



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

***Salmonella enterica* serotipo Enteritidis Y SU CONTROL MEDIANTE
BACTERIÓFAGOS: ESTUDIO EN CECINAS COCIDAS**

Beatriz del Carmen Escobar González

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

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

PROYECTO FONDECYT 1110038

SANTIAGO, CHILE
2014



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

***Salmonella enterica* serotipo Enteritidis Y SU CONTROL MEDIANTE
BACTERIÓFAGOS: ESTUDIO EN CECINAS COCIDAS**

Beatriz del Carmen Escobar González

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESORA GUÍA : DRA. CONSUELO BORIE P

PROFESORA CONSEJERA : DRA. PILAR OVIEDO H

PROFESOR CONSEJERO : DR. PATRICIO RETAMAL M

SANTIAGO, CHILE

ÌNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
HIPÓTESIS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVO ESPECÍFICO	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Cepa desafío.....	8
2. Bacteriófagos	8
3. Matriz alimentaria.....	8
4. Diseño experimental	9
4.1. Protocolo de contaminación con SE.....	9
4.2. Preparación del inóculo bacteriano	9
4.3. Contaminación de las muestras con la cepa bacteriana y aplicación de la mezcla de bacteriófagos.	10
4.4. Bacteriología cuantitativa (Recuento de SE)	11
4.5. Bacteriología cualitativa (Detección de SE)	11
6. Análisis estadístico	11
7. Normas de bioseguridad	12
RESULTADOS	13
1.- Matriz Alimentaria: Jamón de pavo.	13
a. Comportamiento de la cepa desafío a temperatura de refrigeración y ambiente	13
b. Aplicación de bacteriófagos	13
2.- Matriz alimentaria: Vieneses pollo	14
a. Comportamiento de la cepa desafío a temperatura de refrigeración y ambiente	14
b. Aplicación de bacteriófagos	14
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	¡Error! Marcador no definido.
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	27
ANEXO 1	27
ANEXO 2	28

ÌNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Dosis de contaminación con SE y título de la mezcla de fagos, según matriz alimentaria y temperatura de almacenamiento.....9
- Tabla 2.** Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Jamón de pavo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura ambiente ($18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.....13
- Tabla 3.** Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Jamón de pavo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.....14
- Tabla 4.** Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Vienesas pollo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura ambiente ($18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.....15
- Tabla 5.** Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Vienesas pollo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.....15

RESUMEN

En los últimos años se han utilizado biotecnologías, como los bacteriófagos, para controlar patógenos bacterianos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), tales como *Campylobacter spp.*, *E. coli* 0157H7 y *Salmonella enterica*. Si bien en un inicio se realizaron fagoterapias directamente en los animales de abasto, hace poco más de una década se inició el biocontrol de estos agentes biológicos directamente en los alimentos, tanto a temperatura de refrigeración como ambiental. Los resultados internacionales indican que la aplicación directa de ellos logra reducir en rangos variables los recuentos bacterianos, sin producir cambios organolépticos. El objetivo de este estudio fue establecer la efectividad de una mezcla de fagos líticos nativos en la reducción de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis (SE), en dos matrices alimentarias como son las cecinas cocidas, particularmente el jamón de pavo y la vienesa pollo.

Para esto se trabajó con dos grupos de 25 muestras cada uno: el grupo experimental se contaminó con SE y se le aplicó la mezcla de fagos (MOI 10^5), en tanto que el grupo control sólo se contaminó con la cepa desafío. La dosis de contaminación varió según la temperatura de incubación de las muestras. Una vez contaminada y aplicada la mezcla de fagos, las muestras se incubaron por 10 días a temperatura ambiente (18 °C) y a temperatura de refrigeración (4 °C) para luego realizarles recuento bacteriano.

Pasados los 10 días se observó que la aplicación de la mezcla de bacteriófagos redujo significativamente ($p < 0,0001$) los recuentos de SE en jamón de pavo mantenidos a temperatura ambiente, logrando una leve reducción de 0,48 unidades logarítmicas de SE/g mientras que en las muestras que permanecieron a temperatura de refrigeración se obtuvieron mayores reducciones del orden de 1,72 unidades logarítmicas de SE/g. Para vienesa pollo, la mezcla de fagos redujo los recuentos en 1,13 unidades logarítmicas de SE ($p \leq 0,05$) para el grupo que permaneció a temperatura ambiente mientras que en el grupo a temperatura de refrigeración se logró obtener reducciones significativas de 0,48 unidades logarítmicas ($p \leq 0,05$) de SE.

Los resultados obtenidos indican que la efectividad de esta mezcla de fagos líticos depende de la matriz alimentaria y que podría ser una alternativa para el biocontrol de SE en jamón de pavo y vienesa de pollo a temperatura ambiente y de refrigeración por 10 días.

ABSTRACT

In recent years, biotechnological tools, as bacteriophages, have been used to control bacterial pathogens associated with food-borne diseases, such as *Campylobacter* spp., *E. coli* 0157:H7 and *Salmonella enterica*. While initially performed direct phagetherapies were performed in livestock, just over a decade ago the biocontrol direct in Food began, both cooling and room temperature. The international data have shown that the bacteriophage direct application reduce, in variable ranges, the bacterial counts, with no organoleptic changes. The aim of this study was to establish the effectiveness of a native lytic bacteriophage cocktail in reducing *Salmonella* Enteritidis (SE) counts, in two processed food matrices, as turkey breast ham and chicken sausage.

Thus, two groups of 25 samples each one were differentiated: the experimental group was inoculated with SE and receive the phage cocktail (MOI 10^5), in so far as the control group was only inoculated with the bacterial strain. The inoculation dose varied according to the storage temperature of the samples. Once contaminated and added with the phage cocktail, the samples were incubated for 10 days at room (18 °C) and cooling (4 °C) temperature, to next perform the bacterial count.

After 10 days a significant bacterial count reduction ($p < 0.0001$) was observed due to the application of the phage cocktail in turkey breast ham stored at room temperature, achieving a slight reduction of 0.48 log CFU/g, while in the samples stored at cooling temperature higher reductions were obtained, around 1.72 log UFC/g. In chicken sausage, the phage cocktail reduced the bacterial counts in 1.13 log UFC/g ($p \leq 0.05$) in the samples stored at room temperature, while in the samples stored at cooling temperature the reduction were of 0.48 log CFU/g ($p \leq 0.05$).

The present results indicates that the effectiveness of this lytic bacteriophage cocktail depends strongly in the type of food matrix, and that could be an alternative tool for the biocontrol of SE in turkey ham and chicken sausages at room and cooling temperatures for 10 days.

INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos corresponden a virus cuyo hospedero específico son las bacterias. Son las entidades biológicas más abundantes de la tierra, ocupando prácticamente todos los nichos ecológicos, hecho que les asigna un importante rol en el equilibrio de los ecosistemas bacterianos.

