



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



EFICACIA DEL USO DE UNA MEZCLA DE
BACTERIÓFAGOS EN LA REDUCCIÓN DE *Salmonella*
Enteritidis EN CARNE FRESCA DE BOVINO

GERALDINE BEATRIZ PRIETO RENERE

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

PROFESORA GUÍA: PILAR OVIEDO HANNIG

SANTIAGO, CHILE
2013



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



EFICACIA DEL USO DE UNA MEZCLA DE
BACTERIÓFAGOS EN LA REDUCCIÓN DE *Salmonella*
Enteritidis EN CARNE FRESCA DE BOVINO

GERALDINE BEATRIZ PRIETO RENERE

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA	: PILAR OVIEDO
PROFESOR CONSEJERO	: PATRICIO RETAMAL
PROFESOR CONSEJERO	: JUAN IGNACIO EGAÑA

SANTIAGO, CHILE
2013

MEMORIA DE TÍTULO

“EFICACIA DEL USO DE UNA MEZCLA DE BACTERIÓFAGOS EN LA REDUCCIÓN DE *Salmonella* Enteritidis EN CARNE FRESCA DE BOVINO”

BACTERIOPHAGE COCKTAIL APPLICATION EFFICACY IN REDUCTION OF *Salmonella* Enteritidis ON FRESH MEAT BEEF”

Geraldine Beatriz Prieto Renere *

*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

Dedico esta memoria a toda mi familia, a quienes les agradezco su infinito apoyo, amor y paciencia todos estos años.

Además, doy las gracias a la Dra. Oviedo y Dra. Borie, quienes, con su buena disposición, tiempo y dedicación, de una u otra forma me ayudaron en el desarrollo de esta investigación.

A la señorita Patricia, Don Patricio, Don Carlos y Don Humberto, por toda la ayuda brindada.

A mis queridas amigas, por volver más alegres y felices mis años de estudio.

A Andrés, por su cariño, consejos, y apoyo.

Y a mis compañeros de laboratorio, por todo el trabajo en conjunto.

RESUMEN

La Salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más importantes a nivel mundial. Ocasiona un cuadro gastroentérico y en casos extremos puede ser mortal. En Chile, el serotipo más frecuente es *Salmonella* Enteritidis, el cual está asociado al consumo de ovo productos, platos preparados, vegetales y carnes, entre ellas la de bovino.

El biocontrol de *Salmonella* spp. en alimentos mediante el uso de bacteriófagos, es una medida complementaria a los métodos de prevención y control utilizados actualmente.

En la presente investigación se analizó la actividad lítica de una mezcla de cinco bacteriófagos nativos sobre *S. Enteritidis*, en carne fresca de bovino contaminada experimentalmente, luego de diez días de almacenamiento. Se utilizaron dosis de contaminación de 10^3 UFC/mL y de 10^5 UFC/mL para temperatura ambiente (18 °C) y de refrigeración (2 a 8 °C) respectivamente, aplicando la mezcla de fagos con una MOI de 10^4 . Se logró contaminar la totalidad de las muestras en todos los grupos experimentales.

La administración de la mezcla de bacteriófagos logró reducir significativamente ($p \leq 0,0001$) los recuentos bacterianos promedios en 3,65 log UFC/g (5,29 log UFC/g grupo control versus 1,64 log UFC/g grupo experimental) a temperatura ambiente, y en 3,54 log UFC/g (4,42 log UFC/g grupo control versus 0,88 log UFC/g grupo experimental) a temperatura de refrigeración.

Las reducciones bacterianas obtenidas demuestran el efecto lítico de la mezcla de fagos aplicada, sobre *S. Enteritidis*, en carne fresca de bovino contaminada.

Palabras clave: *Salmonella* Enteritidis, bacteriófago, biocontrol, carne fresca de bovino, contaminación experimental.

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most important foodborne diseases worldwide. It causes a gastro enteric illness; in extreme cases it can cause mortality. In Chile, the most frequent serotype is *Salmonella* Enteritidis, which is commonly associated to the consumption of egg products, prepared meals, vegetables and meats, among which is beef.

Nowadays, biocontrol of *Salmonella* spp. in food using bacteriophages is a complimentary measure method for control and prevention.

This investigation analyzed the lytic activity of five native bacteriophages cocktail on *S. Enteritidis*, in fresh meat beef, experimentally contaminated, after ten days of maintenance. We used contamination doses of 10^3 UFC/mL and 10^5 UFC/mL for ambient (18 °C) and refrigeration temperature (2-8 °C) respectively, applying the phages cocktail with a MOI of 10^4 . All samples of each experimental group were contaminated.

The administration of the phages cocktail significantly reduced bacterial burden ($p \leq 0,0001$) in 3,65 log UFC/g (5,29 log UFC/g control group versus 1,64 log UFC/g experimental group) at ambient temperature, and in 3,54 log UFC/g (4,42 log UFC/g control group versus 0,88 log UFC/g experimental group) at refrigeration temperature.

The bacterial reductions obtained show the lytic effect of the phages cocktail applied on *S. Enteritidis*, in contaminated fresh meat beef.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, bacteriophage, biocontrol, fresh meat beef, experimental contamination.

INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son un problema de salud pública, causado por el consumo de alimentos y bebidas contaminadas, ya sea por agentes físicos, químicos, y biológicos, y entre los últimos, bacterias. Generalmente causan un cuadro gastroentérico, y pueden llegar a comprometer la vida de personas inmunodeprimidas o de edades extremas (MINSAL, 2012).

