nro.1 se resumen las distintas cecinas y sus características.

Tabla Nro. 1: Tipos de cecinas analizadas.

Tipo de cecina*	Especie Animal	Clasificación
Salame italiano	Vacuno/Cerdo**	Cecina cruda
Longaniza	Cerdo	Cecina cruda
Vienesas de pollo	Ave/Vacuno/Cerdo***	Cecina cocida
Jamón pechuga de pavo cocida	Pavo	Cecina cocida

*Las marcas de los alimentos fueron mantenidas bajo confidencialidad

**El salame Italiano es elaborado a partir de carne de vacuno, pulpa y tocino de cerdo.

***Las vienasas de ave son elaboradas principalmente, a base de pechuga de pollo aunque entre sus ingredientes también se encuentra carne de cerdo y vacuno.

Los alimentos fueron transportados a temperatura de refrigeración utilizando una caja isotérmica con refrigerante en un tiempo inferior a las 4 horas desde su adquisición. Una vez en el laboratorio, los alimentos fueron analizados mediante un cultivo tradicional asociado a una detección a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para corroborar la ausencia de *Salmonella spp.* Se trabajó solo con muestras cuya bacteriología fuera negativa a esta bacteria.

Cepa desafío: Se utilizó una cepa nativa de S.E de origen aviar donada por la Dra. Irma Acevedo del Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). A partir de ésta, en el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso se seleccionó una cepa doble mutante espontánea resistente a ácido nalidíxico (*nal^r*) y rifampicina (*rif^r*).

Forma de presentación de la matriz alimentaria: De acuerdo a estudios internacionales (Jofré *et al.* 2008, Govaris *et al.* 2010), se analizó la presentación laminada y molida. En cuanto a la presentación laminada, salame y jamón fueron

adquiridos de esta forma desde un supermercado en envases al vacío, en tanto que vienas y longanizas fueron laminadas en el laboratorio (aprox. 1,5 cm/lámina). Por otro lado, para lograr la presentación **molida**, las cecinas fueron procesadas en una picadora de alimentos (Moulinex®). Estos procedimientos fueron realizados bajo condiciones de asepsia en un lugar del laboratorio donde no se trabajaba con bacterias.

Técnicas de aplicación del inóculo: El análisis se realizó en base a investigaciones internacionales (Holck y Berg 2009, Porto-Fett *et al.* 2010) donde se estudiaron distintas formas de contaminación. Las técnicas seleccionadas para este estudio fueron **goteo sin y con homogeneización** mediante asa de Digralsky, con un volumen de inóculo cercano al 1% del peso de la muestra (250 µL). Las matrices se contaminaron con diferentes concentraciones de S.E que variaron entre 10^6 a 10^2 UFC/mL, obtenidas a partir de una cepa de S.E *nal^r rif^r* incubada en caldo común por 24 horas a 35 ± 1 °C, suspensión que luego se diluyó hasta que su turbidez fuera similar al tubo 0,5 del nefelómetro de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bacterias/mL). La concentración de los inóculos fue corroborada mediante recuento bacteriano.

Protocolos experimentales: En cada protocolo experimental se trabajó con 40 muestras de 25 g de alimento (INN 2002). El número de muestras fue definido mediante un programa estadístico para un nivel de confianza de un 95%. Cada muestra se inoculó dentro de una bolsa estéril (Whirl-Pak®, Nasco) bajo gabinete de bioseguridad y con una concentración específica de S.E. Después de la inoculación, las muestras se mantuvieron en gabinete por dos horas para que la bacteria se adaptara a su nuevo medio. Luego de esto, 20 muestras fueron incubadas a **temperatura ambiente** y las 20 restantes a **temperatura de refrigeración** por 10 días. Finalizado este tiempo, las muestras fueron analizadas para detección de S.E (bacteriología cualitativa). Los diferentes protocolos de contaminación se describen en la Tabla Nro. 2.

Tabla Nro. 2: Protocolos de contaminación según temperatura por cada matriz en análisis*.

		Técnica de aplicación del inóculo	
		Homogeneizado (H)	Sin homogeneizar (S)
Forma de presentación	Laminado (L)	L/H	L/S
	Molido (M)	M/H	M/S

* Cada protocolo se ensayó con diferentes dosis de *Salmonella* Enteritidis.

