



Universitat Autònoma de Barcelona

**La desinfección basada en bacteriófagos como
herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos**

Tesis Doctoral

Denis Augusto Spricigo

Departament de Genètica i de Microbiologia

Bellaterra, 2011



Universitat Autònoma de Barcelona

**La desinfección basada en bacteriófagos como
herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos**

Tesis Doctoral presentada por **Denis Augusto Spricigo**

para optar al Grado de **Doctor** por la **Universitat Autònoma de Barcelona**

Programa de Doctorado en **Biotecnología**

Con el visto bueno de las Directoras de la Tesis Doctoral

Dra. Montserrat Llagostera Casas

Dra. M^a Pilar Cortés Garmendia

Bellaterra, 2011.

"Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro"
René Descartes

El presente trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (**INIA**; Ministerio de la Ciencia e Innovación Español; RTA2006-00065). Igualmente, Denis Spricigo ha disfrutado de una beca predoctoral de la *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (**CAPES**; *Ministério da Educação*, Brasil).

i. Resumen

Salmonella enterica es una de las principales causas de toxiinfección alimentaria en todo el mundo. Su transmisión a humanos generalmente se produce a través de productos de origen animal. Sin embargo, en los últimos años, los vegetales frescos son también una fuente de transmisión de *Salmonella*. Las diferentes acciones que se han propuesto como complementarias a las que se aplican habitualmente en la industria alimentaria producen alteraciones organolépticas en los alimentos. En este contexto, el uso de bacteriófagos podría ser una estrategia aceptable dado que los fagos no alteran dichos productos ni comportan riesgos para la salud humana. El objetivo del presente trabajo ha sido aislar y caracterizar nuevos fagos capaces de infectar a las serovariedades *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* a partir de muestras fecales de cerdos y estudiar su aplicación a diferentes matrices alimentarias. Para abordar dicho objetivo y mediante un método basado en medios de enriquecimiento y de selección de *Salmonella*, se aislaron 33 fagos específicos de dicho patógeno desde muestras de heces de cerdo de granjas españolas entre los años de 2007 y 2009. Posteriormente, se realizó un estudio de su biodiversidad con 55 fagos de nuestra colección, la cual incluye a los fagos aislados en este trabajo y a 22 fagos obtenidos por nuestro grupo desde muestras de heces de *Gallus gallus* (Bardina, 2011). En dicho estudio, se compararon los fagos según su perfil de infección de 67 cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* y su perfil de restricción obtenido con seis enzimas diferentes. Los resultados obtenidos mostraron que los fagos procedentes de granjas de aves fueron distintos de los de granjas de cerdos. A pesar de ello, ambos grupos fueron capaces de infectar a cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, independientemente de su origen (aves, cerdos y humanos). De entre todos los fagos de origen porcino aislados, se seleccionó el fago UAB_Phi78 por presentar un elevado rango de huésped y una mayor y más rápida capacidad lítica. Seguidamente, se procedió a determinar su morfología, ciclo multiplicativo, estabilidad en diferentes temperaturas y pH y la secuenciación de su genoma. El estudio de dichos parámetros reveló que el fago UAB_Phi78 pertenece al género tipo SP6 de la familia *Podoviridae*. Mostró una elevada estabilidad a temperaturas de 25, 30 y 37°C y a pH comprendido entre 4 y 9, aunque su infectividad disminuyó significativamente a pH 2. Finalmente, se

determinó su capacidad de lisar cultivos bacterianos a 4, 25, 30 y 37°C. El análisis de la secuencia de su genoma no reveló la existencia de genes de virulencia conocidos. Asimismo, en este trabajo se ha demostrado que el fago UAB_Phi78 mejora significativamente la capacidad lítica combinada de los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 de cultivos de *Salmonella* a 37°C. Por ello, el último objetivo de esta tesis se abordó estudiando la actividad desinfectante de un combinado formado por los tres fagos sobre distintas matrices alimentarias. Es de resaltar que se obtuvieron resultados significativos en todas las matrices. Así, en la desinfección de piel de cerdo (modelo de presacrificio de los animales) produjo un descenso de 4 y 2 log₁₀ cfu/cm² de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, a las 6 h de tratamiento. En pechuga de pollo (modelo cárnico), mantenida a 4°C durante 7 días tras el tratamiento con el cóctel fágico, se consiguió una reducción de 2,2 y 0,9 log₁₀ cfu/g de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente. En huevos frescos (modelo de producto final de origen animal) tras ser tratados con fagos y mantenidos 2 horas a temperatura ambiente, únicamente se observó un descenso de 0,9 log₁₀ cfu/cm² de la concentración de ambas cepas. Finalmente, en lechuga envasada (modelo de producto final de origen vegetal), la reducción de la concentración bacteriana fue de 3,9 y 2,2 log₁₀ cfu/g para *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, a los 60 min de tratamiento. El conjunto de los resultados obtenidos permite concluir que los fagos aislados de granjas de animales, en general, infectan a cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* de diferente origen (aves, cerdos y humanos). Asimismo, demuestran la potencialidad del uso del cóctel desarrollado en la desinfección específica de alimentos, tanto en el producto final como en algunos puntos críticos de su producción. Los resultados permitieron concluir que el uso de dichos bacteriófagos en el biocontrol de *Salmonella* puede representar una opción efectiva si es utilizada de manera complementaria a las medidas de buenas prácticas de manufactura, ya utilizadas en la industria alimentaria.

ii

Palabras clave: *Salmonella*, bacteriófagos, lechuga, pollo, huevos, piel, biocontrol.

ii. Summary

Salmonella enterica is one of the leading causes of foodborne disease worldwide. This pathogen is usually transmitted to humans through animal products. However, in the last years, fresh vegetables are also an important source of transmission of *Salmonella*. The different actions that have been proposed as complementary to those usually applied in the food industry produce organoleptic alterations in the final product. In this context, the use of bacteriophages could be an acceptable strategy due to they do not cause change in food and are safe for human health. The aim of this work was to isolate and characterize new phages capable of infecting *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* serovars from swine faecal samples and use a phage cocktail as a disinfectant in different matrices of the food production chain. A method based on the use of a selective enrichment medium for *Salmonella* allowed the isolation of 33 phages from faecal samples obtained in Spanish swine farms during 2007-2009. Later, we studied the biodiversity of 55 phages from our collection, which include the phages isolated in this work and 22 isolated from *Gallus gallus* faeces and obtained in another study of our research group (Bardina, 2011). The results found in that study, which includes the host range with different *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* strains (n=67) and the restriction profile made with six different restriction enzymes, showed that the bacteriophages from poultry farms were different from those from pig farms. In spite of this, both groups of bacteriophages were able to infect *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* strains, regardless of their origin (poultry, pigs or human). Between the phages isolated from swine samples, UAB_Phi78 was selected due to its high host range, and a high and faster lytic capacity. Afterwards, we determined its morphology, its multiplicative cycle, its stability to different temperature and pH conditions and, finally, its genome sequence. Results obtained revealed that UAB_Phi87 is classified as a SP6-like phage, from *Podoviridae* family. Furthermore, it was demonstrated its ability to withstand at 25, 30, and 37°C and pH range from 4 to 9, although its infective capacity diminished significantly at pH 2. On the other hand, we verified its capacity to lyse the bacterial cultures incubated at 4, 25, 30, and 37°C. The analysis of the sequence of its genome did not reveal the existence of known virulence genes. Likewise, we showed that UAB_Phi78 improves significantly the combined lytic

capacity of UAB_Phi20 and UAB_Phi87 to infecting *Salmonella* cultures at 37°C. Thus, the last aim of this thesis was to study the activity of a cocktail composed by the three phages as a disinfectant on different food matrices. It is noteworthy the significant results that were obtained in all matrices. In this way, the phage treatment of pig skin (model of pre-slaughter animal) produced a decrease of 4 and 2 log₁₀ cfu/cm² on *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* concentration respectively, after 6 h of treatment. In chicken breast (meat model), maintained at 4°C for 7 days after treatment with the phage cocktail, we obtained a reduction of 2.2 and 0.9 log₁₀ cfu/g in the concentration of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, respectively. In fresh eggs (model of animal product) the treatment with phages, keeping 2 hours at room temperature, only showed a decrease of 0.9 log₁₀ cfu/cm² in both strains. Finally, in packaged lettuce (model of vegetable product), the reduction of the bacterial concentration was 3.9 and 2.2 log₁₀ cfu/g for *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, respectively, after 60 min of treatment. All these results suggest that in general phages isolated from farm animals infect strains of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* from different sources (poultry, pigs and humans). Moreover, it demonstrates the potential of using a phage cocktail specifically developed for food disinfection, both in final product and in some critical points of production. Finally, all these results allow to conclude that the use of these bacteriophages in the biocontrol of *Salmonella* can be an effective option if used as a complement to the measures of good manufacturing practices already applied in food industry.

iv

Keywords: *Salmonella*, bacteriophage, lettuce, chicken, eggs, skin, biocontrol.

iii. Índice

1. Introducción	1
1.1. El género <i>Salmonella</i>	3
1.1.1. Características generales	3
1.1.2. La salmonelosis en humanos	4
1.1.3. Importancia de <i>Salmonella</i> no tifoidea en salud pública	5
1.1.4. <i>S. enterica</i> y los alimentos	7
1.2. Los bacteriófagos	13
1.2.1. Características generales	13
1.2.2. Taxonomía.....	14
1.2.3. Ciclo biológico	16
1.2.4. Los bacteriófagos de <i>Salmonella</i>	21
1.2.5. Aplicación de los bacteriófagos como desinfectantes en la producción de alimentos.....	21
1.2.6. Productos comerciales basados en fagos	26
2. Objetivos.....	29
3. Material y Métodos	33
3.1. Cepas bacterianas y bacteriófagos	35
3.2. Medios y condiciones de cultivo.....	37
3.3. Técnicas microbiológicas	38
3.3.1. Aislamiento de bacteriófagos desde muestras de campo.....	38
3.3.2. Test de la gota.....	39
3.3.3. Purificación y obtención de lisados fágicos	39
3.3.4. Titulación de los lisados fágicos	41
3.3.5. Estabilidad fágica a diferentes condiciones ambientales.....	41
3.3.6. Cinética de adsorción fágica	42
3.3.7. Parámetros del ciclo biológico fágico	42

3.3.8. Cinética de infección fágica.....	43
3.3.9. Microscopia electrónica.....	44
3.4. Técnicas de biología molecular.....	44
3.4.1. Extracción de DNA	44
3.4.2. Restricción del DNA fágico.....	45
3.4.3. Electroforesis convencional en gel de agarosa.....	45
3.4.4. Electroforesis en campo pulsado.....	46
3.4.5. Secuenciación del DNA	46
3.5. Análisis bioinformáticos.....	46
3.6. Métodos de aplicación de bacteriófagos en diferentes etapas de la cadena alimentaria	47
3.6.1. Superficie animal (piel de cerdo)	47
3.6.2. Carne de pollo	50
3.6.3. Huevos frescos	51
3.6.4. Verduras frescas.....	52
3.7. Análisis estadísticos	53
4. Resultados	55
4.1. Análisis de la diversidad de los bacteriófagos de <i>S. enterica</i>	57
4.2. Selección de bacteriófagos candidatos a desinfectantes.....	64
4.3. Caracterización del bacteriófago UAB_Phi78.....	71
4.3.1. Morfología del fago y tamaño del genoma	72
4.3.2. Efecto de las condiciones ambientales en la estabilidad fágica	73
4.3.3. Parámetros del ciclo multiplicativo	74
4.3.4. Mecanismo de empaquetamiento del DNA	76
4.3.5. Genómica del fago UAB_Phi78	77
4.3.5.1. Estrategia de secuenciación.....	77
4.3.5.2. Identificación de los posibles genes	78
4.3.5.3. Análisis de los promotores.....	83

4.3.5.4.	Control traduccional	84
4.3.5.5.	Terminadores de transcripción.....	85
4.3.5.6.	Organización del genoma del fago UAB_Phi78	86
4.3.5.7.	Comparación del fago UAB_Phi78 con otros fagos tipo SP6.....	88
4.4.	Desinfección basada en fagos aplicada a diferentes etapas de la producción de alimentos.....	90
4.4.1.	Desinfección de la superficie animal	91
4.4.2.	Desinfección de carne	93
4.4.3.	Desinfección de huevos	96
4.4.4.	Desinfección de lechuga	98
4.4.5.	Efecto de cada uno de los fagos del combinado en la desinfección de la lechuga.....	100
5.	Discusión.....	105
5.1.	Diversidad de fagos de <i>Salmonella</i> en granjas de animales.....	107
5.2.	UAB_Phi78: un nuevo fago del género tipo SP6	109
5.3.	Desinfección basada en fagos: una herramienta para el control de <i>Salmonella</i> ..	111
6.	Conclusiones.....	121
7.	Bibliografía.....	125
	Agradecimientos.....	153
	Anexo: Medios y Soluciones.....	157

iv. Índice de Figuras

Figura 1.1. Prevalencia de la salmonelosis humana entre 2005 y 2009.	6
Figura 1.2. Notificación de casos humanos de zoonosis confirmados en la UE durante el año 2009.	6
Figura 1.3. Morfología de los bacteriófagos.	14
Figura 1.4. Ciclo lítico del bacteriófago T4.	16
Figura 1.5. Fases del ciclo lítico de los bacteriófagos.	17
Figura 3.1. Secuencia de muestreo con hisopo de la superficie de la piel de cerdo.	49
Figura 4.1. Patrones de digestión del DNA de los fagos estudiados con la enzima de restricción <i>EcoRV</i> .	59
Figura 4.2. Patrones de digestión del DNA de los fagos estudiados con la enzima de restricción <i>XbaI</i> .	59
Figura 4.3. Dendrograma y mapa factorial de los grupos de fagos según el análisis de correspondencia múltiple realizado con el programa SPAD v5.0.	64
Figura 4.4. Cinética de infección del bacteriófago UAB_Phi78 a una MOI de 1 sobre las cepas <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. Enteritidis</i> LK5 a lo largo del tiempo a 37°C, 30°C y 25°C.	67
Figura 4.5. Cinética de infección del bacteriófago UAB_Phi78 a una MOI de 1 sobre las cepas <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. Enteritidis</i> LK5 a lo largo del tiempo a 4°C.	67
Figura 4.6. Perfil de restricción de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87.	68
Figura 4.7. Cinética de infección de los cócteles fágicos A y B a una MOI de 1 sobre las cepas de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. Enteritidis</i> LK5 a lo largo del tiempo a 37°C.	69
Figura 4.8. Cinética de infección de los cócteles fágicos A y B de las serovariedades Virchow, Infantis y Hadar de <i>S. enterica</i> .	71
Figura 4.9. Microscopía electrónica de transmisión del bacteriófago UAB_Phi78.	72
Figura 4.10. Determinación del tamaño del genoma del fago UAB_Phi78 mediante PFGE.	72
Figura 4.11. Cinética de adsorción a 37°C del fago UAB_Phi78 sobre las cepas ATCC 14028 y LK5.	75

Figura 4.12. <i>One-step growth</i> del fago UAB_Phi78 sobre las cepas ATCC 14028 y LK5.	76
Figura 4.13. Determinación de la presencia de extremos <i>cos</i> en el genoma del fago UAB_Phi78 y en el del fago λ como control, mediante restricción con la enzima <i>EcoRV</i> .	77
Figura 4.14. Secuencia consenso de las cajas -10 y -35 de los promotores hipotéticos del genoma del fago UAB_Phi78.	84
Figura 4.15. Secuencia consenso de los RBS del bacteriófago UAB_Phi78.	85
Figura 4.16. Organización génica y modular del fago UAB_Phi78.	87
Figura 4.17. Representación de la distancia filogenética de los fagos del género tipo SP6, realizada con el programa ClustalW2.	88
Figura 4.18. Comparación de la arquitectura génica del fago UAB_Phi78 con la de los fagos tipo SP6.	89
Figura 4.19. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en piel de cerdo.	93
Figura 4.20. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en pechuga de pollo.	95
Figura 4.21. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en huevos frescos.	97
Figura 4.22. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en lechuga romana.	99
Figura 4.23. Diagrama de cajas de la eficacia de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78, UAB_Phi87 y del cóctel compuesto por los tres fagos (1:1:1) en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en lechuga romana mantenida a 25°C durante 60 min.	101
Figura 4.24. Cinética de infección de los bacteriófagos UAB_Phi78, UAB_Phi20, UAB_Phi87 y del cóctel fágico a una MOI de 1 sobre las cepas <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. Enteritidis</i> LK5 a lo largo del tiempo a 25°C.	102
Figura 4.25. Cinética de adsorción a 25°C de los fagos UAB_Phi78, UAB_Phi20, UAB_Phi87 en las cepas <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. Enteritidis</i> LK5.	103

v. Índice de Tablas

Tabla 1.1. Clasificación de los bacteriófagos que infectan a células de los dominios <i>Bacteria</i> y <i>Archaea</i> .	15
Tabla 1.2. Productos existentes en el mercado basados en bacteriófagos.	27
Tabla 3.1. Cepas de <i>Salmonella enterica</i> utilizadas en este trabajo.	36
Tabla 3.2. Cepas de <i>Salmonella enterica</i> utilizadas en los estudios del perfil de infección.	35
Tabla 3.3. Fagos aislados de muestras aviares estudiados en este trabajo.	35
Tabla 4.1. Perfiles de restricción de los fagos estudiados.	58
Tabla 4.2. Patrón de infección de los fagos estudiados sobre cepas de <i>Salmonella</i> no relacionadas clonalmente.	60
Tabla 4.3. Perfiles de infección de los fagos estudiados.	62
Tabla 4.4. Grupos de fagos identificados a través del análisis de correspondencia múltiple.	64
Tabla 4.5. Tipo de halo producido por los fagos aislados en este trabajo sobre cepas de <i>Salmonella</i> no relacionadas clonalmente.	66
Tabla 4.6. Reducción de la concentración de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y <i>S. Enteritidis</i> LK5 debida a su infección con los cócteles A (UAB_Phi20 y UAB_Phi87) y B (UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78).	70
Tabla 4.7. Reducción de la capacidad infectiva del bacteriófago UAB_Phi78 a 4°C.	73
Tabla 4.8. Reducción de la capacidad infectiva del bacteriófago UAB_Phi78 a diferentes temperaturas.	74
Tabla 4.9. Reducción de la capacidad infectiva del bacteriófago UAB_Phi78 tras su exposición a diferentes pH a lo largo del tiempo.	74
Tabla 4.10. Parámetros del ciclo lítico del fago UAB_Phi78.	75
Tabla 4.11. Caracterización de los ORF y proteínas del bacteriófago UAB_Phi78.	79
Tabla 4.12. Posición de los promotores hipotéticos y de sus respectivas cajas -10 y -35 del fago UAB_Phi78.	83
Tabla 4.13. Secuencias y ubicación en el genoma de las mejores posiciones de unión de los ribosomas (RBS) del fago UAB_Phi78 según el programa Glimmer.	84
Tabla 4.14. Posibles terminadores Rho-independientes en el genoma del fago UAB_Phi78.	85
Tabla 4.15. Recuperación de <i>Salmonella</i> de la superficie de la piel de cerdo según dos metodologías.	91

Tabla 4.16. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en piel de cerdo.	92
Tabla 4.17. Concentración de los bacteriófagos en la piel de cerdo contaminada con las cepas UA1872 y UA1894 y tratada con el cóctel fágico.	93
Tabla 4.18. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en pechugas de pollo.	94
Tabla 4.19. Concentración de los bacteriófagos en pechugas de pollo contaminadas con las cepas UA1872 y UA1894 y tratadas con el cóctel fágico.	96
Tabla 4.20. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en huevos frescos.	97
Tabla 4.21. Nivel de contaminación de lechuga romana contaminada según la concentración inicial de <i>S. Typhimurium</i> UA1872.	98
Tabla 4.22. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en lechuga romana.	99
Tabla 4.23. Concentración de los bacteriófagos en lechuga romana contaminada con las cepas UA1872 y UA1894 y tratada con el cóctel fágico.	100
Tabla 4.24. Eficacia de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78, UAB_Phi87 y del cóctel en la reducción de <i>S. Typhimurium</i> UA1872 y <i>S. Enteritidis</i> UA1894 en lechuga romana, mantenida a 25°C durante 60 min.	100
Tabla 4.25. Concentración de los bacteriófagos en lechuga romana contaminada con las cepas UA1872 y UA1894 y tratada a 25°C durante 60 min con los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78, UAB_Phi87 y con el cóctel fágico.	101

1. Introducción

1.1. El género *Salmonella*

1.1.1. Características generales

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y comprende bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos y móviles por flagelos peritricos, con excepción de las serovariedades Gallinarum y Pullorum (Wilcock y Schwartz, 1993). Estas bacterias son capaces de crecer a temperaturas de 7 a 45°C y a pH entre 4,5 y 9,0 y son también resistentes a la desecación y a la congelación (Wilcock y Schwartz, 1993). En general, no fermentan la lactosa, pero algunas veces lo hacen lentamente (Libby *et al.*, 2008). Bioquímicamente son indol negativas, producen ácido sulfhídrico y tienen la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, no hidrolizan la urea y descarboxilan la lisina y la ornitina (Holt *et al.*, 1994).

En la actualidad, el género *Salmonella* está dividido en tres especies: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea* (Shelobolina *et al.*, 2004; Su y Chiu, 2007). A su vez, en *S. enterica* se han distinguido seis subespecies (subsp.): *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Su y Chiu, 2007). A nivel práctico, se utiliza el esquema de identificación de Kauffmann & White que divide a este género en tipos serológicos (serovariedades) en base a los antígenos O (somático), Vi (capsular) y H (flagelar). Se conocen más de 2.500 serovariedades con una vasta distribución en la naturaleza, de las cuales aproximadamente el 60% pertenecen a la subespecie *enterica* y colonizan a aves y mamíferos. En esta subespecie se incluyen casi todas las serovariedades que causan enfermedades en animales y humanos (Libby *et al.*, 2008).

La mayoría de las serovariedades de *S. enterica* son patógenas intracelulares que generalmente colonizan el tracto intestinal y pueden ser clasificadas según el grado de adaptación a su huésped. Entre las altamente adaptadas se encuentran las serovariedades que infectan exclusivamente a una especie animal, como por ejemplo *S. Typhi* en humanos. En un segundo grupo, se incluyen las serovariedades que están adaptadas a su huésped, como Cholerasuis a cerdos y Dublin a ganado vacuno, aunque excepcionalmente pueden causar enfermedades en otras especies animales. Sin embargo, la gran mayoría de serovariedades pertenece a un último grupo, donde se encuentran las *Salmonella* no tifoideas, que infectan a varios huéspedes

indistintamente como, por ejemplo, las serovariedades Enteritidis y Typhimurium (Neidhardt *et al.*, 1996; Libby *et al.*, 2008). Esta adaptación al huésped influye en el tipo y en la gravedad de la infección causada. Así, las serovariedades adaptadas al huésped producen enfermedades sistémicas graves tanto en individuos jóvenes como en adultos, mientras que las serovariedades no adaptadas están asociadas a enfermedades entéricas, principalmente en huéspedes jóvenes (Libby *et al.*, 2008).

1.1.2. La salmonelosis en humanos

S. enterica puede causar desde infecciones locales como osteomielitis, meningitis y enterocolitis, hasta enfermedades sistémicas como bacteriemia o fiebre tifoidea (Neidhardt *et al.*, 1996; Ellermeier y Sauch, 2006). Sin embargo, la gastroenteritis suele ser el cuadro clínico más habitual en humanos en el caso de infecciones por serovariedades no tifoideas (Shere *et al.*, 1998).

El progreso de la infección dependerá de la dosis infectiva, de la serovariedad del patógeno y del estado inmunológico del huésped. La dosis infectiva mínima en individuos sanos está comprendida entre 10^5 y 10^6 células bacterianas, mientras que en individuos con factores de riesgo como la edad, inmunodepresión o procesos subyacentes (leucemia, linfoma, drepanocitosis), cirugía gastrointestinal, disminución de la acidez gástrica u otras causas debilitantes, como la desnutrición, dicha dosis es de 10^3 (Gray, 1995; Miller *et al.*, 1995).

La gastroenteritis por *S. enterica* es prácticamente indistinguible de la producida por otros patógenos intestinales. Después de un período de incubación de 6 a 48 horas, aparece súbitamente un cuadro clínico con náuseas y vómitos, seguidos de dolor abdominal tipo cólico y diarrea. En casos graves puede aparecer fiebre alta y sangre en las heces, acompañada de deshidratación (Ellermeier y Sauch, 2006).

Los síntomas suelen persistir durante 3 a 7 días, en el transcurso de los cuales, la enfermedad se cura espontáneamente sin complicaciones, aunque a veces puede prolongarse semanas. Después de resolverse la gastroenteritis, la persistencia del patógeno en las heces puede durar de 4 a 5 semanas, dando lugar a un estado de portador (Ellermeier y Sauch, 2006).

La transmisión al hombre puede producirse por contacto directo con animales portadores, con humanos infectados o por ambientes contaminados con heces. En general, los brotes en humanos están relacionados con productos de origen animal contaminados, como consecuencia de la introducción del microorganismo en las áreas de preparación de los alimentos y el consecuente crecimiento del patógeno, debido a inadecuadas temperaturas de conservación y cocción o a la contaminación cruzada con alimentos preparados, listos para el consumo (EFSA, 2011).

1.1.3. Importancia de *Salmonella* no tifoidea en salud pública

S. enterica es mundialmente conocida como una de las principales causas de toxiinfección alimentaria. Los datos más recientes de la Unión Europea (UE), presentados en el informe de zoonosis del *European Food Safety Authority* (EFSA) del año 2011, señalan que, en el año 2009, la salmonelosis continuaba siendo la segunda enfermedad zoonótica más reportada en la UE, a pesar de su progresiva reducción en los cinco años precedentes (Figuras 1.1 y Figura 1.2). Así, en el año 2009 se comunicaron un total de 108.614 casos, con una tasa de notificación de 23,7 casos por 100.000 habitantes. Dicha tasa fue más alta en niños de la franja etaria de 0 a 4 años (112,4/100.000 habitantes), siendo ésta tres veces mayor que la de la franja de 5 a 14 años y entre seis y nueve veces superior a la de individuos mayores de 15 años. En España, en este mismo periodo, se identificaron 4.304 casos, presentando una tasa de notificación de 37,6 casos por 100.000 habitantes. El informe señala que las serovariedades que más prevalecieron en los casos confirmados fueron Typhimurium (23,3%) y Enteritidis (52,3%).

5

La importancia de la salmonelosis viene corroborada por los datos del estadounidense *Center for Disease Control and Prevention* (CDC). Según un informe del 2008, se reportaron más de 40.000 casos de salmonelosis en los EE.UU. en el año 2006, siendo la mayoría de ellos causados por las serovariedades Typhimurium (16,9%) y Enteritidis (16,6%) (CDC, 2008). Se estima que, en el último lustro, el coste económico fue superior a los de 2.300 millones de dólares anuales en este país, considerando 1,4 millones de infecciones por *Salmonella* no tifoidea (ERS, 2011).

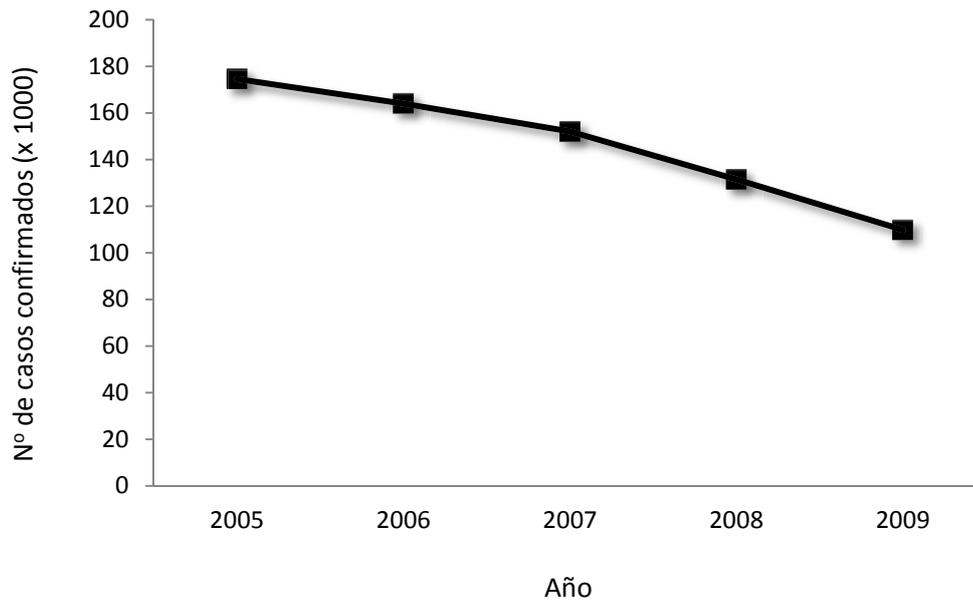


Figura 1.1. Prevalencia de la salmonelosis humana entre 2005 y 2009 (EFSA, 2011).

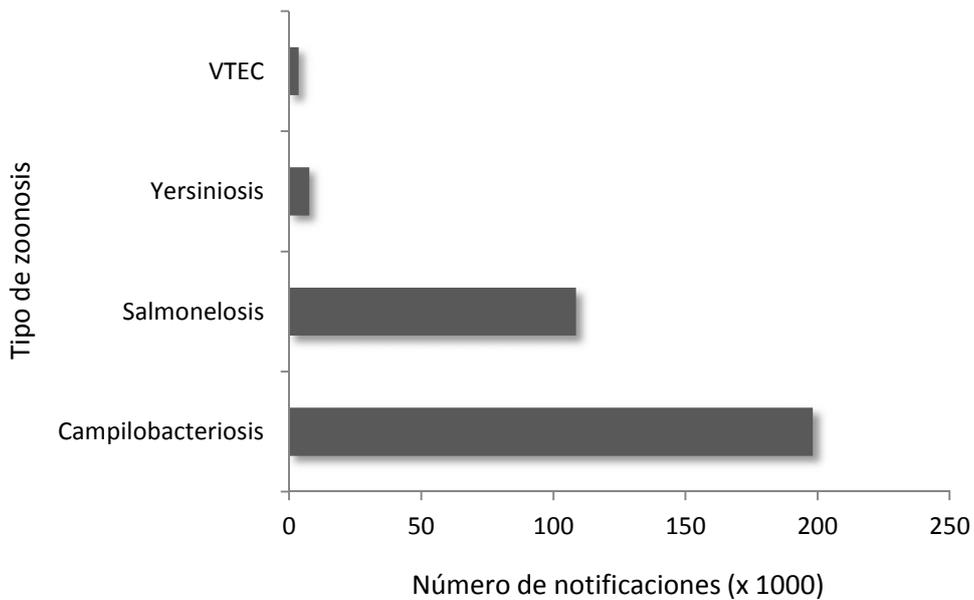


Figura 1.2. Notificación de casos humanos de zoonosis confirmados en la UE durante el año 2009. VTEC, *Escherichia coli* verotoxigénica.

Los datos de la UE del año 2008 (EFSA, 2010), señalan que la mayoría de los brotes de salmonelosis alimentaria se relacionaron en primer lugar con el consumo de huevos y sus derivados y en segundo lugar con la carne de pollo, siendo *S. Enteritidis* la serovariedad más común en todos ellos. La tercera fuente de *Salmonella* fue, principalmente, la carne de cerdo asociada a *S. Typhimurium*. Se concluye que la reducción de los casos de salmonelosis observada en los últimos años se debe

principalmente al éxito de los programas de control de *Salmonella* en aves (*Gallus gallus*) (EFSA, 2011).

1.1.4. *S. enterica* y los alimentos

Actualmente, la superpoblación de las granjas de producción animal propicia un contacto estrecho entre los individuos. Esta proximidad junto con el consiguiente estrés genera unas condiciones óptimas para que *S. enterica* cause infecciones y se disemine rápidamente dentro de la manada. La diseminación entre los individuos también ocurre durante el transporte de los animales y en el corral de espera antes de su sacrificio. De este modo, los animales introducen estos patógenos en la planta de procesamiento, dando lugar a su dispersión en dicha planta por contaminación cruzada. La situación se agrava cuando no se realiza una limpieza adecuada de las instalaciones, máquinas, mesas y herramientas o cuando no se tiene una rigurosa disciplina en la higiene de los manipuladores (White *et al.*, 1997; Swanenburg *et al.*, 2001; Corry *et al.*, 2002; Slader *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2003).

En el caso de los productos de origen vegetal, la contaminación por *Salmonella* está asociada principalmente a fertilizantes de origen animal y al agua de irrigación que puede estar contaminada por heces (Natvig *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2004). La contaminación en estos productos también puede ocurrir durante su procesamiento, transporte y comercialización (Lapidot *et al.*, 2006).

7

Es importante destacar que, anualmente, los estados miembros de la UE deben informar sobre la prevalencia de *Salmonella* en animales y alimentos. El Reglamento (CE) nº 2073/2005 modificado por el Reglamento (CE) nº 1441/2007 establece las normas para el muestreo y el análisis y fija los límites de la presencia de *Salmonella* en las categorías específicas de alimentos y sus productos procesados. De acuerdo con la actual reglamentación, este microorganismo debe estar ausente en 25 g de los productos de origen animal y vegetal, entre los que se incluyen carne de aves y cerdos, quesos y productos preparados, como verduras y frutas frescas envasadas.