Entre los patógenos alimentarios asociados generalmente a brotes de ETA, se encuentran aquellos pertenecientes al género *Salmonella* (CDC, 2012). En Chile, durante el año 2011, el 10,2% de los brotes de ETA correspondieron a infecciones debidas a *Salmonella* (no incluye *Salmonella typhi* ni *Salmonella paratyphi*), un 2,6% a intoxicación estafilocócica, un 1% a *Escherichia coli* enteropatógena, un 0,5% a *Vibrio parahaemolyticus*. El 85,7% restante no tuvo un diagnóstico preciso (MINSAL, 2012).

En un estudio realizado por el Instituto de Salud Pública de Chile, entre los años 2005 y 2011, se pudo establecer que el serotipo aislado con mayor frecuencia en el país, fue *Salmonella* Enteritidis (SE), tanto desde cepas de origen clínico (58,8%) como de origen alimentario (24,9%). Los alimentos con mayor detección de SE fueron carne de ave (54%) y huevos u ovoproductos (15%). Además, se detectó SE en mariscos (3%), vegetales (5%), platos preparados (5%), otras carnes y productos cárnicos (4%) (Vaquero, 2011).

Actualmente la industria alimentaria previene la aparición de ETA, enfocándose principalmente en la higiene de las personas, de los alimentos (almacenamiento, preparación y consumo), y medioambiental (MINSAL, 2012).

Para enfrentar el problema de la Salmonelosis, asociado al consumo de alimentos, se ha implementado una serie de medidas tales como la aplicación de vacunas y antimicrobianos, uso de pre y probióticos (Gast, 2007), aseguramiento de la ejecución de buenas prácticas de manufactura de los productos en riesgo, vigilancia epidemiológica de *Salmonella* spp., entre otros (Vaquero, 2011).

Si bien hoy en día se aplican técnicas directamente en el alimento, tales como la modificación de la temperatura, la cual permite disminuir el crecimiento bacteriano (McCann *et al.* 2006), o bien la aplicación de radiación ultravioleta o radiaciones ionizantes, las que eliminan células vegetativas de la superficie del alimento, sin alterar sus características organolépticas (Isohanni y Lyhs 2009), éstas no han sido lo suficientemente efectivas para combatir la aparición de nuevos brotes de Salmonelosis en la población.

Desde fines del siglo XX y comienzos del siglo XXI se ha investigado el uso de bacteriófagos (fagos) como agentes biocontroladores de *Salmonella* spp. y otros patógenos bacterianos, principalmente en aquellos alimentos asociados a brotes de ETA en la población (Goodridge y Bisha, 2011, Mahony *et al.*, 2011). Las primeras observaciones asociadas a la existencia de los fagos datan del año 1896 por Hankin, el cual observó actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae* en los ríos Ganges y Jumma en la India. En el año 1915, Frederick Twort estableció que tal actividad podía ser provocada por un virus. Dos años después (1917) se adjudicó oficialmente el descubrimiento de los bacteriófagos a Felix d'Herelle, debido a su aporte científico en el tratamiento para un brote severo de disentería hemorrágica en Francia (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Los bacteriófagos son virus con capacidad de invadir células bacterianas, pudiendo presentar en ellas un ciclo lisogénico o un ciclo lítico. Los fagos lisogénicos pueden integrar su ADN al material genético bacteriano, sin afectar su metabolismo, o bien, por inducción o de forma espontánea, pueden iniciar el ciclo lítico. Debido a esta capacidad de integrar su ADN al genoma bacteriano, es que este tipo de fagos no deben ser utilizados en la industria alimentaria, ya que podrían alterar el fenotipo de la bacteria infectada, aumentando su patogenicidad (Hagens y Loessner, 2010). En el caso de los fagos líticos, éstos se unen a la bacteria mediante receptores de superficie e inyectan su genoma, alterando el metabolismo celular bacteriano, multiplicándose en cientos de partículas virales, ocasionando la lisis de la bacteria (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Estos fagos se auto perpetúan en la naturaleza, es por esto que se han podido aislar desde distintos alimentos tales como pepinos, salame, ostras, champiñones, yogurth, entre otros (Hudson *et al.*, 2005).

Son altamente específicos, su rango de hospederos se encuentra asociado a nivel de serotipo, especie, y en menor frecuencia a nivel de género bacteriano (Hagens y Loessner, 2010). No dañan las células eucariotas, siendo hasta la fecha clínicamente inocuos en los seres vivos. Según estudios realizados en seres humanos y animales, su administración a través de diversas vías (oral, rectal, intravenoso e intrapleural), no inducen complicaciones adversas (Sulakvelidze *et al.*, 2001, Atterbury, 2009, Goodridge y Bisha, 2011).

El correcto desempeño de un fago lítico depende de sus características, y de factores influyentes del medio. Cada fago presenta propiedades únicas, las que deben conocerse previamente, para poder emplearlo en condiciones óptimas, y así obtener los resultados esperados.

Uno de los factores condicionantes de su efectividad, es la concentración de la bacteria blanco, la cual debe estar presente en un mínimo suficiente que permita la adsorción y replicación del fago, y la consecuente lisis (Atterbury, 2009, Abedon y Thomas-Abedon, 2010). Para indicar la relación entre el fago y la concentración bacteriana presente, se estableció el término multiplicidad de infección (MOI), el cual Abedon y Thomas-Abedon (2010) definieron como “relación establecida entre la concentración del fago (expresado en Unidades Formadoras de Placas o UFP) y la concentración de la bacteria blanco (expresada en Unidades Formadoras de Colonias o UFC) en un volumen determinado”, existiendo una relación directa entre la efectividad del fago y la MOI empleada.