Bacteriología cualitativa: La detección bacteriana a partir de las cecinas contaminadas se realizó según lo descrito en la Norma Chilena Oficial NCh 2675.Of2002 sobre “Productos hidrobiológicos – Detección de *Salmonella*” (INN 2002). Luego de los 10 días de almacenamiento a ambas temperaturas, a cada muestra contaminada (25g) se le agregaron 225 mL de Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco®) e inmediatamente fueron homogeneizadas en un equipo Masticator® (IUL Instruments) por un minuto, para posteriormente ser incubadas a 35 ± 1 °C por 16 a 20 horas. Transcurrido este tiempo, se transfirió 0,1 mL en un tubo con 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV, Difco®) que se incubó a 42 ± 1 °C durante 24 horas. Paralelamente, se transfirió un mL a un tubo con 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC, Difco®) que se incubó a 35 ± 1 °C por el mismo periodo de tiempo. Luego 0,1 mL de cada tubo fue sembrado en agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD, Difco®) y agar *Salmonella-Shigella* (SS, Difco®) adicionados con ácido nalidíxico (50 µg/mL, Arlab®) y rifampicina (50 µg/mL, Caisson®). Por último, cada placa se incubó a 35 ± 1 °C por 24 a 48 ± 2 horas.

Elección del mejor protocolo de contaminación: Se seleccionó como mejor protocolo aquel cuya **presentación de la matriz, técnica de aplicación y menor dosis de inóculo** bacteriano generaron como mínimo un 80% de muestras positivas. En el caso de existir dos o más métodos que informaran un porcentaje de positividad $\geq 80\%$ con la misma dosis bacteriana, se seleccionó aquel que entregó un mayor recuento (bacteriología cuantitativa) al día 10 post-incubación.

Bacteriología cuantitativa (recuentos): A los nueve días de almacenamiento a temperatura ambiente y refrigeración, las bolsas con alimento contaminado (25 g) fueron adicionadas con 225 mL de APT (Difco®) e inmediatamente homogeneizadas en un equipo Masticator® (IUL Instruments) por un minuto, para posteriormente ser incubadas a 35 ± 1 °C por máximo 18 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron cuatro diluciones consecutivas en APT (Difco®) para finalmente sembrar con asa de Digrafsky un volumen de 0,1 mL de cada dilución en placas Petri estériles con agar XLD (Difco®) adicionado con ácido nalidíxico (50 µg/mL, Arlab®) y rifampicina (50 µg/mL, Caisson®). Estas placas se incubaron a 35 ± 1 °C por 24 ± 2 horas. Pasado el tiempo estipulado, se procedió a contar aquellas placas que contenían como máximo 150 colonias. En el caso de encontrar placas sin crecimiento de colonias (placa negativa) se realizó una bacteriología cualitativa a partir de la muestra inicial.

Adición de Piruvato de Sodio como suplemento para la recuperación de S.E en muestras refrigeradas: Dado que se reconoce el efecto detrimental que provocan las bajas temperaturas en el crecimiento de las bacterias y en particular de *Salmonella spp.*, (Gurtler y Conner 2009, Wesche *et al.* 2009) es que se han estudiado formas para revertir este proceso. Una de ellas es la adición de Piruvato de Sodio (Wu 2008) en medios de cultivo no selectivos (Gurtler y Kornacki 2009). De acuerdo a lo señalado, se realizó un nuevo recuento de las muestras contaminadas y almacenadas a temperatura de refrigeración en agar Tripicasa Soya (TS, Difco®) adicionado con ácido nalidíxico (50 µg/mL, Arlab®) y rifampicina (50 µg/mL, Caisson®) y suplementado con Piruvato de Sodio al 1% (Merck®). Se contempló un grupo control sin la adición del suplemento para evaluar la eficiencia de este último.

Análisis de los resultados: Los datos de la bacteriología cualitativa y cuantitativa fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.* 2008) y los valores de $p \leq 0,05$ fueron estadísticamente significativos. De esta forma, los resultados de la bacteriología cualitativa fueron expresados como porcentaje de

positividad y sus diferencias analizadas mediante la Prueba de Diferencia de Proporciones. En los casos donde no existió diferencia estadística, se realizó un recuento bacteriano cuyos resultados se expresaron en unidades logarítmicas (Log UFC/g) para luego realizar un Análisis de Varianza (ANDEVA). Asimismo, para establecer la eficiencia de la adición del suplemento en la recuperación de *S.E*, se realizó un recuento bacteriano de las muestras contaminadas almacenadas a temperatura de refrigeración y los resultados de sus recuentos se transformaron a unidades logarítmicas (Log UFC/g) para ser analizados mediante un ANDEVA.