Estos virus invaden las células bacterianas interrumpiendo su metabolismo y provocando su lisis, lo que lleva a la muerte y la consiguiente reducción de la carga bacteriana. Son inocuos para las células eucariotas, además de ser fáciles y económicos de aislar. Estas características los hacen ser de uso potencial en diferentes niveles de la cadena alimentaria: como **agentes terapéuticos** en animales, vegetales y en el hombre, como **biosanitizantes**, sobre equipamiento y superficies de contacto. En alimentos, han sido utilizados como **indicativos de contaminación bacteriana**; como **biopreservantes**, para extender la vida útil de productos perecibles y **biocontroladores** en carcasas y otros productos crudos. Todo esto para reducir la carga bacteriana en alimentos que, en conjunto con otras medidas logren disminuir la incidencia de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) en la población (García *et al.*, 2008). A nivel nacional el agente biológico más aislado en brotes de ETA corresponde a *Salmonella spp.* siendo el serotipo Enteritidis el de mayor prevalencia estando asociado al consumo de alimentos contaminados de origen animal tales como carnes, ovoproductos, platos preparados, pescados y mariscos, entre otros.

Recientemente en nuestro país se han aislado bacteriófagos nativos que han demostrado actividad lítica contra SE, en condiciones de laboratorio, los cuales son estables a diferentes pH y temperaturas en distintas matrices cárnicas como lo son las cecinas.

El presente estudio evaluó la efectividad del uso de una mezcla de bacteriófagos líticos nativos en alimentos de riesgo como lo son las cecinas cocidas, vienasas de pollo y jamón de pavo, contaminadas experimentalmente con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis (SE).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los bacteriófagos líticos son virus descubiertos por Twort en 1915 y por D' Herelle en 1917; cada tipo de fago reconoce en forma específica a determinadas especies y cepas bacterianas, generando la lisis de éstas (Górski y Weber-Dabrowska, 2005). Por esta razón se considera que los fagos juegan un rol importante en el balance bacteriano. Se ha estimado que cada mililitro de agua de mar contiene millones de estas partículas (10^8 a 10^9 UFP), algunos investigadores determinaron que la abundancia es aún mayor en sedimentos marinos superficiales cercanos a la costa, encontrándose 10^{30} - 10^{32} virus por cm^3 (Ceyssens, 2009). Por extrapolación, la población total de bacteriófagos se estima en 10^8 especies y 10^{31} partículas en la biósfera, siendo una de las entidades replicantes más abundantes en el mundo (Rohwer, 2003).

Existen bacteriófagos líticos y lisogénicos. Los primeros son capaces de multiplicarse utilizando tanto la maquinaria de replicación del ADN como la de síntesis de proteínas de su hospedero. El ciclo se inicia con la adsorción o unión a la bacteria utilizando como receptores la cápsula bacteriana, diferentes partes del lipopolisacárido (LPS), flagelos, fimbrias y otras proteínas de superficie de las bacterias permitiendo la internalización de su genoma; una vez dentro comienza la replicación y transcripción del material viral; el ciclo finaliza con la lisis osmótica de la bacteria, liberándose la progenie viral (Skurnik y Strauch, 2006). Por otro lado, los fagos lisogénicos, actúan infectando la célula bacteriana, integrando su propio genoma a la célula hospedera, quedando en estado de latencia como profago, por extensos períodos (lisogenia). Si su hospedero se enfrenta a un ambiente adverso, este profago puede activarse y reiniciar su ciclo como fago lítico y así, en algún momento producir la lisis bacteriana y generar la liberación de partículas virales (Górski y Weber-Dabrowska, 2005; Hudson *et al.*, 2005). Lo anterior explica la imposibilidad de utilizar fagos lisogénicos como herramienta de biocontrol, ya que, en algunos casos, pueden codificar genes de virulencia y resistencia a antibióticos que pueden ser transferidos entre bacterias mediante transducción e incrementar la patogenicidad del hospedero; hecho que fue observado en *E.coli* con las toxinas "Shiga like toxin" 1 y 2. Por esto es que para ser usados ya sea en terapia o como biocontrol, los bacteriófagos deben ser cuidadosamente caracterizados para elegir aquellos que tengan sólo características líticas, pues eliminan

a su hospedero y aumentan su progenie rápidamente siendo muy rara la transducción (Monk, *et al.*, 2010).

Las ventajas que tiene la utilización de bacteriófagos en los alimentos son su ubicuidad, facilidad y bajo costo de aislamiento y preparación, poseen también, una alta actividad y especificidad lo que se traduce en una escasa o nula acción lítica sobre bacterias de la flora intestinal normal, además son muy estables en los alimentos, no alterando su calidad organoléptica (Górski y Weber-Dabrowska, 2005; Greer, 2005; García *et al.*, 2008).

Como desventajas cabe mencionar que las propiedades intrínsecas del alimento como su componente en grasas, proteínas y carbohidratos afectan la habilidad del bacteriófago de encontrar e infectar a la bacteria, además de la presencia de bacterias mutantes resistentes a ellos. Este último problema se ha disminuido parcialmente mediante el uso de mezclas de bacteriófagos (Greer, 2005; Goodridge y Bishar, 2011).

Científicos han demostrado la posibilidad de utilizar bacteriófagos líticos para disminuir la presencia de patógenos en alimentos frescos y procesados. En la actualidad ha habido mayor utilización de bacteriófagos sobre alimentos que sobre animales vivos ya que, los primeros no están sometidos a la dinámica de un animal vivo como es la interacción con el sistema inmune y el constante cambio de microambientes (Goodridge y Bishar, 2011). En la última década se han realizado diversos estudios donde se ha observado a los bacteriófagos como biocontroladores en alimentos, demostrándose su efectividad en la reducción de la concentración bacteriana. Entre ellos, cabe mencionar los realizados por:

- O'Flynn y colaboradores en el año 2004 quienes evaluaron la capacidad lítica de una mezcla de tres fagos contra *Escherichia coli* O157:H7 en la superficie de trozos de carne cruda de bovino. Contaminaron 18 trozos de carne con un total 100 μ L de una suspensión de dicha bacteria (2×10^3 Unidades Formadoras de Colonias por mL, UFC/mL), y fueron mantenidos a 37 °C por una hora. Luego, a nueve de las muestras, se les adicionó un mL de la suspensión de fagos (2×10^8 Unidades Formadoras de Placas por mL, UFP/mL) lo que resulta en una multiplicidad de infección o MOI de 10^5 . Las muestras se mantuvieron a 37 °C por tres horas, para luego realizar los recuentos. Como resultado se obtuvo que en las nueve muestras control había un recuento promedio de 10^5 UFC/mL mientras que, en siete de las nueve muestras restantes, no se

evidenció la presencia de *E coli* y en dos había un recuento menor a 10 UFC/mL, lo que demostró la eficacia de estos fagos como biocontroladores en esta carne.