Otros factores del medio, de gran importancia para los fagos, son el pH y la temperatura. Estudios han demostrado estabilidad de algunos fagos a pH entre 3,5 y 6,8, e incluso se ha observado la sobrevivencia de ciertos fagos a pH 1,5 y 2,5. Hudson *et al.* (2005) observaron que, en el caso de la temperatura, la termotolerancia puede llegar a variar entre 5 °C y 60 °C.

García *et al.* (2008) establecen que la aplicación de fagos puede realizarse en los distintos niveles de la cadena alimentaria, desde la granja al tenedor, introduciendo así los conceptos de fagoterapia (aplicados en animales de granja), biosanitización (equipos y superficies), biocontrol (carcasas, productos crudos, y productos listos para su consumo), y biopreservación (para alimentos perecibles).

Según Maura y Debarbieux (2011) en la cadena de producción de alimentos, las dos fuentes principales de contaminación son el alimento crudo, que puede contener bacterias patógenas para el humano, y los trabajadores, que manipulan y pueden contaminar el producto, por lo cual, el uso de fagos previo a la elaboración del alimento, debiese reducir la probabilidad de contaminación originada por el producto inicial y, el uso de fagos durante el proceso, podría potencialmente prevenir una recontaminación.

En la industria alimentaria, los fagos se pueden aplicar de manera exógena, ya que no afectan las características organolépticas del alimento, son fáciles de aplicar, tienen buena tolerancia frente a diversos niveles de pH y temperatura, permanecen estables en ellos, y en general son de bajo costo (Hudson *et al.*, 2005). Dada la capacidad de disminuir la concentración de su bacteria blanco, es que su aplicación en el biocontrol de bacterias patógenas en los alimentos, permitiría potenciar la inocuidad de éstos (García *et al.*, 2008).

Entre las posibles desventajas que puede presentar el uso de fagos en los alimentos, se encuentra el limitado rango de hospederos, además, requieren de una alta concentración bacteriana para poder actuar adecuadamente, y su aplicación puede llegar a inducir la aparición de bacterias resistentes a los fagos aplicados, la cual se podría disminuir utilizando una mezcla de fagos, en vez de aplicarlos por separado (García *et al.*, 2008, Mahony *et al.*, 2011).

Pese a estas desventajas, la investigación y aplicación de fagos en alimentos ha ido en aumento en la última década. Es así como en el año 2006, la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA¹), aprobó el uso de una mezcla de fagos contra *Listeria monocytogenes*, llamada Listex P100, como biopreservante y aditivo alimentario inocuo en carne y productos avícolas listos para su consumo, garantizando ser un producto GRAS, esto quiere decir que es generalmente reconocido, por expertos calificados, como seguro para su propósito como aditivo alimentario (García *et al.*, 2008, Mahony *et al.*, 2011). Actualmente existen en el mercado diversas preparaciones de bacteriófagos, que pueden ser aplicadas directamente sobre el alimento, entre los cuales se encuentran ListShield™, mezcla de seis fagos que generan

¹ Food and Drug Administration.

protección contra *L. monocytogenes*, EcoShield™, mezcla de tres fagos, cuya bacteria blanco es *E. coli* O157:H7 y SalmoFresh™, preparación de fagos que previene y controla la aparición de *Salmonella* Enteritidis en carnes y productos listos para su consumo.

Estudios han demostrado la efectividad que tiene la aplicación de fagos, directamente en el alimento, en la reducción de una concentración bacteriana específica. Guenther *et al.* (2012) estudiaron la eficacia del fago FO1-E2 en la reducción de *Salmonella* Typhimurium en salchichas y carne de pavo, almacenadas a 15 °C durante seis días, obteniendo una reducción de tres y cinco unidades logarítmicas respectivamente. También se estudió la actividad del fago Felix-O1 en salchichas de pollo contaminadas experimentalmente con *S. Typhimurium*, en donde se detectó una reducción bacteriana de una a dos unidades logarítmicas (García *et al.*, 2008).

En Chile, Farfán (2009) analizó la efectividad de la aplicación de una mezcla nativa de fagos líticos sobre huevos libres de patógenos específicos (huevos SPF) contaminados experimentalmente con *S. Enteritidis*, obteniendo una reducción aproximada de tres unidades logarítmicas en el recuento bacteriano.

Dadas las reducciones bacterianas obtenidas en los estudios mencionados anteriormente, es que la presente investigación planteó como hipótesis que, el conocimiento previo de la actividad lítica *in vitro* de cinco fagos nativos sobre SE y su estabilidad frente a diferentes temperaturas, pH, y tipo de matriz cárnea, permiten esperar que su aplicación directa en un alimento contaminado, disminuya los recuentos de *S. Enteritidis*.

Para evaluar la hipótesis, este análisis estudió la eficacia que presenta la mezcla de los cinco fagos líticos, en la reducción de la contaminación experimental con SE en carne fresca de bovino. Dicho estudio se basó en la determinación del efecto que genera la administración de la mezcla de fagos en el número de muestras contaminadas con SE, y en la cuantificación de este efecto, manteniendo las muestras a temperatura ambiente y de refrigeración durante diez días.

Con los resultados obtenidos es posible demostrar su aplicabilidad en este alimento, que actualmente representa un riesgo para la salud pública.

MATERIAL Y METODOS

1. FINANCIAMIENTO

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

2. CEPA DESAFÍO

Se utilizó una cepa mutante espontánea de *S. Enteritidis*, con marcadores genéticos de resistencia a Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*), de tal forma de facilitar su aislamiento en medios de cultivo adicionados de antibióticos, y diferenciación con potenciales cepas contaminantes. Esta cepa fue seleccionada por el Laboratorio de Bacteriología del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso a partir de una cepa nativa de *S. Enteritidis* de origen aviar, donada por la Dra. Irma Acevedo González del Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola Ganadero.