Normas de bioseguridad: Los procedimientos realizados en el laboratorio contaron con una certificación de bioseguridad local y además fueron regidos bajo las normas que señala el nivel de bioseguridad N° 2 del Manual de Normas Bioseguridad que establece CONICYT para sus investigaciones (CONICYT 2008).

RESULTADOS

Todas las cecinas que se analizaron lograron porcentajes de positividad superiores al 80% al ser contaminadas con bajas concentraciones de S.E (10^2 - 10^3 UFC/mL).

Los resultados de los porcentajes de positividad a S.E de cecinas almacenadas a **temperatura ambiente** (Tabla Nro. 3) demostraron que en vienesa, longaniza, y jamón de pavo la concentración mínima que logró más de un 80% de muestras positivas fue de 10^2 UFC/mL, mientras que en salame fue de 10^3 UFC/mL. La presentación **molida**, con y sin homogeneización, entregó para todas las cecinas un 100% de muestras contaminadas con S.E. En la presentación **laminada** en cambio, los valores fueron $\geq 95\%$, con excepción de vienesa laminada sin homogeneizar, que solo entregó un 40% de muestras positivas con una misma dosis de S.E (10^2 UFC/mL).

Tabla Nro. 3: Porcentajes de positividad a *Salmonella* Enteritidis en cecinas contaminadas experimentalmente y almacenadas a temperatura ambiente.

Tipos de cecinas	Forma de presentación	Técnica de inoculación	Porcentaje de positividad	
			Concentración de inóculo (UFC/mL)	
			10^3	10^2
Vienesas	Molido	Con homogeneización	—	100%
		Sin homogeneización	—	100%
	Laminado	Con homogeneización	—	95%
		Sin homogeneización	—	40%
Salame	Molido	Con homogeneización	100%	40%
		Sin homogeneización	100%	40%
	Laminado	Con homogeneización	100%	40%
		Sin homogeneización	100%	40%
Longaniza	Molido	Con homogeneización	—	100%
		Sin homogeneización	—	100%
	Laminado	Con homogeneización	—	100%
		Sin homogeneización	—	100%
Jamón de pavo	Molido	Con homogeneización	—	100%
		Sin homogeneización	—	100%
	Laminado	Con homogeneización	—	100%
		Sin homogeneización	—	100%

(—): No realizado por existir una menor concentración bacteriana que logró $> 80\%$ de muestras positivas.

En cuanto a las cecinas contaminadas y almacenadas a **temperatura de refrigeración** (Tabla Nro. 4) se puede observar que en la mayoría de ellas, independientemente del protocolo seleccionado, se logró un porcentaje superior al 80% con una concentración de 10^2 UFC/mL. La presentación **molida**, con y sin homogeneización, entregó porcentajes \geq al 80% para todas las cecinas, mientras que en la presentación **laminada** los valores fueron de un 100% de positividad a S.E, con excepción de vienesa laminada sin homogeneizar que solo entregó un 40% de muestras positivas con una misma dosis (10^2 UFC/mL).

Tabla Nro. 4: Porcentajes de positividad a *Salmonella* Enteritidis en cecinas contaminadas experimentalmente y almacenadas a temperatura de refrigeración.

Tipos de cecinas	Forma de presentación	Técnica de inoculación	Porcentaje de positividad
			Concentración de inóculo (UFC/mL)
			10^2
Vienesas	Molido	Con homogeneización	80%
		Sin homogeneización	85%
	Laminado	Con homogeneización	100%
		Sin homogeneización	40%
Salame	Molido	Con homogeneización	95%
		Sin homogeneización	100%
	Laminado	Con homogeneización	100%
		Sin homogeneización	100%
Longaniza	Molido	Con homogeneización	100%
		Sin homogeneización	100%
	Laminado	Con homogeneización	100%
		Sin homogeneización	100%
Jamón de pavo	Molido	Con homogeneización	100%
		Sin homogeneización	100%
	Laminado	Con homogeneización	100%
		Sin homogeneización	100%

Dado que la mayoría de los protocolos fueron altamente eficientes en la contaminación, (\geq 80% de positividad) no presentaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) al ser analizados. Es así como se procedió a comparar solo dos protocolos por matriz mediante recuentos bacterianos (bacteriología cuantitativa), los cuales fueron

elegidos según menor riesgo en su manipulación y factibilidad operativa. Finalmente los recuentos alcanzados por los protocolos seleccionados fueron comparados mediante un análisis estadístico para elegir el mejor por cada matriz.