A continuación, se describe la situación actual de la prevalencia de *Salmonella* en productos de origen aviar, porcino y vegetal.

Productos de origen aviar

En 2009, el 5,4% de las muestras de origen aviar analizadas (n= 26.595) fueron positivas para *Salmonella* en la UE (EFSA, 2011). Estas muestras incluyen tomas en el momento del sacrificio de los animales, durante su procesamiento y en los puntos de venta. En general, las muestras del primer tipo presentan el índice de prevalencia más elevado en todos los países de la UE. En el caso de España, se observó una prevalencia del 26,7%, 5,7% y 13,8%, respectivamente, siendo estos valores más altos que los de la mayoría de países europeos (EFSA, 2011). En otro estudio piloto de la UE realizado en 2008 con canales de pollos (n= 10.132), el promedio de la prevalencia de *S. enterica* en los 26 estados miembros más Noruega y Suiza fue del 15,6%, variando del 0% al 26,6%, con excepción de Hungría con un 85,6% (EFSA, 2011).

Las cifras también muestran que en el año 2009, el 0,5% de las muestras de huevos analizadas en la UE fueron positivas para *Salmonella*. En España, la prevalencia fue del 0,2%, valor muy inferior al obtenido el año anterior, el cual alcanzó el 6,3% (EFSA, 2011).

8

En este contexto, una revisión realizada por Fletcher (2006) de 81 publicaciones entre 1961 y 2004, indica que el promedio de la prevalencia fue similar en las diferentes partes del mundo en diferentes décadas, a pesar de que existe una gran diversidad metodológica. Según este autor, desde 1998 y a pesar del éxito de los programas de control de *Salmonella* en aves, la reducción de la prevalencia de este patógeno en la granja no genera cambios muy visibles en los productos que llegan al consumidor final. El promedio de prevalencia que se indica en esta revisión es de aproximadamente el 29%, valor significativamente superior a los reportados por la EFSA para el periodo 2000-2004 en el conjunto de la UE, el cual no alcanzaba el 20% (EFSA, 2006).

Productos de origen porcino

En el año 2009, se detectó *Salmonella* en el 0,7% de las muestras de carne de cerdo comercializada en la UE (n= 83.797), valor que corresponde a la mitad de muestras positivas determinadas el año anterior. En España, la prevalencia fue la más alta de todo el conjunto de países de la UE, al registrarse un 3,5% de muestras

positvas. Sin embargo, estos valores son considerablemente inferiores a los obtenidos en los años 2006 y 2007 con un 12,7% y un 6,1%, respectivamente (EFSA, 2011).

En estudios independientes, la prevalencia de *Salmonella* en productos porcinos es bastante parecida a los primeros datos oficiales arrojados por la UE referentes a los años 2000-2004, los cuales variaran entre 0 y 13% (EFSA, 2006). En este mismo período, en Inglaterra, Irlanda e Italia la prevalencia estuvo comprendida entre el 3,3 y el 9,9% (Mattick *et al.*, 2002; Boughton *et al.*, 2004; Giovannini *et al.*, 2004), siendo similar a la encontrada en los EE.UU. (Duffy *et al.*, 2001). Cabe también señalar que, en España, en el año 2004, se aisló *Salmonella* en el 13,6% de las muestras de carne de cerdo ibérico estudiadas (Pala y Sevilla, 2004).

Productos de origen vegetal

Son muy pocos los casos reportados en la UE de alimentos de origen vegetal contaminados por *S. enterica*, lo que puede ser una consecuencia del bajo número de muestras analizadas, sobre todo si se compara con los productos de origen animal. En el año 2009, España fue el único país que reportó dos casos positivos de *Salmonella* (0,8%) en ensaladas envasadas (n= 248), mientras que en los otros estados miembros que analizaron este tipo de alimento no se detectó ningún caso positivo (n = 4.251).

9

A pesar de que cada vez se producen con mayor frecuencia brotes de salmonelosis asociados a productos vegetales, los estudios de prevalencia en estos alimentos son muy escasos (Ercolani, 1976; Mahon *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 1998; Hedberg *et al.*, 1999; Mohle-Boetani *et al.*, 1999; Burnett y Beuchat, 2000; Campbell *et al.*, 2001). En un análisis realizado en los EE.UU. con 48 tipos diferentes de frutas y vegetales durante tres años, se aisló *Salmonella* en al menos el 18% de los productos envasados que mostraron alguna ligera alteración y en el 9% de los que estaban en buen estado (Wells y Butterfield, 1997).

Medidas para combatir la presencia de *S. enterica* en los alimentos

Durante muchos años, se utilizaron amplia y eficazmente los antimicrobianos como promotores de crecimiento en producción animal, ya que controlaban los microorganismos patógenos, incluyendo los zoonóticos. No obstante, esta práctica ha

significado una presión selectiva hacia bacterias multiresistentes y también la posibilidad de que residuos de los antimicrobianos permanezcan en los productos de origen animal y sean finalmente consumidos por el hombre (Chung *et al.*, 2003; Donoghue, 2003). Debido a estos inconvenientes, el Reglamento (CE) n° 1091/2005 de la UE desaconsejó su empleo como parte de los programas nacionales de control de *Salmonella*.

En la última década, como consecuencia de la preocupación del alto impacto de la salmonelosis no tifoidea en humanos, junto a las restricciones sobre el uso de antimicrobianos, las diferentes autoridades reguladoras han proclamado la necesidad de implementar una actuación integrada. Esta actuación debe iniciarse con una rigurosa vigilancia en la granja, seguida del mantenimiento de un elevado control sanitario y de limpieza en las industrias y finaliza con la concienciación de la población sobre la necesidad de mantener la cadena de frío para evitar así contaminaciones cruzadas en el consumo de los alimentos (Jacob y Powell, 2009; Schiller, 2009).

10

Como ya se ha comentado anteriormente, en la UE existe una reglamentación para la regulación y el análisis de *Salmonella* en los alimentos. Sin embargo, los programas de control existentes no se limitan a los productos finales, sino que también están presentes en los diferentes niveles de la producción animal. El Reglamento (CE) n° 2160/2003, obliga a los países miembros de la UE a realizar programas de control de las cinco principales serovariedades de mayor impacto en el sector avícola (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* y *S. Hadar*). Posteriormente, otros reglamentos establecieron metas de reducción más concretas de estas serovariedades en las granjas de reproductoras (Reglamento [CE] n° 1003/2005), de ponedoras (Reglamento [CE] n° 1168/2006) y de pollos de engorde (Reglamento [CE] n° 646/2007) de *Gallus gallus*.

La aplicación de estas regulaciones está produciendo un efecto significativo no solamente a nivel del control de las cinco serovariedades más importantes, sino en la reducción global de *Salmonella* en los distintos estadios productivos de las granjas aviares de *Gallus gallus*. Ello se ve confirmado por los datos de los países del norte de Europa, en los cuales la prevalencia de *Salmonella* es muy baja, llegando incluso a ser

nula en algunos casos. Probablemente, estos buenos resultados deben ser una consecuencia de la implementación en estos países de los programas de control mencionados, con anterioridad a los demás países de la UE (EFSA, 2010; EFSA, 2011).

Uno de los pilares de dichos programas es la vacunación, principalmente de gallinas ponedoras y reproductoras. Desde de los años 1950, se han utilizado ampliamente vacunas atenuadas de *S. Gallinarum* en la explotación aviar (Zhang-Barbera *et al.*, 1999) y, actualmente, es la medida de control más utilizada en manadas de *Gallus gallus*. No obstante, cabe destacar que dichas vacunas solamente están dirigidas a las serovariedades adaptadas al huésped (*S. Gallinarum* y *S. Pullorum*) y a las más frecuentemente asociadas a infecciones en humanos (*S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*), no contemplando todas las otras serovariedades de importancia zoonótica (EFSA, 2004). Además, la vacunación no es adecuada en los pollos de engorde, ya que el coste del tratamiento y la falta de efecto positivo junto con la corta vida útil de estas aves dificultan las pautas de inmunización (EFSA, 2004).

A pesar de las diversas estrategias utilizadas, todavía no se ha conseguido la erradicación de *Salmonella* en el sector aviar ni una reducción adecuada en pollos de engorde. Debe destacarse en este punto que en otros sectores productivos como el porcino o el vacuno, la UE está en fase de recolección de datos sobre la prevalencia de *Salmonella* y aún no se ha implementado ningún programa de control. Esta situación indica que hay una necesidad de incorporar nuevas estrategias en la lucha contra este patógeno.

De este modo, en los últimos años, se han propuesto diferentes medidas alternativas o complementarias para el control de microorganismos zoonóticos, incluyendo *Salmonella*, en las explotaciones animales. Entre ellas, se destacan dietas de distinta composición y los bacteriófagos. Respecto a la primera medida, se ha propuesto incrementar el contenido proteico, el aporte de fibra o la acidificación del contenido del tracto gastrointestinal para dificultar la supervivencia de *Salmonella* y promover la propia microbiota (Hume *et al.*, 1997; Udayamputhoor *et al.*, 2003; Doyle y Erickson, 2006; Van Immerseel *et al.*, 2006; Donalson *et al.*, 2008). El uso de prebióticos y simbióticos que estimulan la microbiota intestinal y dificultan el

establecimiento de *Salmonella* son también estrategias ampliamente sugeridas (Methner *et al.*, 1997; Grizard y Barthomeuf, 1999; Higgins *et al.*, 2007). Por otra parte, el uso de bacteriófagos y sus derivados (como los enzibióticos) está resurgiendo como una estrategia prometedora. Una mejor comprensión de la biología de los bacteriófagos ha permitido optimizar los resultados de su uso para el control bacteriano, reavivando así su interés y estudio (Sklar y Joerger, 2001; Toro *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008).

La aplicación de todas estas medidas a nivel de la explotación animal es fundamental para el completo control de *Salmonella*. No obstante, es necesario señalar que posiblemente por más medidas que se apliquen en dicha etapa de la cadena de producción de alimentos, se alcanzará un límite en el cual la calidad microbiológica del producto final no obtendrá mejoras (Berends *et al.*, 1998; Alban y Stärk, 2005; Fletcher, 2006). En otras palabras, deben tomarse también nuevas medidas de control en la fase de procesamiento o posprocesamiento de los alimentos. En esta línea, un estudio sobre el impacto de la *Salmonella* en la salud humana concluyó que el método más eficiente y rentable para reducir la salmonelosis sería la descontaminación de los canales, bajo la condición de que en toda la cadena de producción se aplicaran estrictamente las buenas prácticas de fabricación (Berends *et al.*, 1998). De este modo, se han probado algunas estrategias para la descontaminación de canales y productos finales de ternera, cerdos y aves. Los métodos van desde agua caliente al vacío (Gill y Bryant, 1997) y sumergir o pulverizar con ácidos orgánicos (Soares, 1997; Bajaj *et al.*, 2003; Dubal *et al.*, 2004; King *et al.*, 2005) hasta la combinación de ambos métodos (Castelo *et al.*, 2001; Pipek *et al.*, 2006). Sin embargo, estos procedimientos conllevan una indeseable alteración organoléptica de la carne.

Los bacteriófagos se perfilan también como una medida prometedora en la descontaminación de productos de origen animal y vegetal (ver apartado 1.2.5). Los fagos pueden ser considerados como una de las mejores opciones de medida complementaria a los métodos actuales de biocontrol de *Salmonella* en dichos productos alimentarios ya que se trata de componentes naturales, no tóxicos, específicos de huésped y de bajo coste y, además, no causan alteraciones en los alimentos.

1.2. Los bacteriófagos

1.2.1. Características generales

Los bacteriófagos, también denominados fagos, son virus que infectan solamente a bacterias con una elevada especificidad de huésped. Cada partícula fágica (virión) contiene un genoma de ácido nucleico (DNA o RNA) dentro de una envuelta proteica o lipoproteica, denominada cápside. Este conjunto es conocido como nucleocápside (Guttman *et al.*, 2005).

Los fagos son los entes más abundantes en la naturaleza, se han aislado de todos los ambientes explorados y se estima que en nuestro planeta debe haber del orden de 10^{31} individuos (Hendrix, 2003). Su ubicuidad se debe a que los fagos proliferan en los ambientes que colonizan sus huéspedes bacterianos, ya que necesitan de su maquinaria celular para multiplicarse (Goyal *et al.*, 1987; Hendrix *et al.*, 1999). Hasta la fecha se han identificado bacteriófagos que infectan a más de 144 géneros del dominio *Bacteria* y a 10 géneros del dominio *Archaea* (Rowher *et al.*, 2002; Ackermann, 2003).

Los fagos fueron descubiertos de forma independiente por Twort (1915) y d'Herelle (1917) y desde la década de 1930 han sido un modelo para investigar aspectos de la Virología, como la estructura de los viriones, su morfogénesis, genética y replicación. Además, también han sido utilizados como modelo para el estudio de la genética bacteriana y de los mecanismos de regulación de la expresión génica, debido a que sus huéspedes bacterianos son fácilmente cultivables y manejables en el laboratorio (Summers, 2005). Su potencial como antibacterianos fue ya enunciado por d'Herelle (1926), el cual estudió su eficacia terapéutica contra *S. enterica* serovariedad Gallinarum. Sin embargo, con el descubrimiento de los antibióticos, el uso y la investigación sobre las aplicaciones terapéuticas de los fagos cayó en el olvido en los países occidentales, permaneciendo sólo en algunos países del este de Europa y en la antigua Unión Soviética (Goode *et al.*, 2003; Joerger, 2003).

1.2.2. Taxonomía

En el momento de su descubrimiento, Felix d’Hérelle creía que sólo había un único bacteriófago (*Bacteriophagum instestinale*) integrado por muchas “razas” (d’Herelle, 1918 apud Ackermann, 2005). Hoy en día, se conocen 17 familias de bacteriófagos (Tabla 1.1 y Figura 1.3). Tres de ellas, *Myoviridae*, *Podoviridae* y *Siphoviridae*, conforman el orden *Caudovirales*, mientras que las restantes no están asignadas a ningún orden, además existen tres géneros no clasificados en ninguna familia (ICTV, 2009).

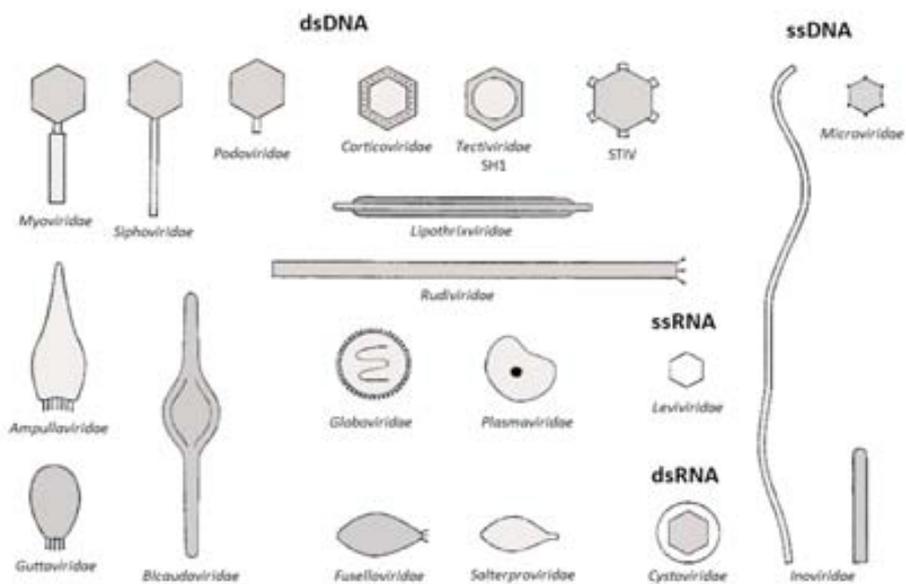


Figura 1.3. Morfología de los bacteriófagos (modificado de Ackermann, 2005).

El 96,2 % de los fagos estudiados hasta la actualidad presentan cola y están asignados al único orden definido, el orden *Caudovirales*. Los fagos de este orden se caracterizan por poseer DNA de doble cadena, no tener envuelta lipídica y presentar simetría binaria, debida a la simetría cúbica de sus cápsides y a la simetría helicoidal de sus colas (Ackermann, 2005). El orden *Caudovirales* está compuesto por un 25% de fagos con cola larga y contráctil (familia *Myoviridae*), un 61% con cola larga no contráctil (familia *Siphoviridae*) y el 14% restante con cola corta (*Podoviridae*) (Ackermann, 2007).

Tabla 1.1. Clasificación de los bacteriófagos que infectan a células de los dominios *Bacteria*[†] y *Archaea*^{*} (adaptado de ICTV, 2009).

Orden	Familia	Subfamilia	Género	Nº de especies		
Caudovirales	<i>Myoviridae</i> [*]		Tipo I3	1		
			Tipo Mu	1		
			Tipo P1	2		
			Tipo P2	2		
			Tipo PhiH	1		
			PhiKZ	3		
			Tipo SPO1	1		
			Tipo T4	8		
			No asignado	3		
		<i>Podoviridae</i> [†]	<i>Autographivirinae</i>		Tipo PhiKMV	2
					Tipo SP6	5
					Tipo T7	3
					No asignado	3
			<i>Picovirinae</i>		Tipo AHJD	2
				Tipo Phi29	4	
				No asignado	3	
	No asignado			Tipo BPP-1	3	
				Tipo Epsilon15	2	
				Tipo LUZ24	2	
			Tipo N4	1		
			Tipo P22	4		
			Tipo Phieco32	1		
			No asignado	8		
	<i>Siphoviridae</i> ^{*†}		Tipo c2	2		
			Tipo L5	2		
			Tipo Lambda	3		
			Tipo N15	1		
			Tipo PhiC31	1		
			Tipo PsiM1	1		
			Tipo SPbeta	1		
			Tipo T1	1		
			Tipo T5	2		
		No asignado	<i>Ampullaviridae</i> [†]		<i>Ampullavirus</i>	1
<i>Bicaudaviridae</i> [†]			<i>Bicaudavirus</i>	1		
<i>Corticoviridae</i> [†]			<i>Corticovirus</i>	1		
<i>Cystoviridae</i> [†]			<i>Cystovirus</i>	1		
<i>Inoviridae</i> [†]			<i>Inovirus</i>	36		
			<i>Plectrovirus</i>	7		
<i>Fuselloviridae</i> [*]			<i>Fusellovirus</i>	1		
<i>Globuloviridae</i> [†]			<i>Globulovirus</i>	2		
<i>Guttaviridae</i> [*]			<i>Guttavirus</i>	1		
<i>Leviviridae</i> [†]			<i>Allolevivirus</i>	2		
			<i>Levivirus</i>	2		
<i>Lipothrixviridae</i> [*]			<i>Alphalipothrixvirus</i>	1		
			<i>Betalipothrixvirus</i>	6		
			<i>Deltalipothrixvirus</i>	1		
			<i>Gammalipothrixvirus</i>	1		
<i>Microviridae</i> [†]	<i>Gokushovirinae</i>			<i>Bdellomicrovirus</i>	2	
				<i>Chlamydiamicrovirus</i>	4	
				<i>Spiromicrovirus</i>	1	
			No asignado	<i>Microvirus</i>	5	
<i>Plasmaviridae</i> [†]			<i>Plasmavirus</i>	1		
<i>Rudiviridae</i> [*]			<i>Rudivirus</i>	3		
<i>Tectiviridae</i> [†]			<i>Tectivirus</i>	4		
		No asignado	1			
	No asignado	<i>Salterprovirus</i> [*]	1			
		Tipo STV1 [†]	1			
		Tipo SH1 [†]	1			

1.2.3. Ciclo biológico

Los fagos pueden ser líticos, lo cual normalmente conlleva la destrucción de la célula huésped (Figura 1.4) o atenuados, los cuales, además de poder desarrollar un ciclo lítico, experimentan un ciclo lisogénico en el que el genoma del virus se integra en el cromosoma bacteriano o se mantiene en el citoplasma celular en un estado conocido como profago (Huff *et al.*, 2005). En el ciclo lítico, toda la maquinaria metabólica de la bacteria es secuestrada para replicar y transcribir el DNA fágico y formar la nueva progenie. En términos de terapia y desinfección con fagos, es deseable que éstos sean líticos para minimizar al máximo la posible transducción de genes. Por ello, esta revisión se centrará en exponer las características del ciclo lítico.

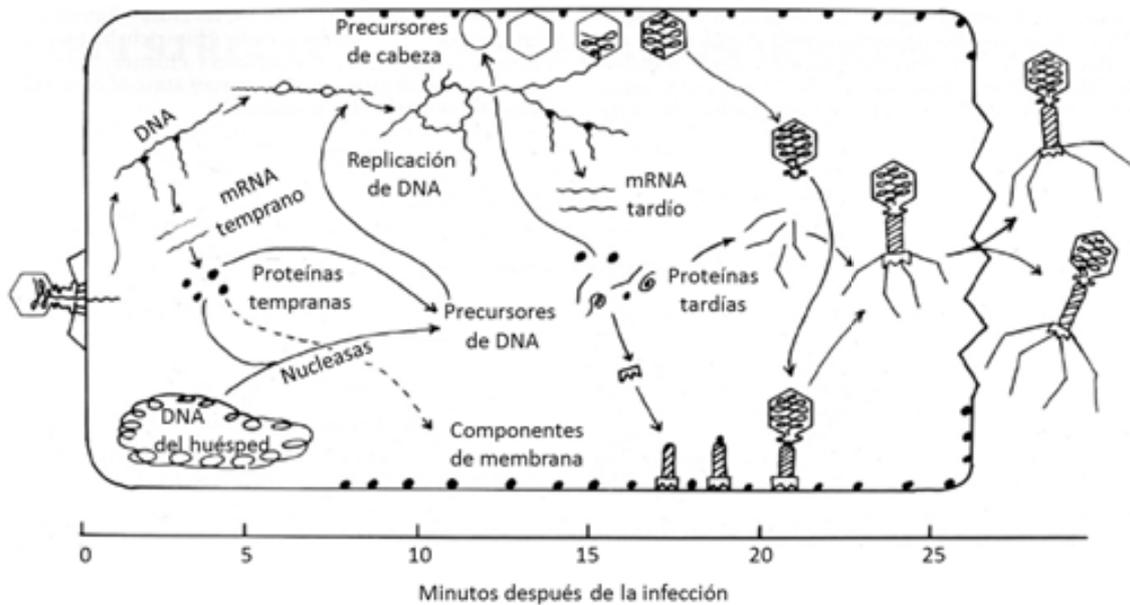


Figura 1.4. Ciclo lítico del bacteriófago T4 (modificado de Mathews *et al.*, 1983).

El ciclo lítico de cualquier fago consta de varias etapas: (i) adsorción del virus a la bacteria por reconocimiento específico de su receptor bacteriano e inyección de su ácido nucleico en el citoplasma celular; (ii) expresión de los genes tempranos del fago, lo que permite la síntesis de proteínas involucradas en la replicación del genoma vírico; (iii) replicación del genoma fágico; (iv) síntesis de las proteínas víricas de expresión tardía implicadas en la formación de las nuevas partículas y en la lisis celular; (v) empaquetamiento del DNA y ensamblaje de las nuevas partículas y (vi) destrucción de

Fase de adsorción e inyección

La infección por fagos con cola comienza cuando las estructuras especializadas de la adsorción, como las fibras o las espículas, se unen a moléculas específicas de la superficie de la bacteria diana. Teóricamente, en las bacterias gramnegativas, cualquier proteína, oligosacárido o lipopolisacárido de pared, cápsula, flagelo e incluso pili, puede actuar como receptor fágico (Guttman *et al.*, 2005). Esta amplia variedad de receptores celulares han dotado a algunos fagos de la capacidad de cambiar sus sitios de reconocimiento o expresar diferentes adhesinas, permitiéndoles un mayor potencial, éxito y flexibilidad para infectar (Henning y Hashemol-Hosseini, 1994; Abedon *et al.*, 2001; Scholl *et al.*, 2001). Aunque estos entes tengan una elevada afinidad por sus receptores, la velocidad y la eficiencia de la adsorción son parámetros importantes que pueden variar en función de los factores externos y del estado fisiológico del huésped (Guttman *et al.*, 2005).

18

En un primer momento, la unión fago-bacteria es reversible, pero una reorganización de la base de la cola permite el correcto posicionamiento del bacteriófago para que dicha unión se torne irreversible (Kutter *et al.*, 2005). Tras el proceso de adsorción, el material genético fágico es inyectado en el citoplasma bacteriano a través de la proteína portal, que se encuentra en la zona de unión entre la cápside y la cola. La internalización del DNA fágico en el citoplasma es posible debido al poro creado en la membrana bacteriana por el efecto de las proteínas de la cola y del núcleo interno del fago. Este proceso requiere un aporte energético que posiblemente se consiga por el establecimiento de un potencial electroquímico en la membrana, lo que permite la entrada de una parte del genoma. Finalmente, se finaliza la internalización con la ayuda de las proteínas inyectoras del propio bacteriófago que además protegen al material genético fágico de los mecanismos de restricción de la célula huésped (Kutter *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2007).

Replicación y empaquetamiento

El origen de replicación de los fagos, de forma similar a la mayoría de los orígenes de replicación, se caracteriza por ser una región no codificante, con alto contenido en AT y con numerosas repeticiones directas e invertidas (Keppel *et al.*,

1988). El proceso de replicación se inicia en θ y posteriormente en círculo rodante, formándose así los concatámeros de DNA.

En general, el paso inicial implica el reconocimiento por la RNA polimerasa del huésped de los promotores fuertes del fago, lo que lleva al inicio de la transcripción de los genes tempranos fágicos. Los productos de estos genes pueden proteger al genoma del fago, inactivando las proteasas bacterianas, bloqueando las enzimas de restricción, eliminando directamente la biosíntesis de macromoléculas celulares o destruyendo algunas proteínas del huésped. Entonces, se transcribe un conjunto de genes de expresión intermedia, lo que permite la síntesis de las nuevas cadenas de DNA fágico. Seguidamente, se expresan los genes de expresión tardía que codifican las proteínas de la cápside y de la cola y las enzimas relacionadas con la lisis celular. Estos genes, en algunos casos, también codifican factores sigma para reprogramar la RNA polimerasa del huésped o incluso su propia RNA polimerasa (Guttman *et al.*, 2005).

Las terminasas fágicas son las proteínas que se unen al DNA fágico e inician el proceso de translocación o empaquetamiento del DNA. Estas proteínas reconocen unas secuencias determinadas, que marcan el inicio y fin de cada copia del genoma en el concatámero y permiten el corte del DNA para su posterior translocación. La secuencia reconocida puede ser de repetición única (secuencias *cos*), de repetición no única (secuencias *pac*, las cuales generan redundancia terminal) o secuencias misceláneas (sin secuencia concreta o con una proteína unida covalentemente) (Fujisawa y Morita, 1997). Normalmente, el sistema de empaquetamiento está formado por dos terminasas que forman un complejo. La subunidad pequeña reconoce el material genético y se une a él mientras que la subunidad mayor se une a la proteína portal, localizada en el vértice inferior de la procápside, y permite la translocación del DNA, cortando cada una de las copias en función de la secuencia reconocida (Catalano *et al.*, 1995).

Una vez que el DNA ha sido completamente internalizado, la cápside termina su maduración, expandiéndose, aproximadamente en un 20%, y adoptando su estructura final al pasar de circular a polihédrica, para cobijar mejor el material genético (Steven

et al., 2005). El proceso termina con el ensamblaje entre la cola y la cápside en la zona conectora y la generación de los viriones funcionales (Jardine y Anderson, 2006).

Lisis bacteriana

El ciclo lítico finaliza con la lisis de las células huésped y la liberación de la progenie viral. En fagos con genomas pequeños y limitados, normalmente de cadena sencilla, este proceso se produce por la acción de una única proteína sin actividad muraminidasa pero que es igualmente efectiva ya que impide la biosíntesis del peptidoglicano bacteriano (Bernhardt *et al.*, 2002). En fagos con DNA de doble cadena, generalmente, la lisis celular requiere de la acción de dos enzimas codificadas por el genoma fágico: la endolisina, que actúa degradando el péptidoglicano de la pared celular de forma similar a la lisozima, y la holina, que va a provocar la desorganización de la membrana celular, generando poros que permiten el acceso de dicha lisina a la pared celular (Guttman *et al.*, 2005).

20

Actualmente, se conocen cuatro endolisinas diferentes: la muraminidasa que rompe los enlaces 1,4-glicosílicos de la mureína, la transglicosilasa que hidroliza los mismos enlaces y genera un producto cíclico, la amidasa que hidroliza los enlaces amida y la endopeptidasa que ataca a los enlaces peptídicos. En algunos bacteriófagos es posible encontrar más de una de estas actividades (Young, 2005).

Las holinas son pequeñas proteínas de membrana que determinan el momento de la lisis. Posiblemente, su acción está asociada a su acúmulo y posterior formación de poros en la membrana citoplasmática de la bacteria lo que permite el acceso de las endolisinas a la pared celular (Wang *et al.*, 2000; Bernhardt *et al.*, 2002). El correcto funcionamiento de estas proteínas y su sincronización con el estado de madurez de los viriones y el entorno son factores claves para la prosperidad de los ciclos infectivos. Se ha sugerido que el proceso de lisis debe producirse rápidamente una vez se han ensamblado todos los viriones o bloquearse si el proceso de síntesis se ve alterado o si en el entorno hay pocas bacterias susceptibles de ser infectadas, esperando a que mejoren estas condiciones. Esta precisión debe estar debidamente regulada y, por ello, algunos fagos presentan una antiholina para refinar el proceso (Young, 2005).

1.2.4. Los bacteriófagos de *Salmonella*

Todos los bacteriófagos conocidos del género *Salmonella* pertenecen al orden *Caudovirales*. Hasta el año 2005, se habían descrito 172 bacteriófagos de este orden, correspondiendo 44 de ellos a la familia *Myoviridae*, 65 a la *Siphoviridae* y 63 a la *Podoviridae*. Un análisis de los proteomas de los bacteriófagos secuenciados permitió su clasificación en 5 grupos: tipo P27 (ST64B), tipo P2 (Fels-2, SopE ϕ y PSP3), tipo P22 (ϵ 34, ES18, P22, ST104 y ST64T), tipo T7 (SP6), los lambdoides (Gifsy-1, Gifsy-2 y Fels-1) y tres fagos independientes (ϵ 15, KS7 y Felix O-1) (Kropinski *et al.*, 2007).

En el año 2008, esta clasificación se actualizó con la inclusión de 2 nuevos bacteriófagos independientes entre los que destaca el fago ES18. Su cola larga y un minucioso análisis de su genoma permitieron la separación de este fago del grupo tipo P22 (Casjens, 2008). Asimismo, actualmente, el fago SP6 compone un grupo tipo que lleva su nombre (ICTV, 2009). Entre los fagos de *Salmonella* identificados y clasificados hasta el momento, se observa una clara predominancia de entes atenuados. Esto es consecuencia del elevado número de profagos existentes en las cepas de este microorganismo.

21

1.2.5. Aplicación de los bacteriófagos como desinfectantes en la producción de alimentos

La habilidad que presentan los fagos para matar específicamente a las células bacterianas a las que infectan, es lo que permite emplearlos como agentes terapéuticos y de control en las diferentes etapas de la cadena alimentaria (Barrow y Soothil, 1997; Huff *et al.*, 2005; Skurnik y Strauch, 2006). Aparte de dicha especificidad, los fagos presentan otras características apreciables como la autorreplicación y, al mismo tiempo, la autolimitación. Además, cuando se encuentran en exceso también son capaces de lisar las células bacterianas por un fenómeno conocido como “muerte por nadie”, donde el elevado número de partículas desestabiliza las envueltas celulares, provocando la muerte de la bacteria. Otra característica importante es que presentan un mecanismo de acción totalmente diferente a la de los antimicrobianos, lo que hace a los fagos efectivos incluso frente a bacterias resistentes a múltiples antibióticos.

No obstante, dichas características por sí mismas no garantizan el éxito del uso de bacteriófagos en terapia fágica y biocontrol de microorganismos. Para ello, deben considerarse otros factores, como la elección de agentes altamente infectivos para un amplio número de cepas del patógeno y que dichos agentes sean líticos, de forma que su coexistencia con la bacteria sea completamente inviable (Brüssow, 2005). Asimismo, el genoma de los fagos candidatos debe ser estudiado, debido a que no deben poseer genes conocidos de virulencia o de resistencia a antibióticos que, de alguna manera, pudieran incorporarse en el genoma del huésped.

Por otro lado, uno de los principales problemas en el uso de fagos es la posibilidad de selección de mutantes resistentes a la infección. Este inconveniente puede ser minimizado con el empleo de preparados fágicos que contengan más de un fago específico contra las bacterias diana. Además, debe también tenerse en cuenta que los fagos pueden sufrir mutaciones, de forma que alguna de ellas genere fagos mutantes capaces de infectar a dichas bacterias resistentes.

22

Los bacteriófagos pueden ser utilizados a lo largo de todo el proceso de producción y elaboración de alimentos de origen animal y vegetal. Así, pueden aplicarse en: i) animales que pueden actuar como reservorio (fagoterapia); ii) canales y productos crudos de origen animal y vegetal (biocontrol); iii) superficies y utensilios de producción (biohigienización) y iv) como conservantes naturales en productos manufacturados perecederos para aumentar su vida útil (biopreservación) (García *et al.*, 2008).