- Guenther *et al.* en el año 2009 estudiaron la eficiencia en la reducción del recuento de dos cepas de *Listeria monocytogenes* en ocho diferentes alimentos seleccionados para cubrir el espectro de alimentos frescos, refrigerados y listos para consumir que con frecuencia se encuentran contaminados con *Listeria*. Se utilizaron completos (salchichas), pechuga de pavo cocido y rebanado (embutidos), salmón ahumado, mariscos mixtos (cocidos y refrigerados), chocolate con leche pasteurizada (3,5% de grasa), suero de queso mozzarella (suero de leche pasteurizada sin sal de bolsas de plástico que contienen queso mozzarella fresco), lechuga (hojas frescas), y repollo (rodajas de hojas frescas). Los alimentos se contaminaron con 10^3 UFC de *Listeria monocytogenes* por gramo, incubándose durante dos a tres horas a 30°C, luego se aplicó una concentración de 3×10^8 UFP por gramo o mL (MOI 10^5), incubándose las muestras a 6°C durante seis días. Los resultados indicaron una disminución en los recuentos finales entre 0,4 y 5,0 unidades logarítmicas. En alimentos líquidos se logró la mayor disminución, dada la facilidad en la difusión del fago. En el caso de los alimentos sólidos la situación fue diferente, dado que la superficie limitó físicamente la difusión de los fagos, dificultando el contacto entre éstos y la bacteria blanco.

- En Chile, Farfán en el año 2009 y Jorquera y colaboradores en el año 2012 analizaron la efectividad del uso de una mezcla de bacteriófagos líticos nativos. Farfán utilizó una mezcla de tres bacteriófagos a una concentración de 10^7 UFP/mL aplicándolos por inmersión y aspersion sobre huevos libres de patógenos específicos (SPF) previamente contaminados con SE a una concentración de $1,28 \times 10^1$ UFC/mL (MOI 10^6) los cuales fueron incubados a 37 °C por 24 horas. Como resultado obtuvo una reducción aproximada en el recuento bacteriano de tres unidades logarítmicas en huevos SPF experimentalmente contaminados con SE y tratados con bacteriófagos por inmersión o aspersion, en comparación a un grupo control, detectándose una actividad lítica incluso hasta cinco días post aplicación de fagos. Por su parte Jorquera y colaboradores evaluaron la actividad lítica de una mezcla de cinco fagos en carne fresca de pollo contaminada con SE. Las muestras fueron inoculadas con $5,7 \times 10^5$ UFC de SE/mL y 10^9 UFP de fagos/mL (MOI 10^4) y mantenidas a 4 °C por 10 días. En los días tres, seis y 10 se realizó recuento bacteriano encontrándose una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en el recuento de SE en rangos entre 1,0 – 1,55 log en todas las muestras tratadas con bacteriófagos, observándose en el día 10 un mayor efecto.

El estudio de los bacteriófagos ha centrado su aplicación en el procesamiento de los alimentos. Sus óptimos resultados han permitido que actualmente se disponga de productos comerciales aprobados por FDA utilizados como aditivos que se expenden actualmente en Estados Unidos y Europa, entre éstos cabe mencionar el LMP-102 (Intralytics) consistente en una mezcla de seis fagos con acción lítica sobre *Listeria monocytogenes*, para uso en productos cárnicos y avícolas listos para el consumo. Otro producto es LISTEX (Microes Food Safety), que amplió su uso a todos los alimentos de riesgo adquiriendo la categoría de producto GRAS (del inglés Generally Recognized as Safe) (FDA, 2007) y por último el producto SALMOFRESH aprobado su uso por la FDA en febrero del año 2013, siendo el primer producto en el mundo destinado al control de *Salmonella* en alimentos.

En Chile, *Salmonella* es el principal agente de ETA. Las ETA son un problema de Salud Pública originadas por el consumo de alimentos y bebidas contaminadas. En el país, durante el año 2013 se notificaron un total de 1150 brotes de ETA con 7778 casos. En el año 2014 considerando hasta la semana epidemiológica 9, se han notificado 204 brotes de ETA con un total de 410 casos, siendo *Salmonella* spp. el agente más aislado mediante diagnóstico microbiológico, alcanzando en el año en curso un 92% de los casos. En cuanto a los alimentos involucrados en los brotes de ETA, platos preparados ocupa el primer lugar con un 45,6% seguido por pescados y mariscos con un 26,9% de los casos, en tercer lugar huevos y ovoproductos con un 10,4% y en cuarto puesto se ubican carnes y productos cárneos con un 6,2% de los casos (MINSAL, 2014). Aunque en Chile no hay registros sobre brotes de salmonelosis atribuidos al consumo de cecinas, no se descarta que estos podrían ocurrir, debido a que la presencia de *Salmonella* spp. en estos alimentos como en las materias primas de éstos que corresponden a las aves de corral ha sido notificada en los informes de vigilancia en dichos planteles avícolas realizados por la entidad de salud correspondiente, así como sus consecuencias en la salud de los consumidores (Pui et al. 2011). Si bien las cecinas no representan un alto porcentaje de contaminación con *Salmonella*, siguen existiendo brotes en el mundo asociados a su consumo (DEIS, 2009). En el año 2010 se registró un brote asociado al consumo de vienasas en Francia, al consumo de salame en Italia, Estados Unidos y Dinamarca entre los años 2007 y 2011 (Bone et al. 2010). En Chile, debido al aumento del consumo de cecinas (15 kg/ hab.) y a su mayor volumen de

producción (5% respecto a los años anteriores), (INE, 2010) no se descarta que exista una mayor probabilidad de que se presenten nuevos brotes asociados a cecinas.

Debido a que las cecinas son consideradas un alimento de riesgo es que Robeson, *et al.*, en el año 2012 evaluaron *in vitro* la estabilidad de cinco fagos líticos frente a SE en cecinas cocidas y acidificadas. Pasados 10 días observaron que tres de los cinco fagos no presentaron disminución apreciable de título, en tanto que los otros dos evidenciaron una baja de sólo 1 log al final del estudio. Estos resultados destacan la estabilidad de los fagos en este tipo de alimento (Anexo 1).

La situación de salmonelosis en Chile sumada al aislamiento y caracterización de fagos nativos con excelentes características líticas y de estabilidad en diversas matrices cárneas (Robeson *et al.*, 2012), llevan a plantear que el biocontrol podría ser una herramienta factible de usar. Por ello, en esta memoria de título se estudió la eficacia de una mezcla de cinco fagos líticos nativos en cecinas cocidas (vienesas y jamón) contaminadas experimentalmente con SE, con el fin reducir la contaminación bacteriana.

HIPÓTESIS

Dado que los bacteriófagos nativos, previamente aislados, demuestran actividad lítica sobre *Salmonella* Enteritidis en condiciones de laboratorio y, a que son estables en vienasas de pollo y jamón de pavo, su aplicación en estas matrices alimentarias contaminadas con *Salmonella* Enteritidis, reducirá los recuentos de ésta.

OBJETIVO GENERAL

Establecer la capacidad biocontroladora de una mezcla de fagos líticos nativos en la reducción de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en vienasas y jamón contaminados experimentalmente.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Determinar la disminución de los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en vienasas de pollo y jamón de pavo tratados con una mezcla de bacteriófagos y mantenidos por 10 días a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepa desafío

La cepa bacteriana que se utilizó corresponde a una cepa de SE, de origen aviar, donada por la Dra. Irma Acevedo González del Laboratorio de Bacteriología del Servicio Agrícola Ganadero de Chile. De esta cepa se seleccionó una mutante espontánea resistente a Ácido Nalidíxico (*nal^r*) y Rifampicina (*rif^r*) por el Dr. James Robeson, investigador del Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

2. Bacteriófagos

Se utilizaron cinco fagos líticos aislados del estero Marga Marga de Viña del Mar por el Dr. James Robeson. La selección de ellos se realizó en base a sus características líticas frente a la cepa desafío, estabilidad en la matriz en estudio, tolerancia al pH y a temperaturas entre -20°C y 25°C, y por su rango de hospederos (Robeson *et al.*, 2012) (Anexo 1). La mezcla de fagos se aplicó a los alimentos a una multiplicidad de infección (MOI= relación entre cantidad de fagos por cada bacteria), de 10⁵.