La Ilustración Nro. 1 presenta los recuentos alcanzados por los protocolos de las cecinas almacenadas a **temperatura ambiente**. En términos generales, los recuentos de los dos protocolos analizados en longaniza presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), siendo la técnica sin homogeneizar la más exitosa (LMSA). De la misma forma, los recuentos de los dos protocolos analizados en salame también presentaron diferencias estadísticas, siendo en este caso la técnica homogeneizada la mejor (SLHA). Por otro lado, las vienasas (VMHA, VMSA) no presentaron diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre los recuentos de los dos protocolos analizados, al igual que el jamón de pavo (JLHA, JLSA), por lo que sus protocolos fueron igualmente exitosos.

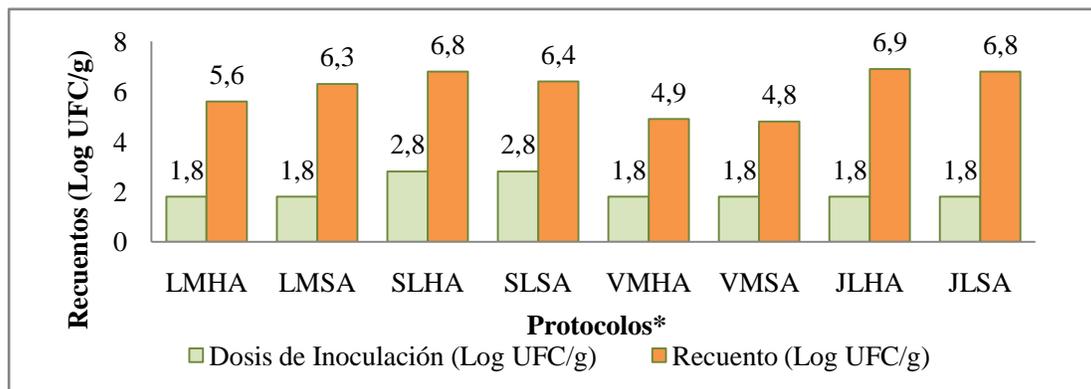


Ilustración Nro. 1: Recuentos bacterianos (Log UFC/g) de dos protocolos por matriz almacenados por 10 días a temperatura ambiente. * V: Viena; S: Salame; L: Longaniza; J: Jamón de Pavo. M: Molido; L: Laminado. H: Homogeneizado; S: Sin Homogeneizar. A: Ambiente.

En la Ilustración Nro. 2 se observan los recuentos alcanzados por los protocolos de las cecinas almacenadas a **temperatura de refrigeración**. En las longanizas no existió diferencia estadística ($p > 0,05$) entre los recuentos alcanzados por los protocolos con y sin homogeneización, resultando ambos igual de exitosos (LMHR, LMSR). Por otro lado, los recuentos de los dos protocolos analizados en salame

presentaron diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) al igual que los recuentos analizados tanto en vienasas como en jamón de pavo. Para las vienasas la mejor técnica fue sin homogeneización (VMSR) y para salame y jamón de pavo la homogeneización resultó ser la más exitosa (SLHR, JLHR).