Seguidamente, se comenta el estado actual del uso de bacteriófagos en terapia fágica y como desinfectantes en la producción y elaboración de productos cárnicos y vegetales.

Fagoterapia

Félix d'Herelle (1917) planteó por primera vez el concepto de la fagoterapia al proponer el uso de fagos de determinados patógenos bacterianos para combatir las enfermedades que dichas bacterias producían. En concreto, este autor probó este concepto para el tratamiento de la infección causada por *Shigella dysenteriae*, siendo

ésta una práctica que se ha utilizado tradicionalmente desde principios del siglo XX en los países del este de Europa. Ya en 1923, d'Herelle contribuyó a la fundación del instituto Eliava en Tbisili, actual capital de la República de Georgia. Actualmente, éste es uno de los principales institutos de investigación y desarrollo de productos comerciales de fagos. Durante sus mejores años, esta institución contó con unos 1.200 investigadores y personal de apoyo, produciendo fagos contra varios patógenos, incluyendo *Pseudomonas*, *Proteus* y muchos microorganismos entéricos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Los ensayos clínicos más claramente documentados sobre el uso de fagos como agentes terapéuticos fueron publicados por el Instituto Hirszfeld, fundado en 1952 en Wroclaw, Polonia. En este instituto se desarrollan y producen fagos para el tratamiento de septicemias, forunculosis e infecciones de los tractos respiratorio y urinario, siendo utilizados fundamentalmente contra patógenos multiresistentes que son refractarios a los tratamientos convencionales con antibióticos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

En los países de Occidente, la producción y el uso masivo de antimicrobianos a partir de la Segunda Guerra Mundial anularon casi por completo el desarrollo de la fagoterapia. No obstante, en las últimas décadas, existe una creciente preocupación por la emergencia de cepas bacterianas multiresistentes que comprometen el uso de los antimicrobianos. Varios autores han asociado el aumento de la resistencia bacteriana al uso indiscriminado de estos fármacos en los animales de producción (Cruchaga *et al.*, 2001; Schwarz y Chaslus-Dancla, 2001; Teuber, 2001). Así, dicha resistencia podría estar asociada directamente al patógeno que llega al ser humano a través de la cadena alimentaria o bien producirse en bacterias comensales, las cuales podrían transferir los genes de resistencia a las zoonóticas (Salyers, 1995). De este modo, la búsqueda de alternativas para el tratamiento de bacterias multiresistentes ha hecho resurgir el interés por la fagoterapia en dichos países. Recientemente, se han realizado diversos estudios con el objetivo de reducir la colonización del tracto gastrointestinal de animales por las serovariedades Enteritidis y/o Typhimurium de *Salmonella* (Fiorentin *et al.*, 2005a; Toro *et al.*, 2005; Wagenaar *et al.*, 2005; Atterbury *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2007; Borie *et al.*, 2008), *Campylobacter jejuni* (Loc Carrillo *et*

al., 2005; Wagenaar *et al.*, 2005) y *Escherichia coli* O157:H7 (Bach *et al.*, 2003; Callaway *et al.*, 2006; Raya *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos han sido muy variables, indicando que la terapia fágica depende de una apropiada selección de los fagos y también de los pautas de aplicación utilizados en los animales.

Los bacteriófagos como desinfectantes

Debido a que los tratamientos físicos y químicos de inactivación de bacterias pueden alterar las características organolépticas de los productos alimentarios y el uso de antibióticos como conservantes y para el control de patógenos está cada vez más cuestionando por favorecer la selección y proliferación de bacterias resistentes, la utilización de fagos como agentes de control en las diferentes etapas de la cadena alimentaria es un tema relevante de actual interés (García *et al.*, 2008). En este contexto, es importante considerar que la efectividad de los fagos en los alimentos variará con cada fago, matriz alimentaria y condición de aplicación, incluyendo los factores ambientales (EFSA, 2009). En este punto debe mencionarse que el uso de fagos en los alimentos no debe entenderse como una estrategia alternativa, sino como una herramienta complementaria a las ya existentes para el control de los patógenos (Krylov, 2001).

24

Debe señalarse que los estudios que evalúan el efecto desinfectante de los fagos en carne de diferentes orígenes y en vegetales utilizan diferentes fagos y pautas de aplicación distintas, por lo que los resultados son difíciles de comparar.

Los productos cárnicos de origen aviar han sido uno de los más utilizados en los estudios de biocontrol mediante bacteriófagos. Reducciones significativas del número de células de *Campylobacter jejuni* y de *S. Enteritidis* fueron observadas después del tratamiento con fagos de piel de pollo contaminada artificialmente (Atterbury *et al.*, 2007; Goode *et al.*, 2003). También se ha descrito una disminución importante de *Salmonella* en canales de aves de engorde (Chighladze *et al.*, 2001; Higgins *et al.*, 2005) y muslos de pollo, contaminados experimentalmente y tratados con fagos (Fiorentin *et al.* 2005b).

Los estudios de desinfección fágica de productos cárnicos de origen vacuno se han dirigido tanto a eliminar los patógenos bacterianos (biocontrol) como a combatir las bacterias causantes de su deterioro (biopreservación). Respecto a los resultados de biocontrol, cabe destacar que se obtuvo una significativa reducción de *E. coli* O157:H7 después del tratamiento con fagos de carne (O'Flynn *et al.*, 2004) y de carne picada (Abuladze *et al.*, 2008), artificialmente contaminada con este patógeno. De la misma manera, en un estudio realizado con bacteriófagos contra *S. Typhimurium* y *C. jejuni* para la descontaminación de carne cruda y cocida, se observó una reducción significativa de la concentración de ambos microorganismos, principalmente partiendo de una elevada concentración bacteriana, a una alta multiplicidad de infección y elevada temperatura de incubación (Bigwood *et al.*, 2008). No obstante, no se obtuvieron buenos resultados en la reducción de *Listeria monocytogenes* en un modelo de carne envasada al vacío (Dykes y Moorhead, 2002). Por otra parte, en estudios de biopreservación de carne vacuna, experimentalmente contaminada con *Pseudomonas* spp., el uso de fagos controló el crecimiento de este microorganismo, aumentando consecuentemente la vida media del producto (Greer, 1982; Greer, 1986). Sin embargo, el tratamiento de superficies de carne contaminada de forma natural con *Pseudomonas* spp. no tuvo el éxito esperado (Greer y Dilts, 1990).

25

No existen muchos estudios que utilicen productos porcinos como modelo para estudiar el efecto de bacteriófagos como agentes de control bacteriano. Entre estos estudios destaca la reducción significativa del crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* presente en el tejido adiposo de carne de cerdo (Greer y Dilts, 2002). Sin embargo, tras la incubación de estas muestras de tejido durante 10 días a 4°C, se observó crecimiento de células bacterianas resistentes a la infección fágica. Un estudio reciente ha demostrado que los fagos podrían reducir significativamente el número de *L. monocytogenes* en salchichas, obteniéndose un mayor valor de reducción cuando se aplicaban fagos a una elevada concentración. En este estudio se observó que los bacteriófagos se mantuvieron infectivos en la superficie del alimento durante seis días a 6°C, presentando una reducción no significativa de su título durante este período (Guenther *et al.*, 2009).

También son escasos los estudios de control de microorganismos en vegetales mediante el uso de estos bacteriófagos. Como en los otros alimentos, los resultados son muy variables, dependiendo del tipo de producto, del agente patógeno y de los fagos utilizados. De manera general, los tratamientos fágicos utilizados contra *E. coli* O157:H7 produjeron una reducción significativa de este patógeno en brócoli, tomate, espinacas y lechuga (Abuladze *et al.*, 2008; Viazis *et al.*, 2011). Asimismo, en experimentos de contaminación experimental de melón con *L. monocytogenes* y de brotes de alfalfa con *Salmonella*, el tratamiento con fagos produjo, en algunos casos, una reducción significativa de estos patógenos (Leverentz *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2010), mientras que los datos aportados por otros autores en el mismo tipo de alimentos muestran un escaso efecto del tratamiento fágico (Hong y Conway, 2007; Kocharunchitt *et al.*, 2009).

En resumen, los bacteriófagos pueden ser una buena herramienta en el control de bacterias en los productos alimenticios, únicamente cuando están asociados a buenas prácticas de manipulación en producción animal, procesado y producción de alimentos. Considerando la gran variedad de fagos existentes en el medio ambiente, deben seleccionarse aquellos que permitan la obtención de preparados fágicos con un adecuado espectro de actuación y ausencia de cualquier característica que conlleve riesgos para el consumidor.

26

1.2.6. Productos comerciales basados en fagos

Existen actualmente en el mundo varias empresas dedicadas a la fabricación de productos comerciales basados en fagos con diferentes aplicaciones. En una reciente revisión de Housby y Mann (2009) se recoge una selección de las compañías que han desarrollado productos basados en fagos o que están en fase de desarrollo o de aprobación por las diferentes agencias competentes. En dicha revisión se citan 19 empresas, no obstante pocos son los productos de esta tipología que están comercializados actualmente. En la Tabla 1.2 se presentan estos productos así como las empresas que los comercializan. De entre los productos citados en dicha tabla, están aprobados actualmente por la *Food and Drug Administration* (FDA) los dos cocteles fágicos para biocontrol de *L. monocytogenes*, mientras que EcoShield™ está

aceptado (debido al precedente abierto con la aprobación de ListShield™), Agriphage® presenta registro de la EPA (*Environmental Protection Agency*, EE.UU.) y Biotector® S1 está registrado como un aditivo para piensos.

Tabla 1.2. Productos existentes en el mercado basados en bacteriófagos.

Empresa	Localización	Producto		
		Nombre	Bacteria diana	Uso
Intralix, Inc.	EE.UU.	ListShield™	<i>L. monocytogenes</i>	Productos preparados
		EcoShield™	<i>E. coli</i> O157:H7	Carne, frutas y vegetales
EBI Food Safety	Países Bajos	Listex™ P-100	<i>L. monocytogenes</i>	Alimentos
CheilJedang Corp.	Corea del Sur	Biotector S1	<i>S. Gallinarum</i>	Pienso para aves
Omnilytics, Inc.	EE.UU.	AgriPhage™	<i>X. campestris</i> y <i>P. syringae</i>	Plantas

La principal problemática de los productos basados en fagos es la falta de normativas sobre los estudios que deben realizarse de cara a su aprobación y posterior comercialización. Dichos productos, así como otras sustancias o productos utilizados en la industria alimentaria, pueden ser aprobados por la FDA mediante dos vías: i) como aditivos de alimentos o ii) como productos *generally recognized as safe* (GRAS). En la primera vía, el proceso es mucho más complicado, debido a que los productos deben presentar unas características según determina la *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* (FFDCA), algunas de las cuales no serían aplicables a los bacteriófagos. En cambio en la segunda vía el producto es examinado por un grupo de expertos los cuales deben reconocerlo, en su caso, como seguro (Sulakvelidze y Pasternack, 2010).

Respecto a la UE, la EFSA llevó a cabo un estudio para establecer las bases de futuras regulaciones para productos fágicos sin que por el momento haya ningún protocolo específico para la aprobación del uso de este tipo de productos en la industria alimentaria (EFSA, 2009). No obstante, es de destacar que en junio de 2007, el Organismo de Inspección Pública de los Países Bajos confirmó el estatus de Listex™ P-100 como un producto biológico de acuerdo con el Reglamento (CEE) nº 2092/91 Anexo VI Sección B. Por ello, Listex™ P-100 está disponible para su uso en productos orgánicos. Por otro lado, el artículo 14 (2) del Reglamento (CE) nº 178/2002 define que cualquier productor de alimentos tiene la libertad de producir y vender alimentos en la UE sin la previa autorización, siempre y cuando estos alimentos sean seguros. La

propia empresa productora de alimentos debe certificar la seguridad del producto según los artículos 17 (1) y 19 (1) de la mencionada regulación. De este modo, de acuerdo con la ley alimentaria de la UE, los bacteriófagos pueden ser utilizados en los productos alimentarios sin autorización previa, siempre que se compruebe que el producto en cuestión es seguro para la salud del consumidor (von Jagow y Teufer, 2007). Por tanto, a través de vías como las indicadas pueden utilizarse actualmente productos fágicos en alimentos.

2. Objetivos

Salmonella es un enteropatógeno zoonótico de amplio rango de huésped, causante de grandes pérdidas económicas y de elevado impacto en la salud humana. Esta bacteria está principalmente relacionada con los productos de origen animal aunque, en los últimos años, se ha detectado en diferentes vegetales y ha aumentado la asociación entre productos frescos de origen vegetal y brotes de toxiinfección alimentaria. Todo ello ha significado un aumento de la preocupación sobre la contaminación por *Salmonella* de productos mínimamente manufacturados (Tauxe *et al.*, 1997).

Las granjas y los mataderos son los primeros niveles en los que deben aplicarse medidas de control para esta bacteria (Castellan *et al.*, 2004). Los animales portadores de *Salmonella* están directamente relacionados con la contaminación de los productos de origen animal y, de manera indirecta, con los de origen vegetal, principalmente a través del agua de riego y de los abonos (Beuchat, 1996; Buck *et al.*, 2003). Actualmente, existe una urgente necesidad de desarrollar y aplicar medidas adicionales de control de *Salmonella* a nivel de la producción animal y también a lo largo de todo el proceso de la producción de alimentos, ya que, como se ha comentado en la introducción de esta memoria, reducir el impacto de la *Salmonella* en los animales no conlleva necesariamente obtener alimentos seguros a nivel microbiano.

31

Las nuevas medidas que se han aplicado como vapor de agua y ácidos orgánicos (Gill y Bryant, 1997; Soares, 1997; Castelo *et al.*, 2001; Bajaj *et al.*, 2003; Dubal *et al.*, 2004; King *et al.*, 2005; Pipek *et al.*, 2006) provocan cambios indeseables en las características organolépticas de los productos cárnicos. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de investigar nuevas estrategias para el control de *Salmonella* que sean eficaces y no alteren el alimento. En este contexto, el principal objetivo del presente trabajo ha sido estudiar la aplicación de bacteriófagos como desinfectantes en la cadena de producción alimentaria. Los objetivos parciales han sido los siguientes:

1. Estudiar la diversidad de los fagos de las serovariedades Typhimurium y Enteritidis de *Salmonella* en granjas aviares y porcinas.
2. Aislar y seleccionar fagos líticos específicos de *Salmonella*.
3. Caracterizar biológica y molecularmente los fagos seleccionados.
4. Estudiar la desinfección basada en fagos en diferentes matrices alimentarias.

3. Material y Métodos

3.1. Cepas bacterianas y bacteriófagos

Las cepas de *Salmonella enterica* utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis están detalladas en las Tablas 3.1 y 3.2, clasificadas en función de su serovariedad y origen. Las cepas ATCC 14028 y LK5 proceden de la *American Type Culture Collection* (ATCC; EE.UU.) y del *Salmonella Genetic Stock Center* (SGSC; Canadá), respectivamente. Las cepas UA1872 (Cm^R) y UA1894 (Km^R) son derivadas de ATCC 14028 y LK5, respectivamente (Bardina, 2011). Las restantes cepas de origen aviar y porcino fueron cedidas por el *Laboratori de Sanitat Animal* del DARP (Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya) y las cepas de origen humano por el Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona) y por el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona). Ninguna de las cepas de origen aviar, porcino y humano están relacionadas clonalmente, lo que se ha determinado por un estudio de macrorestricción genómica con la enzima *XbaI* mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Bardina, 2007).

Tabla 3.2. Cepas de *Salmonella enterica* utilizadas en los estudios del perfil de infección.

Origen	Serovariedad		Total
	Typhimurium	Enteritidis	
Aviar	25	6	31
Porcino	17	8	25
Humano	7	4	11
Total	49	18	67

35

Las cepas salvajes ATCC 14028 y LK5 se emplearon para la caracterización de los distintos parámetros biológicos, la estabilidad de los fagos seleccionados y para los estudios de infección *in vitro*. Asimismo, las cepas UA1872 y UA1894 se utilizaron en los estudios de eficacia del cóctel fágico.

Los fagos utilizados en este trabajo de tesis fueron los obtenidos por Bardina (2011) en un estudio paralelo de nuestro grupo de investigación (Tabla 3.3), además de los nuevos fagos aislados en este trabajo (ver apartado Resultados; Tabla 4.1).

Tabla 3.3. Fagos aislados de muestras aviares estudiados en este trabajo.

C2	C14	C19	C22	C28	C69	C74	C86
C13	C17	C20	C23	C45	C72	C80	C87
	C18	C21	C25	C61	C73	C82	

Tabla 3.1. Cepas de *Salmonella enterica* utilizadas en este trabajo.

Serovariedad	Cepa	Origen ¹	Año de Aislamiento	Procedencia	Utilización
Enteritidis	LK5	A	-	SGSC	Caracterización fágica
	UA1894	A	-	Bardina (2011)	Estudios de eficacia
	951	A	1989		
	9310	A	2003		
	7358	P	2000	DARP	Aislamiento de fagos y espectro de infección
	9449	P	2003		
	9609	P	2003		
	65	A	1983		
	6824	A	2000	DARP	
	7385	A	2000		
	8044	A	2001		
	F20.5 CP/94	H	1994	HVH	
	O/20.9 CG/98	H	1998		
	1861/F06	H	2006	HSP	Espectro de infección
	2123/F06	H	2006		
	7129	P	2000		
	7593	P	2000		
	7616	P	2000	DARP	
	8419	P	2001		
	9451	P	2003		
Typhimurium	ATCC 14028†	A	-	ATCC	Caracterización fágica
	UA1872†	A	-	Bardina (2011)	Estudios de eficacia
	S4426	A	1994		
	S6254	A	1994		
	8880	A	2002	DARP	Aislamiento de fagos y espectro de infección
	887	P	1989		
	1624/F06	H	2006	HSP	
	1711/F06	H	2006		
	1	A	1979		
	16	A	1981		
	124	A	1983		
	421	A	1986		
	976	A	1989		
	3360	A	1992		
	MG86	A	1994		
	MG98	A	1994		
	S4354	A	1994		
	S5832	A	1994		
	S5833	A	1994	DARP	
	5419	A	1996		
	5833	A	1997		Espectro de infección
	6231	A	1998		
	7627	A	2000		
	7653	A	2001		
	7987	A	2001		
	8429	A	2001		
	8647	A	2002		
	9208	A	2002		
	10127	A	2005		
	10182	A	2005		
J/10.2CP/96	H	1996			
D/20.5 CP/99	H	1999	HVH		
J/11.16 CP/01	H	2001			

Tabla 3.1. Cepas de *Salmonella enterica* utilizadas en este trabajo (continuación).

Serovariedad	Cepa	Origen ¹	Año de Aislamiento	Procedencia	Utilización
Typhimurium	1557/F06	H	2006	HSP	Espectro de infección
	1992/F06	H	2006		
	4516	P	1994		
	S5801	P	1997		
	S5812	P	1997		
	S5827	P	1997		
	S5857	P	1997		
	S5974	P	1997		
	6269	P	1998		
	7320	P	2000		
	8695	P	2002	DARP	
	8862	P	2002		
	9222	P	2002		
	9434	P	2003		
	9813	P	2004		
9849	P	2004			
10082	P	2005			
10175	P	2005			
Hadar	8546	D	2001		
Infantis	05S44	H	NC	HSP	
Virchow	791S	H	NC		

¹ A, Aviar; P, Porcino; H, Humano; D, Depuradora

SGSC, *Salmonella Genetic Stock Centre*

DARP, Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya

HVH, Hospital de la Vall d'Hebrón de Barcelona

HSP, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona

ATCC, *American Type Culture Collection*

NC, no conocido

La conservación de las cepas bacterianas se realizó por dos procedimientos distintos: i) en viales al 50% de glicerol a -20°C y (ii) en viales de criopreservación *Protect* (Ferrer Farma) a -80°C. Por otro lado, los fagos fueron conservados en medio LB o MgSO₄ 10 mM a 4°C.

3.2. Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos rutinarios de *Salmonella* se realizaron en medio Luria-Bertani (LB), añadiendo agar-agar al 1,7% (p/v) para cultivos en medio sólido. Cuando fue necesario se adicionó al medio LB 150 µg/ml (microgramos por mililitro) de kanamicina (Km) y 34 µg/ml de cloranfenicol (Cm). La inoculación de los microorganismos en medio líquido se realizó a partir de una dilución 1/100 de cultivos líquidos crecidos durante 18-20 horas (h) a 37°C y en agitación a 150 rpm (agitador orbital Rotabit, Selecta). La

inoculación en medio líquido de las cepas congeladas siempre estuvo precedida de una siembra en medio sólido para comprobar su morfología celular y pureza. El crecimiento de los cultivos en placas de LB se realizó a 37°C durante 18 h.

En los estudios con matrices alimentarias, la detección directa de *Salmonella* se llevó a cabo sembrando en placas de medio selectivo xilosa-lisina-desoxicolato (XLD; Pronadisa), suplementado con cloranfenicol (3,4 µg/ml) o kanamicina (75 µg/ml) según la cepa, y con una incubación a 37°C durante 48 h. En los casos en los que fue necesario, se realizó un enriquecimiento de *Salmonella* en agua peptonada tamponada (BPW; Merck) durante 18 h a 37°C tras una posterior selección en medio Müller-Kauffmann (Merck) durante 24 h a 37°C, se sembró en agar XLD (Pronadisa) suplementado con los antimicrobianos correspondientes, incubándose a 37°C durante 48 h.

Los medios se prepararon y esterilizaron siguiendo las recomendaciones indicadas por los fabricantes. Los antimicrobianos fueron esterilizados utilizando filtros de membrana estériles de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore). En todos los casos, el agua utilizada fue ultrapura de grado Milli-Q (MQ) (*Ultra-pure water system Milli-Q_{plus} 185*; Millipore). Los medios sólidos se dejaron enfriar hasta una temperatura de 50° C, momento en el que se añadieron, en caso de ser necesario, los suplementos adecuados y se dispensaron en placas de Petri (Sterilin) en condiciones de esterilidad.

38

3.3. Técnicas microbiológicas

3.3.1. Aislamiento de bacteriófagos desde muestras de campo

Para el aislamiento de nuevos fagos desde muestras de heces de cerdos facilitadas por Laboratorio de Diagnóstico General (Barcelona), se realizó un método de enriquecimiento basado en mezclar 1 g de la muestra en 20 ml de BPW. Tras 18 h de incubación a 37°C, se inoculó 1 ml del cultivo en 9 ml del medio selectivo Müller-Kauffmann, incubándose durante 24 h a 37°C. A continuación, se centrifugó el cultivo durante 10 minutos (min) a 8.000 x g (Beckman J2-21), recuperándose y filtrándose el sobrenadante con filtros estériles de fluoruro de polividinil de 0,45 µm de diámetro de poro (PVDF; Millipore). Finalmente, los filtrados se conservaron a 4°C.

3.3.2. Test de la gota

El test de la gota fue utilizado en dos situaciones diferentes: i) para detectar la presencia de bacteriófagos en los filtrados obtenidos y ii) para determinar el perfil de infección de los bacteriófagos aislados.

Para realizar el test de la gota, se preparó un cultivo de noche en 10 ml de medio LB líquido de la cepa bacteriana deseada. Al día siguiente, se realizó una dilución 1:10 en medio LB líquido. Se sembró en doble capa. Para ello, se mezclaron 100 μ l de la dilución del cultivo de noche con 2,5 ml de LB blando (LB agar al 0,7%), atemperado a 50°C y se depositaron en una placa de LB agar, distribuyéndolo uniformemente por la superficie. Tras la solidificación del medio, se dividió la placa en sectores y se depositaron gotas de 10 μ l del filtrado fágico. Se esperó a que las gotas se secaran y se incubó la placa a 37°C durante 18 h, tiempo tras el cual se observó la aparición o ausencia de zonas de lisis.

3.3.3. Purificación y obtención de lisados fágicos

Para la purificación de fagos, se recogió con una asa estéril el contenido del halo de lisis, obtenido mediante el test de la gota y se resuspendió en 1 ml de tampón SM (Tris-HCl 0,05 M; NaCl 0,1 M; MgSO₄·7H₂O 0,2%; gelatina 0,01%). Se agitó el tubo durante 20 min a baja velocidad para no desestructurar los fagos. Seguidamente, se añadieron 200 μ l de cloroformo y se agitó por inversión. Se centrifugó a 8.000 x g durante 5 min para que los restos celulares se depositaran en el fondo del tubo. A continuación, se recuperó el sobrenadante transfiriéndolo a un tubo con 50 μ l de cloroformo y se conservó a 4°C. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales en tampón SM y se realizó una siembra en doble capa de las diluciones 10⁰, 10⁻², 10⁻⁴ y 10⁻⁶. Tras la incubación a 37°C durante 18 h, se observó la morfología de las calvas obtenidas, recuperándose una de ellas con una pipeta Pasteur y repitiendo el proceso descrito anteriormente hasta 3 veces con el objetivo de asegurar que se disponía de un clon fágico único. Finalmente, se resuspendió en 1 ml de tampón SM y se conservó en un tubo de microcentrífuga a 4°C.

Una vez obtenidos los fagos puros, la obtención de los lisados se realizó a través de los siguientes procedimientos:

i) Lisado en medio líquido

Se infectó un cultivo de la cepa bacteriana deseada a una DO_{550} de 0,6-0,7 (mitad de la fase exponencial) con 0,5 ml del fago aislado. Después de 5 h de incubación a 37°C, se centrifugó el cultivo a 8.000 x g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante, se filtró a través de filtros PVDF de 0,45 μ m de diámetro de poro y se conservó a 4°C.

En el caso de necesitar aumentar el título u obtener lisados de mayor volumen, se realizó el mismo procedimiento descrito a una multiplicidad de infección (*multiplicity of infection*; MOI) igual a 1.

ii) Lisado en placa

40 Cuando se necesitó obtener lisados fágicos con un título superior a 10^{11} pfu /ml (*plaque-forming unit*; unidades formadoras de calvas por mililitro), se realizó un lisado en placa que permite obtener una suspensión de fagos en un menor volumen, lo que resulta en lisados más concentrados. A tal efecto, se mezclaron 100 μ l de una dilución 1:10 de un cultivo de noche de *Salmonella* con 100 μ l de una suspensión fágica de la dilución apropiada en 2,5 ml de LB blando. Es conveniente conocer el título del lisado de partida para poder conseguir mediante esta siembra unas 1.000 calvas por placa. Se extendió la mezcla sobre una placa de LB y se incubó a 37°C durante 18 h. Al día siguiente, se añadieron 3 ml de $MgSO_4$ 10 mM y se mantuvo durante 20 min en reposo a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se rompió la capa de agar blando con ayuda de un asa de Kolle. Posteriormente, con la ayuda de un asa de Drigalsky se traspasó el agar blando y el $MgSO_4$ 10 mM a un tubo de polipropileno inerte, el cual se agitó suavemente durante 30 min. Seguidamente, esta suspensión se centrifugó a 8.000 x g durante 10 min y el sobrenadante se filtró a través de filtros PVDF de 0,45 μ m de diámetro de poro, se tituló y se conservó a 4°C.

En determinados casos, fue necesario obtener lisados fágicos libres de impurezas. En estos casos, se procedió a centrifugar el sobrenadante a 51.000 x g durante 2 h en una ultracentrífuga Optima™ L (Beckman) utilizando el rotor 80Ti. El

sedimento obtenido, correspondiente a las partículas fágicas, se resuspendió en el volumen deseado de MgSO_4 10 mM y se conservó a 4°C.

Cuando fue necesario, se obtuvieron lisados de los fagos deseados en *S. Typhimurium* ATCC 14028 o en *S. Enteritidis* LK5, para disponer de fagos que tuvieran el patrón de modificación de dichas cepas.

3.3.4. Titulación de los lisados fágicas

Para conocer la concentración de los fagos en suspensión, se realizaron diluciones decimales del lisado fágico en MgSO_4 10 mM y se sembraron las diluciones adecuadas mediante doble capa de agar. Tras su incubación, se procedió al recuento del número de calvas para calcular las pfu/ml. Solamente se consideraron las placas que presentaron entre 15 y 300 calvas.

3.3.5. Estabilidad fágica a diferentes condiciones ambientales

Con el fin de determinar la estabilidad de los fagos en distintas condiciones ambientales se incubaron los fagos en las condiciones a estudiar durante el tiempo deseado, tomándose muestras a diferentes tiempos para calcular la concentración fágica. Los resultados obtenidos fueron transformados en logaritmo en base diez y se determinó la reducción de la infectividad en las diferentes condiciones ambientales. A este efecto, los estudios de estabilidad fueron:

pH. Se determinó la capacidad infectiva de los fagos en MgSO_4 10 mM acidificado o alcalinizado hasta obtener valores de pH de 2, 4, 6 y 9. Se determinó el título fágico durante 2 h a temperatura ambiente, tomándose muestras cada 30 min.

Temperatura. La estabilidad fágica a distintas temperaturas se determinó incubando los fagos en MgSO_4 10 mM sin agitación durante siete días a 25°C, 30°C, 37°C y 42°C, titulando una muestra cada 24 h. Asimismo, se determinó la estabilidad fágica a la temperatura de conservación de los fagos (4°C) durante el período de un año, determinándose el título de los mismos a los 2, 4, 6 y 12 meses.

3.3.6. Cinética de adsorción fágica

La adsorción es la capacidad que tiene el virus para reconocer determinadas moléculas y estructuras de la membrana celular, a las cuales se unirá. Esta interacción es el primer paso para una posterior infección. La constante de adsorción fágica puede determinarse siguiendo la disminución de los viriones libres a lo largo del tiempo en un cultivo infectado. Esta constante es específica para cada pareja fago/bacteria y depende de las condiciones físicas y químicas a las que está sujeto el experimento.

Para determinar la constante de adsorción, se obtuvo un cultivo de la cepa bacteriana deseada a una DO_{550} de 0,5 (aproximadamente 3×10^8 cfu/ml [*colony-forming unit*; unidades formadoras de colonias por mililitro]) a partir de una resiembra de un cultivo de noche (1:100) en LB. Dicho cultivo se centrifugó y el sedimento se resuspendió en $MgSO_4$ 10 mM al cual se le añadió KCN a una concentración final de 10 mM. Después, se incubó en agitación a $37^\circ C$ durante 10 min y se añadió el fago objeto de estudio a una MOI aproximada de 0,1 y se mantuvo el cultivo a $37^\circ C$ sin agitar. A determinados tiempos se tomaron muestras, las cuales se diluyeron y titularon según se ha explicado en el apartado 3.3.4 con el fin de determinar el número de fagos libres. Los valores obtenidos se representaron gráficamente, indicando el porcentaje de fagos libres a lo largo del tiempo, considerando que a tiempo cero el 100% de los fagos no están adsorbidos. A partir de esta curva, se determinó también la constante de adsorción del fago al receptor celular, la cual se calcula a partir de la siguiente fórmula (Adams, 1959):

$$K = \frac{2,3}{B \times t} \times \log P_0/P$$

donde K es la constante de adsorción, B es la concentración bacteriana, t es el tiempo en minutos y P_0 y P son las concentraciones de fagos libres al principio y al tiempo t, respectivamente.

3.3.7. Parámetros del ciclo biológico fágico

La técnica del *One-step growth*, diseñada por Ellis y Delbrück (1939) y posteriormente modificada por Doermann (1952), permite determinar cada una de las fases del ciclo infectivo fágico: la fase de eclipse (tiempo en el que se detectan los

primeros viriones infectivos en el citoplasma bacteriano desde la inyección del DNA fágico), el tiempo de latencia (tiempo en el que los fagos son liberados al medio desde la inyección del DNA fágico) y el tamaño de explosión (progenie vírica por ciclo infectivo y bacteria infectada). Para determinar estos parámetros, se obtuvo un cultivo de la cepa bacteriana deseada a una DO_{550} de 0,5 a partir de la resiembra de un cultivo de noche (1:100) en LB. A dicho cultivo se añadió KCN a una concentración final de 10 mM y después de incubarlo en agitación a 37°C durante 10 min, se infectó con el fago a una MOI de 5, aproximadamente. Seguidamente, se incubó sin agitación durante 10 min para permitir la adsorción de los fagos. Pasado dicho tiempo, se realizó una dilución del cultivo (10^{-4}), la cual se incubó a 37°C sin agitación y se tomaron muestras por duplicado cada 5 min durante 1 h, para determinar la concentración fágica en cada tiempo. Una de las muestras se diluyó y tituló directamente para obtener el recuento de las partículas fágicas libres en el medio. La otra muestra se trató con cloroformo (100 μ l) para lisar las células bacterianas y se centrifugó a 6.000 x g durante 10 s. La fase acuosa se diluyó y tituló para obtener el recuento total de partículas fágicas. Los valores obtenidos con la primera muestra permiten determinar el tiempo de latencia mientras que, los de la segunda, indican el tiempo de eclipse. La diferencia entre la concentración fágica inicial y final permite conocer el tamaño de explosión (Figura 1.5).