3. BACTERIÓFAGOS

Se utilizó una mezcla de cinco fagos líticos, aislados del Estero Marga Marga, Viña del Mar, por el Laboratorio de Bacteriología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Estos fagos fueron seleccionados por sus características líticas frente a la cepa desafío, su estabilidad en el tiempo en la matriz cárnea en estudio, por su tolerancia a pH entre 6,0 y 8,0, temperaturas entre -20 °C y 25 °C, y por su amplio rango de hospederos² (Anexo N° 1).

4. MATRIZ CÁRNEA

La matriz cárnea empleada fue carne fresca de bovino, utilizando el tipo de corte comercial Posta Negra, proveniente del músculo semimembranoso del animal. El alimento fue adquirido en un supermercado de la ciudad de Santiago (RM, Chile), en envase sellado, con fecha de elaboración cercana al día de la adquisición, y transportado al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en una caja isotérmica con refrigerantes en un período inferior a cuatro horas.

En el Laboratorio de Microbiología se tomó una muestra representativa del alimento, la cual fue sometida a análisis bacteriológico cualitativo y detección genómica de *Salmonella* spp. mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), según lo establecido por WHO (2010). Este método, utilizando partidores para amplificar una región del gen *invA*, posee un 100% de especificidad para el gen *invA*, presente en la mayoría de las cepas virulentas de *Salmonella* (incluyendo SE), y un 99,6% de sensibilidad para SE (Malorny *et al.*, 2003). Esta técnica fue implementada en el laboratorio por Sánchez (2007).

² ROBESON, JAMES. 2011. [comunicación personal] Laboratorio de Genética bacteriana. Instituto de Biología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Campus Curauma.

Se trabajó sólo con muestras negativas a *Salmonella* spp., las cuales se mantuvieron refrigeradas, entre 2-8 °C, durante 24 horas previas al inicio del estudio.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

- **Protocolo de contaminación con SE**

La matriz fue contaminada utilizando el protocolo previamente seleccionado por Espina (2012) esto es, carne molida (en Moulinex®) e inóculo homogeneizado. La dosis de contaminación para las muestras almacenadas a temperatura ambiente fue aumentada diez veces, y para las muestras refrigeradas, cien veces, en relación a lo descrito por Espina (2012) (Tabla N° 1).

TABLA N° 1. Protocolos de contaminación con *Salmonella* Enteritidis (SE) para la matriz bovino, y título de fagos, según temperatura de mantención.

	Temperatura ambiente (18 °C)	Temperatura refrigeración (2-8 °C)
*Dosis SE	10 ³ UFC/mL	10 ⁵ UFC/mL
**Título fagos	10 ⁷ UFP/mL	10 ⁹ UFP/mL
***MOI	10 ⁴	10 ⁴

(*) UFC= Unidades formadoras de colonias; (**) UFP= Unidades formadoras de placas líticas; (***) MOI= Multiplicidad de Infección

- **Preparación del inóculo bacteriano**

El inóculo fue elaborado a partir de un cultivo rejuvenecido de SE *nal rif* en caldo Luria Bertani (Difco ®) incubado a 36°C durante 24 horas. Se preparó un tubo con titulación aproximada de 10^8 UFC/mL mediante la comparación con el tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bacterias / mL).

Luego, se realizaron diluciones al décimo en tubos de ensayo con Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco ®) hasta llegar a las concentraciones teóricas de contaminación requeridas para cada temperatura (Tabla N° 1).

La concentración del inóculo fue corroborada mediante recuento bacteriano, sembrando 100µL de cada dilución en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Difco ®) adicionadas con Ácido Nalidíxico (Arlab ®, 50µg/mL) y Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL).

6. CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS CON LA CEPA DESAFÍO Y APLICACIÓN DE LA MEZCLA DE BACTERIÓFAGOS

Se utilizaron 25 muestras de 25 gramos de carne molida de bovino para cada protocolo, las cuales se mantuvieron individualizadas en bolsas Whirl-Park®. El tamaño muestral de esta investigación está basado en los resultados obtenidos en un estudio preliminar referente a la efectividad de una mezcla nativa de fagos líticos sobre huevos libres de patógenos específicos contaminados experimentalmente con SE realizado por Farfán (2009).

Una vez individualizadas, las muestras de carne molida fueron contaminadas con *S. Enteritidis nal rif* (Tabla N° 1). La inoculación se llevó a cabo en un gabinete de bioseguridad (Heal Force ®m clase A II), mediante goteo utilizando una micropipeta, con un volumen aproximado del 10% del tamaño total de la muestra, siendo éste homogeneizado en el alimento con un asa de Digrafsky. Luego, las muestras fueron dejadas en reposo a temperatura ambiente durante dos horas, permitiendo de esta forma la adaptación al medio y adhesión de la bacteria a la superficie de la matriz.

Posteriormente, a cada muestra contaminada se le agregó una alícuota de la mezcla de fagos según su dosis de SE inoculada, suspendidos en suero fisiológico estéril, en un volumen del 10% del peso de la muestra, la cual fue homogeneizada con un asa de Digrafsky. La multiplicidad de infección (MOI) utilizada fue de 10^4 (Tabla N° 1).

Las muestras se mantuvieron en cajas herméticamente cerradas a temperatura ambiente controlada de $18\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (n=25), y de refrigeración, 2 a 8 °C (n=25), durante 10 días.