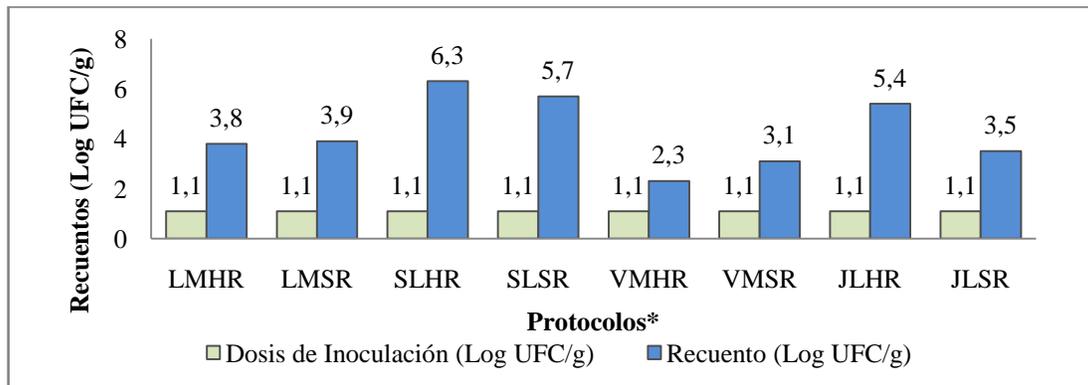


Ilustración Nro. 2: Recuentos bacterianos (Log UFC/g) de dos protocolos por matriz almacenados por 10 días a temperatura de refrigeración. * V: Vienesas; S: Salame; L: Longaniza; J: Jamón de Pavo. M: Molido; L: Laminado. H: Homogeneizado; S: Sin Homogeneizar. R: Refrigeración.

En cuanto a **la eficiencia del Piruvato de Sodio 1%** en la recuperación de S.E desde cecinas almacenadas a temperatura de refrigeración, se estableció que no existió diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre ninguno de los recuentos analizados con y sin Piruvato (Ilustración Nro. 3).

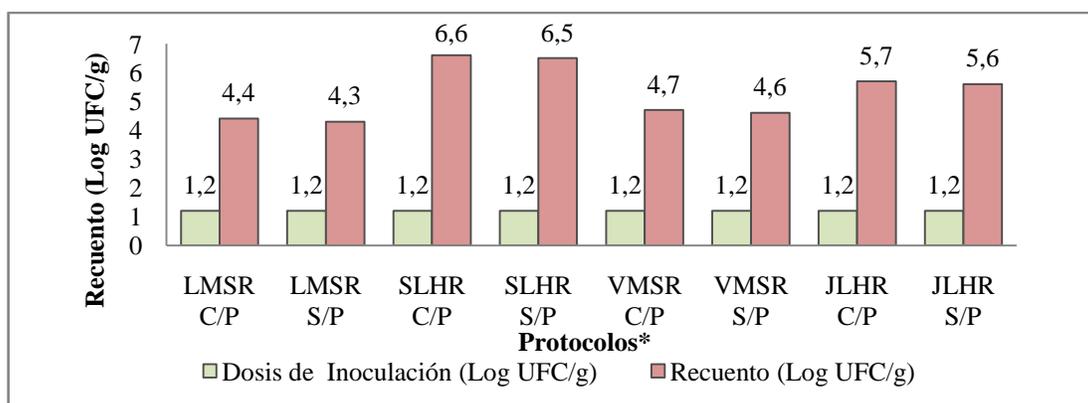


Ilustración Nro. 3: Comparación de recuentos bacterianos según la adición o no de Piruvato de Sodio 1% desde muestras almacenadas a temperatura de refrigeración. * V: Vienesas; S: Salame; L: Longaniza; J: Jamón de Pavo. M: Molido; L: Laminado. H: Homogeneizado; S: Sin Homogeneizar. R: Refrigeración. C/P: Con Piruvato; S/P: Sin Piruvato.

DISCUSIÓN

Las cecinas analizadas en esta investigación han sido objeto de estudio de inoculaciones experimentales con diferentes dosis de *Salmonella spp.* A manera de ejemplo, se han contaminado con éxito salchichas tipo Frankfurt (Sommers *et al.* 2010) y chorizos con concentraciones de 10^6 UFC/g (Hajmeer *et al.* 2006), jamón con 10^4 UFC/g (Jofré *et al.* 2008) o salame inoculado con 10^3 UFC/g (Abdelwaheb *et al.* 2008).

En este estudio, se logró contaminar **vienesas, longaniza y jamón de pavo** con dosis tan bajas de S.E como 10^2 UFC/mL tanto a temperatura ambiente como de refrigeración, logrando porcentajes de positividad $> 80\%$ en la mayoría de los protocolos. Por otro lado, el **salame** almacenado a temperatura de refrigeración logró ser contaminado con una dosis baja de S.E (10^2 UFC/mL), pero a temperatura ambiente la inoculación debió aumentar (10^3 UFC/mL) para obtener porcentajes aceptados de positividad ($\geq 80\%$). Esto último pudo deberse a que intrínsecamente los ingredientes que componen este tipo de cecina (FSIS 2011), en especial los cultivos iniciadores, podrían estar seleccionados para suprimir de mejor forma el crecimiento de microorganismos patógenos a temperatura ambiente que bajo refrigeración, debido a que ésta es una cecina elaborada y almacenada a temperaturas cercanas a la señalada (Newton *et al.* 2009). Es relevante mencionar que los cultivos iniciadores podrían aumentar su número a temperatura ambiente, lo que sumado a su alta habilidad de competencia contra otros microorganismos (FSIS 2005) produciría una dificultad para que S.E contaminara con éxito el salame, necesitando por lo tanto, una mayor carga bacteriana para entregar los porcentajes de positividad requeridos.