43

3.3.8. Cinética de infección fágica

Para determinar la cinética de infección de los bacteriófagos en las diferentes condiciones a valorar, se partió de una dilución 1:100 en medio LB de un cultivo de noche de la cepa deseada de *Salmonella*. Se incubó a las diferentes temperaturas de ensayo en agitación hasta alcanzar una DO_{550} de 0,2 (equivalente a 10^8 cfu/ml), momento en que el cultivo se infectó con el fago o fagos de estudio a una MOI 1. Seguidamente, se incubó la mezcla a la temperatura apropiada y en agitación (150 rpm), siguiendo el crecimiento del cultivo mediante la medida de su absorbancia a 550 nm y por recuento de viables (cfu/ml) cada 15 ó 30 min durante un período de 8 h. Por lo que respecta a los estudios de la cinética de infección a 4°C, se dejó crecer la cepa bacteriana a 25°C durante el período previo a la inoculación de los fagos hasta alcanzar

una DO_{550} de 0,2. Seguidamente, se infectaron los cultivos y se mantuvieron a 4°C en agitación y se tomaron las muestras diariamente durante siete días.

3.3.9. Microscopia electrónica

Para la caracterización de los fagos mediante microscopía electrónica, se utilizaron lisados purificados por ultracentrifugación a 51.000 x g durante 2 h (Optima™ L de Beckman) a una concentración de 10^{10} pfu/ml en $MgSO_4$. Se depositaron 5 µl de lisado fágico en rejillas de cobre durante 2 min, se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar. Seguidamente, para la tinción negativa, se depositaron 5 µl de acetato de uranilo al 2% sobre la rejilla. Se incubó durante 2 min y se eliminó el exceso de líquido, dejándose secar a temperatura ambiente. Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1400 en el *Servei de Microscopia* de la UAB.

3.4. Técnicas de biología molecular

44

3.4.1. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA fágico, se utilizó una modificación del protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1987). Para ello, se concentraron los lisados mediante ultracentrifugación a 51.000 x g durante 2 h para conseguir un título de entre 10^{11} y 10^{12} pfu/ml en $MgSO_4$ 10 mM. Para eliminar los restos de material genético bacteriano, la suspensión fágica se trató inicialmente con DNasa I (80 U/ml; Roche) y RNasa I (80 µg/ml; Roche) durante 2 h a 37°C. Seguidamente, se incubó con SDS (0,5%) y proteinasa K (200 µg/ml; Roche) a 56°C. Tras 2 h de tratamiento, se extrajo el DNA por el método de fenol-cloroformo convencional, mezclando 500 µl de la suspensión fágica con 500 µl de fenol-cloroformo 1:1 (v/v). A continuación, se realizó un proceso de agitación vigoroso durante 20 min y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min (MiniSpin; Eppendorf). Se recuperó el sobrenadante y se repitió el proceso. Para acabar de eliminar las impurezas, se añadió un volumen de cloroformo isoamílico 24:1 (v/v). Se recuperó la fase superior y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) con acetato sódico 80 mM (pH 4,8), realizándose la precipitación del DNA por

centrifugación a 12.000 x g durante 10 min. Finalmente, se lavó el sedimento con etanol al 70% seguido de una centrifugación a 12.000 x g durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 10 mM) con RNasa I (0,1 mg/ml) y se comprobó su integridad mediante observación en gel de agarosa al 0,4%. Finalmente, se cuantificó (*GeneQuantTM*, Amersham Biosciences) y se conservó a -20°C hasta su uso.

3.4.2. Restricción del DNA fágico

La digestión del DNA fágico se realizó con las enzimas *BstEII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y *XbaI* (Roche o New England Biolabs) siguiendo, en cada caso, las indicaciones recomendadas por los fabricantes. Se efectuaron reacciones con 30 µl de volumen final, añadiendo cantidades de aproximadamente 750 ng de DNA e incubándose a 37°C durante 16-18 h.

3.4.3. Electroforesis convencional en gel de agarosa

La electroforesis convencional se realizó en gel de agarosa al 0,7% (0,5 µg/ml de bromuro de etidio) en tampón TAE 1X (Tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM pH 8).

45

En todos los casos, en el momento de cargar las muestras en el gel, se les añadió 1:6 (v/v) de una solución compuesta por glicerol al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0,25% (p/v), xilencianol al 0,25% (p/v) y EDTA 0,1 mM (pH 8). La electroforesis se realizó en tampón TAE 1X a 50 V durante 17-18 h en una cubeta *DNA Sub Cell* (BioRad) a una temperatura de 20°C. El patrón de bandas se visualizó mediante el sistema de transiluminación y captación de imagen *E-box-1000/20 M* (Vilber Loumat).

Como patrón de tamaño se utilizaron, según los casos, el DNA del fago λ (Promega) digerido con *BstEII* (New England Biolabs) o con *HindIII* (Roche) y la forma replicativa del DNA del fago φX174 digerida con *Hinfl* (Biotools).

3.4.4. Electroforesis en campo pulsado

Para la determinación del tamaño del DNA de los fagos seleccionados, la preparación del DNA fágico, inmovilizado en bloques de agarosa, se llevó a cabo según describieron Atterbury *et al.* (2003).

Inicialmente, se concentró y se resuspendió el fago de interés en TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM), siendo su concentración final de 10^{11} pfu/ml. Para cada inserto, se utilizaron 5 μ l de esta suspensión; es decir, para cinco insertos, 25 μ l de fago se diluyeron en 250 μ l de TE y se mezclaron con el mismo volumen de agarosa de bajo punto de fusión InCert (Iberlabo) al 1,4% (0,7% concentración final). Tras dejar solidificar los insertos a 4°C, se depositaron en tubos de 5 ml químicamente inertes que contenían 2 ml del tampón de lisis (0,1 M EDTA; 10 mM Tris; 1% Sarcosilato; 0,1 mg/ml de proteinasa K). Seguidamente, se incubaron durante 18 h a 55°C. Se lavó cada inserto varias veces con tampón TE antes de cargarlo en el gel.

Para la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 1% en TBE 0,5X (Tris-borato 50 mM, EDTA 0,1 mM). Se efectuó la electroforesis en este mismo tampón a 6 V/cm con una rampa ascendente de pulsos de 2 a 20 segundos (s) durante 10 h y de 20 a 30 s durante 5 h, utilizando el aparato CHEF DRIII (BioRad). Como patrones de tamaño, se utilizaron los marcadores comerciales *Lambda Ladder PFGE marker* (New England Biolabs) y *Low range PFG marker* (New England Biolabs). El tamaño de los genomas fágicos se determinó mediante el programa Fingerprinting II (BioRad).

3.4.5. Secuenciación del DNA

La secuenciación del genoma fágico fue realizada por Sistemas Genómicos (Valencia), empleando la técnica de rotura mecánica para obtener fragmentos de DNA de 2 a 3 Kb, los cuales fueron secuenciados y ensamblados con una redundancia de 5 a 6 lecturas para cada posición nucleotídica.

3.5. Análisis bioinformáticos

Para el análisis de las secuencias de DNA se utiliza el paquete de programas de *DNASStar* (DNASStar Inc.) y los programas y bases de datos disponibles en las siguientes

direcciones de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih>, <http://ebi.ac.uk> y <http://cmr.jcvi.org>.

El análisis para identificar los ORF (*Open Reading Frame*) de los genomas fágicos se realizó utilizando el programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y delimitando las proteínas a partir de 25 aminoácidos. Los potenciales ORF se determinaron mediante la base de datos BlastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La localización de los promotores y terminadores se efectuó mediante las aplicaciones *FindTerm* y *BProm* de Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) y *Transterm* (<http://nbc11.biologie.uni-kl.de/framed/left/menu/auto/right/glimmer2.02/>). Asimismo, se utilizaron las aplicaciones de Glimmer (<http://www.cbcb.umd.edu/software/glimmer/>) para la detección de los RBS (*Ribosomal Binding Site*) y la dirección de internet WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) para la creación de la secuencia consenso. Para alinear múltiples secuencias y determinar las distancias evolutivas entre las mismas se utilizó el programa *ClustalW* del *European Bioinformatics Institute* (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

47

3.6. Métodos de aplicación de bacteriófagos en diferentes etapas de la cadena alimentaria

Para los estudios de eficacia del cóctel fágico, se seleccionaron cuatro tipos de matrices con el objetivo de cubrir algunas de las principales etapas de la cadena de producción de alimentos susceptibles de contaminación por *Salmonella*. De este modo, se utilizaron secciones de piel de cerdo, pechuga de pollo, huevos frescos y lechuga envasada. A continuación, se describe el procedimiento utilizado en cada una de estas matrices.

3.6.1. Superficie animal (piel de cerdo)

Los segmentos de piel utilizados en este trabajo fueron obtenidos en una carnicería localizada en el municipio de Cerdanyola del Vallès (Barcelona) y corresponden a la región ventrolateral del abdomen del cerdo (panceta). Las muestras se adquirieron y utilizaron el día posterior al sacrificio de los animales, siendo

conservadas a 4°C hasta su manipulación. La piel pasó por todos los tratamientos del proceso de sacrificio, es decir, fue desprovista de pelos y suciedades. Igualmente, se limpió la superficie de la muestra con etanol al 70% antes de la realización de los ensayos. Se mantuvo la piel higienizada antes y después del tratamiento en bandejas de polipropileno, cubiertas con papel de aluminio, que previamente habían sido desinfectadas con etanol 70% e irradiadas durante 30 min a 0,7 J/m² con radiación UV en una cabina de seguridad biológica.

48 Para determinar el efecto del tratamiento con el cóctel fágico sobre la superficie de un animal vivo, se diseñó un experimento simulando la temperatura periférica de los cerdos, la cual es de aproximadamente 33°C (Huynh et al., 2005). Antes de los experimentos de eficacia del cóctel fágico, se realizaron diferentes pruebas para obtener un método reproducible y adecuado de cuantificación de *Salmonella* en este tipo de matriz. Para ello, se utilizó un segmento de piel de 900 cm², contaminándose su superficie mediante la distribución homogénea (2 µl/cm²) de una suspensión de la cepa UA1872 de *S. Typhimurium* a una concentración comprendida entre 5 x 10⁵ y 1 x 10⁶ cfu/ml. Seguidamente, se dejó secar durante 30 min en una cabina de seguridad biológica (Nuair), tomándose muestras en este momento (t= 0) y a las 3 h de incubación a 33°C para la cuantificación de *Salmonella*. El muestreo se realizó mediante dos métodos: i) escisión de muestras de 6,25 cm² (2,5 x 2,5 cm) de piel y ii) frotando mediante un hisopo una superficie de piel de 49 cm² (7 x 7 cm). En este último método, se utilizó un marco de polipropileno estéril, cuyas dimensiones eran las de la zona de muestreo, se humedeció el hisopo con BPW estéril y una de sus caras se frotó sobre la superficie de la piel desde la izquierda hacia la derecha. Con la segunda cara, se procedió igual, pero de abajo a arriba, con la tercera de derecha a izquierda y con la cuarta de arriba abajo (Figura 3.1). A continuación, ambos tipos de muestras se depositaron en tubos de 10 cm de largo x 1,5 cm de diámetro que contenían 2 ml de BPW. Se homogeneizó, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio XLD, adecuadamente suplementado con el antibiótico. Al día siguiente, se realizó el recuento de colonias, expresando los resultados en cfu/cm².

Para determinar en esta matriz la reducción de la concentración de *Salmonella* debida al tratamiento con el cóctel fágico, el método de contaminación con las cepas

UA1872 y UA1894 de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, fue el descrito anteriormente. El muestreo se realizó mediante hisopos, según se ha comentado en este apartado, pero la superficie de piel muestreada fue de 25 cm² (5 x 5 cm) en lugar de 49 cm². Se utilizó un segmento de piel de 1500 cm², tomándose inicialmente dos muestras para determinar la ausencia de *Salmonella*, antes de contaminar la piel con dicha bacteria. Seguidamente, se dividió el segmento de piel en dos partes iguales, tratándose uno de ellos con MgSO₄ 10 mM y la otra con una suspensión del cóctel fágico a 10¹⁰ pfu/ml. El tratamiento se realizó con un pulverizador de líquidos que dispensa aproximadamente 500 µl en cada dosificación, cubriéndose toda la superficie tras 6-8 aplicaciones. A continuación, se secaron ambas partes durante 30 min en una cabina de seguridad biológica, se tomaron 6 muestras para la cuantificación de *Salmonella* a tiempo cero y se incubaron ambas partes de piel a 33°C. A las 3 y 6 h de incubación se tomaron 6 muestras de la superficie control y de la tratada con fagos para cada tiempo, se realizaron diluciones y se sembró en medio XLD suplementado con el antibiótico adecuado. Paralelamente, se realizó una titulación fágica de todas las muestras tomadas de la piel tratada con fagos mediante siembra en doble capa. En todos los casos, se incubaron a 37°C los tubos de BPW que contenían los hisopos para detectar *Salmonella* a través del método de enriquecimiento.

49

Los resultados se expresaron en cfu/cm² y pfu/cm² en logaritmo en base 10. La diferencia entre la concentración bacteriana en la superficie de piel no tratada y tratada indicó la reducción de *Salmonella* producida por el tratamiento fágico. Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente según indica el apartado 3.7.

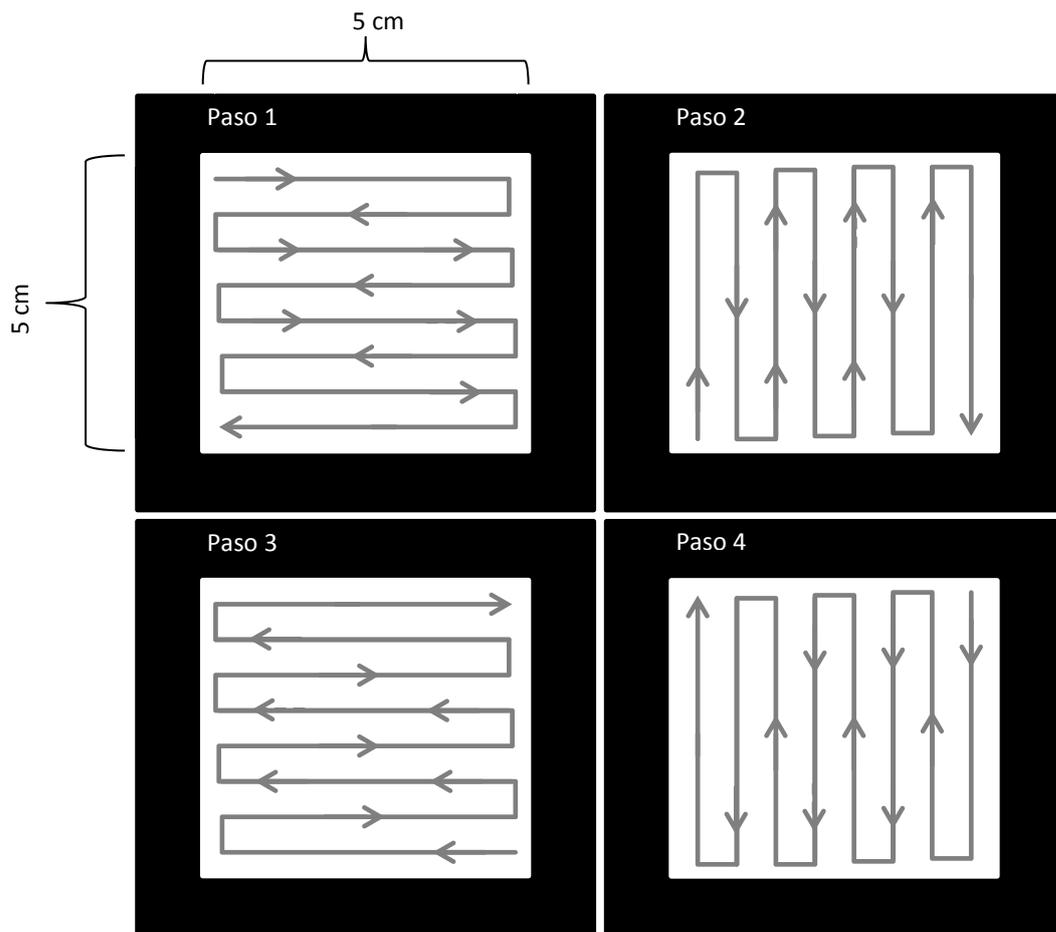


Figura 3.1. Secuencia de muestreo con hisopo de la superficie de la piel de cerdo.

3.6.2. Carne de pollo

En todos los experimentos de descontaminación de carne de pollo, se utilizaron pechugas envasadas adquiridas en un supermercado local. En el laboratorio, estas pechugas se cortaron de forma aséptica con ayuda de un bisturí en trozos de aproximadamente 30 g. En cada experimento se utilizaron 47 trozos de carne (cerca de 1,5 Kg), comprobándose la ausencia de *Salmonella* en dos de ellos. De los 45 restantes, 25 fueron utilizados como control y 20 fueron tratados con el cóctel fágico.

Para determinar la eficacia del tratamiento con el cóctel fágico, se contaminaron los 45 trozos de carne de pollo sumergiéndolos durante 5 min en una suspensión de las cepas UA1872 y UA1894 de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* a 10^6 cfu/ml en NaCl al 0,9% (relación 1:2 p/v). Seguidamente, se eliminó el exceso de líquido y se dejaron secar los trozos de carne en una cabina de seguridad biológica

durante 15 min a temperatura ambiente. Se colocó cada trozo en una bolsa Whirl-Pak (Nasco, Fort Atkinson, WI), a la cual se añadieron 100 ml de una suspensión fágica a 10^9 pfu/ml (n= 20) o de una solución de NaCl al 0,9% (n= 25). Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente en agitación, se eliminó el exceso de líquido y se mantuvieron las muestras a 4°C durante una semana. La cuantificación de *Salmonella* se realizó a tiempo cero en cinco trozos de carne y a los días 1, 2, 5 y 7 en cinco trozos de carne tratada y no tratada con fagos para cada tiempo. Además, se determinó la concentración de fagos en los trozos de carne tratada con el cóctel en los tiempos y ya indicados. Para la cuantificación de *Salmonella* y de los fagos, se añadieron 100 ml de BPW a cada bolsa y se trituró su contenido con un *Bagmixer* (Interscience) a la máxima velocidad durante 60 s. Finalmente, se realizaron diluciones y se procedió a la siembra para el recuento de *Salmonella* y de los fagos de forma similar a la descrita en el apartado 3.6.1. Los resultados se expresaron como se ha comentado en dicho apartado.

3.6.3. Huevos frescos

51

Para el estudio con huevos frescos se utilizaron muestras adquiridas en un supermercado local, midiéndose el largo y el ancho de todos los huevos con un pie de rey (Mitutoyo, Japan). También se limpió cada huevo con una gasa embebida en etanol al 70%.

Antes de los experimentos de eficacia del cóctel fágico, se realizaron diferentes pruebas para obtener un método reproducible de cuantificación de *Salmonella* en la cáscara del huevo. Para ello, se contaminaron un total de 6 huevos para cada metodología con la cepa UA1872 de *S. Typhimurium*. La contaminación de los huevos se realizó sumergiéndolos durante 5 min en una suspensión de *Salmonella* a 10^7 cfu/ml en NaCl a 0,9% (200 ml/huevo). Seguidamente, se dispusieron los huevos contaminados en bandejas desinfectadas como se ha descrito en el apartado 3.6.1. Tras 30 min de secado en una cabina de seguridad biológica, se incubaron todos los huevos 2 h y 30 min a temperatura ambiente. Pasado dicho tiempo, se pulverizaron los huevos con $MgSO_4$ 10 mM y se dejaron secar 30 min en una cabina de seguridad biológica a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la recuperación de

los microorganismos frotando la superficie del huevo con una gasa embebida en BPW (Método 1) y rompiendo el huevo para eliminar su contenido, reservando la cáscara (Método 2). Tanto la gasa como la cáscara se depositaron en sendas botellas con 20 ml de BPW, se agitó y se realizaron diluciones seriadas, sembrando en medio XLD, adecuadamente suplementado con el antibiótico, como se ha descrito anteriormente (apartado 3.6.1).

Para determinar la eficacia del tratamiento con el cóctel fágico de huevos contaminados experimentalmente con las cepas UA1872 y UA1894 de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, se utilizaron 42 huevos frescos. Dos de ellos fueron utilizados para determinar la ausencia de *Salmonella* en los huevos y los 40 restantes fueron contaminados e incubados con *Salmonella* como se ha indicado anteriormente. Veinte de dichos huevos fueron pulverizados con el cóctel fágico a una concentración de 10^{10} pfu/ml, y los otros 20 restantes con $MgSO_4$ 10 mM. Se dejaron secar 30 min en una cabina de seguridad biológica, se mantuvieron seguidamente a temperatura ambiente 1 h 30 min. Finalmente, se recuperaron los microorganismos mediante el Método 2, se realizaron diluciones y se procedió a la siembra para el recuento de *Salmonella* y de los fagos de forma similar a la descrita en el apartado 3.6.1.

52

A partir de los recuentos en placa, se calculó el número de viable por cm^2 de superficie según la fórmula desarrollada por Narushin (2005):

$$S = (3,155 - 0,0136L + 0,0115B) \times L \times B$$

donde S es la superficie del huevo, L es la medida del largo del huevo y B es la medida del ancho.

Los resultados se expresaron de forma similar a la descrita en el apartado 3.6.1.

3.6.4. Verduras frescas

Para el experimento de descontaminación de verduras frescas, se utilizó lechuga romana troceada y envasada, adquirida en un supermercado local.

En cada experimento se utilizaron unos 675 g de lechuga, tomándose muestras de 25 g para cuantificar *Salmonella* y, en su caso, los fagos. En todos los experimentos,

se utilizaron dos muestras para comprobar la ausencia de *Salmonella*. La contaminación de la lechuga se realizó sumergiéndola durante 5 min en una suspensión de las cepas UA1872 y UA1894 de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* a 10^5 cfu/ml en NaCl al 0,9% (1:10 [p/v]) ya que, previamente, se había determinado que con este procedimiento se conseguía una contaminación de 10^4 cfu/g de lechuga. Seguidamente, se eliminó el exceso de líquido y se dejó secar en una cabina de seguridad biológica durante 15 min. Los 625 g así contaminados se distribuyeron en alícuotas de 25 g, los cuales fueron depositados en bolsas Whirl-Pak. A 15 de dichas bolsas se añadieron 100 ml de fagos a 10^9 pfu/ml en NaCl al 0,9% y a las 10 restantes 100 ml de NaCl al 0,9%, manteniéndolas en agitación a 100 rpm a temperatura ambiente. A tiempo cero se procesaron 5 bolsas no tratadas con fagos para determinar la concentración bacteriana inicial. A los tiempos 30 y 60 min se procesaron 5 bolsas en cada tiempo de los dos grupos (control y tratado con fagos). En todos los casos, se eliminó el exceso de líquido y se añadieron 100 ml de BPW, triturándose seguidamente su contenido con un *Bagmixer* a la máxima velocidad durante 60 s. Se realizaron diluciones y se determinó la concentración de *Salmonella* y de los fagos según se ha descrito en apartado 3.6.1. Los resultados se expresaron como se ha comentado en dicho apartado.

53

3.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados por el *Servei de Estadística* de la UAB. Para los análisis de los perfiles de infección de los fagos, la lectura y gestión de la base de datos se realizó con el software SPAD v5.0 para Windows con un nivel de significación de 0,05. En el análisis bivariado se analizó la infección de los fagos según el tipo de cepa infectada y su procedencia, mediante la prueba de homogeneidad de distribuciones discretas adecuada (Test Chi-Cuadrado, Exacto de Fisher o Razón de verosimilitud) en función del cumplimiento de los criterios de aplicación. En el análisis multivariante se realizó un análisis de correspondencias múltiples a partir de las variables indicadoras de infección de cada uno de los fagos. Para facilitar la interpretación de los resultados se aplicó un algoritmo de clasificación para identificar grupos de fagos con perfiles homogéneos.

Como se ha comentado anteriormente, todos los resultados obtenidos en los experimentos de desinfección con fagos de las distintas matrices fueron expresados en logaritmos, siendo utilizados estos datos en los análisis estadísticos. Para ello, la lectura y gestión de la base de datos se realizó con el software SAS v9.2 con un nivel de significación de 0,05. El análisis de normalidad dentro de cada grupo se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para el análisis entre tratados y no tratados se utilizó un modelo no paramétrico (test de Kruskal-Wallis). Los valores se representaron en un diagrama de caja. Cada grupo tratado con fagos se contrastó respecto a los grupos control en el mismo periodo de tiempo y en el tiempo inicial mediante una prueba no paramétrica bivariada (test de Wilcoxon).

4. Resultados

4.1. Análisis de la diversidad de los bacteriófagos de *S. enterica*

Son muy escasos los estudios sobre la diversidad de los fagos de *Salmonella* en diferentes ambientes. Además, tampoco se dispone de datos sobre la existencia de alguna relación entre los fagos de *Salmonella* y sus huéspedes en atención a su origen. Disponer de este tipo de información es clave a la hora de seleccionar fagos de cara a su posterior aplicación en terapia o en desinfección. Por ello, el primer objetivo de este trabajo ha sido estudiar la biodiversidad de los bacteriófagos aislados de granjas de aves y de cerdos que infecten a cepas de *S. Typhimurium* y/o *S. Enteritidis* y analizar si existe alguna especificidad fago/bacteria en atención a su origen.

Para realizar este estudio sólo se disponía de 22 fagos que infectaban a *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* y que habían sido previamente aislados por nuestro grupo desde heces de aves (Bardina, 2011). Por ello, se procedió a aislar bacteriófagos desde heces de cerdo que infectaran a ambas serovariedades de *Salmonella*.

Para el aislamiento de los nuevos fagos, se utilizaron muestras de heces de cerdos de diferentes regiones geográficas de España. Las muestras fueron facilitadas por el Laboratorio de Diagnóstico General (Barcelona, España). Para incrementar las posibilidades de aislamiento de bacteriófagos específicos de *Salmonella*, se procedió a un proceso de enriquecimiento selectivo de esta bacteria a partir de las muestras de heces (ver Material y Métodos). La detección de la presencia de fagos en los filtrados obtenidos se realizó mediante el test de la gota. En esta detección, se utilizaron 11 cepas de *S. enterica* como indicadoras (*S. Enteritidis* [n= 5] y *S. Typhimurium* [n= 6]; véase Tabla 3.1 de Material y Métodos), ya que nuestro grupo había determinado previamente que dichas cepas eran sensibles a la infección de diferentes bacteriófagos.

Tras su detección, los fagos fueron aislados mediante tres pasos de purificación consecutivos, obteniéndose 33 fagos de un total de 103 muestras analizadas, lo cual significa un porcentaje de aislamiento del 32%.

Seguidamente, el total de los 55 fagos de nuestra colección fueron caracterizados en atención a: i) su patrón de restricción con las enzimas *BstEII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y *XbaI* y ii) su perfil de infección sobre 67 cepas de *S. Typhimurium*

(n=49) y *S. Enteritidis* (n=18), aisladas de aves, cerdos y humanos y no relacionadas clonalmente.

El análisis genético permitió diferenciar 22 patrones de restricción (Tabla 4.1). La identificación de 21 de ellos fue posible utilizando solamente el perfil de restricción obtenido con las enzimas *EcoRV* y *XbaI*. La primera de ellas fue la que tuvo una mayor capacidad discriminativa, ya que permitió distinguir 19 patrones (Figura 4.1), mientras que con la enzima *XbaI* pudo dividirse uno de los perfiles de *EcoRV* en tres patrones diferentes (Figura 4.2). Con las enzimas *BstEII*, *EcoRI*, *HindIII* y *PstI* se obtuvieron 9, 7, 12 y 7 patrones de restricción, respectivamente, por lo que su capacidad discriminativa fue menor que la de la enzima *EcoRV*. Sin embargo, el patrón de restricción 22 solamente pudo determinarse con la enzima *BstEII*, ya que el DNA de dicho fago no se digirió con las otras enzimas utilizadas. Además, no fue posible la restricción del DNA de dos de los fagos estudiados con ninguna de las enzimas empleadas.

Tabla 4.1. Patrón de restricción de los fagos estudiados.

Patrón de restricción	Nº de fagos por origen	
	Aviar	Porcino
1	1	-
2	-	4
3	-	6
4	1	-
5	-	9
6	1	-
7	-	1
8	-	1
9	-	1
10	1	-
11	-	1
12	1	-
13	5	-
14	6	-
15	1	-
16	1	-
17	-	3
18	-	1
19	3	-
20	1	-
21	-	3
22	-	1
ND*	0	2
<hr/>		
Nº total de fagos	22	33
<hr/>		
Nº total de patrones	11	11

* ND, incluye los fagos cuyo DNA no se digirió con ninguna de las enzimas utilizadas.

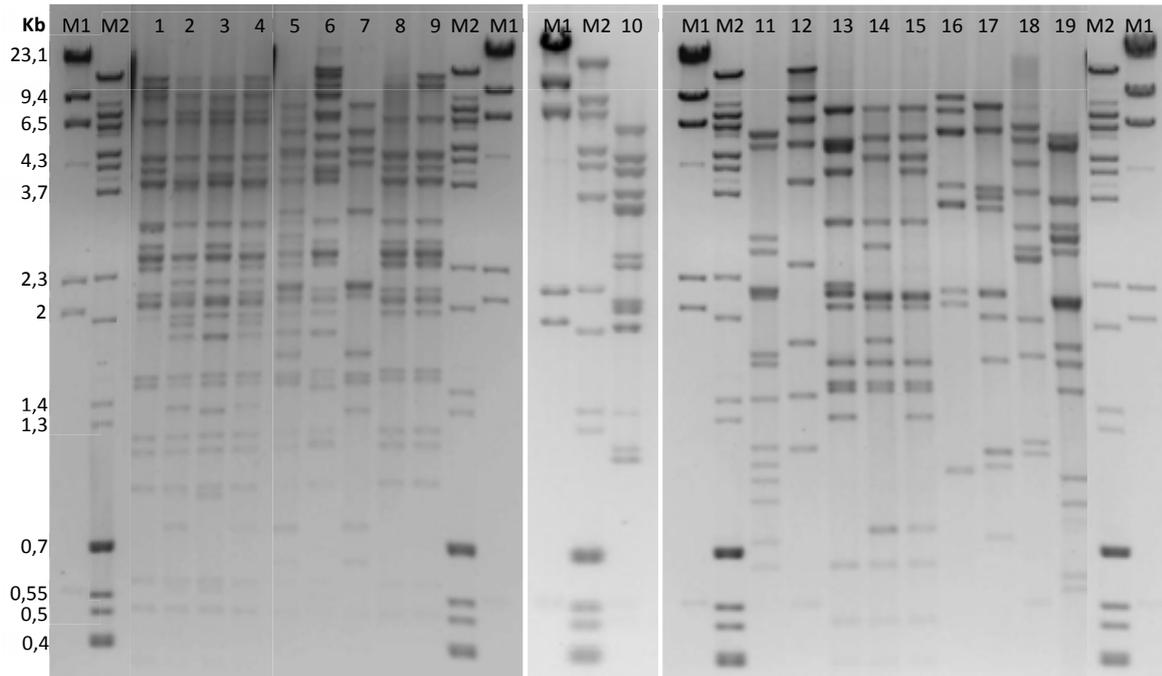


Figura 4.1. Patrones de digestión del DNA (1 a 19) obtenidos para los fagos estudiados con la enzima de restricción *EcoRV*. El DNA del fago λ digerido con *HindIII* (M1) y de dicho fago digerido con *BstEII* mezclado con el DNA del fago ϕ X714 cortado con *HinfI* (M2) son utilizados como patrón.

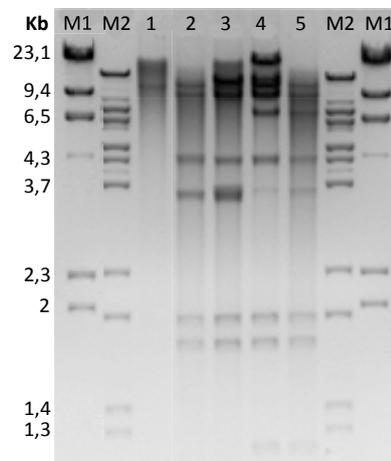


Figura 4.2. Patrones de digestión del DNA (1 a 5) obtenidos para los fagos estudiados con la enzima de restricción *XbaI*. El DNA del fago λ digerido con *HindIII* (M1) y de dicho fago digerido con *BstEII* mezclado con el DNA del fago ϕ X714 cortado con *HinfI* (M2) son utilizados como patrón.

Por otro lado, el estudio del espectro de infección sobre las 67 cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* de origen aviar, porcino y humano reveló una alta variabilidad, obteniéndose 39 perfiles de infección para los 55 fagos estudiados (Tablas 4.2 y 4.3). Dichos perfiles se definieron en función de la ausencia o presencia de un halo de lisis sobre las cepas bacterianas utilizadas.

Tabla 4.3. Patrón de infección de los fagos estudiados.