3. Matriz alimentaria

En este estudio se utilizaron vienasas de pollo y jamón cocido de pavo laminado cuya composición se detalla en el anexo 2, ambos productos envasados al vacío con fecha de elaboración cercana a la de adquisición. Dichos alimentos fueron comprados en un supermercado de la Región Metropolitana y luego fueron transportados en cajas isotérmicas en no más de cuatro horas hasta el Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La marca comercial de las matrices fue siempre la misma y confidencial. Una vez en el laboratorio, los alimentos fueron analizados para corroborar la ausencia de contaminación previa con *Salmonella* sp. mediante cultivo tradicional asociado a detección a través de PCR (Sánchez, 2007) por el laboratorio de Bacteriología Veterinaria. Se trabajó solo con muestras negativas a *Salmonella*. Además por parte de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso se descartó la presencia de fagos en muestras de las matrices ya mencionadas.

Las muestras se mantuvieron congeladas hasta el momento de su análisis, por no más de 96 horas.

4. Diseño experimental

4.1. Protocolo de contaminación con SE

Ambas matrices fueron contaminadas de acuerdo a un protocolo previamente establecido por López (2012) aumentando en ambas matrices la dosis de contaminación (Tabla 1).

Tabla 1. Dosis de contaminación con SE y título de la mezcla de fagos, según matriz alimentaria y temperatura de almacenamiento.

Matriz	Temperatura Ambiente (18° C)		Temperatura Refrigeración (4° C)	
	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL	Dosis SE UFC/mL	Título fagos UFP/mL
Vienesas molidas	10 ³	10 ⁸	10 ⁵	10 ¹⁰
Jamón molido	10 ³	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁹

4.2. Preparación del inóculo bacteriano

El inóculo se elaboró a partir de la cepa de SE *nal^r* y *rif^r* preparada en caldo Luria Bertani (LB, Difco®), incubada a 37° C por 18 horas en agitación orbital (Big Bill digital, Thermolyne®). El cultivo fue diluido en tubos redondos de 16 mm hasta ajustar su turbidez en el espectrofotómetro (Spectroquant® Pharo 300-Merck®) a valores entre 0,6 - 0,8 de absorbancia a una longitud de onda de 625 nm (equivale a 10⁸ UFC/mL). Luego, desde esta suspensión se realizaron diluciones al décimo en Agua Peptonada Tamponada (APT, Difco®), hasta tener las concentraciones deseadas (Tabla 1). Mediante recuento bacteriano se corroboró la concentración del inóculo, sembrando 100µL de las diluciones en placas de Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD, Difco®) adicionadas con Rifampicina (Sigma®, 50µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50µg/mL) e incubadas a 37° durante 24 horas.

4.3. Contaminación de las muestras con la cepa bacteriana y aplicación de la mezcla de bacteriófagos.

Las muestras de vienasas y jamón fueron lavadas con agua destilada estéril, molidas (Moulinex®) y posteriormente contaminadas con *SE nal^r rif^r* según protocolo descrito por López, 2012 (Tabla 1). Se utilizaron 50 muestras de 25 gramos cada una, las que fueron individualizadas en bolsas Whirl-Park®.

La contaminación se realizó en un gabinete de Bioseguridad Healforce® (HFsafe 1200), agregando un volumen de *SE* correspondiente al 10% de la muestra (2,5 mL). Luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos horas, previa homogenización, para facilitar la adaptación bacteriana al medio y la adhesión de ésta a la matriz alimentaria.

A cada muestra contaminada, se le agregó una alícuota de fagos suspendidos en buffer SM (2 g MgSO₄ y 50 mL Tris-HCl 1M, pH 7,5), en un volumen aproximado del 10% del peso de la muestra, utilizando una MOI de 10⁵. Estas muestras se mantuvieron en cajas herméticamente cerradas durante 10 días, la mitad (n=25) a temperatura ambiente controlada (estufa 18° C ± 1° C) y la otra mitad (n=25) a temperatura de refrigeración (4° C ± 1° C). Cada refrigerador contó con un termómetro digital, registrándose la temperatura dos veces/día durante toda la experiencia; a partir de estos datos se obtuvo un promedio y desviación estándar, para los 10 días de almacenamiento. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron analizadas para determinar el recuento de *SE*.

Para cada grupo experimental se estableció un grupo control de 25 muestras solo contaminadas con *SE*, las que se mantuvieron y procesaron separadas de los grupos que recibieron fagos y se sometieron a bacteriología cuantitativa (recuento bacteriano) al final del periodo. Se contó además con un grupo blanco (control de contaminación) mantenido a temperatura ambiente, el cual no fue contaminado con *SE* ni recibió la aplicación de fagos. La mitad (n=5) se mantuvo en el laboratorio del grupo experimental y la otra mitad (n=5) en el laboratorio del grupo control. Al final del periodo a las muestras se les realizó bacteriología cualitativa para descartar contaminación intralaboratorio con *SE*.

4.4. Bacteriología cuantitativa (Recuento de SE)

Finalizado los 10 días y utilizando el gabinete de bioseguridad, a cada bolsa se le adicionó 225 mL de APT (Difco®) y se mezcló en un equipo homogeneizador y triturador (Stomacher® 400 circulator), durante aproximadamente 1 minuto. A partir de estas bolsas, se realizaron al menos cuatro diluciones al décimo con APT (Difco®), sembrando 100 µL, en duplicado, en placas de agar XLD (Difco®), adicionadas con Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL). Las placas fueron sembradas en superficie mediante asa de Digralsky e incubadas a 37° C durante 24 a 48 horas, realizando lectura sólo en aquellas que presentaron \leq a 150 colonias. Las muestras negativas, donde no se observó desarrollo bacteriano, fueron sometidas a bacteriología cualitativa.

4.5. Bacteriología cualitativa (Detección de SE)

Se realizó mediante la norma ISO 6579:2002 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.” (ISO 6579, 2002), modificada de acuerdo a protocolos internos del laboratorio. Dichas adaptaciones fueron la utilización de un solo medio de enriquecimiento (Caldo Rappaport-Vassiliadis, RV Difco®) y un medio selectivo (XLD, Difco®), al cual se le adicionó Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL), para mejorar la selectividad.