Es importante resaltar que las concentraciones de inoculación alcanzadas en este estudio, tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, son una de las más bajas registradas (10^2 y 10^3 UFC/mL) al compararlas con otras investigaciones (Hajmeer *et al.* 2006, Abdelwaheb *et al.* 2008, Jofré *et al.* 2008, Sommers *et al.* 2010). Las

concentraciones de inóculo mayores usadas por otros investigadores pueden explicarse por la necesidad de contaminar con seguridad la totalidad de sus muestras, en cambio en este estudio, se postuló encontrar la **menor dosis de S.E que entregara $\geq 80\%$** de muestras positivas con el propósito de ser una base para estudios posteriores destinados al control de S.E en cecinas por medio de bacteriófagos.

En cuanto a las **formas de presentación** y a las **técnicas de contaminación** analizadas, ambas fueron igualmente exitosas para todas las matrices ($\geq 80\%$ de positividad a S.E). Solo vienesa laminada sin homogeneizar, tanto a temperatura ambiente como refrigeración, entregó un valor inferior al aceptado (40%) al ser contaminada con una concentración bacteriana de 10^2 UFC/mL. Esta diferencia no se puede atribuir a un factor específico, dado que esta matriz obtuvo porcentajes de positividad $> 80\%$ en los demás protocolos, así como la presentación laminada y sin homogeneizar alcanzó porcentajes de positividad similares en las otras matrices analizadas.

Las diferentes temperaturas a las cuales se almacenaron las cecinas también son un punto relevante a discutir, puesto que arrojaron distintos resultados al momento de comparar los recuentos bacterianos obtenidos luego de 10 días de almacenamiento.

A temperatura de **refrigeración** cada matriz fue inoculada con 1,1 Log UFC/g. El salame registró un aumento de 5,2 Log UFC/g comparado con la dosis de inoculación, posteriormente siguió jamón de pavo con un aumento de 4,3 Log UFC/g y en tercer y cuarto lugar respectivamente, longaniza y vienesa con aumentos de 2,8 y 2,0 Log UFC/g. Cabe destacar que ninguna matriz mantuvo o disminuyó el número de bacterias luego de 10 días de almacenamiento, como se presenta en algunos estudios para *Salmonella spp.* almacenada bajo parámetros similares a los analizados en esta investigación (Gurtler y Conner 2009). El aumento en los recuentos registrado pudo deberse a que en el transcurso de los 10 días de almacenamiento S.E generó una adaptación al estrés por frío incluso aumentando su número (Wesche *et al.* 2009).

A temperatura **ambiente** en tanto, las matrices fueron inoculadas con 1,8 Log UFC/g, excepto salame que fue contaminado con 2,8 Log UFC/g. De acuerdo a esto, jamón de pavo y longaniza fueron las cecinas donde más aumentó el número de bacterias luego de 10 días de almacenamiento comparado con la dosis de inoculación, siendo de 5,1 y 4,5 Log UFC/g respectivamente, luego les siguieron salame con un aumento 4,0 Log UFC/g y finalmente vienesa con 3,1 Log UFC/g de crecimiento con respecto a la dosis de contaminación. Todas las cecinas presentaron mayores diferencias en sus recuentos a temperatura ambiente que los registrados a temperatura de refrigeración, con la excepción de **salame**, que en base a su dosis de inoculación disminuyó el número de bacterias encontradas. Un caso similar a lo ocurrido con salame se describe en una investigación donde se inoculó esta matriz con *Salmonella* Zanzibar en una concentración de 10^3 UFC/g, y luego de 10 días de almacenamiento a 4 °C y a 25 °C, registraron que los recuentos bacterianos aumentaron a temperatura de refrigeración y se mantuvieron a temperatura ambiente (Abdelwaheb *et al.* 2008). Esto puede explicarse dado que -como se mencionó anteriormente- los cultivos iniciadores pueden verse favorecidos a temperatura ambiente y desplazar competitivamente a *S.E* la que podría mantener o disminuir su número (FSIS 2005). Por otro lado, la temperatura de refrigeración podría afectar el crecimiento de los cultivos iniciadores que no lograrían disminuir adecuadamente el pH del producto, lo que finalmente provocaría que microorganismos como *S.E.* puedan crecer y multiplicarse con éxito (FSIS 2011).