Patrón de infección	Nº de fagos por origen	
	Aviar	Porcino
1	-	1
2	-	3
3	-	4
4	-	2
5	-	6
6	-	1
7	1	-
8	2	1
9	-	1
10	-	1
11	-	1
12	-	1
13	1	-
14	1	-
15	-	1
16	-	1
17	1	-
18	1	-
19	1	-
20	1	-
21	1	-
22	1	2
23	2	-
24	1	-
25	1	-
26	1	-
27	1	-
28	1	-
29	-	1
30	-	1
31	-	1
32	-	1
33	-	1
34	1	-
35	1	-
36	1	-
37	1	-
38	-	1
39	-	1
Nº total de fagos	22	33
Nº total de patrones	20	21

En ambos tipos de estudio, los fagos aislados de aves presentaron una mayor variabilidad respecto a los obtenidos desde cerdos. Así, se identificaron 11 perfiles de restricción y 20 perfiles de infección para los 22 fagos de aves. Sin embargo, para los 33 fagos provenientes de cerdos sólo se observaron 11 perfiles de restricción y 21 de

infección. Es destacable el hecho de que los fagos aislados en ambos ambientes (granjas de aves y de cerdos) no mostraron coincidencias en los perfiles de restricción y únicamente compartieron dos perfiles de infección (Tablas 4.1 y 4.3).

Debido a que el espectro de infección presentó una mayor variabilidad, se realizó un análisis estadístico con el objetivo de determinar si había alguna agrupación entre los diferentes patrones obtenidos. En este estudio se incluyeron aquellos fagos que, a pesar de mostrar perfiles idénticos, habían sido aislados desde muestras obtenidas en periodos distintos. En cambio, en los casos en que varios fagos presentaron al mismo perfil de infección y habían sido aislados de muestras obtenidas en la misma fecha, sólo se escogió un fago representante. En atención a estos criterios, este estudio se realizó con 46 fagos.

El análisis bivariado (prueba de homogeneidad de distribuciones discretas) indicó que el 41,3% de dichos fagos infectaban a un porcentaje superior de cepas de *S. Enteritidis* que de *S. Typhimurium* ($p \leq 0,01$), independientemente del origen de dichas cepas (ave, cerdo o humano). Para determinar si existía algún tipo de relación entre el origen (aves, cerdos y humanos) de los fagos y de las cepas de *Salmonella* y su serovariedad, se realizó un análisis de correspondencia múltiple de los 46 perfiles. Dicho análisis agrupó a los fagos en tres grupos en función de las cepas que infectaban ($p \leq 0,001$). Dichos grupos se muestran en el dendrograma y en el mapa factorial de la Figura 4.3.

Un análisis detallado de dichos grupos indicó que el primero de ellos englobaba a 26 fagos que infectaban preferentemente a cepas de *S. Typhimurium*, si bien alguno de ellos también infectaba a *S. Enteritidis*. El segundo grupo formado por 16 fagos, incluye a aquellos fagos que mayoritariamente no infectan a *S. Typhimurium* y el tercero, con 4 fagos, a los que sólo infectan a un pequeño porcentaje de cepas (Tabla 4.4). Se debe señalar que en cada uno de estos grupos no se obtuvo ninguna significación en cuanto al origen de los fagos y de las cepas.

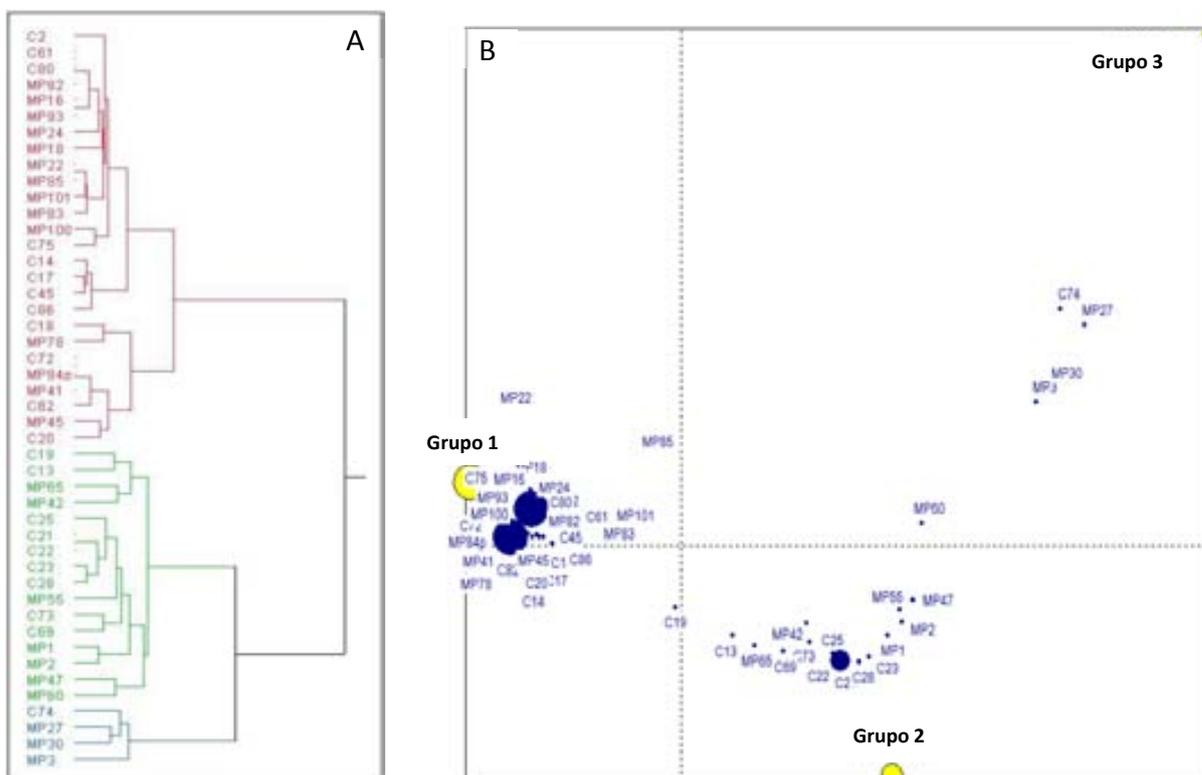


Figura 4.3. Dendrograma (A) y mapa factorial (B) de los grupos de fagos según el análisis de correspondencia múltiple realizado con el programa SPAD v5.0.

64

Tabla 4.4. Grupos de fagos identificados a través del análisis de correspondencia múltiple.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Bacteriófagos	C2, C14, C17, C18, C20, C45, C61, C72, C75, C80, C82, C86, MP16, MP18, MP22, MP24, MP41, MP45, MP78, MP82, MP83, MP84p, MP85, MP93, MP100, MP101.	C13, C19, C21, C22, C23, C25, C28, C69, C73, MP1, MP2, MP42, MP47, MP55, MP60, MP65.	C74, MP3, MP27, MP30

4.2. Selección de bacteriófagos candidatos a desinfectantes

El segundo objetivo de este trabajo ha sido aislar, identificar y caracterizar fagos candidatos para ser utilizados como desinfectantes para reducir la concentración de *Salmonella* en diferentes procesos de la industria alimentaria. Por ello, una vez se hubieron aislado los 33 fagos procedentes de las heces de cerdo, se procedió a la selección de los mejores candidatos.

El primer criterio de selección fue escoger a aquellos fagos que habían presentado un mayor espectro de infección frente a nuestra colección de cepas de las serovariedades Typhimurium (n= 49) y Enteritidis (n= 18). Para ello, se analizaron los 21 perfiles de infección, comentados en el apartado anterior (Tabla 4.2). Así, pudo observarse que 5 de ellos incluían a más de un fago y que el porcentaje de cepas infectadas oscilaba, según el fago, entre el 6 y el 97%, con una mediana del 80,6% (Tabla 4.5). También se observó que todos los fagos daban lugar a calvas líticas o turbias según la cepa. El porcentaje de calvas líticas osciló entre el 24,3 y el 81,2% según el fago, siendo la mediana del 35,8% (Tabla 4.5). Un análisis detallado de estos resultados indicó que el fago MP78 era el que presentaba una mejor relación entre número de cepas infectadas (n= 64) y halos líticos (n= 52). Por ello, se escogió a dicho fago, al que se denominó UAB_Phi78, para posteriores estudios.

El éxito del control de patógenos utilizando bacteriófagos está estrechamente vinculado a la capacidad de lisis de las bacterias diana (EFSA, 2009). Por ello, el segundo criterio de selección fue estudiar la cinética de infección del fago UAB_Phi78 sobre las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 a diferentes temperaturas (4, 25, 30 y 37°C), debido a su posible uso en distintas condiciones ambientales. Los resultados obtenidos revelaron que el fago UAB_Phi78 causó un descenso de la absorbancia a 550 nm (A_{550}) de ambos cultivos bacterianos con la misma rapidez e intensidad, a las temperaturas de 30 y 37°C. No obstante, los resultados también mostraron una recuperación de la concentración bacteriana más rápida a la temperatura más elevada (Figura 4.4). En la misma figura, puede observarse que a 25°C, se obtuvo una reducción más lenta de la A_{550} de ambas cepas bacterianas, prolongándose este descenso durante mayor tiempo, sobre todo en el caso de *S. Typhimurium*. Por otro lado, se observó que la infección del fago UAB_Phi78 de los cultivos de ATCC 14028 y LK5 a 4°C detuvo el crecimiento de ambas bacterias durante un día, el cual fue aumentando progresivamente para *S. Typhimurium* ATCC 14028. En cambio, en el caso de *S. Enteritidis* LK5 dicho aumento a lo largo del tiempo se produjo a partir del segundo día de incubación a 4°C. En cualquier caso, pasados 7 días, la A_{550} de ambos cultivos infectados fue inferior a la de los cultivos no infectados (Figura 4.5).

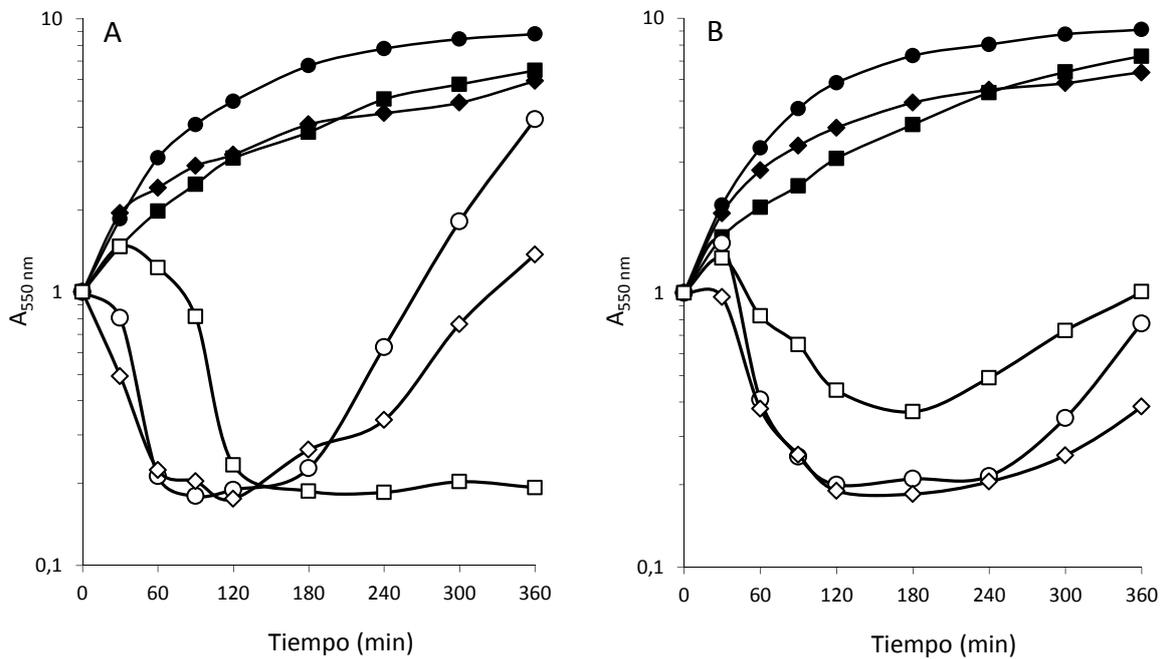


Figura 4.4. Cinética de infección del bacteriófago UAB_Phi78 a una MOI de 1 sobre las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 (A) y *S. Enteritidis* LK5 (B) a lo largo del tiempo a 37°C (○), 30°C (◊) y 25°C (□). Los símbolos rellenos representan la curva control sin infectar a las respectivas temperaturas de ensayo.

67

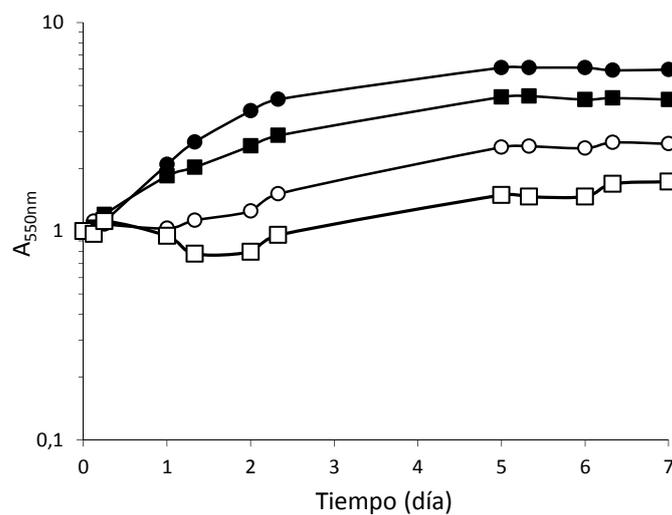


Figura 4.5. Cinética de infección del bacteriófago UAB_Phi78 a una MOI de 1 sobre las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 (○) y *S. Enteritidis* LK5 (□) a lo largo del tiempo a 4°C. Los símbolos rellenos representan la curva control sin infectar.

Como se ha comentado anteriormente, trabajos paralelos realizados por nuestro grupo de investigación se habían centrado en aislar y seleccionar posibles fagos desde heces de aves. En dichos trabajos se habían seleccionado y caracterizado los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 como candidatos para formar parte de un cóctel fágico destinado a terapia fágica y desinfección.

Al analizar el espectro de infección de estos fagos y también el del fago UAB_Phi78 se observó que eran diferentes y que los tres fagos eran capaces de infectar al 97% de las cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* de nuestra colección, dando lugar a un 81,2% de halos claros (Tabla 4.5). A la vista de estos datos, se decidió analizar el patrón de restricción del genoma de los tres fagos con las enzimas *EcoRI*, *EcoRV* y *HindIII*. Como puede observarse en la Figura 4.6, los patrones obtenidos mostraron que los tres fagos presentaban perfiles de restricción distintos.

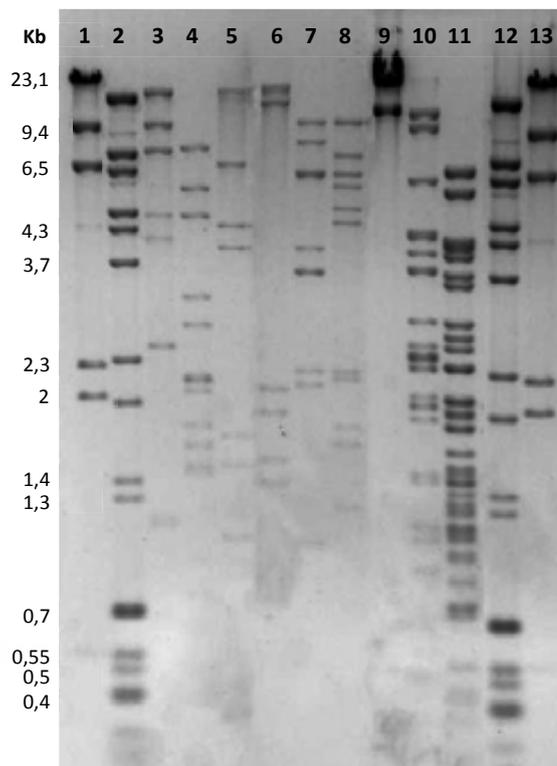


Figura 4.6. Perfil de restricción de los fagos UAB_Phi20 (3 a 5), UAB_Phi78 (6 a 8) y UAB_Phi87 (9 a 11). Los carriles 3, 6 y 9; 4, 7 y 10; 5, 8 y 11 corresponden a la digestión con las enzimas *EcoRI*, *EcoRV* y *HindIII*, respectivamente. El DNA del fago λ cortado con *HindIII* (carriles 1 y 13) y el de dicho fago digerido con *BstEII*, mezclado con el DNA del fago ϕ X714 cortado con *HinfI* (carriles 2 y 12) son utilizados como patrón.

Dado que el fago UAB_Phi78 era claramente diferente a los otros dos fagos, se procedió a estudiar comparativamente la cinética de infección de un cóctel fágico compuesto por los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 (cóctel fágico A) y de otro cóctel integrado por los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78 (cóctel fágico B) sobre las cepas ATCC 14028 y LK5 a 37°C. En todos los casos, la concentración de cada fago en los combinados fue siempre la misma, respetando una relación de 1 entre cada uno de los fagos y realizando las infecciones a MOI 1.

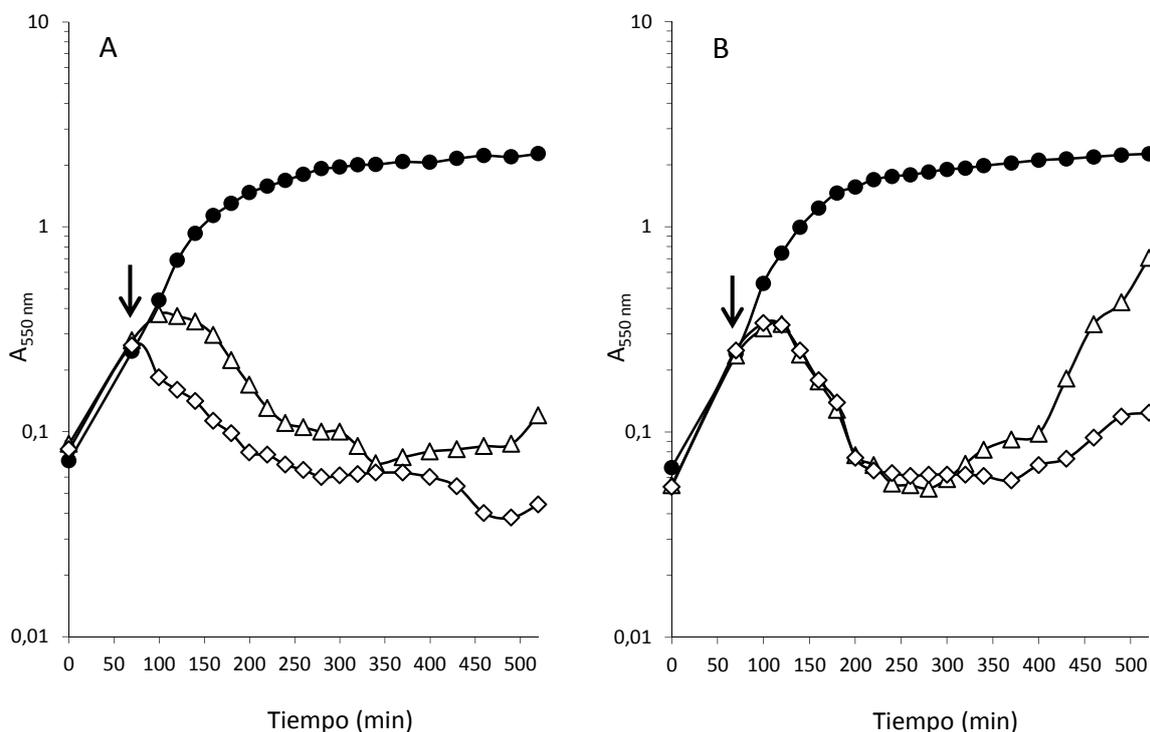


Figura 4.7. Cinética de infección de los cócteles fágicos A (Δ) y B (\diamond) a una MOI de 1 sobre las cepas de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (A) y *S. Enteritidis* LK5 (B) a lo largo del tiempo a 37°C. Como control se muestra la A_{550} de ambos cultivos sin infectar (\bullet). La flecha indica el momento de la infección.

Los resultados obtenidos mostraron que en la infección de la cepa ATCC 14028, la adición del fago UAB_Phi78 provoca una reducción mayor y más rápida de la A_{550} del cultivo bacteriano (Figura 4.7, Panel A). En cambio, la inclusión del fago UAB_Phi78 en el cóctel no afecta a la cinética de infección obtenida sobre la cepa LK5 hasta los 250 min de infección. A partir de este tiempo, se observó que la infección con el cóctel que contiene a dicho fago tiene un mayor efecto en la disminución de la A_{550} del cultivo a lo largo del tiempo que el cóctel que no lo contiene (Figura 4.7, Panel B). Además,

también puede observarse en esta figura que el descenso de la A_{550} causado por la infección de ATCC 14028 con ambos cócteles se produce antes y se mantiene durante un mayor período de tiempo que en los cultivos infectados de LK5.

Asimismo, se determinó la evolución de la concentración bacteriana mediante recuento de viables tras la infección de ambas cepas de *Salmonella* con los cócteles fágicos A y B. En la Tabla 4.6, se indica la reducción de dicha concentración a los 60 min y a las 8 h de la infección y también la máxima reducción obtenida. Los resultados presentados en dicha tabla muestran claramente que el cóctel que contiene al fago UAB_Phi78 produce una mayor reducción de la concentración de viables de ambas cepas y que este descenso es mayor en la concentración de LK5 que en la de ATCC 14028.

Tabla 4.6. Reducción de la concentración de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 debida a su infección con los cócteles A (UAB_Phi20 y UAB_Phi87) y B (UAB_Phi20, UAB_Phi87 y UAB_Phi78).

Bacteria	Cóctel	Reducción (Log_{10} cfu/ml)		
		60 min	8 h	Máxima
<i>S. Typhimurium</i>	A	2,5	2,4	4,3 ¹
	B	3,2	2,8	4,3 ¹
<i>S. Enteritidis</i>	A	1,4	3,7	5,6 ²
	B	2,3	4,1	6,5 ²

¹Reducción obtenida tras 4 h de infección

²Reducción obtenida tras 3 h de infección

Los programas de control de *Salmonella* en el sector avícola en la UE, no sólo se centran en la erradicación de las serovariedades *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, sino que también son objetivo de interés *S. Hadar*, *S. Infantis* y *S. Virchow* (EFSA, 2011). Esto se debe a que dichas serovariedades fueron identificadas entre las 10 principales causantes de brotes de salmonelosis en la UE en el año 2009 (EFSA, 2011). Por ello, también se estudió si ambos cócteles eran capaces de lisar cultivos de las serovariedades *Hadar*, *Infantis* y *Virchow*. Los resultados obtenidos mostraron que ambos cócteles producen una disminución de la A_{550} de los cultivos de todas ellas, aunque se obtuvieron mejores resultados, de nuevo, con el cóctel B (Figura 4.8).

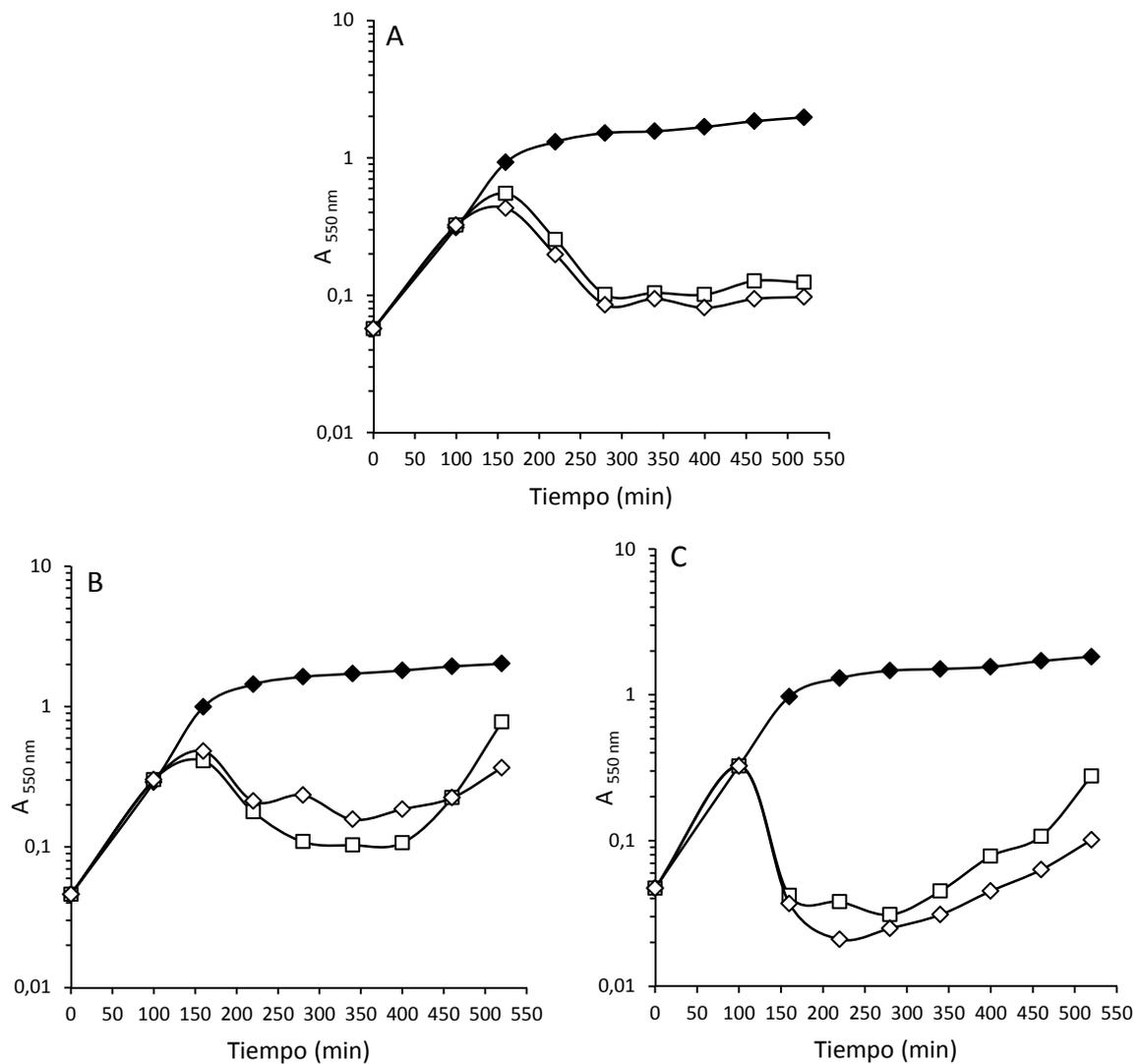


Figura 4.8. Cinética de infección de los cócteles fágicos A (□) y B (◇) de las serovariedades Virchow (panel A), Infantis (panel B) y Hadar (panel C) de *S. enterica*. Como control se muestra la $A_{550\text{nm}}$ de los cultivos de cada una de las serovariedades estudiadas sin infectar (◆).

4.3. Caracterización del bacteriófago UAB_Phi78

Dado que el fago UAB_Phi78 era un buen candidato para ser incluido en un cóctel fágico con aplicaciones en desinfección, se procedió a su caracterización. Para ello, se determinó su morfología, el tamaño de su genoma, se estudió su estabilidad a distintas condiciones ambientales, los parámetros de su ciclo multiplicativo y su mecanismo de empaquetamiento.

4.3.1. Morfología del fago y tamaño del genoma

La morfología del fago UAB_Phi78 se visualizó mediante microscopía electrónica de transmisión. De este modo, pudo observarse que poseía una cápside pequeña e icosaédrica y una cola corta no contráctil (Figura 4.9), lo que permitía clasificarlo en la familia *Podoviridae* (Ackermann, 2005). Además, pudo establecerse que el diámetro de su cápside era de $66 \pm 1,7$ nm y la longitud de su cola de $14 \pm 0,7$ nm.

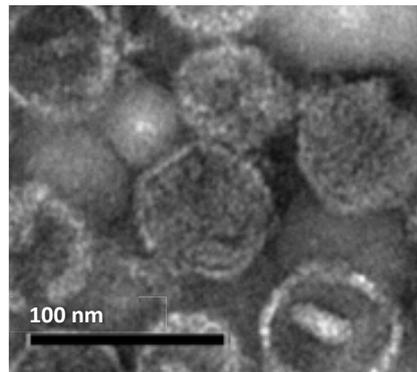


Figure 4.9. Microscopía electrónica de transmisión del bacteriófago UAB_Phi78.

72

Seguidamente, se determinó el tamaño del genoma del fago mediante PFGE, determinándose con esta metodología que el fago UAB_Phi78 posee un genoma de 43 Kb, aproximadamente (Figura 4.10).

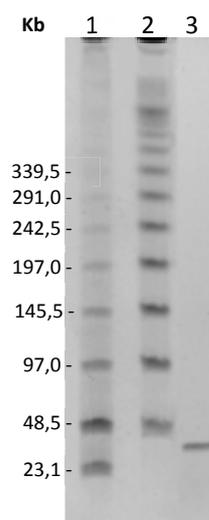


Figura 4.10. Determinación del tamaño del genoma del fago UAB_Phi78 mediante PFGE. (1) Patrón de tamaño "Low range PFG marker"; (2) Patrón de tamaño "Lambda Ladder PFG marker"; (3) DNA del fago UAB_Phi78.

4.3.2. Efecto de las condiciones ambientales en la estabilidad fágica

Los fagos seleccionados para el uso en terapia o desinfección de diferentes tipos de matrices deben ser estables en las condiciones ambientales a las que estarán expuestos. Por ello, se determinó la estabilidad del fago UAB_Phi78 a diferentes temperaturas y condiciones de acidez y alcalinidad, así como a 4°C, por ser una temperatura adecuada para conservar fagos durante largos periodos de tiempo.

Así, se determinó la estabilidad del fago UAB_Phi78 durante 8 días a 25, 30, 37 y 42°C, temperaturas que se corresponden, respectivamente, con la temperatura ambiental, la de la superficie corporal de los mamíferos, la corporal interna de los mamíferos y la corporal interna de las aves. Como se observa en la Tabla 4.7, dicho fago es muy estable a 25°C y 30°C, ya que su infectividad solo se redujo 0,3 y 0,2 log₁₀ cfu/ml, respectivamente, a los 8 días de incubación a dichas temperaturas. A 37°C, el título de este fago se redujo 0,5 log₁₀ cfu/ml desde el primer día de incubación a esta temperatura, manteniéndose así hasta el octavo día de incubación. Por el contrario a 42°C, la reducción del título del fago sufrió un mayor descenso, alcanzando una disminución de 1,4 log₁₀ cfu/ml a los 8 días de mantenerlo a esta temperatura. Además, como puede observarse en la Tabla 4.8, el fago UAB_Phi78 redujo el título solamente 0,6 log₁₀ cfu/ml tras un año de conservación en refrigeración, lo cual indica una elevada estabilidad bajo estas condiciones.

73

Tabla 4.7. Reducción de la capacidad infectiva del bacteriófago UAB_Phi78 a diferentes temperaturas.

Tiempo (día)	Reducción (Log ₁₀ cfu/ml)			
	25°C	30°C	37°C	42°C
1	0	0,2	0,4	0,8
2	0	0,2	0,5	0,8
3	0	0,2	0,5	0,9
4	0,03	0,2	0,5	0,8
5	0,1	0,2	0,5	1,3
6	0,2	0,2	0,5	1,3
7	0,2	0,2	0,4	1,3
8	0,3	0,2	0,5	1,4

Tabla 4.8. Reducción de la capacidad infectiva del bacteriófago UAB_Phi78 a 4°C.

Tiempo (meses)	Reducción (Log ₁₀ cfu/ml)
2	0
4	0,1
6	0,5
12	0,6

Por otra parte, como puede observarse en la Tabla 4.9, la infectividad del fago UAB_Phi78 prácticamente no se alteró durante 120 min a valores de pH comprendidos entre 4 y 9, si bien a este tiempo a pH 4 se observó una reducción de 1 log₁₀ cfu/ml. En cambio a pH 2, se observó una disminución de 1,5 log₁₀ cfu/ml a los 30 min y de 5,8 log₁₀ cfu/ml tras mantenerlos 120 min en estas condiciones.

Tabla 4.9. Reducción de la capacidad infectiva del bacteriófago UAB_Phi78 tras su exposición a diferentes pH a lo largo del tiempo.

pH	Reducción (Log ₁₀ cfu/ml)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
2	1,5	3,9	5,2	5,8
4	0	0	0,2	1
6	0	0	0	0
9	0,03	0,02	0,1	0,2

74

4.3.3. Parámetros del ciclo multiplicativo

Como se ha comentado en la Introducción, el primer paso en la infección fágica es el reconocimiento y la adsorción del fago a los receptores de su huésped. Este proceso viene definido por la constante de adsorción, la cual es un valor característico de cada pareja fago/huésped y puede variar en función de las condiciones fisiológicas del huésped, de la MOI y de factores físico-químicos tales como la temperatura, el pH y la presencia de determinadas sustancias o iones en el medio (Rakhuba *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 mostraron que la constante de adsorción del fago UAB_Phi78 es prácticamente la misma (Figura 4.11 y Tabla 4.10).