A partir de las bolsas incubadas a 37° C \pm 1° C por 18 horas \pm 2 horas, se transfirieron 100 µL a un tubo con 10 mL de caldo RV (Difco®) y se incubaron a 41° C \pm 1° C en baño termorregulado durante 24 horas \pm 3 horas. A partir de este caldo, se sembraron 30 µL en agar XLD (Difco®), adicionado con Rifampicina (Sigma®, 50 µg/mL) y Ácido Nalidíxico (Sigma®, 50 µg/mL). Las placas fueron incubadas a 37° C \pm 1° C por 24 horas \pm 3 horas. Las colonias sospechosas se sometieron a aglutinación mediante el antisuero comercial *Salmonella* O Antiserum Poly A – I & Vi (Difco®).

6. Análisis estadístico

Los resultados del recuento del grupo experimental con su respectivo control, fueron expresados en unidades logarítmicas y analizados mediante un análisis de varianza con el programa InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008). A las muestras negativas a bacteriología cuantitativa, pero positivas en bacteriología cualitativa, se les asignó un valor de 10⁰ UFC/mL, que corresponde al límite de detección. Mientras que aquellas

muestras cuyos recuentos fueron incontables (> 150 colonias), se les asignó un valor arbitrario de 10^8 UFC/mL.

7. Normas de bioseguridad

El proyecto contó con un Certificado de bioseguridad local (FAVET), que permitió su realización. Se utilizó delantal, guantes, mangas y mascarillas desechables. También se contó con un gabinete de seguridad para la contaminación y procesamiento de las muestras. Como desinfectante/antiséptico se utilizó alcohol y alcohol yodado y, para la desinfección de los mesones, cloro. Todos los residuos sólidos contaminados fueron incinerados y/o esterilizados en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y los residuos líquidos, fueron clorados (5.000 ppm) previa descarga. La eliminación de todos los residuos químicos tóxicos, líquidos y sólidos, fue realizada por una compañía externa.

RESULTADOS

1.- Matriz Alimentaria: Jamón de pavo.

a. Comportamiento de la cepa desafío a temperatura de refrigeración y ambiente

En las muestras de jamón de pavo que fueron incubadas a temperatura ambiente la concentración bacteriana aumentó en 5,1 unidades logarítmicas de SE/g entre el día 0 y el día 10 (Tabla 2). Mientras que, en las muestras que fueron incubadas a temperatura de refrigeración el aumento fue bastante menor, alcanzando a 1 unidad logarítmica de SE/g entre el día 0 y 10 de estudio (Tabla 3).

b. Aplicación de bacteriófagos

Los resultados de la aplicación de fagos en las muestras incubadas a temperatura ambiente se muestran en la Tabla 2, donde se alcanzaron reducciones de 0,48 unidades logarítmicas de SE/g., valor significativo ($p \leq 0,05$) al compararlo con su grupo control. Por otro lado, las reducciones bacterianas de las muestras que fueron mantenidas a temperatura de refrigeración se muestran en la Tabla 3, donde se observaron reducciones significativas ($p \leq 0,05$) de 1,72 unidades logarítmicas de SE/g.

Tabla 2: Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Jamón de pavo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura ambiente ($18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.

Grupo ¹	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio día 10 (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ²	Recuentos mínimos - máximos de SE (\log_{10} UFC/g)
JCA	1,05	5,76 ^a \pm 0,38	4,94 – 6,41
JFA	1,05	5,28 ^b \pm 0,35	4,59 – 5,80

¹ JCA: Grupo control, Jamón de pavo contaminada con SE, mantenida a t° ambiente.

JFA: Grupo experimental, Jamón de pavo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° ambiente.

² D.E.: Desviación Estándar

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

Tabla 3: Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Jamón de pavo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.

Grupo ¹	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio día 10 (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ²	Recuentos mínimos - máximos de SE (\log_{10} UFC/g)
JCR	1,05	2,12 ^a \pm 0,24	1,64 – 2,48
JFR	1,05	0,40 ^b \pm 0,34	0,00* – 1,00

¹ JCR: Grupo control, Jamón de pavo contaminada con SE, mantenida a t° de refrigeración.

JFR: Grupo experimental, Jamón de pavo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° de refrigeración.

² D.E.: Desviación Estándar

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

*: se asumió el valor 10^0 UFC/mL.

Cabe señalar que en 7 de las 25 muestras del grupo experimental mantenido a temperatura de refrigeración, no se observó desarrollo bacteriano en la placa de recuento; sin embargo, se logró detectar la bacteria al incluir enriquecimiento de la muestra, situación que llevó a asumir el valor del límite de detección y con ello un valor de recuento mínimo de $0 \log_{10}$.

2.- Matriz alimentaria: Vienesas pollo

a. Comportamiento de la cepa desafío a temperatura de refrigeración y ambiente

En las muestras de vienesa pollo que fueron incubadas a temperatura ambiente la concentración bacteriana aumentó en 3 unidades logarítmicas de SE/g entre el día 0 y el día 10 (Tabla 4) de igual forma ocurrió en las muestras refrigeradas.

b. Aplicación de bacteriófagos

Los resultados de la aplicación de fagos en las muestras incubadas a temperatura ambiente se muestran en la Tabla 4, donde se alcanzaron reducciones estadísticamente significativas de 1,13 unidades logarítmicas de SE/g ($p \leq 0,05$) al comparar el grupo experimental con su control. Por otro lado, las reducciones bacterianas de las muestras

que se encontraban a temperatura de refrigeración se muestran en la Tabla 5, donde se observaron reducciones significativas de 0,48 unidades logarítmicas de SE/g ($p \leq 0,05$).

Tabla 4: Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Vieneses pollo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura ambiente ($18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.

Grupo ¹	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio día 10 (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ²	Recuentos mínimos - máximos de SE (\log_{10} UFC/g)
VCA	1,8	4,85 ^a \pm 1,98	0,00* - 6,12
VFA	1,8	3,72 ^b \pm 1,29	0,00* - 5,12

¹ VCA: Grupo control, Vieneses pollo contaminada con SE, mantenida a t° ambiente.

VFA: Grupo experimental, Vieneses pollo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° ambiente.

² D.E.: Desviación Estándar.

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

*: se asumió el valor 10^0 UFC/mL.

Cabe señalar que en 1 de las 25 muestras tanto del grupo experimental como del grupo control mantenido a temperatura ambiente, no se observó desarrollo bacteriano en la placa de recuento; sin embargo, se logró detectar la bacteria al incluir enriquecimiento de la muestra, situación que llevó a asumir el valor del límite de detección y con ello un valor de recuento mínimo de 0 \log_{10} .

Tabla 5: Concentración inicial, recuentos promedio, mínimos y máximos (\log_{10} UFC/g) de *Salmonella* Enteritidis en Vieneses pollo, con y sin adición de fagos, mantenidos a temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 10 días.

Grupo ¹	Concentración inicial (\log_{10} UFC/g)	Recuento promedio día 10 (\log_{10} UFC/g) \pm D.E. ²	Recuentos mínimos - máximos de SE (\log_{10} UFC/g)
VCR	1,8	4,84 ^a \pm 0,08	4,74 - 5,02
VFR	1,8	4,36 ^b \pm 0,22	4,00 - 4,60

¹ VCR: Grupo control, Vieneses pollo contaminada con SE, mantenida a t° de refrigeración.

VFR: Grupo experimental, Vienesita pollo contaminada con SE más una mezcla de fagos, mantenida a t° de refrigeración.