Para cada grupo experimental se estableció un grupo control, de igual tamaño, con muestras contaminadas sólo con SE, las que fueron almacenadas y procesadas de la misma forma que su respectivo grupo experimental, utilizando un laboratorio diferente, evitando toda posibilidad de contaminación cruzada.

Adicionalmente, se establecieron dos grupos denominados blanco, para detectar la posible contaminación con SE en el laboratorio. Cada grupo estuvo conformado por cinco muestras de 25 gramos de carne molida cada una, las cuales se individualizaron en bolsas Whirl-Park®, y mantuvieron junto a las muestras de cada grupo control durante diez días.

Finalizados los 10 días, a todas las muestras se les adicionó 225 mL de Agua Peptonada Tamponada (APT Difco ®), y luego fueron homogeneizadas en un equipo triturador homogeneizador (Masticator ®) durante un minuto y dejadas en reposo a 36 °C por dos horas. Posteriormente fueron sometidas a bacteriología cuantitativa y bacteriología cualitativa. A las muestras de los grupos Blanco sólo se les realizó análisis bacteriológico cualitativo.

- **Bacteriología Cuantitativa (Recuento bacteriano)**

De la muestra homogeneizada se tomaron 100µL y se preparó una dilución al centésimo y tres diluciones al décimo en APT (Difco®). Posteriormente, 100µL de cada dilución fueron transferidos a una placa de agar XLD y su respectivo duplicado, adicionada con Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Arlab®, 50µg/mL) y sembrados en superficie con un asa de Digrafsky.

Las placas se incubaron a 36 °C por 24 horas, posteriormente se realizó el recuento bacteriano. Todas las muestras cuyas placas no evidenciaron crecimiento bacteriano fueron sometidas a bacteriología cualitativa.

- **Bacteriología cualitativa**

Para la detección de SE se utilizaron como referencias las recomendaciones establecidas por la Norma Chilena Oficial 2675 Of 2002: “Detección de *Salmonella* en Productos Hidrobiológicos” (INN, 2002) y los resultados obtenidos por Espina (2012).

Posterior a la extracción de los 100 µL para la bacteriología cuantitativa, las muestras homogeneizadas restantes se dejaron en incubación a 35 °C ± 1 °C por 18 horas ± 2 horas. Luego, se transfirieron 100 µL de cada muestra a un tubo con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco®) los cuales se mantuvieron a 42 °C ± 1 °C por 18-24 horas en un baño termorregulado. A partir del cultivo en el caldo RV, se sembraron 30 µL en agar XLD (Difco®), adicionado con Rifampicina (Caisson®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidixico (Arlab®, 50µg/mL), mediante la técnica de siembra por agotamiento.

Las placas sembradas se incubaron a 36°C durante 48 h ± 2 h, estableciendo como muestra positiva aquellas placas que presentaron una o más colonias bacterianas.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para poder determinar si existió una disminución en el número de muestras contaminadas con SE, debido a la aplicación de la mezcla de fagos, los resultados obtenidos en el análisis bacteriológico cualitativo fueron expresados como porcentaje de positividad a *Salmonella*, y sus diferencias analizadas mediante la Prueba de diferencia de proporciones X^2 (chi cuadrado).

Para cuantificar la reducción de SE, los resultados obtenidos en el análisis bacteriológico cuantitativo fueron expresados en unidades logarítmicas (\log_{10}/g) y sus diferencias analizadas mediante un Análisis de Varianza, considerando estadísticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. A las muestras que presentaron más de 150 colonias en la bacteriología cuantitativa, es decir, fueron incontables, se les designó el valor $9 \log_{10}/g$. Para aquellas muestras que fueron negativas en la bacteriología cuantitativa y positiva en la cualitativa, se les designó el valor de $2 \log_{10}/g$, mientras que para aquellas que fueron negativas en ambos análisis, se les designó el valor $1 \log_{10}/g$.

Todos los datos obtenidos en esta investigación fueron analizados a través del programa computacional para análisis estadístico InfoStat® versión 2008.

8. NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Esta investigación contó con un Certificado de bioseguridad (Anexo N°2) otorgado por el Comité local de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, el cual permitió realizar este ensayo. Se trabajó bajo estándares acordados al nivel dos de bioseguridad según el Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina (CDC, 1999).

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LA MEZCLA DE FAGOS LÍTICOS EN EL NÚMERO DE MUESTRAS CONTAMINADAS CON SE

Los resultados obtenidos en la bacteriología cualitativa indican que el 100% de las muestras inoculadas con SE, tanto del grupo experimental como del grupo control, así como las muestras almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración, fueron positivas a *S. Enteritidis* posterior a diez días de su respectiva contaminación. Estos resultados indican que no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de contaminación entre el grupo control y el experimental, independiente de la temperatura de mantención.

De acuerdo con los antecedentes proporcionados por el Laboratorio de Genética bacteriana, del Instituto de Biología, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso³, en los grupos controles no se detectó la presencia de los fagos utilizados, lo que descarta la posibilidad de contaminación cruzada con los grupos experimentales y demuestra que los grupos fueron manipulados correctamente.

Los resultados del análisis bacteriológico cualitativo de las muestras blanco, almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración, demostraron que ninguna muestra se contaminó con SE, descartando la eventual contaminación al interior del laboratorio.

³ ROBESON, JAMES. 2012. [comunicación personal] Laboratorio de Genética bacteriana. Instituto de Biología. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Campus Curauma.

2. CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UNA MEZCLA DE FAGOS LÍTICOS SOBRE CARNE FRESCA DE BOVINO CONTAMINADA CON SE, ALMACENADA A TEMPERATURA AMBIENTE Y DE REFRIGERACIÓN DURANTE DIEZ DÍAS

Al analizar los recuentos promedio de los distintos grupos, obtenidos de la bacteriología cuantitativa (Tablas N° 2 y N° 3), se detectó que las diferencias entre el grupo experimental y su respectivo grupo control fueron significativas ($p \leq 0,0001$) tanto para los grupos almacenados a temperatura ambiente, como para los grupos almacenados a temperatura de refrigeración.

TABLA N° 2. Recuentos promedio de *Salmonella* Enteritidis (SE) en carne fresca de bovino, con y sin administración de fagos, almacenada a temperatura ambiente por diez días (\log_{10} UFC/g).

*Grupo	**Recuento promedio \pm ***D. E.	Recuentos mínimos y máximos SE
BAC	5,29 ^a \pm 0,71	3,64 – 6,72
BAF	1,64 ^b \pm 1,49	0,64 – 4,12

(*) BAC : grupo control, muestras de carne molida de bovino, almacenadas a temperatura ambiente, contaminadas con SE, (*) BAF : grupo experimental, muestras de carne molida de bovino, almacenadas a temperatura ambiente, contaminadas con SE y mezcla de fagos, (**) ^{a, b} : letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,0001$), (***) D. E.: Desviación estándar

TABLA N° 3. Recuentos promedio de *Salmonella* Enteritidis (SE) en carne fresca de bovino, con y sin administración de fagos, almacenada a temperatura de refrigeración por diez días (log₁₀ UFC/g).

*Grupo	**Recuento promedio ± ***D. E.	Recuentos mínimos y máximos SE
BRC	4,42 ^a ± 0,17	4,12 – 4,68
BRF	0,88 ^b ± 0,83	0,64 – 3,64

(*) BRC: grupo control, muestras de carne molida de bovino, almacenadas a temperatura de refrigeración, contaminadas con SE, (*) BRF: grupo experimental, muestras de carne molida de bovino, almacenadas a temperatura refrigeración, contaminadas con SE y mezcla de fagos, (**) ^{a, b}: letras diferentes señalan que hay diferencias estadísticamente significativas (p≤0,0001), (***) D. E.: Desviación estándar

DISCUSIÓN

En la presente investigación, se estudió la actividad biocontroladora de una mezcla de cinco bacteriófagos líticos nativos sobre SE, en carne fresca de bovino contaminada experimentalmente, posterior a diez días de mantención.

Se aumentaron las dosis de contaminación con SE, obtenidas por Espina (2012), para otorgarle a los fagos una concentración bacteriana suficiente que les permitiera desempeñarse adecuadamente, previniendo además el posible efecto negativo que genera el estrés térmico en las bacterias, debido a las bajas temperaturas, y prolongado tiempo de exposición (Wu, 2008).

Los resultados obtenidos en el análisis bacteriológico cualitativo, indican que la mezcla de fagos empleada con una MOI de 10^4 , no disminuyó el número de muestras de carne fresca de bovino contaminadas experimentalmente con SE, independiente de la temperatura de mantención, siendo detectada la presencia de esta bacteria en el total de las muestras contaminadas al momento de su análisis. En un estudio realizado por Armijo (2010) en albúminas de huevo, contaminadas experimentalmente con SE, empleando una mezcla de fagos con distintas MOI (10^3 , 10^4 , y 10^5), se analizó la presencia de la bacteria a las 24 y 48 horas, teniendo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) a las 48 horas en el grupo tratado con la MOI más alta (10^5), en el cual se detectó la presencia de SE en sólo un 68% de las muestras contaminadas.

En la investigación realizada por Guenther *et al.* (2012), en mariscos y leche chocolatada, contaminados con 10^3 UFC/g de *Salmonella* Typhimurium, empleando una concentración del fago FO1-E2 de 10^8 UFP/g y almacenados a 8 °C durante 6 días, no fue posible detectar la presencia de la cepa empleada en el 100% de las muestras contaminadas al momento de su análisis.

De estos estudios es posible concluir que el efecto lítico del fago y consecuente reducción en el número de muestras contaminadas, es mayor cuando la MOI empleada es más alta. La MOI utilizada en la presente investigación fue de 10^4 , por lo que debiesen realizarse estudios utilizando una MOI mayor o igual a 10^5 , para obtener reducciones significativas en el número de muestras contaminadas.

Al analizar los resultados generados por el análisis bacteriológico cuantitativo y comparar los recuentos promedios de SE del grupo control, versus su respectivo grupo experimental (tratado con fagos), es posible indicar que hubo una reducción promedio de 3,65 log UFC/g en los grupos almacenados a temperatura ambiente y de 3,54 log UFC/g en los grupos almacenados a temperatura de refrigeración. Ambas reducciones fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,0001$).

Similar reducción obtuvo Aguirre (2013) en carne fresca de cerdo contaminada con 10^3 UFC/mL de S.E, empleando una mezcla de fagos con una MOI de 10^4 , en donde, luego de diez días de mantención a temperatura ambiente, se detectó una reducción bacteriana de 2,56 log UFC/g. En los estudios realizados por Cruz (2013), en carne fresca de pollo contaminada con dosis de 10^3 UFC/mL y 10^5 UFC/mL de SE en grupos almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración respectivamente, durante diez días, aplicando una mezcla de fagos con una MOI de 10^4 , se lograron reducciones bacterianas de 0,88 log UFC/g y 1,66 log UFC/g respectivamente.