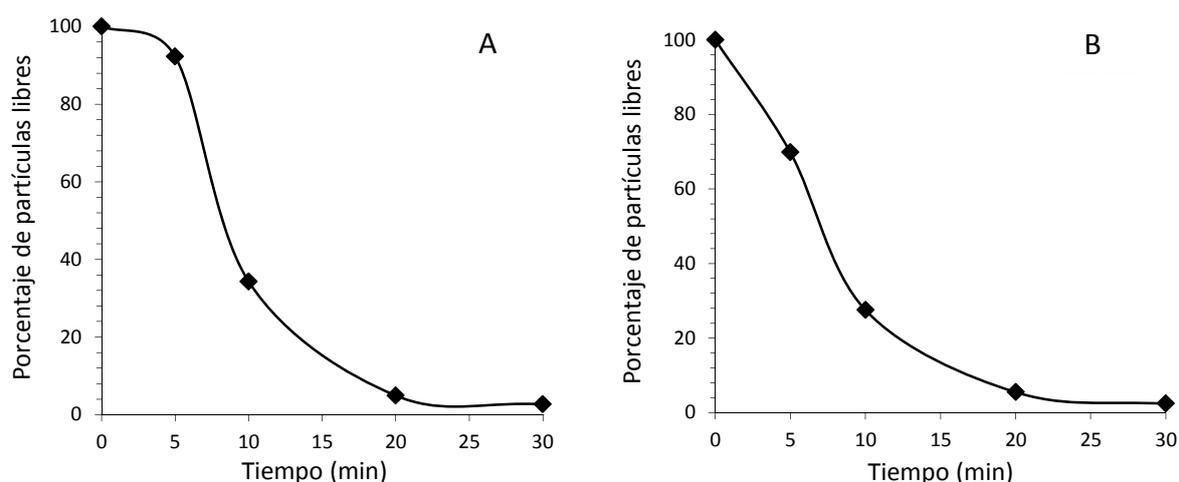


Figura 4.11. Cinética de adsorción a 37°C del fago UAB_Phi78 sobre las cepas ATCC 14028 (A) y LK5 (B).

Tabla 4.10. Parámetros del ciclo lítico del fago UAB_Phi78.

Parámetro	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>S. Enteritidis</i> LK5
Constante de adsorción ($\text{ml cfu}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$1,2 \times 10^{-9} \pm 6,1 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-9} \pm 4,7 \times 10^{-10}$
Tiempo de eclipse (min)	$21,7 \pm 2,9$	$26,7 \pm 2,9$
Tiempo de latencia (min)	$26,7 \pm 2,9$	$26,7 \pm 2,9$
Tamaño de explosión (pfu/cfu)	$87,7 \pm 21,1$	$20,8 \pm 5,3$

75

Para tener una información más precisa de las etapas de la infección fágica se realizó un experimento conocido como curva de crecimiento viral en escalón (*one step growth curve*), que permite determinar los tiempos de latencia y de eclipse y el tamaño de explosión del fago. En la Tabla 4.10 y en la Figura 4.12 se presentan los resultados de dicho experimento al infectar con el fago UAB_Phi78 a las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5. En la Tabla 4.10 puede observarse que el tiempo de latencia de este fago en ambas serovariedades es similar, si bien el tiempo de eclipse fue algo menor en *S. Typhimurium* que en *S. Enteritidis*. Además, los valores obtenidos para el tiempo de latencia y el de eclipse en la infección de *S. Enteritidis* LK5 fueron iguales, lo que significa que la diferencia entre ambos tiempos debía ser inferior a 5 min, ya que éste fue el intervalo de tiempo en el que se tomaron las muestras. De la misma manera, se observó que la producción fágica fue muy distinta en las dos cepas. Así, al infectar a LK5, sólo se obtienen 20 partículas del fago UAB_Phi78 por

célula bacteriana infectada, mientras que el tamaño de explosión del fago en la cepa ATCC 14028 es cercano a 90.

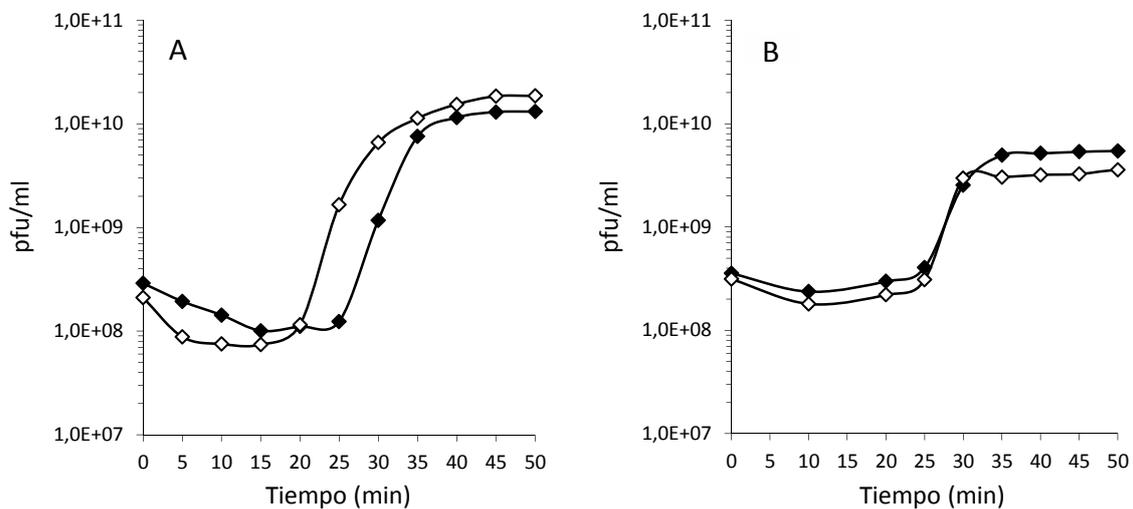


Figura 4.12. *One-step growth* del fago UAB_Phi78 sobre las cepas ATCC 14028 (A) y LK5 (B).

4.3.4. Mecanismo de empaquetamiento del DNA

76

La multiplicación del material genético fágico en la célula bacteriana termina con la acumulación de concatámeros de DNA, los cuales deben ser procesados y empaquetados en las nuevas cápsides víricas mediante extremos cohesivos (*cos*) o permutación circular con redundancia terminal (*pac*). Para averiguar el tipo de mecanismo de empaquetamiento utilizado por el fago UAB_Phi78, se comparó el perfil de bandas del DNA fágico digerido con la enzima *EcoRV* y desnaturalizado por temperatura con el del DNA fágico digerido pero no desnaturalizado (Figura 4.13).

Si el DNA fágico poseyera extremos cohesivos, deberían observarse cambios entre ambos perfiles, mientras que si no los presentara, no deberían observarse alteraciones en el patrón de restricción. Los resultados obtenidos mostraron que el patrón de bandas de DNA del UAB_Phi78 no variaba, asumiéndose que el sistema de empaquetamiento se producía mediante el sistema *pac* (Hernández, 2007). En la Figura 4.13, también puede observarse el DNA del fago λ , el cual presenta extremos cohesivos, sometido a las mismas condiciones que el DNA del fago UAB_Phi78. En dicha figura puede apreciarse que cuando el DNA del fago λ no se desnaturaliza se

observa una banda de 3.326 bp, mientras que si se trata a 95°C disminuye la intensidad de dicha banda. Además, a dicha temperatura aumenta la intensidad de una banda de 650 bp y se obtiene una nueva banda de 2.674 bp.

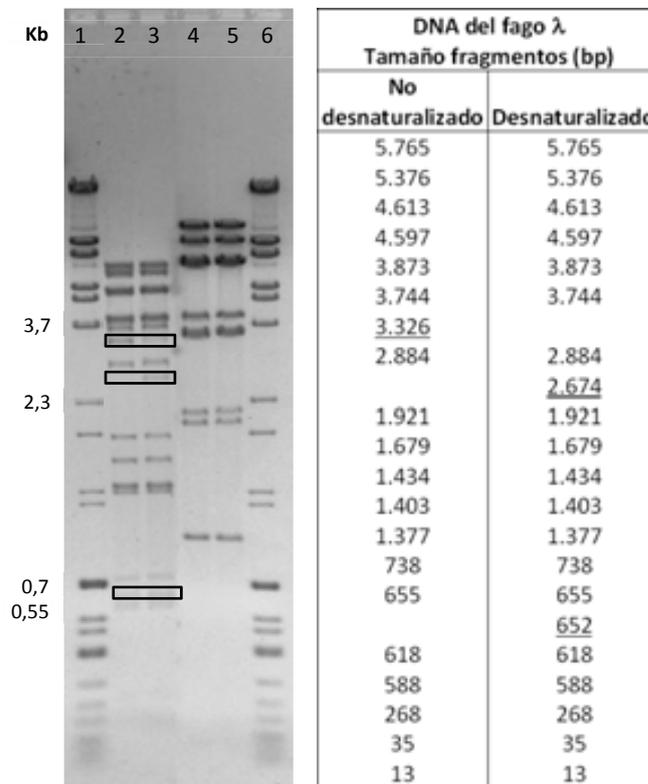


Figura 4.13. Determinación de la presencia de extremos *cos* en el genoma del fago UAB_Phi78 (carriles 4 y 5) y en el del fago λ , como control (carriles 2 y 3), mediante restricción con la enzima *EcoRV*. Los carriles 2 y 4 corresponden a la muestra no desnaturalizada mientras que los carriles 3 y 5 a la desnaturalizada. El DNA del fago λ digerido con *BstEII* mezclado con el DNA del fago ϕ X714 cortado con *HinfI* (carriles 1 y 6) es utilizado como patrón. En la tabla se indica el tamaño de los fragmentos obtenidos tras la digestión del genoma del fago λ con la enzima *EcoRV*, mediante el programa MapDraw (DNASTAR Inc.). El fragmento generado por la unión de los extremos *cos* (3.326 bp) y los generados tras su desnaturalización (2.674 bp y 652 bp) se subrayan en la tabla y se indican en un recuadro en la imagen.

4.3.5. Genómica del fago UAB_Phi78

4.3.5.1. Estrategia de secuenciación

El genoma del fago UAB_Phi78 fue secuenciado por Sistemas Genómicos (Valencia), empleando la técnica de rotura mecánica. Su tamaño fue de 43.940 pb, valor muy parecido al estimado mediante PFGE, con un porcentaje G+C del 47,41%. La

secuencia obtenida fue depositada en el GenBank bajo el número de acceso GU595417.

4.3.5.2. Identificación de los posibles genes

El análisis de los marcos abiertos de lectura (*open reading frame*; ORF) presentes en el genoma del fago UAB_Phi78, así como su traducción a secuencias aminoacídicas, se realizó mediante el programa ORF Finder (NCBI). Para este estudio, se fijó un tamaño mínimo de polipéptido de 25 aminoácidos (aa), prediciéndose 406 posibles ORF. Con el objetivo de encontrar similitudes con proteínas ya descritas, se analizó cada uno de los ORF con el programa BlastP (NCBI). Tras este estudio, el número definitivo de genes se redujo a 58 (Tabla 4.11). El análisis del genoma del fago UAB_Phi78 reveló una elevada similitud con el del fago SP6 de *Salmonella* y con otros fagos tipo SP6 que infectan *E. coli* (K1-5, K1E y K1F). En función de ello y de la morfología observada en microscopía electrónica, se le clasificó definitivamente como un virus del Orden *Caudovirales*, Familia *Podoviridae*, Subfamilia *Autographivirinae*, Género tipo SP6.

Tabla 4.11. Caracterización de los ORF y proteínas del bacteriófago UAB_Phi78.

Gen	Producto génico ^a	Dirección ^b	Posición inicial ^c	Posición final ^c	Longitud de la proteína (aa)	Función de la proteína ^d	Secuencia con mayor similitud ^e	Valor e ^f
Phi78p1		+	662	949	95	Desconocida	ND	ND
Phi78p2		+	954	1016	20	Desconocida	ND	ND
Phi78p3		+	1062	1241	59	Desconocida	ND	ND
Phi78p4		+	1238	1417	59	Desconocida	AAP48742.1 Gp3 Bacteriófago SP6	2e ⁻²²
Phi78p5		+	1410	1619	69	Desconocida	AAP48743.1 Gp4 [Bacteriófago SP6]	5e ⁻²⁵
Phi78p6		+	1773	2129	118	Desconocida	AAP20499.1	7e ⁻³⁸
Phi78p7		+	2130	2249	39	Desconocida	0.3 [Bacteriófago phiA1122]	ND
Phi78p8		+	2319	2474	51	Desconocida	ND	ND
Phi78p9		+	2537	3412	291	Desconocida	CAJ29406.1 Gp6 [Bacteriófago K1E]	2e ⁻¹¹³
Phi78p10	Gp8	+	3487	6111	874	RNA polimerasa	AAP48747.1 Gp8 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p11		+	6771	6845	24	Desconocida	ND	ND
Phi78p12		+	6849	6974	41	Desconocida	AAP33970.1 gene 1.1 [Bacteriófago T7]	1,7e ⁻¹
Phi78p13	Gp10	+	6976	8871	631	DNA primasa	AAP48750.1 Gp10 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p14		+	9065	9469	134	Desconocida	ND	ND
Phi78p15		+	9381	9614	77	Desconocida	ND	ND
Phi78p16		+	9607	9807	66	Desconocida	ND	ND
Phi78p17		+	9758	10000	80	Desconocida	AAP48751.1 Gp12 [Bacteriófago SP6]	5e ⁻²¹
Phi78p18		+	10068	10172	33	Desconocida	ND	
Phi78p19		+	10159	10377	72	Desconocida	CAJ29416.1 Gp12 [Bacteriófago K1E]	6e ⁻³³

Tabla 4.11. Caracterización de los ORF y proteínas del bacteriófago UAB_Phi78 (continuación).

Gen	Producto génico ^a	Dirección ^b	Posición inicial ^c	Posición final ^c	Longitud de proteína (aa)	Función de proteína ^d	Secuencia con mayor similitud ^e	Valor e ^f
<i>Phi78p20</i>	Gp14	+	10364	12910	848	DNA polimerasa	AAP48753.1 Gp14 [Bacteriófago SP6]	0
<i>Phi78p21</i>		+	12910	13008	32	Desconocida	AAP48754.1 Gp15 [Bacteriófago SP6]	8e ⁻⁵
<i>Phi78p22</i>		+	13123	13500	125	Desconocida	AAP48756.1 Gp17 [Bacteriófago SP6]	4e ⁻³⁸
<i>Phi78p23</i>		+	13580	14389	269	Desconocida	AAP48757.1 Gp18 [Bacteriófago SP6]	2e ⁻¹⁴²
<i>Phi78p24</i>	Gp20	+	14407	14625	72	Desconocida	AAP48758.1 Gp19 [Bacteriófago SP6]	4e ⁻³⁵
<i>Phi78p25</i>		+	14645	14728	27	Desconocida	ND	ND
<i>Phi78p26</i>	Gp20	+	14731	15099	122	Desconocida	AAP48759.1 Gp20 [Bacteriófago SP6]	1e ⁻⁴⁹
<i>Phi78p27</i>		+	15165	15476	103	Desconocida	ND	ND
<i>Phi78p28</i>	Gp21	+	15383	16414	343	Exonucleasa	AAP48760.1 Gp21 [Bacteriófago SP6]	0
<i>Phi78p29</i>	Gp22	+	16399	16809	136	Endonucleasa	AAP48761.1 Gp22 [Bacteriófago SP6]	5e ⁻⁷¹
<i>Phi78p30</i>		+	16895	17809	304	Desconocida	AAP48762.2 Gp23 [Bacteriófago SP6]	0
<i>Phi78p31</i>		+	17910	18359	149	Desconocida	AAR90065.1 23 [Bacteriófago K1-5]	3e ⁻⁴³
<i>Phi78p32</i>	Gp25	+	18359	19306	315	DNA ligasa	AAP48764.1 Gp25 [Bacteriófago SP6]	0
<i>Phi78p33</i>		+	19278	19493	71	Desconocida	AAP48765.1 Gp26 [Bacteriófago SP6]	3e ⁻²⁷
<i>Phi78p34</i>		+	19456	19599	47	Desconocida	AAP48766.1 Gp27 [Bacteriófago SP6]	3e ⁻⁷

Tabla 4.11. Caracterización de los ORF y proteínas del bacteriófago UAB_Phi78 (continuación).

Gen	Producto génico ^a	Dirección ^b	Posición inicial ^c	Posición final ^c	Longitud de proteína (aa)	Función de proteína ^d	Secuencia con mayor similitud ^e	Valor e ^f
Phi78p35		+	19629	20090	153	Desconocida	AAP48767.1 Gp28 [Bacteriófago SP6]	2e ⁻⁸³
Phi78p36		+	20100	20309	69	Desconocida	AAP48768.1 Gp29 [Bacteriófago SP6]	2e ⁻²⁹
Phi78p37	Gp30	+	20311	21858	515	Proteína portal	AAP48769.1 Gp30 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p38	Gp31	+	22329	22706	125	Proteína estructural (<i>scaffolding</i>)	AAP48770.1 Gp31 [Bacteriófago SP6]	3e ⁻⁵⁸
Phi78p39		+	22782	23078	98	Desconocida	ND	ND
Phi78p40	Gp32	+	23256	24458	400	Proteína principal de la cápside	AAP48771.1 Gp32 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p41	Gp33	+	24514	25254	246	Proteína de la cola	AAP48772.1 Gp33 [Bacteriófago SP6]	2e ⁻¹⁴³
Phi78p42	Gp34	+	25254	27677	807	Proteína de la cola	AAP48773.1 Gp34 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p43	Gp35	+	27668	28387	239	Proteína interna del virión	AAP48774.1 Gp35 [Bacteriófago SP6]	7e ⁻¹³¹
Phi78p44		+	28388	31324	978	Desconocida	AAP48775.1 Gp36 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p45	Gp37	+	31391	35203	1270	Proteína interna del virión	AAP48776.1 Gp37 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p46	Gp38	+	35203	36162	319	Fibra de la cola	AAP48777.1 Gp38 [Bacteriófago SP6]	0
Phi78p47	Gp39	+	36171	36365	64	Holina	AAP48778.1 Gp39 [Bacteriófago SP6]	2e ⁻²⁷
Phi78p48	Gp40	+	36505	36651	48	Subunidad menor de la terminasa	AAP48779.1 Gp40 [Bacteriófago SP6]	4e ⁻¹⁸
Phi78p49	Gp41	+	36651	38549	632	Subunidad mayor de la terminasa	AAP48780.1 Gp41 [Bacteriófago SP6]	0

Tabla 4.11. Caracterización de los ORF y proteínas del bacteriófago UAB_Phi78 (continuación).

Gen	Producto génico ^a	Dirección ^b	Posición inicial ^c	Posición final ^c	Longitud de proteína (aa)	Función de proteína ^d	Secuencia con mayor similitud ^e	Valor e ^f
<i>Phi78p50</i>		+	38702	38977	91	Desconocida	CAJ29452.1 Gp41 [Bacteriófago K1E]	6e ⁻³²
<i>Phi78p51</i>		+	38993	39280	95	Desconocida	CAJ29453.1 Gp42 [Bacteriófago K1E]	6e ⁻³⁷
<i>Phi78p52</i>		+	39283	39627	114	Desconocida	CAJ29454.1 Gp43 [Bacteriófago K1E]	3e ⁻⁴³
<i>Phi78p53</i>		+	39627	39764	45	Desconocida	ND	ND
<i>Phi78p54</i>		+	39981	40166	61	Desconocida	CAJ29456.1 Gp45 [Bacteriófago K1E]	3e ⁻²³
<i>Phi78p55</i>	Gp49	+	40297	41949	550	Espícula	AAP48788.1 Gp49 [Bacteriófago SP6]	0
<i>Phi78p56</i>		+	42033	43547	504	Desconocida	AAP48789.1 Gp50 [Bacteriófago SP6]	0
<i>Phi78p57</i>		+	43555	43698	47	Desconocida	AAP48790.1 Gp51 [Bacteriófago SP6]	6e ⁻¹⁷
<i>Phi78p58</i>		+	43752	43829	25	Desconocida	AAP48791.2 Gp52 [Bacteriófago SP6]	1e ⁻⁰⁴

^a Están anotados los productos génicos con los que se ha encontrado similitud y se conoce su posible función.

^b La cadena codificante del gen (+) corresponde a la secuencia depositada en el GenBank en 5' -3'.

^c Coordenadas de inicio y fin de transducción.

^d Función de la proteína inferida por la similitud encontrada en las bases de datos.

^e Número de acceso y nombre de la secuencia del bacteriófago con mayor similitud en las búsquedas con el programa BlastX.

^f Valor de similitud entre el gen del bacteriófago UAB_Phi78 y la secuencia más símil obtenida con el programa BlastX.

4.3.5.3. Análisis de los promotores

Dado el elevado nivel de compactación de los genomas fágicos, muchos de los promotores se encuentran solapados en regiones codificantes. La búsqueda de dichos promotores se realizó mediante el programa BPROM (Softberry). De esta manera, se detectaron 105 posibles promotores. Considerando su posición respecto a los genes, se seleccionaron 25 de ellos (Tabla 4.12), los cuales presentan una secuencia consenso -10 igual a ggTataaT y una consenso -35, TTGAca. En ambas, solo se conservan claramente las bases que están indicadas en letra mayúscula (Figura 4.14).

Tabla 4.12. Posición de los promotores hipotéticos y de sus respectivas cajas -10 y -35 del fago UAB_Phi78.

Posición del Promotor	Caja -10		Caja -35	
	Posición	Secuencia	Posición	Secuencia
493	478	TCTTATTCT	453	TTGGTC
799	784	AGGTGAAGT	760	TTGCTT
1246	1234	AACTATGAT	1210	TTGGTA
1663	1648	GGTTACATT	1628	TTGACA
2213	2198	CGCTAAAAT	2178	CTGAAA
3451	3436	AAGTAAGAT	3416	TTGACT
6823	6808	TCGTAAATT	6789	ATGAGC
9037	9022	TGCCATGCT	9002	ATGATT
9551	9536	CGGTATCAT	9512	AGCACA
10054	10038	CACTATCAT	10016	TTGTCT
14661	14646	TGGTATCCT	14628	CTAACG
15219	15204	AGCTATTAT	15185	TTTAAA
16320	16305	TGCTAGAAT	16284	TCGGCA
18275	18260	AGGTAAGAA	18240	TTGAAG
19367	19352	TGATATGCT	19330	TTGAGG
20049	20034	ATGTATAAT	20011	TTAATG
23132	23117	AGGTAAGGT	23097	TTCACA
25242	25227	ACTTAAACT	25207	TCGCCT
27601	27586	TGGTAGAAT	27565	CCGACA
36633	36618	AGGTAAAGT	36593	TTGCTA
38690	38675	TACTATACT	38651	TGTACA
39203	39188	CTGTATATT	39168	TTGAGA
39589	39574	GCTTACACG	39554	CTGACA
39890	39875	CCGTAGGCT	39854	TTACCA
40193	40178	ATGTATCAT	40158	TACAAT
42010	41995	GGTATCAT	41974	TTCACG

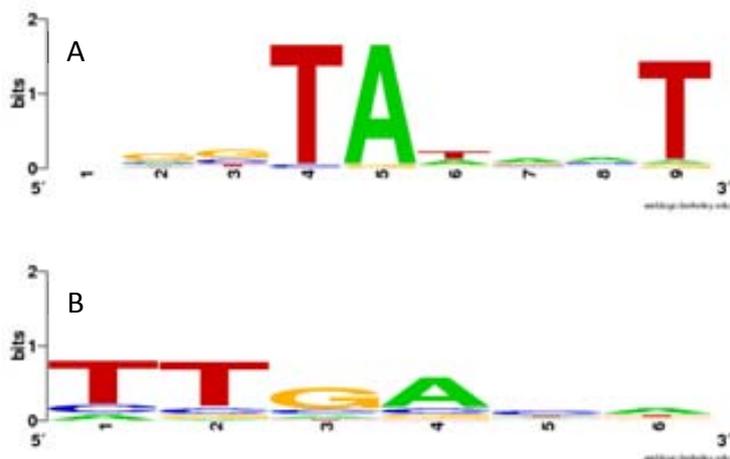


Figura 4.14. Secuencia consenso de las cajas -10 (A) y -35 (B) de los promotores hipotéticos del genoma del fago UAB_Phi78.

4.3.5.4. Control traduccional

El codón de inicio de traducción de los 58 genes predichos fue claramente identificado ya que todos estos genes presentaban el codón de inicio ATG, a excepción del gen *Phi78p39* que presentaba TTG. En referencia a los codones de final de traducción, los tres se encuentran presentes. No obstante, el codón TAA es el mayoritario con una presencia del 67,2% (39/58), mientras que el codón TGA se halla en el 19% (11/58) de los genes y el codón TAG en el 13,8% (8/58).

84

Tabla 4.13. Secuencias y ubicación en el genoma de las mejores posiciones de unión de los ribosomas (RBS) del fago UAB_Phi78 según el programa Glimmer.

Posición de inicio	Secuencia	Posición inicial del ORF
3519	AGAAG	3487 (Phi78p10)
6961	TGGAG	6976 (Phi78p13)
13565	AGGAG	13580 (Phi78p23)
14717	AGGAG	14731 (Phi78p26)
15370	AGGAG	15383 (Phi78p28)
16790	AGGAG	16895 (Phi78p30)
18322	AGAAG	18359 (Phi78p32)
19444	TGGAG	19456 (Phi78p34)
20300	AGGAG	20311 (Phi78p37)
23243	AGGAG	23256 (Phi78p40)
24504	AGGAG	24514 (Phi78p41)
27654	AGGAG	27668 (Phi78p43)
28378	AGGAG	28388 (Phi78p44)
31381	AGGAG	31391 (Phi78p45)
35193	TGGAG	35203 (Phi78p46)
36641	AGGAG	36651 (Phi78p48)
38860	AGGAG	38993 (Phi78p51)
40287	AGGAG	40297 (Phi78p55)
42023	AGGAG	42033 (Phi78p56)

Tras la identificación de los codones de inicio y final de los genes, se utilizó el programa RBS Finder (Glimmer) para la detección de los mejores sitios de unión de los ribosomas (RBS). La alineación de las secuencias mediante el programa Weblogo mostró la conservación parcial de los RBS del fago UAB_Phi78, respecto a la secuencia consenso de Shine-Dalgarno (AGGAGG) (Tabla 4.13 y Figura 4.15). La distancia de la secuencia consenso respecto al inicio de la traducción no se conserva en todos los genes, variando desde 10 pb hasta 105 pb, indicando posiblemente una diferencia de la eficiencia de traducción de estos genes.



Figura 4.15. Secuencia consenso de los RBS del bacteriófago UAB_Phi78.

4.3.5.5. Terminadores de transcripción

Mediante el programa FindTerm (Softberry), se detectó la presencia de 4 terminadores Rho-independientes en el genoma del fago UAB_Phi78 (Tabla 4.14 y Figura 4.16). El primer terminador detectado se situó tras el transcrito del gen de la RNA polimerasa. El segundo se encontraba tras una secuencia de genes asociados con la replicación del DNA, el tercero tras las proteínas de la cápside y el último tras las de la cola. Con el programa Transterm pudo identificarse otro terminador que se encontraba tras los genes que codifican la holina, las terminasas y las espículas.

85

Tabla 4.14. Posibles terminadores Rho-independientes en el genoma del fago UAB_Phi78.

Terminador	Ubicación	Secuencia
1	6129-6150	UAUACAUCAGCCGACGUGAAU
2	15107-15134	CAGUUCAGGGUAGGUAUCCCACAGGCGG
3	24468-24492	CGUCGCAUACAGUUCCUCCACUUU
4	31337-31360	UGGUACUCCAUCUGGAUUUCAUC
5*	41955-41970	CGUCGCGAUUGC GCGACG

*Terminador detectado solamente mediante el programa Transterm.

4.3.5.6. Organización del genoma del fago UAB_Phi78

Para designar las funciones de los genes identificados en el apartado 4.3.5.2, se realizó un análisis bioinformático, determinándose la similitud con las secuencias incluidas en las bases de datos. De este modo, fue posible asignar una función a 18 de los 58 productos génicos codificados en el genoma del fago UAB_Phi78. De los 40 genes potenciales restantes, 26 de ellos presentaron similitud con alguno ya descrito, pero no se les pudo adjudicar una función determinada. Finalmente, 14 genes no presentaron ninguna similitud con las secuencias génicas disponibles en las bases de datos.

Los resultados obtenidos en las comparaciones realizadas permitieron organizar el genoma de este fago en 3 módulos funcionales, formados por genes próximos físicamente y relacionados con una función determinada (Figura 4.16), descritos a continuación:

Módulo de replicación. En el fago UAB_Phi78, el gen *Phi78p20* presenta un 95% de similitud con el gen *gp14* del fago SP6, el cual codifica una DNA polimerasa. En este gen está localizado el origen de replicación bidireccional del genoma de SP6 (Dobbins *et al.*, 2004). Asimismo, se identificaron los siguientes genes asociados con la replicación del genoma vírico: *Phi78p10* (RNA polimerasa), *Phi78p13* (DNA primasa), *Phi78p28* (exonucleasa), *Phi78p29* (endonucleasa) y *Phi78p32* (DNA ligasa). Todos ellos presentan una similitud igual o superior al 95% con los del fago SP6 en un análisis con BlastX.

Módulo de lisis. Este módulo está insertado en el medio del módulo de morfogénesis y contiene un único gen. Dicho gen presenta un 96% de similitud con su homólogo en el SP6, codificando la holina (*Phi78p47*), que está encargada de lisar a la célula bacteriana. Además, al igual que los fagos SP6, K1E y K1-5, el fago UAB_Phi78 no presenta ningún gen con similitud con el gen *gp18.5* del T7, el cual está presente en el fago K1F y es necesario para producir la lisis celular a una elevada concentración de cationes divalentes (Dobbins *et al.*, 2004).

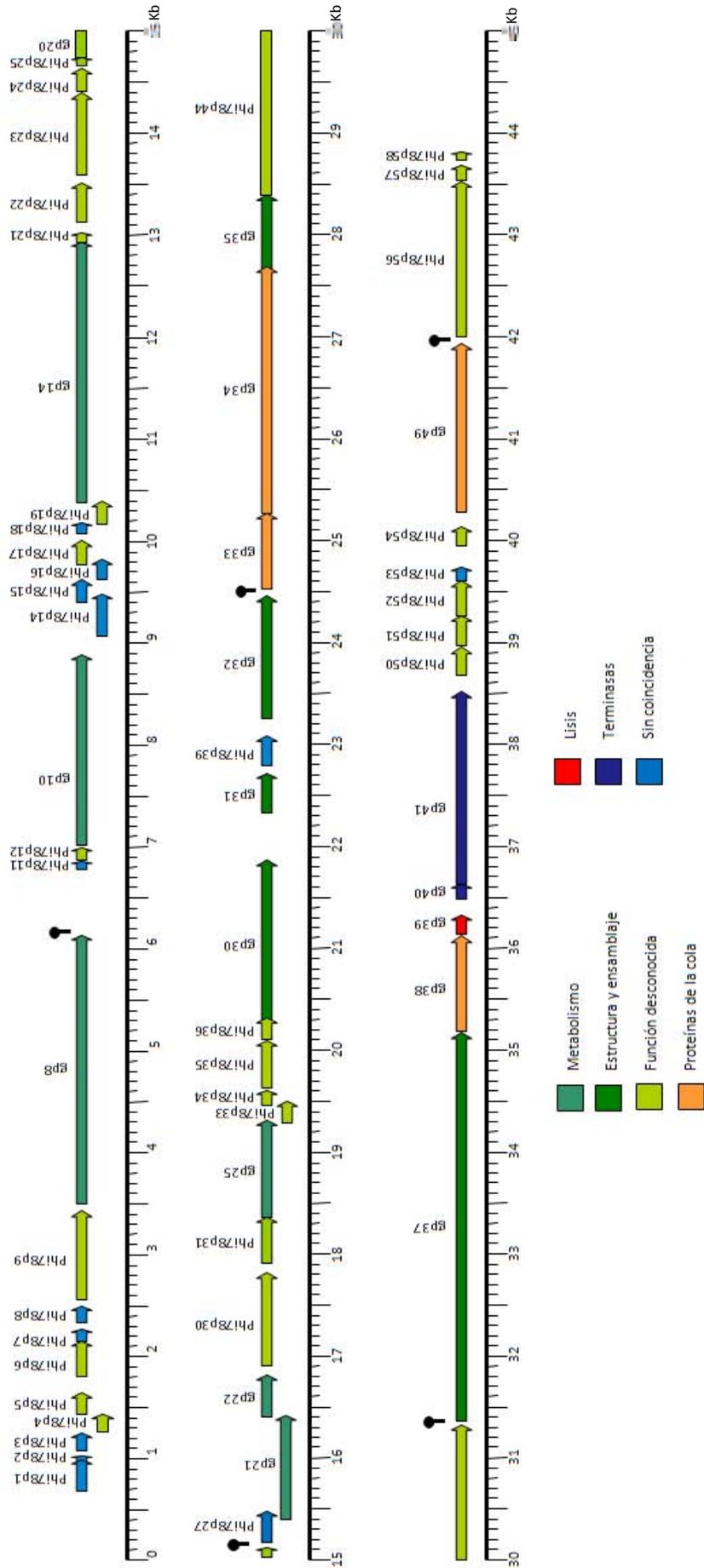


Figura 4.16. Organización génica y modular del fago UAB_Phi78. Se indica la posición de los terminadores (●).

Módulo de morfogénesis. Este módulo estructural incluye más de la mitad del genoma del fago UAB_Phi78. En este módulo se encuentran los genes que codifican las terminasas (subunidades menor y mayor), la proteína portal de la cápside, proteínas internas del virión, proteínas de la cola, fibras y espículas. Todos estos genes presentan una similitud igual o superior al 91% respecto a sus homólogos en el fago SP6. Además, en este módulo se halla también un grupo de 4 genes sin función conocida que presentan un alto grado de similitud con genes del fago K1E.