² D.E.: Desviación Estándar

^{a, b}: letras diferentes indican que hay diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

En cuanto al grupo blanco, las muestras fueron negativas a SE, lo cual descartó la contaminación intralaboratorio con la cepa desafío.

Además, es importante destacar que en las muestras de los grupos controles no se detectaron bacteriófagos nativos, corroborando la ausencia de contaminación viral interlaboratorios, información entregada por el Instituto de Biología de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, quienes desarrollaron esta parte del estudio. Cabe mencionar también que en el 100% de las muestras experimentales se detectaron títulos altos de fagos (PUCV).

DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que la mezcla de cinco fagos nativos redujo significativamente los recuentos de *Salmonella* Enteritidis en jamón de pavo y vienesa pollo y sus valores de reducción se encuentran dentro de los rangos observados a nivel internacional en matrices alimentarias sólidas.

En cuanto al crecimiento de *Salmonella* Enteritidis a temperatura ambiente y de refrigeración se observó que ésta varía dependiendo del tipo de matriz. Así, y como era previsible, en la matriz jamón de pavo, la bacteria creció 5 unidades logarítmicas durante los 10 días de almacenamiento a temperatura ambiente mientras que a refrigeración, se observó un escaso desarrollo que no sobrepasó una unidad logarítmica. Esta situación era esperable debido a que se describen diversos tipos de agentes estresantes que pueden afectar a los microorganismos que se encuentran en los alimentos, los cuales producirían un descenso en el crecimiento bacteriano. La baja temperatura como lo es la temperatura de refrigeración sumado al prolongado tiempo de almacenamiento, se considera por Wesche y colaboradores (2009) como un estrés de tipo moderado, el cual desencadenaría una disminución en el crecimiento de *Salmonella*.

En el caso particular de vienesa pollo, la bacteria creció de forma similar en ambas temperaturas, alcanzando un crecimiento del orden de 3,04 unidades logarítmicas en las muestras en refrigeración y 3,05 unidades logarítmicas en las muestras a temperatura ambiente. En el caso de las muestras que permanecieron a temperatura de refrigeración, el crecimiento podría deberse a que el mayor porcentaje de grasa que contiene este alimento ejercería una función de aislante que protegería a las bacterias del estrés térmico. (Wesche *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que a pesar de que estas dos matrices alimentarias se clasifican como cecinas cocidas la composición nutricional de ambas varía bastante en ítems como la cantidad de grasa, colesterol, sodio, entre otros (Anexo 2). Estas variaciones hacen que la composición química de cada una de ellas sea también distinta en cuanto a su

porcentaje de humedad, actividad de agua y pH, proporcionando distintos ambientes que facilitarían o no el desarrollo de *Salmonella* en jamón de pavo y vienesa pollo.

La aplicación de la mezcla de cinco fagos nativos redujo significativamente los recuentos de *Salmonella* Enteritidis (SE) en jamón de pavo y vienesa pollo, almacenadas durante 10 días a temperatura ambiente y de refrigeración. Con valores de disminución entre 1,13 y 0,48 unidades logarítmicas en vienesa pollo mantenidas a temperatura ambiente y de refrigeración respectivamente, y de 0,48 y 1,72 unidades logarítmicas en el caso de jamón de pavo mantenidas a temperatura ambiente y de refrigeración respectivamente. Se puede observar que el mayor efecto de los fagos a temperatura ambiente ocurrió en vienesa pollo mientras que en refrigeración fue en jamón de pavo. Los resultados del presente estudio son diferentes a lo observado por Jorquera y colaboradores en el año 2012 en carne fresca de pollo y de pavo, ya que obtienen mejores efectos de los fagos en carne fresca de pollo a temperatura de refrigeración, mientras que en carne de pavo lograron reducciones mayores a temperatura ambiente, a diferencia de lo ocurrido en este estudio en jamón de pavo, en donde la mayor reducción fue a temperatura de refrigeración. Probablemente aquí juega un rol importante el procesamiento de ambos tipos de carnes para la elaboración de las cecinas.

Se han realizado diversos estudios centrados en el biocontrol de SE mediante el uso de bacteriófagos en matrices alimentarias que forman parte de las materias primas de elaboración de las cecinas de pollo y pavo utilizadas en este estudio. Es así como Kang y colaboradores en el año 2013, estudiaron la aplicación de un fago en muestras de piel de pollo contaminadas con una concentración de 10^3 UFC/cm² de SE, utilizando una MOI de 10^4 y siendo almacenadas a 8° C durante siete días. Al final de la experiencia obtuvieron reducciones significativas, del orden de 2,43 unidades logarítmicas por cm². Spricigo y colaboradores en el año 2013, estudiaron la aplicación de una mezcla de fagos contra SE en pechugas de pollo, la cual fue contaminada con una concentración inicial de 10^6 UFC/mL y utilizando una MOI de 10^3 , las muestras fueron almacenadas durante siete días a 4° C. Al final de la experiencia existió una reducción, estadísticamente significativa, de 0,9 unidades logarítmicas de UFC/g. De estos dos trabajos se puede observar que en el caso de Kang y colaboradores el estudio fue realizado contaminando con la bacteria en la superficie de trozos de 4 cm² de piel de

pollo, tanto la bacteria como el bacteriófago fueron aplicados con pulverizador. Este tipo de contaminación bacteriana y aplicación del fago facilita el encuentro entre la bacteria y el fago debido a que se ubican en el mismo espacio físico a diferencia del método usado en este estudio, en donde se realizó una homogenización manual, la que no asegura que queden uniformemente distribuidos, hecho que dificulta que se produzca el encuentro fago bacteria. Por su parte, el estudio realizado por Spricigo y colaboradores en pechuga de pollo presenta reducciones similares a este estudio, a pesar de haber utilizado una MOI más baja. Esto puede asociarse a que en el presente estudio las muestras de vienesa pollo se mantuvieron por tres días más en almacenaje, que en el estudio realizado por Spricigo y esta situación podría haber influido en la viabilidad de los bacteriófagos y en su capacidad de lisar bacterias.

Los resultados obtenidos en ambas matrices y temperaturas fueron siempre inferiores a los observados por Jorquera y colaboradores en el año 2012 con la misma mezcla de fagos, pero en carnes frescas de pollo y pavo. Esta diferencia en las reducciones obtenidas puede atribuirse a que las cecinas reciben distintos ingredientes en su elaboración que resultan en un producto muy distinto a la carne que le da origen, en cuanto a sus características químicas y nutricionales. Así, los productos cárnicos como las cecinas son preparados total o parcialmente con carne, vísceras, grasa, despojos (huesos, tendones y sangre) y otros subproductos de animales así como ingredientes de origen vegetal, condimentos, especias y aditivos.