Cabe destacar que los fagos empleados en la presente investigación, fueron los mismos utilizados en los estudios de Aguirre (2013) y Cruz (2013). De esto es posible establecer que la mezcla de cinco fagos es más eficaz en la reducción de SE en la matriz carne fresca de bovino, respecto de las tres matrices cárnicas, y, cuando los grupos experimentales permanecen a temperatura ambiente durante el período determinado.

Existen además otros estudios que demuestran la efectividad de la aplicación de fagos en la reducción de *Salmonella*, cuando éstos son incubados a temperatura ambiental. En un ensayo realizado en carne de vacuno se analizó la eficacia del fago PT160 en la reducción de la concentración de *Salmonella* Typhimurium, a dos temperaturas distintas, obteniéndose que, a 5 °C hubo una disminución en el recuento bacteriano de 2 a 3 unidades logarítmicas y a 24 °C la disminución superó las 5 unidades logarítmicas (García *et al.*, 2008). Situación cercana se logró en un estudio realizado por Leverentz *et al.* (2001) en trozos de melón contaminados con SE con una concentración de 10^6 UFC/mL, y una mezcla de fagos con una MOI de 10^2 , e incubados a 5 °C y 20 °C por siete días, en el cual se observaron reducciones de 3,5 log y 2,5 log respectivamente.

De acuerdo a lo establecido por Greer (2005), los alimentos presentan una serie de barreras físicas, como el contenido de grasa, fluidos, o la microflora bacteriana normal, que alteran la interacción inicial entre el fago y su bacteria blanco, interfiriendo en la adsorción del fago a los receptores de superficie de la bacteria. Para que los bacteriófagos tengan un buen desempeño, y generen reducciones bacterianas significativas, debe existir una cercanía física entre el fago y su bacteria afín. Para disminuir la posible acción negativa que ejerce el contenido graso de la carne sobre la interacción fago – bacteria y sobre el mismo desarrollo de la *Salmonella*, en esta investigación se realizó una limpieza de la grasa visible que poseía el trozo de carne, previa contaminación.

Además, se realizó una minuciosa homogeneización del inóculo bacteriano y de la mezcla de fagos aplicada, dado que para lograr una reducción bacteriana deseada, en una matriz sólida como la carne, se debe abarcar la mayor parte de la superficie total de la muestra, para así favorecer la movilización y absorción de los fagos (Guenther *et al.*, 2009, Guenther *et al.*, 2012). Estas características explicarían las favorables reducciones obtenidas en esta investigación, independiente de la temperatura a la que los grupos fueron almacenados.

Si bien Wesche *et al.* (2009) establecen que *Salmonella* sufre un estrés moderado cuando se expone a bajas temperaturas, pudiendo generar la muerte de una cierta cantidad de bacterias, este efecto no se vió reflejado en este estudio, siendo similares las reducciones obtenidas en ambas temperaturas.

A título complementario, se realizó una experiencia en carne fresca de bovino, contaminada con dosis de 10^4 UFC/mL y 10^6 UFC/mL, en grupos almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración respectivamente y se aplicó una mezcla de tres de los fagos utilizados en la presente investigación, empleando una MOI de 10^3 . Luego de diez días de almacenamiento se detectaron reducciones bacterianas significativas en los grupos tratados con fagos versus su grupo control, de 1,00 log UFC/g ($p \leq 0,0001$) y 0,35 log UFC/g ($p \leq 0,0001$), en los grupos almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración respectivamente.

Estos resultados permiten establecer que, la adición de dos fagos a la mezcla empleada, aumenta la eficacia en la reducción de SE en carne fresca de bovino contaminada, en 2,65 log a temperatura ambiente, y en 3,19 log a temperatura de refrigeración.

Debido a la elevada manipulación de la carne de bovino, desde la planta faenadora hasta el momento de consumo, la ingesta de este alimento, crudo o mal cocinado, constituye un riesgo sanitario para la población. Sus características físico-químicas la convierten en un medio de cultivo ideal para el desarrollo de microorganismos, tales como *Salmonella*, por lo que, los actuales y futuros métodos de conservación deben estar enfocados en retrasar o inhibir el crecimiento microbiano, y aumentar la vida útil de la carne fresca.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican que la mezcla de cinco fagos líticos reduce efectivamente la contaminación con *S. Enteritidis* en carne fresca de bovino, independiente de la temperatura de almacenamiento, constituyendo una posible alternativa de biocontrol para ser utilizada por la industria alimentaria, en conjunto con otras medidas de control, para la reducción y/o eliminación de este patógeno.

REFERENCIAS

1. **ABEDON, S.; THOMAS-ABEDON, C.** 2010. Phage Therapy Pharmacology. Current Pharmaceutical Biotechnology. 11: 28-47.
2. **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. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 22 p.
3. **ARMIJO, J.** 2010. Uso de bacteriófagos para la reducción *in Vitro* de *Salmonella* Enteritidis en albúmina y yema de huevos SPF. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 74 p.
4. **ATTERBURY, R. J.** 2009. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. Microbial Biotechnology. 2: 601-612.
5. **CDC. CENTRO DE CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES.** 1999. Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. 4º ed. Public Health Services: Washington D.C. 196 p.
6. **CDC. CENTRO DE CONTROL Y PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES.** 2012. Estimación de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Estados Unidos. [en línea] <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>> [consulta: 23 Abril 2012].
7. **CRUZ, F.** 2013. Bacteriófagos líticos como agentes biológicos reductores de *Salmonella* enterica serotipo Enteritidis en carne fresca de pollo experimentalmente contaminada. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 20 p.
8. **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. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 25 p.