4.3.5.7. Comparación del fago UAB_Phi78 con otros fagos tipo SP6

Como ya se ha comentado anteriormente, el fago UAB_Phi78 pertenece al género tipo SP6. Esto se evidencia cuando se hace una búsqueda con su genoma en la base de datos del NCBI mediante el programa BlastN. En los resultados obtenidos se observa un 87% de similitud con el genoma del fago SP6. También se obtiene una similitud del 43% y del 41% con los fagos K1-5 y K1E, respectivamente. Solamente, con el fago K1F no se encuentra similitud a nivel de nucleótidos. Esta similitud se refuerza cuando se comparan los productos de traducción de los genomas fágicos (BlastX), obteniéndose una similitud del 92%, 76%, 76% y 20%, con los fagos SP6, K1-5, K1E y K1F, respectivamente. Del mismo modo, al realizar un alineamiento del DNA con el programa ClustalW2, la semejanza con los fagos SP6, K1-5, K1E y K1F es del 86%, 69%, 69% y 55%, respectivamente. Asimismo, con el programa ClustalW2 se pudo construir un árbol filogenético, mostrado en la Figura 4.17, en el que puede apreciarse la proximidad entre todos estos fagos.

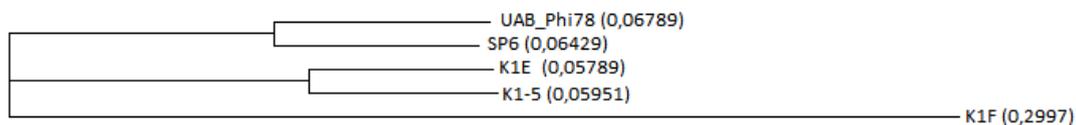


Figura 4.17. Representación de la distancia filogenética de los fagos del género tipo SP6, realizada con el programa ClustalW2. La distancia entre ellos se encuentra indicada entre paréntesis.

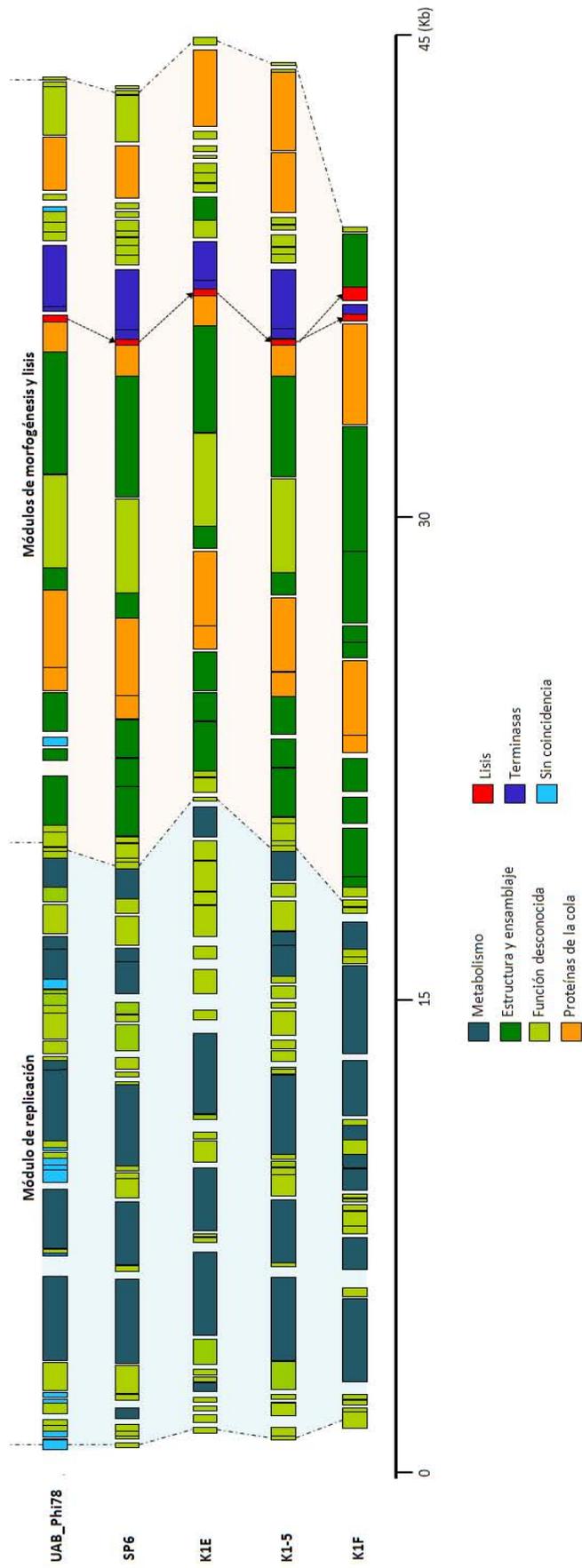


Figura 4.18. Comparación de la arquitectura génica del fago UAB_Phi78 con la de los fagos tipo SP6.

La comparación de la organización génica y modular del fago UAB_Phi78 con los otros fagos tipo SP6 indicó que existe una gran homología entre todos ellos, destacando la existente entre los fagos UAB_Phi78 y SP6 (Figura 4.18). De hecho, de todos los genes presentes en el genoma del fago UAB_Phi78, 35 de ellos (60,3%) tienen una elevada similitud con sus homólogos en el fago SP6. Las principales diferencias entre ambos fagos se encuentran sobre todo: (i) al principio de la secuencia del genoma, ya que en esta región hay muchos genes sin concordancia en la base de datos del NCBI; (ii) entre la DNA primasa y la DNA polimerasa, donde hay muchos genes sin concordancia con la base de datos y uno sin función conocida que también se halla en el fago K1E (proteína Gp12) y (iii) entre las terminasas y la espícula, donde casi todos los genes predichos presentan una mayor similitud con genes del fago K1E (Tabla 4.11).

4.4. Desinfección basada en fagos aplicada a diferentes etapas de la producción de alimentos

90

En atención a los resultados obtenidos en los estudios anteriores, se decidió estudiar el efecto del cóctel fágico, integrado por los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78 y UAB_Phi87 (1:1:1), en la reducción de la concentración de *Salmonella* en diferentes matrices de interés en la producción de alimentos.

Los diferentes diseños experimentales que se han utilizado se eligieron tras considerar algunos de los puntos más críticos en la producción de alimentos, teniendo en cuenta el riesgo potencial de contaminación por *Salmonella*. Por este motivo los modelos utilizados fueron:

- Piel de cerdo, como modelo de desinfección presacrificio de los animales.
- Pechuga de pollo, como modelo de desinfección de carnes en la planta de procesamiento y también como producto final de origen animal.
- Huevos frescos, como producto final de origen animal y de alto riesgo potencial, dado que no existen actualmente métodos regulados de desinfección.
- Lechuga envasada, como modelo de producto final de origen vegetal.

Para estos estudios, la contaminación bacteriana de estas matrices se realizó con la cepa UA1872, derivada de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028 y portadora de un casete de resistencia a cloranfenicol, y con la cepa UA1894, obtenida a partir de la cepa LK5 de *S. Enteritidis* por inserción de un casete de resistencia a kanamicina.

4.4.1. Desinfección de la superficie animal

Se considera que el tiempo de espera de los animales en el matadero, antes de su sacrificio, es un periodo muy crítico para obtener un producto final con la calidad microbiológica adecuada (Lo Fo Wong *et al.*, 2002). Por ello, es esencial que la piel de los animales presente una mínima colonización por bacterias no deseables o esté libre de ellas. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue probar la eficacia del cóctel fágico en la descontaminación de la piel de cerdo infectada experimentalmente con *Salmonella*. Así, se utilizó piel de cerdo de la región latero-ventral del abdomen (vulgarmente conocida como panceta), la cual se mantuvo a 33°C por ser la temperatura media de la superficie corporal de estos animales (Huynh *et al.*, 2005).

Previamente, se desarrolló la metodología adecuada tanto para contaminar experimentalmente esta matriz como para recuperar las bacterias de forma repetitiva. Para ello, se utilizó un trozo de piel de 900 cm² y se probaron las dos metodologías descritas en apartado 3.6.1 de Material y Métodos, basadas en recuperar las bacterias mediante hisopo o directamente desde secciones muy finas de piel. Los resultados obtenidos indicaron que, con ambas técnicas, la concentración de *Salmonella* que se obtenía era muy similar (Tabla 4.15). Debido a que el método del hisopo era más sencillo de realizar, se optó por utilizar dicho método en los estudios posteriores. Además, en estos estudios se redujo el tamaño de la zona de piel muestreada a 5 x 5 cm (25 cm²).

91

Tabla 4.15. Recuperación de *Salmonella* de la superficie de la piel de cerdo utilizando dos metodologías distintas.

Tiempo (h)	Concentración (Log ₁₀ cfu/cm ²) *	
	Hisopo	Escisión
0	4,6 x 10 ¹	1,0 x 10 ²
3	3,5 x 10 ²	4,1 x 10 ²

*Media de cuatro (0 h) y dos (3 h) experimentos independientes.

Una vez elegida la metodología de contaminación, se procedió a estudiar el efecto del cóctel fágico como descontaminante de la superficie de animales. Para ello, se adquirieron dos trozos de piel de unos 1500 cm² en una carnicería local, contaminándose cada uno de ellos con la cepa UA1872 o con la cepa UA1894. Seguidamente, cada trozo se dividió en dos partes iguales, pulverizándose una de ellas con una solución del cóctel fágico (10¹⁰ pfu/ml) y la otra con MgSO₄ 10 mM. Ambas se mantuvieron a 33°C y se tomaron seis muestras a las 0, 3 y 6 h para determinar la concentración de *Salmonella* (Tabla 4.16; Figura 4.19).

Tabla 4.16. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 y *S. Enteritidis* UA1894 en piel de cerdo.

Tiempo (h)	Tratamiento fágico	Concentración (Log ₁₀ cfu/cm ²)*		Reducción (Log ₁₀ cfu/cm ²)	
		Typhimurium	Enteritidis	Typhimurium	Enteritidis
0	-	2,6 ± 0,2	2,0 ± 0,1		
3	-	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,1		
	+	E	E	2,9	2,2
6	-	4,0 ± 0,03	3,2 ± 0,05		
	+	E	1,2 ± 0,1	4,0	2,0

* Media ± SD de seis experimentos independientes.

E, sólo se detectó *Salmonella* por el método de enriquecimiento.

92

Para ambas cepas bacterianas, a las 3 h postratamiento se obtuvo una reducción de su concentración tan acentuada ($p \leq 0,005$) que imposibilitó el recuento de viables por siembra directa en placa. No obstante, mediante el método de enriquecimiento selectivo para *Salmonella*, se pudo detectar la presencia de la cepa UA1872 en dos de las seis muestras analizadas y de la cepa UA1894 en tres de las seis analizadas. A las 6 h postratamiento, la disminución continuó siendo muy significativa respecto a los controles ($p \leq 0,005$). Sin embargo, a dicho tiempo, ya fue posible detectar la cepa UA1872 mediante siembra directa en placa en tres muestras y, mediante enriquecimiento selectivo, en dos de las seis muestras analizadas. En cambio, se detectó la cepa UA1894 en las seis muestras estudiadas mediante siembra directa en placa. En la Figura 4.19 se presentan los resultados estadísticos en un diagrama de cajas.

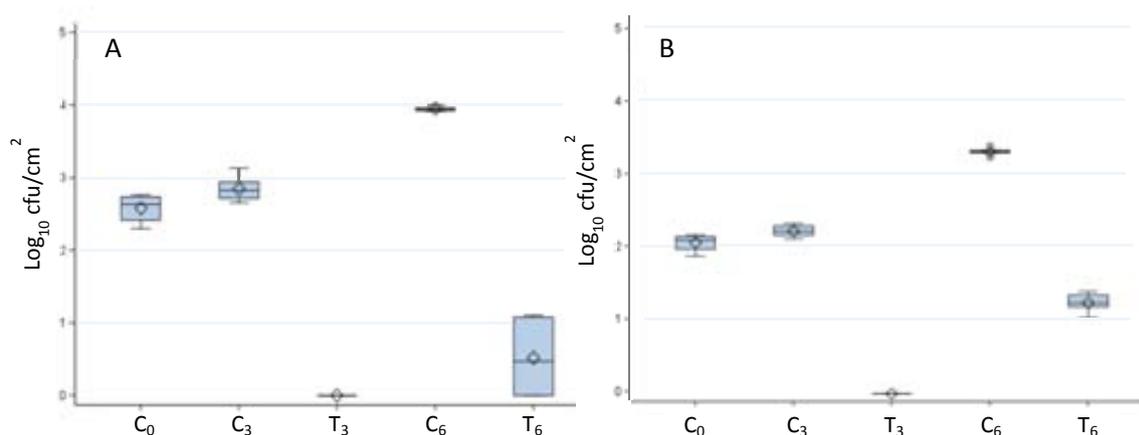


Figura 4.19. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 (A) y *S. Enteritidis* UA1894 (B) en piel de cerdo. Se representan la mediana (\diamond); los intervalos de confianza 95% (barras); los cuartiles (cajas) y los datos atípicos (\circ). Cada grupo tratado con fagos se contrastó con el grupo control del mismo periodo de tiempo y del tiempo inicial. En el eje de abscisas se indican los grupos control (C), los tratados con fagos (T) y como subíndice el tiempo del tratamiento en horas.

Por otra parte, cabe indicar que la concentración de fagos se mantuvo constante a lo largo de todo el experimento, obteniéndose valores del orden de $7 \text{ log}_{10} \text{ pfu/cm}^2$ (Tabla 4.17).

93

Tabla 4.17. Concentración de los bacteriófagos en la piel de cerdo contaminada con las cepas UA1872 y UA1894 y tratada con el cóctel fágico.

Tiempo (h)	Título fágico ($\text{Log}_{10} \text{ pfu/cm}^2$)*	
	UA1872	UA1894
3	$7,6 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,1$
6	$7,5 \pm 0,04$	$7,0 \pm 0,1$

* Media \pm SD de seis experimentos independientes.

4.4.2. Desinfección de carne

Como se ha comentado en la Introducción de esta memoria, la carne de pollo es una de las principales fuentes de infección de *Salmonella* en humanos (EFSA, 2011). La contaminación del producto final puede producirse en varias etapas de la cadena de producción animal y de la manufacturación de la carne. Por ello, para la eliminación o la reducción de esta contaminación es necesario tomar diferentes medidas en varios puntos del proceso, lo cual se realiza normalmente de forma sistemática en este tipo

de industrias. A pesar de ello, se detecta *Salmonella* en el producto final con una frecuencia mayor de la deseada.

Por ello, el objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar el efecto del cóctel fágico en la reducción de la concentración de *Salmonella* en carne de pollo. Dicho tratamiento puede aplicarse tanto en las plantas de procesamiento como en el producto final. En primer lugar, se realizaron diferentes ensayos para determinar cuál debería ser la concentración de *Salmonella* en el inóculo inicial para conseguir una concentración final en la carne de 10^4 cfu/g. Se determinó que el inóculo más adecuado debía contener 10^6 cfu/ml y estar en una relación 1:10 (p/v). Se escogió esta concentración final de *Salmonella* dado que en los pocos estudios que se han realizado de cuantificación de este patógeno en carne fresca y derivados frescos, los valores obtenidos no suelen ser superiores a 10^3 cfu/g (Sinell *et al.*, 1990; Dufrenne *et al.*, 2001; Giovannini *et al.*, 2004; Spricigo *et al.*, 2008).

Una vez determinada la concentración del inóculo, se contaminaron en estas condiciones pechugas de pollo con las cepas UA1872 y UA1894 y se siguió la evolución de la concentración de ambas en este tipo de matriz, tras ser tratada con el cóctel fágico y mantenerlas a 4°C durante 7 días. Brevemente, tras la contaminación, se trató la carne con 100 ml de fagos a 10^9 pfu/ml o con una solución de NaCl al 0,9%, eliminándose el exceso de líquido y manteniéndose la carne a 4°C durante una semana. Se tomaron cinco muestras control al día 0 y cinco muestras de la carne tratada y no tratada con fagos a los días 1, 2, 5 y 7.

Tabla 4.18. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 y *S. Enteritidis* UA1894 en pechugas de pollo.

Tiempo (día)	Tratamiento fágico	Concentración (Log ₁₀ cfu/g)*		Reducción (Log ₁₀ cfu/g)	
		Typhimurium	Enteritidis	Typhimurium	Enteritidis
0	-	4,6 ± 0,03	4,4 ± 0,06		
1	-	4,4 ± 0,2	4,4 ± 0,1		
	+	2,8 ± 0,2	3,7 ± 0,2	1,6	0,7
2	-	4,2 ± 0,1	4,4 ± 0,2		
	+	2,6 ± 0,2	3,4 ± 0,1	1,6	1,0
5	-	4,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1		
	+	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,8	1,4	1,4
7	-	4,2 ± 0,1	4,0 ± 0,2		
	+	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3	2,2	0,9

* Media ± SD de cinco experimentos independientes.

Como puede observarse en la Tabla 4.18, el tratamiento con el cóctel fágico produjo una significativa reducción de la concentración de ambas cepas desde el primer día postratamiento. En las muestras contaminadas con UA1872, dicha disminución se mantuvo constante durante los 5 primeros días, observándose una reducción de 2,2 \log_{10} cfu/g al séptimo día de tratamiento ($p \leq 0,0001$). Por otro lado, en las muestras contaminadas con UA1894, se obtuvo una reducción de 1,4 \log_{10} cfu/g al quinto día y de 0,9 \log_{10} cfu/g al séptimo ($p \leq 0,0001$). Los resultados estadísticos se presentan en un diagrama de cajas en la Figura 4.20.

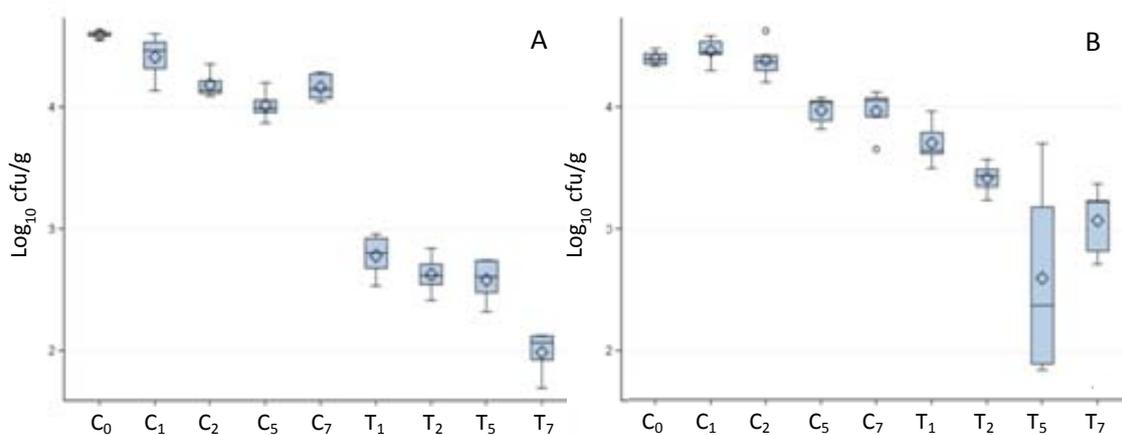


Figura 4.20. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 (A) y *S. Enteritidis* UA1894 (B) en pechuga de pollo. Se representan la mediana (\diamond); los intervalos de confianza 95% (barras); los cuartiles (cajas) y los datos atípicos (o). Cada grupo tratado con fagos se contrastó con el grupo control del mismo periodo de tiempo y del tiempo inicial. En el eje de abscisas se indican los grupos control (C), los tratados con fagos (T) y como subíndice el tiempo del tratamiento en días.

La concentración de los fagos en la carne tratada con el cóctel fágico se mantuvo constante durante todo el experimento, con valores alrededor de 7 \log_{10} pfu/g en las muestras contaminadas con la cepa UA1894 y de entre 7,5 y 8 \log_{10} pfu/g en las inoculadas con la cepa UA1872 (Tabla 4.19).

Tabla 4.19. Concentración de los bacteriófagos en pechugas de pollo contaminadas con las cepas UA1872 y UA1894 y tratadas con el cóctel fágico.

Tiempo (día)	Título fágico (Log_{10} pfu/g)*	
	UA1872	UA1894
1	7,6 \pm 0,2	7,0 \pm 0,1
2	7,6 \pm 0,2	7,0 \pm 0,1
5	7,4 \pm 0,2	6,9 \pm 0,1
7	7,8 \pm 0,1	7,1 \pm 0,2

* Media \pm SD de cinco experimentos independientes.

4.4.3. Desinfección de huevos

Según el Reglamento (CE) n° 589/2008, los huevos frescos deben suministrarse en su estado natural, sin haber sido limpiados por ningún procedimiento ni haber sufrido tratamientos de conservación o refrigeración. No obstante, actualmente, los huevos y sus productos son la principal causa de salmonelosis en humanos (EFSA, 2011). Por este motivo, el siguiente experimento tuvo como objetivo desarrollar una metodología idónea para el tratamiento de huevos frescos sin alterar sus características y sin riesgos para la salud del consumidor.

96

En primer lugar fue necesario estandarizar un método reproducible de cuantificación de *Salmonella* en la cáscara del huevo. Los métodos que se probaron fueron la recuperación de los microorganismos de la superficie del huevo, contaminado experimentalmente con UA1872 con una gasa embebida en BPW o bien utilizando toda la cáscara tras la eliminación de su contenido. En ambos métodos se utilizaron seis huevos, obteniéndose una concentración de 3,8 \pm 1,1 y 2,4 \pm 0,8 log_{10} cfu/cm², respectivamente. A pesar de que con el primer método se consigue una mayor recuperación de *Salmonella*, es de difícil reproducción, ya que fácilmente se produce la rotura de la cáscara del huevo, lo que comporta la pérdida de parte de la muestra a analizar. Por ello, en los experimentos posteriores se utilizó el segundo método. Además, se decidió realizar los ensayos con 20 huevos por grupo experimental para obtener una menor desviación estándar.

Para evaluar el efecto del tratamiento con el cóctel fágico sobre la concentración de *Salmonella* en la superficie del huevo se requiere una gran cantidad de espacio y material. Por ello, en este estudio se tomaron muestras únicamente a las 2 h postratamiento. El proceso se realizó según se ha descrito en Material y Métodos

(apartado 3.6.3). Brevemente, se contaminaron 40 huevos con *Salmonella* (cepa UA1872 o UA1894), tratándose 20 de estos huevos con el cóctel fágico a una concentración de 10^{10} pfu/ml y los otros 20 restantes con MgSO_4 10 mM. Los resultados obtenidos demuestran que hay una reducción significativa ($p \leq 0,005$) de la concentración de ambas serovariedades de *Salmonella* del orden de $0,9 \log_{10} \text{cfu/cm}^2$ (Tabla 4.20). Los resultados estadísticos también se muestran en un diagrama de cajas en la Figura 4.21.

Tabla 4.20. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 y *S. Enteritidis* UA1894 en huevos frescos.

Tiempo (h)	Concentración ($\text{Log}_{10} \text{cfu/cm}^2$)*					
	Typhimurium			Enteritidis		
	Control	Tratado	Reducción	Control	Tratado	Reducción
3	$3,8 \pm 1$	$2,9 \pm 0,5$	0,9	$4,5 \pm 0,7$	$3,6 \pm 1$	0,9

* Media \pm SD de 20 experimentos independientes.

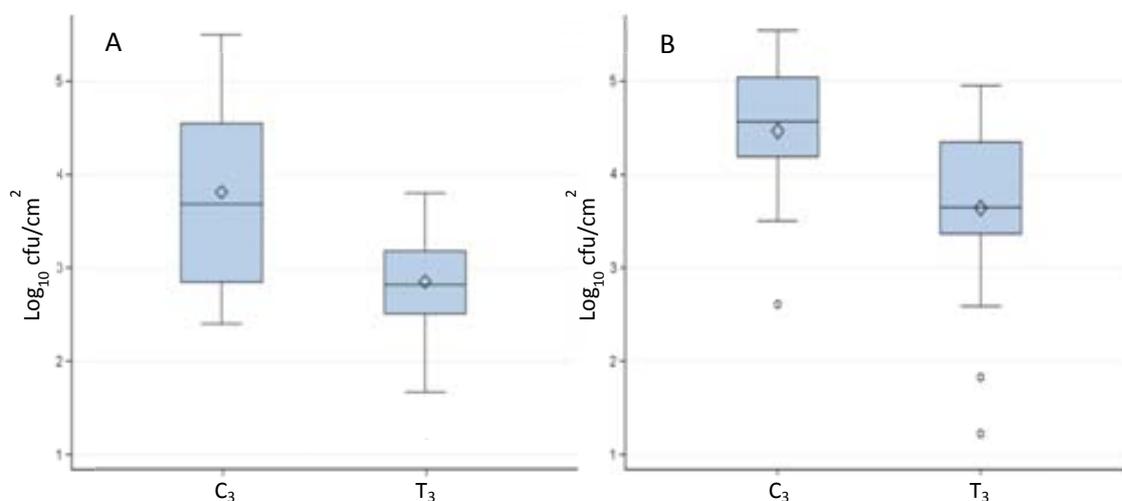


Figura 4.21. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 (A) y *S. Enteritidis* UA1894 (B) en huevos frescos. Se representan la mediana (\diamond); los intervalos de confianza 95% (barras); los cuartiles (cajas) y los datos atípicos (\circ). Cada grupo tratado con fagos se contrastó con el grupo control del mismo periodo de tiempo y del tiempo inicial. En el eje de abscisas se indican los grupos control (C), los tratados con fagos (T) y como subíndice el tiempo del tratamiento en horas.

Igualmente, se determinó la concentración fágica al final del periodo de tratamiento, la cual fue de $6,4 \pm 0,9$ y $6,1 \pm 0,7 \log_{10} \text{pfu/cm}^2$ en las muestras contaminadas con las cepas UA1872 y UA1894, respectivamente.

4.4.4. Desinfección de lechuga

Las verduras frescas normalmente no representan una importante causa de salmonelosis en humanos (EFSA, 2011). Sin embargo, es necesario considerar que son muy pocos los estudios existentes en los que se ha analizado la prevalencia de *Salmonella* en este tipo de producto.

Para finalizar la serie de estudios sobre la aplicación de bacteriófagos en diferentes etapas del proceso de producción de alimentos, se procedió a determinar el efecto del cóctel fágico sobre lechuga romana envasada y contaminada experimentalmente con *Salmonella*.

En primer lugar fue necesario determinar la concentración adecuada de *Salmonella* en el inóculo inicial para conseguir la contaminación del producto deseada. Para ello, se prepararon cuatro suspensiones de la cepa de UA1872 a concentraciones comprendidas entre $1,6 \times 10^4$ cfu/ml y $1,6 \times 10^7$ cfu/ml. Se contaminó la lechuga por inmersión en dichas suspensiones y se determinó la concentración de *Salmonella* como se ha descrito en Material y Métodos (Apartado 3.6.4). En atención a los resultados obtenidos, se decidió utilizar para los posteriores ensayos un inóculo inicial de 10^5 cfu/ml, ya que así se consigue una contaminación de la lechuga de 10^4 cfu/g (Tabla 4.21). Se decidió utilizar este nivel de contaminación ya que no existen datos exhaustivos de cuantificación de este patógeno en verduras comercializadas y este valor es uno de los máximos que se ha descrito en productos de origen animal (Sinell *et al.*, 1990; Dufrenne *et al.*, 2001; Giovannini *et al.*, 2004; Spricigo *et al.*, 2008).

98

Tabla 4.21. Nivel de contaminación de lechuga romana contaminada según la concentración inicial de *S. Typhimurium* UA1872.

	Inóculo inicial (cfu/ml)*			
	10^4	10^5	10^6	10^7
Concentración de UA1872 (cfu/g)	$3,8 \times 10^3$ $\pm 4,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^4$ $\pm 6,0 \times 10^3$	$3,9 \times 10^5$ $\pm 1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$ $\pm 3,2 \times 10^5$

* Media \pm SD de cuatro experimentos independientes.

Dado que se pretendía probar un procedimiento de desinfección que fuera adecuado para ser utilizado por el consumidor, se aplicaron tiempos de tratamiento de 30 y 60 min. Se mantuvo durante estos tiempos la lechuga contaminada en presencia

de una suspensión del cóctel fágico a 10^9 pfu/ml o en una solución de NaCl al 0,9% y se tomaron muestras para cuantificar *Salmonella*, según se ha descrito en Material y Métodos (Apartado 3.6.4). Los resultados obtenidos tras el tratamiento mostraron que el cóctel fágico producía una reducción de *S. Typhimurium* UA1872 de 3,4 y 3,9 \log_{10} cfu/g a los 30 y 60 min, respectivamente ($p \leq 0,005$; Tabla 4.22). Asimismo, el tratamiento fágico redujo la concentración de la cepa de *S. Enteritidis* UA1894 en 1,9 y 2,2 \log_{10} cfu/g a los 30 y 60 min, respectivamente ($p \leq 0,005$; Tabla 4.22). En la Figura 4.22, puede observarse la representación de los resultados estadísticos en un diagrama de cajas.

Tabla 4.22. Eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 y *S. Enteritidis* UA1894 en lechuga romana.

Tiempo (min)	Tratamiento	Concentración (\log_{10} cfu/g)*		Reducción (\log_{10} cfu/g)	
		Typhimurium	Enteritidis	Typhimurium	Enteritidis
0	-	$4,3 \pm 0,04$	$4,0 \pm 0,1$	-	-
30	-	$4,3 \pm 0,03$	$4,3 \pm 0,1$	-	-
	+	$0,9 \pm 0,7$	$2,4 \pm 0,01$	3,4	1,9
60	-	$4,2 \pm 0,04$	$4,5 \pm 0,3$	-	-
	+	$0,3 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,4$	3,9	2,2

* Media \pm SD de cinco experimentos independientes.

99

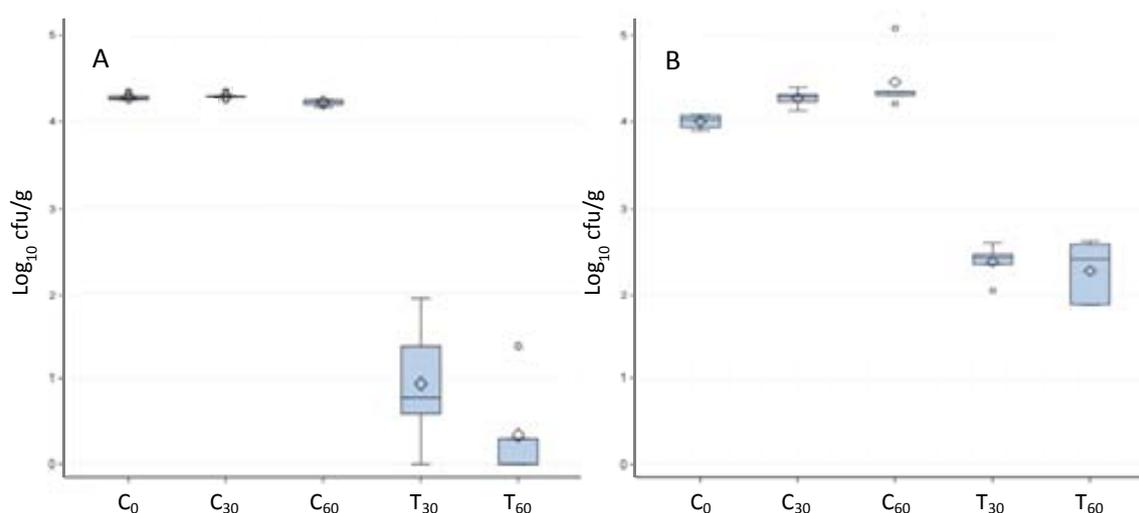


Figura 4.22. Diagrama de cajas de la eficacia del cóctel fágico en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 (A) y *S. Enteritidis* UA1894 (B) en lechuga romana. Se representan la mediana (\diamond); los intervalos de confianza 95% (barras); los cuartiles (cajas) y los datos atípicos (\circ). Cada grupo tratado con fagos se contrastó con el grupo control del mismo periodo de tiempo y del tiempo inicial. En el eje de abscisas se indican los grupos control (C), los tratados con fagos (T) y como subíndice el tiempo del tratamiento en minutos.

La concentración de los fagos en la lechuga tratada con el cóctel fágico se mantuvo entre 8,5 y 9 log₁₀ pfu/g en todos los casos (Tabla 4.23).

Tabla 4.23. Concentración de los bacteriófagos en lechuga romana contaminada con las cepas UA1872 y UA1894 y tratada con el cóctel fágico.

Tiempo (min)	Título fágico (Log ₁₀ pfu/g)*	
	UA1872	UA1894
30	9,0 ± 0,1	8,9 ± 0,04
60	8,6 ± 0,6	8,4 ± 0,03

* Media ± SD de seis experimentos independientes.