También se debe destacar la diferencia sustancial que existe a nivel de cantidad de agua presente en una carne fresca en comparación a una carne de tipo cocida en que la cantidad de agua se reduce significativamente. Un alimento líquido o con alto porcentaje de humedad, facilita el encuentro entre los bacteriófagos y la bacteria blanco pues las partículas fágicas difunden libremente; sin embargo, en alimentos sólidos o con bajo porcentaje de humedad, dependerá de la capacidad del alimento para absorber la suspensión fágica (Guenther *et al.*, 2009), esta situación fue observada por Bigwood y colaboradores en el año 2008, quienes trabajaron aplicando una mezcla de fagos en muestras de carne de vacuno cruda y cocida contaminadas con *Salmonella* Typhimurium e incubadas durante ocho días a 5° C. Al final del periodo lograron una mayor inactivación del patógeno en carne cruda que en las muestras cocinadas, dado que esta última poseía una consistencia seca lo que impediría la movilización del fago.

En el año 2012, Guenther y colaboradores realizaron estudios en alimentos listos para el consumo, entre ellos, salchichas y cecinas de pavo. Las matrices se contaminaron con *Salmonella* Typhimurium a una concentración de 10^3 UFC/g y tratadas con 3×10^8 UFP/g del fago FO1-E2 (MOI 10^5) manteniéndolas durante 6 días a 15° C logrando reducciones mayores que las obtenidas en este estudio, en ambas matrices. En salchichas obtuvieron reducciones de hasta 3 unidades logarítmicas mientras que en cecinas de pavo las reducciones fueron del orden de 5 unidades logarítmicas.

Los diferentes resultados observados según el tipo de matriz en este estudio coinciden con los de otros autores, quienes indican que la capacidad de reducción de los fagos depende fuertemente del tipo de matriz alimentaria. Esto, está asociado a factores intrínsecos tales como fuerza iónica, pH y componentes propios del alimento que pueden interferir en el proceso de la unión de los fagos a los receptores de la superficie bacteriana (Bigwood *et al.*, 2008; Guenther *et al.*, 2009). Por esta razón es difícil comparar resultados entre matrices. Con esto se refuerza la idea de analizar los bacteriófagos frente a cada matriz alimentaria sin extrapolar los resultados.

En cuanto a la dosis contaminante de *Salmonella* Enteritidis, los valores que fueron utilizados en este estudio se encuentran dentro de los rangos utilizados en estudios similares tales como Guenther y colaboradores en el año 2012 quienes utilizaron concentraciones de 10^3 UFC de *Salmonella* Typhimurium por gramo en salchichas y jamón de pavo laminado, Spricigo y colaboradores en el año 2013 quienes usaron concentraciones del orden de 10^5 UFC de SE por gramo en carne fresca de pollo y Kang y colaboradores en el año 2013 con concentraciones de 10^3 UFC de *Salmonella* Enteritidis /mL en piel de pollo.

Los resultados observados muestran que si bien las reducciones logradas en este estudio utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 10^5 en ambas matrices y temperaturas son bajas pero significativas, dichos valores podrían mejorar aumentando la MOI. Algunos autores destacan que lograron una mayor inactivación o reducción del patógeno cuando aplicaron los bacteriófagos en concentraciones superiores. Así, Guenther y colaboradores en el año 2009, aplicaron una mezcla de dos fagos en diferentes concentraciones en alimentos listos para consumo (RTE) frente a *Listeria*

monocytogenes, almacenados durante seis días a 6° C. En vienasas, utilizando una MOI de 10^3 y 10^4 obtuvieron reducciones de 2,2 y 2,7 unidades logarítmicas por gramo de alimento, respectivamente. Sin embargo, utilizando una MOI de 10^5 fue suficiente para controlar completamente al patógeno. En el presente estudio si bien se utilizó la misma MOI (10^5), las reducciones fueron menores. De igual manera Hudson y colaboradores en el año 2013, evaluaron la actividad de un fago a diferentes concentraciones, frente a *Escherichia coli* O157:H7, en muestras de carne cruda de vacuno almacenadas a 37° C durante 1 hora. En ese estudio evidenciaron que utilizando una MOI de 10^4 existía una marcada inactivación de la bacteria, mayor a 2,6 unidades logarítmicas por pieza de alimento, mientras que a una MOI de 10^1 no había inactivación de la bacteria hospedera. Por lo tanto y tomando en cuenta estos datos, es importante enfatizar que la concentración de fagos debe ser lo suficientemente alta para asegurar el contacto de los fagos con su bacteria hospedera, teniendo en cuenta las limitaciones físicas que presenta el alimento, para su correcta difusión.

Finalmente, si bien las reducciones obtenidas fueron menores que en otras matrices más simples y con mayor porcentaje de humedad, existen opciones de mejorar estos resultados como lo es aumentar la multiplicidad de infección y/o usar fagos con mayor actividad lítica.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos permiten concluir la efectividad de la mezcla de los cinco fagos nativos en la reducción de SE en cecinas cocidas de tipo jamón de pavo y vienesa pollo, incubadas a temperatura ambiente y de refrigeración durante 10 días.
- La mezcla de bacteriófagos utilizados en este estudio podría ser un buen candidato como herramienta de biocontrol alternativa frente SE en este tipo de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- **ALERTE, V.; CORTÉS, S.; DÍAZ, J.; VOLLAIRE, J.; ESPINOZA, M.; SOLARI, V.; CERDA, J.; TORRES, M.** 2012. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *Revista Chilena Infectología* 29(1):26-31.
- **BIGWOOD, T.; HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; HEINEMANN, J.** 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology* 25(2):400-406.
- **BONE, A.; NOEL, H.; LE HELLO, S.; PIIER, N.; DANAN, C.; RAGUENAUD, M.** 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4, 12: i, infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010. *EuroSurveillance*. 15: 2 – 4.
- **CEYSSENS, P.J.** 2009. Isolation and characterization of lytic bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para lograr el grado de Doctor en Bioingeniería. Lovaina, Bélgica. Facultad de Bioingeniería, U. Católica de Lovaina. 150p.
- **CONICYT. COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.** 2008. Manual de normas de bioseguridad. 2ed. Santiago, Chile. 139 p.
- **DEIS. DEPARTAMENTO DE ESTADÍSTICAS E INFORMACIÓN DE SALUD. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2009. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) año 2009 - 2008. [en línea]. <<http://163.247.51.54/eta/index0.php?ano=2009>>. [consulta: 29-03-2013].
- **DI RIENZO, A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, G.; GONZÁLEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.** 2008. InfoStat *Software* estadístico, versión 2008. Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- **EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY.** 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2011. *European Food Safety Authority Journal* 11(4):1-250.
- **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. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.
- **FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2007. Determination of the GRAS status of bacteriophage P100 as an antimicrobial food ingredient. [en línea]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/701456A.pdf> [consulta: 15-04-2013]. 82 pp

- **FERGUSON, S.; ROBERTS, CH.; HANDY, E.; SHARMA, M.** 2013. Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 on fresh cut lettuce introduced through cross-contamination. *Bacteriophage* 3(1):1-7.
- **GARCÍA, P.; MARTÍNEZ, B.; OBESO, J.M.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology* 47(6):479-485.
- **GOODRIGE, L.; BISHAR, B.** 2011. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3):130-137.
- **GÓRSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B.** 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(5):511-519.
- **GREER, G.** 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection* 68(5):1102-1111.
- **GUENTHER, S.; HUWYLER, D.; RICHARD, S.; LOESSNER, M.J.** 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and Environmental Microbiology* 75(1): 93-100.
- **GUENTHER, S.; HERZIG, O.; FIESELER, L.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.** 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology* 154(1-2):66-72.
- **HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CAREY-SMITH, G.; GREENING, G.** 2005. Bacteriophage as Biocontrol Agents in Food. *Journal of Food Protection* 68(2):426-437.
- **HUDSON, J.; BILLINGTON, C.; CORNELIUS, A.; WILSON, T.; ON, S.; PREMARATNE, A.; KING, N.** 2013. Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Food Microbiology* 36(1):14-21.
- **INE. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS DE CHILE.** 2010. Pecuarias, primer semestre 2010. [en línea]. <http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/040110/pec10_040111.pdf> [consulta: 15-04-2013].
- **ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** 2002. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. 15 Julio 2002. 34p.