En relación a la adición de Piruvato de Sodio 1% en agar TS para aumentar los recuentos de *S.E* en cecinas almacenadas durante 10 días a temperatura de refrigeración, se estableció que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras con y sin la adición del suplemento. Diferentes estudios demostraban que Piruvato de Sodio 1% adicionado en agares no selectivos aumentaba los recuentos de *Salmonella spp.* cuando era expuesta a algún tipo de estrés (Wu 2008, Gurtler y Kornacki 2009), lo que no se observó en esta

investigación. Los resultados dispares podrían explicarse porque se describe que *Salmonella spp.* mantenida a esta temperatura no se multiplica, sino más bien, su crecimiento se mantiene o disminuye (Gurtler y Conner 2009), por lo que se podría deducir que Piruvato de Sodio en un comienzo redujo el daño provocado por las bajas temperaturas, pero al pasar los días, *S.E* generó una respuesta metabólica al golpe de frío que finalmente provocó una adaptación y posterior crecimiento bacteriano (Wesche *et al.* 2009) que al término de los 10 días de almacenamiento igualó los recuentos medidos tanto en TS con y sin Piruvato de sodio 1%. De acuerdo a lo descrito, sería adecuado que en experimentos posteriores se realizaran recuentos bacterianos a distintos tiempos dentro de los días de almacenamiento para evaluar el real efecto que produciría la adición de este suplemento.

Se concluye con los resultados expuestos, que es posible recuperar *S.E* desde cecinas contaminadas con bajas concentraciones (10^2 a 10^3 UFC/mL) y almacenadas por 10 días a temperatura ambiente y refrigeración casi sin importar el protocolo que se utilice para llevar a cabo la contaminación de la matriz, ya que en la mayoría de ellos se logró contaminar con éxito más del 80% de las muestras. La adición de Piruvato de Sodio en los medios de cultivo no aumentó el número de bacterias al compararlo con medios sin la adición del suplemento luego de 10 días de almacenamiento.

REFERENCIAS

1. **Abdelwaheb C, Imen L, Ahmed L.** Growth and survival of *Salmonella zanzibar* in juice and salami stored under refrigerated and room temperature. African Journal of Microbiology Research. 2008; 2: 47 – 49.
2. **Bone A, Noel H, Le Hello S, Pihier N, Danan C, Raguenaud M, et al.** Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12: i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. EuroSurveillance. 2010; 15: 2 – 4.
3. **CDC. Centro de Control y Prevención de Enfermedades.** Estimates of foodborne illness in the United States [Internet]. 2011. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/index.html> [citado en Sept de 2011].
4. **CONICYT. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica.** Manual de Normas de Bioseguridad [Internet]. 2008. Disponible en: http://www.fondecyt.cl/578/articles-30555_recurso_1.pdf [citado en Dic de 2011].
5. **DEIS. Departamento de Estadísticas e Información de Salud. Ministerio de Salud, Chile.** Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) año 2009 - 2008 [Internet]. 2009. Disponible en: <http://163.247.51.54/eta/index0.php?ano=2009> [citado en Sept de 2011].
6. **Di Rienzo A, Casanoves F, Balzarini G, Gonzales L, Tablada M, Robledo W.** InfoStat, versión 2008, grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
7. **Dünner A.** Informe brotes por Enfermedades Transmitidas por Alimentos [Internet]. 2011. Disponible en: http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/ETA/Informe_ETA_2011.pdf [citado en Oct de 2011].
8. **Figueroa, J.** 2007. Tesis/Memoria. Descripción y análisis de las acciones realizadas por los servicios públicos (salud animal y salud pública), frente a

salmonelosis humana. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 98 p.