9. **FARFÁN, F.** 2009. 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. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 69 p.
10. **GARCÍA, P.; MARTINEZ, B.; OBESO, J. M.; RODRIGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 479-485.
11. **GAST, R. K.** 2007. Serotype-specific and serotype-independent strategies for preharvest control of food-borne *Salmonella* in poultry. *Avian Dis.* 51: 817-828.
12. **GREER, G.** 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*. 68: 1102-1111.
13. **GOODRIDGE, L.; BISHA, B.** 2011. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*. 1: 130-137.
14. **GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.** 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 93-100.
15. **GUENTHER, S.; HERZIG, O.; FIESELER, L.; KLUMPP, J.; LOESSNER.** 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology*. 154: 66-72.
16. **HAGENS, S.; LOESSNER, M.** 2010. Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 11: 58-68.
17. **HUDSON, J.A.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G.** 2005. Bacteriophage as Biocontrol Agents in Food: A Review. *Journal of Food Protection*. 68: 426-437.
18. **INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2002. Norma Chilena Oficial NCh 2675. Of2002. Productos hidrobiológicos-Detección de *Salmonella*. 05 Abril 2002. 31 p.

19. **ISOHANNI, P.; LYHS, U.** 2009. Use of ultraviolet irradiation to reduce *Campylobacter jejuni* on broiler meat. Poultry Science. 88: 661-668.
20. **LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W.J.; FUCHS Y.; CAMP, M.J.; 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: 1116-1121.
21. **MAHONY, J.; MAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; VAN SINDEREN, D.** 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. Current Opinion in Biotechnology. 22: 157-163.
22. **MALORNY, B.; HOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R.** 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. Applied and Environmental Microbiology. 69: 290-296.
23. **MAURA, D.; DEBARBIEUX, L.** 2011. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. Applied Microbiology and Biotechnology. 90: 851-859.
24. **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. Journal of Applied Microbiology. 101: 1177-1187.
25. **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2012. Informe de Brotes por Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Departamento Epidemiología. [en línea] <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/ETA/ETA_SE6_2012.pdf> [consulta: 24 Abril 2012].
26. **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. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 69 p.

- 27. SULAKVELIDZE, A.; ALAVIDZE, Z.; MORRIS, J.** 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 649-659.
- 28. VAQUERO, A.** 2011. Informe *Salmonella* Enteritidis 7 de Noviembre 2011.
[en línea]
<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Salmonella/Informe_Salmonella_2011.pdf> [consulta: 24 Abril 2012].
- 29. WESCHE, A.; GURTLER, J.; MARKS, B.; RYSER, E.** 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 72: 1121-1138.
- 30. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2010. Diagnóstico de *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp. por PCR. Inversión de fase en *Salmonella* spp. III Curso Avanzado WHO Global Foodborne Infections Network. Servicio Enterobacterias. Departamento Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS "Carlos G. Malbran". 42 p.
- 31. WU, V.** 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. 25: 735-744.

ANEXO N°1. Estabilidad* de fagos líticos, según característica, a los diez días, y rango de hospederos

Característica	Fago				
	fSE7	fSE8	fSE12	1 C	4 S
Temperatura	-20 °C a 25 °C	-20 °C a 25 °C	-20 °C a 25 °C	-20 °C a 37 °C	-20 °C a 37 °C
pH	6,0 a 8,0	6,0 a 8,0	6,0 a 8,0	3,0 a 8,0	3,0 a 8,0
Medio	BM Suero Salino Agua	BM Suero Salino Agua	BM Suero Salino Agua	Suero Salino Agua	Suero Salino Agua
Rango de hospedero	Se** serovar Bredeney, Seftenberg, Worthington, Derby, Dublin, Heidelberg, Enteritidis	Se serovar Bredeney, Seftenberg, Worthington, Derby, Dublin, Heidelberg, Enteritidis	Se serovar Bredeney, Seftenberg, Worthington, Derby, Dublin, Heidelberg, Enteritidis	Se serovar Infantis, Heidelberg, Thyphi, Thyphimurium, Enteritidis	Se serovar Infantis, Heidelberg, Thyphi, Thyphimurium, Enteritidis

(*) Niveles de titulación inicial se mantienen, o no disminuyen más de 2 unidades logarítmicas después de 10 días, (**) Se: *Salmonella enterica*

ANEXO N° 2. Certificado de Bioseguridad local



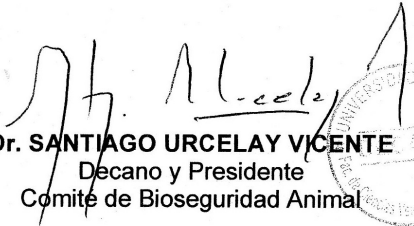
CERTIFICADO N° 002

El Comité Institucional de Bioseguridad ha revisado el proyecto titulado "BIOCONTROL OF SALMONELLA ENTERICA SEROVAR ENTERITIDIS IN ANIMAL FOOD REPRESENTING A PUBLIC HEALTH HAZARD: USE OF BACTERIOPHAGES", a cargo de la Dra. Consuelo Borie P.

En el documento se informa que las muestras se trabajarán con bioseguridad de laboratorio nivel 2, empleando ropas desechables, desinfectantes adecuados y eliminación de desechos en forma correcta.

Con los antecedentes expuestos, este Comité estima que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el Manual de Normas de Bioseguridad editado por CONICYT versión 2008 y, previenen el riesgo para personas, animales y ambiente.

Se extiende el presente documento para ser presentado al Proyecto Fondecyt 2011.


Dr. SANTIAGO URCELAY VICENTE
Decano y Presidente
Comité de Bioseguridad Animal



Santiago, julio 6 de 2010