- **JORQUERA, D.; ESPINA K., CRUZ, F.; TURRA, G.; HUBER, K., ROBESON, J.; BORIE, C.** 2012. Actividad lítica de una mezcla de bacteriófagos en carne fresca de pollo contaminada con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis. In: 17° Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Valdivia, Chile. 18 al 20 Noviembre. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias.
- **KANG, H.; KIM, J.; JUNG, T.; WOO, G.** 2013. Wksl3, a New biocontrol agent for *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in foods: characterization, application, sequence analysis, and oral acute toxicity study. *Applied and Environmental Microbiology* 79(6):1956-1968.
- **LÓPEZ, G.** 2012. Inoculación experimental con *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis en distintos tipos de cecinas. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 28p.
- **MINSAL. MINISTERIO DE SALUD DE CHILE.** 2014. Situación de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) hasta el 04 de marzo 2014 (semana epidemiológica 1 a 9). [en línea]. <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/ETA/ETA_SE122014.pdf>. [Consulta: 10-03-2014].
- **MONK, A.; REES, C.; BARROW, P.; HAGENS, S.; HARPER, D.** 2010. Bacteriophage applications: where are we now?. *Letters in Applied Microbiology*. 51: 363–369.
- **O'FLYNN, G.; ROSS, R.; FITZGERALD, G.; COFFEY, A.** 2004. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 70(6):3417-3424.
- **PUI, C.; WONG, W.; NOOR HIDAYAH, M.; CHAI, L.; UBONG, A.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; FARINAZLEEN, M.; CHEAH, Y.; SON, R.** 2011. *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal* 18: 465-473
- **ROBESON, J.; TURRA, G.; HUBER, K.; BORIE, C.** 2012. Persistencia de bacteriófagos de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en matrices alimentarias. In: XXXIV Congreso Chileno de Microbiología. Valdivia, Chile. 23-26 Noviembre 2012. Sociedad de Microbiología de Chile.
- **ROHWER, F.** 2003. Global Phage Diversity. *Cell* 113(2):141.
- **SÁNCHEZ, P.** 2007. Uso de reacción de polimerasa en cadena en el diagnóstico de *Salmonella* Enteritidis en tejidos y contenido intestinal de pollos experimentalmente contaminados. Memoria para optar al Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 69p.

- **SKURNIK, M.; STRAUCH, E.** 2006. Phage therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 5-14.
- **SPRICIGO, D.; BARDINA, C.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M.** 2013. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* and the food industry. *International Journal of Food Microbiology* 165(2):169-174.
- **WESCHE A., GURTNER J., MARKS B., RYSER E.** 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 72(5):1121-1138

ANEXOS

ANEXO 1

Serovares	fSE7	fSE8	fSE12	f1C	f4S
Bredenev	+	+	+	-	-
Seftenberg	+	+	+	-	-
Hadar	-	-	-	-	-
Worthington	+	+	+	-	-
Derby	+	+	+	-	-
Dublin	+	+	+	-	-
Cubana	-	-	-	-	-
Anatum	-	-	+	-	-
Infantis	-	-	+	+	+
Heidelberg	+	+	+	+	+
Enteritidis	+	+	+	+	+

Rango de hospederos de los fagos aislados con actividad lítica contra SE.

1. +: actividad lítica.
2. -: ausencia de actividad lítica.

Tolerancia a la temperatura de los fagos fSE7, fSE8, fSE12, f1C y f4S

	-20°C	4°C	25°C	37°C
fSE7 (UFP/mL)	1,5x10 ⁸	1,3x10 ⁸	9,5x10 ⁷	1,2x10 ⁷
fSE8 (UFP/mL)	2,6x10 ⁸	2,7x10 ⁸	1x10 ⁸	1,3x10 ⁷
fSE12 (UFP/mL)	2,3x10 ⁸	5,3x10 ⁸	1,6x10 ⁸	2,6x10 ⁷
f1C (UFP/mL)	1,2x10 ⁸	8,1x10 ⁷	6x10 ⁷	1x10 ⁷
f4S (UFP/mL)	1x10 ⁸	1,8x10 ⁸	1,6x10 ⁸	1,6x10 ⁸

Tolerancia al pH de los fagos fSE7, fSE8, fSE12, f1C y f4S

pH	3	4	5	6	7	8
fSE7 (UFP/mL)	0	0	2,1x10 ³	1,8x10 ⁶	2,2x10 ⁸	1,8x10 ⁸
fSE8 (UFP/mL)	0	0	2,4x10 ⁴	3,4x10 ⁶	2,7x10 ⁸	2,0x10 ⁸
fSE12 (UFP/mL)	0	0	5,4x10 ⁴	7,9x10 ⁶	6,3x10 ⁸	5,5x10 ⁸
f1C (UFP/mL)	2,4x10 ⁸	3,4x10 ⁸	2,9x10 ⁸	2x10 ⁸	2,5x10 ⁸	3x10 ⁸
f4S (UFP/mL)	2,3x10 ⁸	2,8x10 ⁸	2x10 ⁸	2,2x10 ⁸	3x10 ⁸	3,4x10 ⁸

ANEXO 2

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL (SEGÚN ETIQUETADO OFICIAL DEL PRODUCTO) EN 100g DE JAMÓN PECHUGA DE PAVO COCIDA

Energía (kcal)	102
Proteínas (g)	20
Grasa Total (g)	2
Colesterol (mg)	0
H. de C. Disponibles (g)	1
Sodio (mg)	990

Ingredientes: 100% pechuga de pavo, agua, sal, polifosfato de sodio, azúcar, eritorbato de sodio, proteína de soya, dextrosa, nitrito de sodio, glutamato monosódico, vino en polvo.

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL (SEGÚN ETIQUETADO OFICIAL DEL PRODUCTO) EN 100g DE VIENESA POLLO

Energía (kcal)	213
Proteínas (g)	13
Grasa Total (g)	17
Colesterol (mg)	73
H. de C. Disponibles (g)	2
Sodio (mg)	1125

Ingredientes: pollo, agua, proteína de soya, cerdo, sal, polifosfatos de sodio, goma guar, eritorbato de sodio, humo líquido natural, saborizante natural, carmín de cochinilla, glutamato monosódico, cebolla, ajo, nuez moscada, cilantro, pimienta, jengibre, nitrito de sodio.