9. **FSIS. Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture.** Microbiology shelf-stable dried meats [Internet]. 2005. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/pdf/fsre_ss_5microbiologydried.pdf [citado en Ene de 2012].
10. **FSIS. Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture.** Progress report on *Salmonella* testing of raw meat and poultry products, 1998-2010 [Internet]. 2010. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/science/progress_report_salmonella_testing/index.asp [citado en Sept de 2011].
11. **FSIS. Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture.** Principles of preservation of shelf-stable dried meat products [Internet]. 2011. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/pdf/fsre_ss_7principles.pdf [citado en Ene de 2012].
12. **García P, Martínez B, Obeso J, Rodríguez A.** Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*. 2008; 47: 479 – 485.
13. **Govaris A, Solomakos N, Pexara A, Chatzopoulou P.** The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 137: 175 – 180.
14. **Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields P, Bockemühl J, Grimont P, et al.** Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*. 2010; 161: 26 – 29.
15. **Gurtler J, Conner D.** Survival and growth of *Salmonella* Enteritidis in liquid egg products varying by temperature, product composition, and carbon dioxide concentration. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2009; 6: 561 – 567.

16. **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.
17. **Hajmeer M, Basheer I, Hew C, Civer D.** Modeling the survival of *Salmonella* spp. in chorizos. *International Journal Food Microbiology*. 2006; 107: 59 – 67.
18. **Holck A, Berg J.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75: 6944 – 6946.
19. **INE. Instituto Nacional de Estadísticas de Chile.** Pecuarias, primer semestre 2010 [Internet]. 2010. Disponible en: http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/040110/pec10_040111.pdf [citado en Sept de 2011].
20. **INN. Instituto Nacional de Normalización de Chile.** Norma Chilena Oficial NCh 2675. Of2002. Productos hidrobiológicos-Detección de *Salmonella*. 2002. 31 p.
21. **ISP. Instituto de Salud Pública de Chile.** Vigilancia de *Salmonella* spp. Laboratorio de Referencia 2010 [Internet]. 2010. Disponible en: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2011/09/Vigilancia_Salmonella_spp.pdf [citado en Sept de 2011].
22. **Jofré A, Garriga M, Aymerich T.** Inhibition of *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science*. 2008; 78: 53 – 59.
23. **Julian E, MacDonald K, Bonavolante R, Austin C, Von Stein D, Pringle J, et al.** *Salmonella* Montevideo infections associated with salami products made with contaminated imported black and red pepper — United States, July 2009–April 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2010; 59: 1647 – 1650.

24. **Kuhn K, Torpdahl M, Frank C, Sigsgaard K, Ethelberg S.** An outbreak of *Salmonella* Typhimurium traced back to salami, Denmark, April to June 2010. EuroSurveillance. 2011; 16: 1 – 4.
25. **Luzzi I, Galetta P, Massari M, Rizzo C, Dionisi A, Filetici E, et al.** An easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104A associated with traditional pork salami in Italy. EuroSurveillance. 2007; 12: 149 – 152.
26. **Mahony J, McAuliffe O, Ross P, Van Sinderen D.** Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. Current Opinion in Biotechnology. 2010; 22: 1 – 7.
27. **Mukhopadhyay S, Ramaswamy R.** Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. Food Research International. En Prensa; 2011.
28. **Newton G, Franke A, Dall’Agnol C, Lorenci A.** Effect of the addition of starter cultures in the physico-chemical and microbiological characteristics of italian sausages during pipening and storage. Revista Ciências Exatas e Naturais. 2009; 11: 91 – 109.
29. **Porto-Fett A, Campano S, Smith J, Oser A, Shoyer B, Call J, Luchansky J.** Control of *Listeria monocytogenes* on commercially - produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the sprayed lethality in container (SLIC®) delivery method. Meat Science. 2010; 85: 312 – 318.
30. **Prado V, Solari V, Álvarez I, Arellano C, Vidal R, Carreño M, et al.** Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. Revista Médica de Chile. 2002; 130: 495 – 501.
31. **Sommers H, Scullen O, Sites J.** Inactivation of foodborne pathogens on frankfurters using ultraviolet light and gras antimicrobials. Journal of Food Safety. 2010; 30: 666 – 678.

32. **Vaquero A, Fernández A, Díaz J.** Informe *Salmonella* Enteritidis [Internet]. 2011. Disponible en: http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Salmonella/Informe_Salmonella_2011.pdf [citado en Sept de 2011]
33. **Wesche A, Gurtler J, Marks B, Ryser E.** Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 2009; 72: 1121 – 1138.
34. **Wu V.** A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. 2008; 25: 735 – 744.
35. **Yang B, Qu D, Zhang X, Shen J, Cui S, Shi Y.** Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 141: 63 – 72.