4.4.5. Efecto de cada uno de los fagos del combinado en la desinfección de la lechuga

Los experimentos con lechuga tienen un menor coste que los realizados con las otras matrices y no presentan tantos inconvenientes en lo que se refiere a material y espacio. Por ello, se decidió estudiar en este modelo la relevancia en la desinfección de cada uno de los fagos que integran el cóctel fágico.

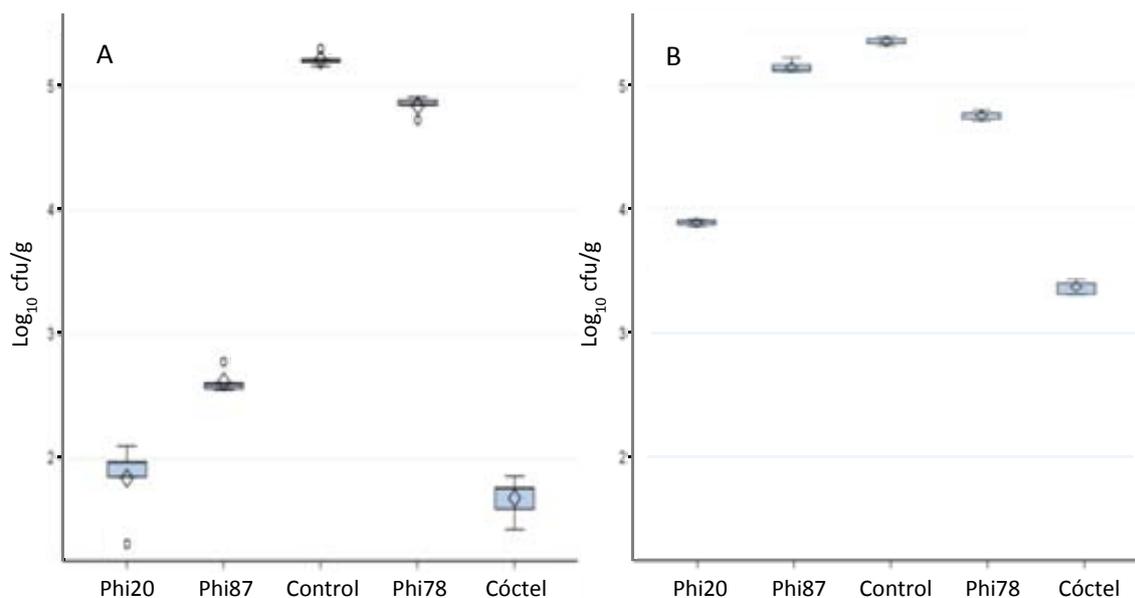
Así, se realizaron diferentes experimentos independientes con el mismo diseño que el descrito en el apartado anterior, pero utilizando cada uno de los fagos como desinfectante en lugar del cóctel y sólo con un tratamiento de 60 min. Como control positivo se utilizó el cóctel fágico. Los resultados obtenidos muestran que el fago que produjo una mayor reducción de la concentración de las cepas *S. Typhimurium* UA1872 y *S. Enteritidis* UA1894 fue UAB_Phi20, aunque el fago UAB_Phi87 tuvo también un destacado efecto sobre la primera cepa (Tabla 4.24).

Tabla 4.24. Eficacia de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78, UAB_Phi87 y del cóctel en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 y *S. Enteritidis* UA1894 en lechuga romana, mantenida a 25°C durante 60 min.

Tratamiento	Concentración (Log ₁₀ cfu/g)*		Reducción (Log ₁₀ cfu/g)	
	Typhimurium	Enteritidis	Typhimurium	Enteritidis
Control	5,2 ± 0,05	5,4 ± 0,03	-	-
UAB_Phi20	1,8 ± 0,3	3,9 ± 0,02	3,4	1,5
UAB_Phi78	4,8 ± 0,1	4,8 ± 0,04	0,4	0,6
UAB_Phi87	2,6 ± 0,1	5,1 ± 0,05	2,6	0,3
Cóctel fágico	1,7 ± 0,2	3,3 ± 0,06	3,5	2,1

* Media ± SD de cinco experimentos independientes

En la Figura 4.23, puede observarse la representación de los resultados estadísticos en un diagrama de cajas y en la Tabla 4.25 la concentración fágica tras 60 min de tratamiento. En dicha tabla puede apreciarse que en todos los casos, el título fágico es del mismo orden.



101

Figura 4.23. Diagrama de cajas de la eficacia de los fagos UAB_Phi20, UAB_Phi78, UAB_Phi87 y del cóctel compuesto por los tres fagos (1:1:1) en la reducción de *S. Typhimurium* UA1872 (A) y *S. Enteritidis* UA1894 (B) en lechuga romana mantenida a 25°C durante 60 min. Se representan la mediana (\diamond); los intervalos de confianza 95% (barras); los cuartiles (cajas) y los datos atípicos (\circ). Cada grupo tratado con fagos se contrastó con el grupo control del mismo periodo de tiempo y del tiempo inicial. En el eje de abscisas se indican los diferentes tratamientos.

Tabla 4.25. Concentración de los bacteriófagos en lechuga romana contaminada con las cepas UA1872 y UA1894 y tratada a 25°C durante 60 min con los bacteriófagos UAB_Phi20, UAB_Phi78, UAB_Phi87 y con el cóctel fágico.

Tratamiento	Título fágico (Log_{10} pfu/g)*	
	UA1872	UA1894
UAB_Phi20	9,0 \pm 0,05	8,5 \pm 0,1
UAB_Phi78	9,5 \pm 0,04	8,0 \pm 0,04
UAB_Phi87	8,9 \pm 0,03	8,5 \pm 0,1
Cóctel fágico	9,2 \pm 0,1	9,0 \pm 0,02

* Media \pm SD de seis experimentos independientes.

Estos resultados fueron inesperados, dado que a 37°C el fago UAB_Phi78 presentaba un tiempo de lisis menor (Tabla 4.10) que los otros dos fagos del cóctel (Bardina, 2011). Además, el tamaño de explosión del fago UAB_Phi78 a esta temperatura es igual o superior al de los otros dos fagos (Bardina, 2011). Teniendo en cuenta todo ello, se determinó la cinética de infección de cada uno de los fagos que componen el cóctel a 25°C sobre cultivos de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 (Figura 4.24). Además, también se estudió su cinética de adsorción en estas condiciones. Los resultados mostraron que en los cultivos líquidos el fago UAB_Phi78 fue el que tuvo un mayor efecto en la disminución de la concentración de ambas cepas, sobre todo de la de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (Figura 4.24), a pesar de que su adsorción sobre esta cepa es más lenta que la de los otros fagos (Figura 4.25).

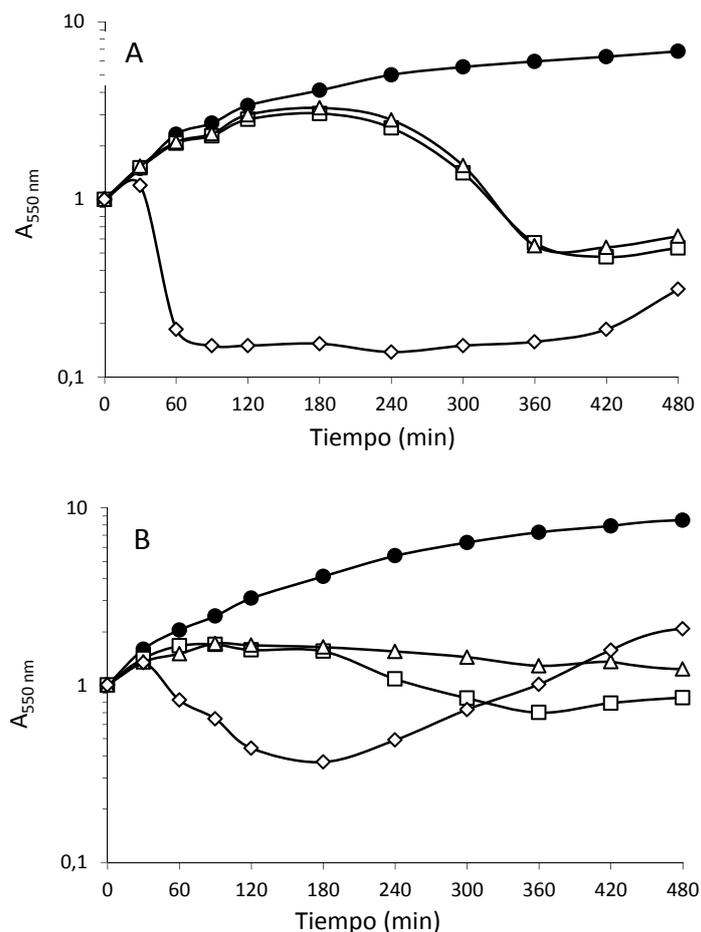


Figura 4.24. Cinética de infección de los bacteriófagos UAB_Phi78 (◇), UAB_Phi20 (□), UAB_Phi87 (Δ) y del cóctel fágico (○) a una MOI de 1 sobre las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 (A) y *S. Enteritidis* LK5 (B) a lo largo del tiempo a 25°C. Como control se muestran la A_{550} de ambos cultivos sin infectar (●).

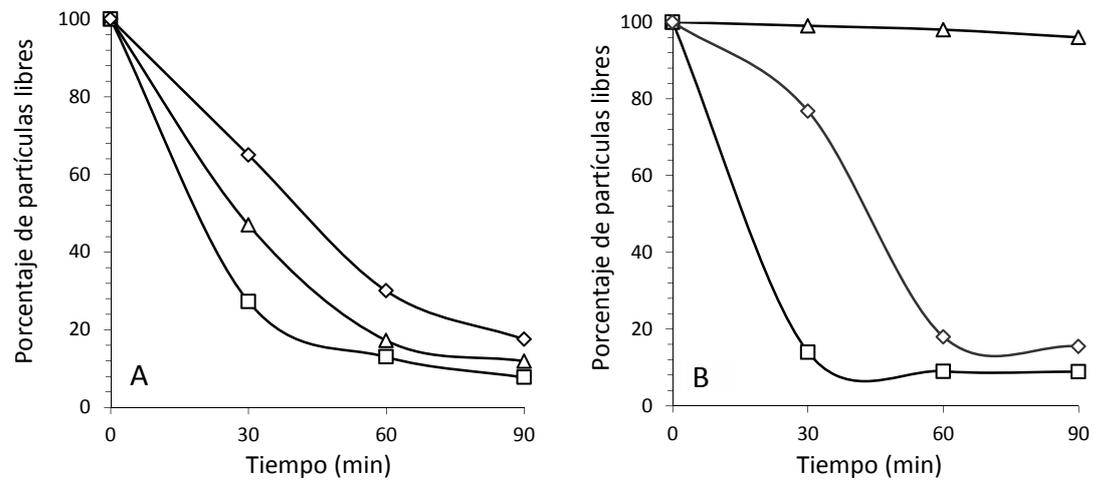


Figura 4.25. Cinética de adsorción a 25°C de los fagos UAB_Phi78 (◇), UAB_Phi20 (□), UAB_Phi87 (△) en las cepas *S. Typhimurium* ATCC 14028 (A) y *S. Enteritidis* LK5 (B).

5. Discusión

5.1. Diversidad de fagos de *Salmonella* en granjas de animales

Los bacteriófagos son los entes más abundantes en la naturaleza y se encuentran en los ambientes que colonizan sus huéspedes (Goyal *et al.*, 1987; Hendrix *et al.*, 1999; Hendrix, 2003). Dado que *Salmonella* es un patógeno que reside en el tracto intestinal de los animales, la posibilidad de aislar fagos que infecten a esta bacteria es elevada si se buscan en el intestino de animales o en sus heces. Por ello, en este trabajo, se aislaron fagos desde muestras de heces de cerdos, obteniéndose un porcentaje de aislamiento del 32%. Este valor es superior al alcanzado en un trabajo paralelo realizado en nuestro laboratorio en el que se partió de muestras de heces de aves. En este caso, el porcentaje de aislamientos fue del 25%, utilizando la misma metodología que la descrita en esta memoria (Bardina, 2011). Los resultados obtenidos sugieren que la detección de fagos puede ser un indicativo de la presencia y abundancia de *Salmonella* en un determinado ambiente, ya que existe una cierta correlación entre el porcentaje de fagos aislados de muestras de heces en los años 2007 y 2008 y la prevalencia de *Salmonella* en granjas. Así, en el año 2008 en España dicha prevalencia en granjas de cerdos fue superior al 50%, mientras que en las de pollos en el 2007 fue del 25,3% (EFSA, 2010).

107

Asimismo, es importante destacar que el porcentaje de aislamiento de fagos que hemos obtenido es también superior al reportado por otros autores (Fiorentin *et al.*, 2004; Borie *et al.*, 2008; Callaway *et al.*, 2010). Esta diferencia puede estar relacionada con una menor abundancia de fagos en las muestras utilizadas por estos autores y también puede ser consecuencia de las metodologías usadas. En el presente estudio se realizó un preenriquecimiento previo con BPW y, posteriormente, un enriquecimiento en medio selectivo para *Salmonella* (medio Tetrionato de Müller-Kauffmann). Con ello se pretendía favorecer el crecimiento de las bacterias de este género en detrimento de otras enterobacterias (Becker *et al.*, 1987), promoviéndose así la multiplicación de los fagos que pudieran estar en las muestras a baja concentración. En cambio, en los trabajos mencionados anteriormente no se utilizó ningún enriquecimiento selectivo, lo cual permitía el crecimiento de otras bacterias que compiten con *Salmonella*, disminuyendo su concentración relativa y dificultando el aumento del título de los fagos de *Salmonella*.

A pesar del interés creciente por el uso de bacteriófagos en el control de bacterias zoonóticas y de otros patógenos, la mayoría de estudios publicados se han centrado en el aislamiento de fagos a partir de muestras de animales o ambientales, en su caracterización y en su aplicación. Por otro lado, otros trabajos que estudian la diversidad de los fagos son muy parciales (McLaughlin *et al.*, 2006; McLaughlin y King, 2008; Callaway *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). Recientemente, se ha publicado un método de RAPD-PCR para analizar la diversidad genética de fagos que infectan a distintas especies bacterianas, lo que sin duda facilitará el estudio de la diversidad fágica (Gutiérrez *et al.*, 2011). En esta línea, desde nuestra perspectiva un mejor conocimiento de la diversidad de los fagos de *Salmonella* en determinados ambientes y de su capacidad para infectar cepas de origen diverso, puede proporcionar datos de interés a la hora de seleccionar fagos candidatos para terapia y/o desinfección. Debido a ello, en este trabajo, se ha estudiado la biodiversidad de los bacteriófagos aislados de granjas de aves y de cerdos que infectan a cepas de *S. Typhimurium* y/o *S. Enteritidis* y se ha analizado si existe alguna especificidad fago/bacteria en atención a su origen. A través del estudio del patrón de infección de 55 fagos procedentes de muestras porcinas y aviares se ha demostrado que un porcentaje significativo de dichos fagos infecta a un mayor número de cepas clonalmente no relacionadas de *S. Enteritidis* que de *S. Typhimurium* (Tabla 4.2). Desde el punto de vista de la aplicación de fagos de *Salmonella*, este resultado sugiere que, en general, dichos fagos serán mucho más activos controlando la diversidad de cepas de *S. Enteritidis* que hay en el ambiente que la de *S. Typhimurium*.

108

Por otra parte, a través de la determinación del patrón de infección y del de restricción del genoma de los 55 fagos estudiados, hemos demostrado que los de origen aviar tienen una mayor diversidad que los de origen porcino (Tablas 4.1 y 4.3). Este hecho podría estar relacionado con el sistema de explotación animal aplicado en cada una de estas especies. En este sentido, la explotación del ganado porcino en España todavía presenta una importante proporción de granjas de ciclo cerrado, mientras que la producción de aves, en casi su totalidad, es mediante el sistema de cebos (MARM, 2011a; MARM, 2011b). La explotación con cebos es un sistema más especializado que, sin embargo, puede promover una mayor circulación de diferentes

microorganismos en la granja, incluyendo a *Salmonella* y a sus fagos. Además, una mayor diversidad de fagos podría posibilitar la obtención de nuevos entes, a través de procesos de recombinación, dado que se ha descrito, que este mecanismo es el principal responsable de la estructura en mosaico que presentan los genomas fágicos y también de la generación de nuevas combinaciones génicas en fagos (Casjens y Thuman-Commike, 2011). Por otra parte, no puede descartarse que la mayor diversidad de fagos encontrada en las granjas de aves se deba, al menos en parte, a un factor geográfico, dado que no disponemos de datos sobre la localización de las granjas de las que se obtuvieron las muestras.

Es de destacar que el análisis de correspondencia múltiple de los perfiles de infección indicó que no hay ninguna significación estadística que relacione el origen aviar o porcino de los fagos con el origen de las cepas que infectan. Este resultado indica que, probablemente, los determinantes de *Salmonella*, necesarios para que progrese la infección fágica, están presentes en las distintas cepas de esta bacteria, con independencia de que éstas posean una cierta especificidad de huésped (aviar, porcino y humano). No obstante, y a pesar de ello, los fagos procedentes de aves y de cerdos son diferentes, al menos por lo que se refiere al patrón de restricción de su DNA (Tabla 4.1). En este sentido, se constató que los fagos obtenidos de aves no comparten patrones de restricción con los de origen porcino y además, ambos grupos presentan solamente dos perfiles de infección comunes (Tabla 4.3).

109

Todo ello indica que los fagos de las granjas de aves son, en general, distintos de los de las granjas de cerdos, aunque ambos grupos pueden infectar eficientemente a las cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* presentes en ambos tipos de granjas. Desde la perspectiva de terapia fágica y de desinfección, este hecho es ventajoso ya que, al menos contra *Salmonella*, podrá aplicarse un mismo combinado fágico en terapia de aves y cerdos y también en los procedimientos de desinfección de la industria alimentaria.

5.2. UAB_Phi78: un nuevo fago del género tipo SP6

En este trabajo se aisló y seleccionó al fago UAB_Phi78, el cual pertenece al género tipo SP6 de la familia *Podoviridae*, en la que se incluyen más del 35% de los

fagos de *Salmonella* (Kropinski *et al.*, 2007). Actualmente, se conocen cuatro fagos (SP6, KE1, K1-5 y K1F) de este género (ICTV, 2009) y todos ellos tienen como huésped a *E. coli*, excepto el fago SP6 que infecta a *Salmonella*. Estos fagos son muy parecidos respecto a su secuencia de DNA y organización genómica (Figura 4.17). Sus principales diferencias radican en las proteínas de la cola. En el fago SP6, dichas proteínas han sido sustituidas por las del fago P22, biológicamente distinto de los fagos tipo SP6 (Scholl *et al.*, 2002). Esta sustitución también la presenta el fago UAB_Phi78, probablemente porque su huésped es también *Salmonella*. Además, otras características hacen que dicho fago sea similar al SP6. Entre ellas cabe destacar que no tan solo el 60,3% de los genes del fago UAB_Phi78 son similares a los que contiene el fago SP6 (Tabla 4.10), sino también que la organización de los módulos de ambos es la misma (Figura 4.17) y que los terminadores Rho-independientes se encuentran prácticamente en la misma posición del genoma (Dobbins *et al.*, 2004), a pesar de presentar secuencias con una similitud inferior al 56%.

110

El fago UAB_phi78 posee unas características que lo hacen buen candidato para terapia fágica y desinfección. Así, su título prácticamente no disminuye durante 8 días a 25 y 30°C (Tabla 4.8), un aspecto crucial para su uso en el ambiente y en la superficie de los animales, como en cerdos cuya temperatura superficial es de aproximadamente 33°C (Huynh *et al.*, 2005). Asimismo, es muy estable a un pH comprendido entre 4 y 9, lo cual es también importante de cara a sus futuras aplicaciones. En cambio, al igual que otros fagos (Bardina, 2011) es muy inestable a pH 2, siendo ello un hándicap para su aplicación en terapia. Por otra parte, es estable a 4°C, lo cual indica que esta temperatura es la más recomendable para su conservación y también que puede aplicarse a la temperatura habitual de refrigeración de alimentos.

Asimismo, el fago UAB_Phi78 infecta a la mayoría de las cepas de *Salmonella* de nuestra colección (Figura 4.5) y presenta a 37°C un tiempo de latencia sobre *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 inferior a 30 min. Este parámetro es menor que el descrito para otros fagos de *Salmonella*, como los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 (Bardina, 2011) que forman parte del cóctel fágico estudiado en este trabajo, lo cual puede redundar en que el fago UAB_Phi78 tenga una mayor actividad lítica que otros fagos en un intervalo de tiempo menor. Por otra parte, la progenie del

UAB_Phi78 en *S. Enteritidis* LK5 es casi 5 veces menor a la que se obtiene en *S. Typhimurium* ATCC 14028. Ello puede ser debido a características propias de la cepa, ya que cada población bacteriana dispone de maquinarias de producción de proteínas y de material genético distintas (Hadas *et al.*, 1997) y también podría ser consecuencia de una infección abortiva (sistema Abi; *abortive infection*). A este respecto, se sabe que las bacterias tienen una amplia gama de proteínas que pueden interferir en pasos cruciales del ciclo fágico, tales como replicación, transcripción o traducción del DNA. En este tipo de mecanismo Abi, la célula infectada muere y el número de viriones que se obtienen es muy bajo, lo cual no ocurre en otros mecanismos de resistencia a la infección fágica (Labrie *et al.*, 2010). Asimismo, la síntesis de la holina en *S. Enteritidis* podría estar desregulada, alcanzando su concentración crítica en un tiempo menor que en *S. Typhimurium*. Ello podría promover la lisis celular antes de que la mayoría de los viriones estuvieran maduros, con la consiguiente muerte celular prematura y baja producción fágica. Nuestros resultados sugieren que alguno de estos procesos podría estar presente en *S. Enteritidis* LK5, ya que explicaría tanto la lisis de los cultivos de esta bacteria como la escasa producción de viriones infectivos.

111

5.3. Desinfección basada en fagos: una herramienta para el control de *Salmonella*

El uso de fagos no debería implicar ningún problema en la salud pública, ya que los fagos son los entes más abundantes de la tierra, estando presentes en un número significativo en agua y alimentos, particularmente en los fermentados (Sulakvelidze y Barrow, 2005). La carne y sus derivados frescos o procesados contienen más de 10^8 pfu/g (Kennedy y Bitton, 1987). Por tanto, está claro que los fagos se ingieren cotidianamente con la comida y son comensales de humanos y animales, siendo especialmente abundantes en el tracto gastrointestinal (Furuse, 1987; Breitbart *et al.*, 2003).

Se ha descrito en un estudio de toxicología con ratas que el fago P100 de *Listeria*, tras ser aplicado por vía oral a una dosis diaria de 2×10^{12} pfu/Kg durante 5 días, es seguro, bien tolerado y no produce mortalidad, morbilidad o cambios histopatológicos (Carlton *et al.*, 2005). Igualmente, otros estudios de aplicación de fagos en animales no han encontrado ningún efecto adverso o inesperado (Berchieri *et*

al., 1991; Merrill *et al.*, 1996; Biswas *et al.*, 2002; Cervený *et al.*, 2002; Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004; Bardina, 2011). Recientemente, se ha demostrado que tras la administración por vía oral del fago T4 a dosis de hasta 10^5 pfu a voluntarios humanos, no se encontraron fagos en el torrente sanguíneo ni tampoco anticuerpos en el suero (Bruttin y Brussow, 2005). En atención a todo ello, no hay ningún dato que sugiera algún efecto indeseable del uso de fagos para la desinfección de alimentos destinados al consumo humano.

Por otra parte, debe considerarse que el uso de un combinado fágico en terapia o desinfección presenta varias ventajas respecto a la aplicación de un único fago, tales como un mayor espectro de infección, una menor selección de bacterias resistentes a la infección y, también, una lisis de las poblaciones bacterianas más rápida y prolongada en el tiempo. En este sentido, nuestros resultados *in vitro* indican que la inclusión del fago UAB_Phi78 en el combinado formado por los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 produce una lisis más acentuada y prolongada a lo largo del tiempo en *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* LK5 (Figura 4.7).

112

En este punto, es importante señalar que las bacterias presentan varios mecanismos de resistencia contra los bacteriófagos. Entre ellos destacan: i) la prevención de la adsorción, mediante el bloqueo de los receptores, la producción de matriz extracelular y la producción de inhibidores competitivos; ii) el bloqueo de la inyección del DNA fágico a través del sistema *Sie*; iii) la degradación del DNA fágico por sistemas de restricción bacteriana y el mecanismo CRISPR-*Cas*; y, iv) el sistema de infección abortiva (Labrie *et al.*, 2010). Los datos genómicos junto con los morfológicos indican que los fagos que integran el cóctel fágico utilizado en este trabajo son diferentes. Así, el fago UAB_Phi78 es del tipo SP6, el UAB_Phi20 pertenece al género P22 y el UAB_Phi87 al tipo Felix O1 (Bardina, 2011). Como consecuencia, es previsible que la selección de cepas resistentes al cóctel a través de mecanismos tipo CRISPR-*Cas* sea considerablemente menor que la que se derivaría de la aplicación de un único fago. Del mismo modo, es esperable que los receptores de los tres fagos sean diferentes, por lo que los mecanismos de resistencia a la infección a nivel de la adsorción fágica deberían tener menor impacto.

Garantizar la seguridad alimentaria es un proceso muy complejo que depende de la aplicación de medidas en todos los niveles de la cadena de producción de alimentos. No obstante, se ha sugerido que el método más eficiente y rentable para reducir la salmonelosis en humanos probablemente sea la descontaminación del producto manufacturado, siempre y cuando se garantice que en toda la cadena de producción se aplican estrictamente las buenas prácticas de fabricación (Berends *et al.*, 1998).

En nuestro trabajo, se ha estudiado la desinfección basada en fagos tanto en condiciones que simulan algunos puntos críticos de la producción de alimentos como en productos finales (carne de pollo, huevos y lechuga). En la primera situación se simuló la contaminación superficial de cerdos por *Salmonella* en el momento de su entrada en el matadero. Se planteó este estudio debido a que la prevalencia de *Salmonella* en cerdos para abasto en la UE fue superior al 30% en el año 2009 (EFSA, 2011). Además de esta alta prevalencia individual, el estrés del transporte y el ayuno antes del sacrificio son factores desencadenantes de la excreción de *Salmonella* por sus portadores (Isaacson *et al.*, 1999), lo que promueve la contaminación por contacto directo o indirecto durante el transporte de los animales y en el corral de espera. Así pues, el periodo de espera en el matadero es un punto crítico y crucial para la calidad microbiológica del producto final (Lo Fo Wong *et al.*, 2002), dado que se facilita que patógenos como *Salmonella* lleguen a la planta de procesamiento (Berends *et al.*, 1996; Isaacson *et al.*, 1999) y que por contaminación cruzada se extienda a los canales y sus derivados (Botteldoorn *et al.*, 2004; Farzan *et al.*, 2006). Por todo ello, en términos de seguridad alimentaria, eliminar o disminuir la concentración de *Salmonella* de la superficie de la piel animal es esencial, siendo aún mejor si ello se consigue antes de que los animales entren en la línea de producción cárnica.

113

Los resultados obtenidos sobre la desinfección con el cóctel fágico de piel de cerdo contaminada con *Salmonella* (Tabla 4.16 y Figura 4.20) demuestran una reducción muy significativa de este patógeno a las 3 h, lo cual según se ha indicado (Warriss *et al.*, 1998) es un tiempo ideal de descanso presacrificio. Además, se obtuvo una reducción de 4 y 2 \log_{10} cfu/cm² de la concentración de las cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, a las 6 h de tratamiento, siendo éste el

tiempo de espera utilizado normalmente en los mataderos españoles (Mora M.T., Departament de Ciència Animal i dels Aliments; Àrea de Nutrició i de Bromatologia; comunicación personal). No obstante, cabe señalar que estos resultados podrían variar en condiciones reales, ya que la piel utilizada en este trabajo se encontraba libre de pelos y suciedad y, en condiciones de espera, los animales estarían en contacto entre ellos y con la estancia.

Sin embargo, teniendo en cuenta que la reducción de la concentración de *Salmonella* obtenida en este estudio ha sido en muchos casos prácticamente total, puede especularse que con la desinfección basada en fagos puede conseguirse reducir y, probablemente, eliminar a este patógeno de uno de los puntos críticos de la industria cárnica porcina, ya que nuestros estudios se han realizado utilizando un nivel de contaminación de *Salmonella* superior al que deben tener los animales al llegar al matadero.

Otro punto destacable de la industria alimentaria en relación a *Salmonella* es el procesamiento de la carne fresca refrigerada, concretamente de la carne de pollo, ya que es una de las principales fuentes de transmisión de *Salmonella* a humanos. Así, en 2009 en la UE, el 5,4% de las muestras analizadas (n=26.595) de carne de pollo fueron positivas para *Salmonella*, siendo el tercer producto más frecuentemente relacionado con brotes alimentarios causados por este patógeno (EFSA, 2011). Por ello, la eliminación o, al menos, la disminución a niveles indetectables de *Salmonella* significaría una gran mejora de esta etapa de la cadena de producción de carne fresca de pollo. Para conseguir este objetivo, se han propuesto varios métodos de desinfección de la carne, tales como vapor de agua y ácidos orgánicos, pero todos estos procesos normalmente causa alteraciones organolépticas en el producto (Gill y Bryant, 1997; Soares, 1997; Bajaj et al, 2003; Dubal et al., 2004; King et al., 2005; Castelo et al., 2001; Pipek et al., 2006).

Dado que los fagos no tienen ningún efecto sobre la propia matriz cárnica, los estudios de desinfección de carne de pollo basada en fagos realizados en este trabajo, se han dirigido a determinar el efecto de los fagos sobre dicha carne contaminada con 10^4 cfu/g. Se escogió este nivel de contaminación debido a que los datos disponibles de cuantificación de *Salmonella* en esta matriz indican que la concentración de esta

bacteria es normalmente inferior a 10^3 cfu/g (Dufrenne *et al.*, 2001), valor similar al reportado en Alemania, Italia y Brasil para productos cárnicos de origen porcino (Sinell *et al.*, 1990; Giovannini *et al.*, 2004; Spricigo *et al.*, 2008). En estas condiciones, la aplicación del cóctel fágico consigue reducir la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en 2,2 y 0,9 \log_{10} cfu/g, respectivamente, tras mantener la carne refrigerada a 4°C durante 7 días (Tabla 4.17 y Figura 4.18). En la Tabla 5.1, se presentan, a modo de resumen, los estudios más relevantes de desinfección de carne basados en fagos descritos en la bibliografía. Puede observarse que únicamente en dos de estos experimentos (Fiorentin *et al.*, 2005; Bigwood *et al.*, 2007) el tiempo de tratamiento es similar al utilizado en este trabajo. La diferencia entre todas las metodologías hace difícil la comparación de los resultados. No obstante, puede apreciarse que, en general, la reducción de la concentración de *Salmonella* ha sido mayor con nuestro cóctel.

Los huevos y sus derivados son los principales productos alimentarios vehículos de brotes de salmonelosis en humanos, siendo responsables del 49,1% de los casos (EFSA, 2011). Se han descrito dos posibles rutas de contaminación del huevo por *Salmonella*: transmisión horizontal y transmisión vertical. En la primera, el huevo puede ser contaminado por la penetración de la bacteria a través de la cáscara desde el intestino colonizado por *Salmonella* o a partir de heces contaminadas con este patógeno durante o después de la ovoposición (De Reu *et al.*, 2006). En la segunda, la yema, el albumen, las membranas de la cáscara y la cáscara se contaminan antes de la ovoposición debido a que los órganos reproductivos están infectados con *S. Enteritidis* (Keller *et al.*, 1995). A este respecto, se ha demostrado que *Salmonella* puede crecer a 25°C en la cáscara de huevos contaminados con heces, las cuales deben ser la reserva nutricional de este patógeno (Schoeni *et al.*, 1995). Igualmente, en ausencia de heces, es posible el crecimiento de *Salmonella* en estas condiciones, sobre todo a bajas temperaturas y humedad relativa (Messens *et al.*, 2006). En cualquier caso, es necesaria la rápida eliminación de la materia fecal para reducir los riesgos de contaminación externa del huevo. A pesar de esta y otras medidas, tales como lavar y desinfectar la cáscara, probadas en plantas de procesamiento de huevos en los EE.UU., no ha sido posible eliminar totalmente la contaminación por *S. Enteritidis* (Braden, 2006).

Tabla 5.1. Metodología y resultados obtenidos por diversos autores en la desinfección de productos alimentarios contaminados con *Salmonella*.

Metodología y Resultados	Autor			
	Goode <i>et al.</i> (2003)	Fiorentin <i>et al.</i> (2005)	Higgins <i>et al.</i> (2005)	Bigwood <i>et al.</i> (2007)
Producto	Piel de pollo	Muslos de pollo	Canal de pollo	Carne de vacuno
Contaminación bacteriana	S. Enteritidis	S. Enteritidis	S. Enteritidis	S. Typhimurium
Método de contaminación	Distribución con asa de 10^3 cfu/cm ²	Inmersión en una suspensión de 10^6 cfu/ml	Distribución con asa de 20-30 cfu	Gota de 20 μ l de 10^4 cfu sobre la carne
Composición del cóctel fágico	Fago 12	Fagos CNPSA1, CNPSA3 y CNPSA4	Fago PHL4	Fago P7
Tratamiento fágico	Distribución con asa a una MOI de 1	Inmersión en cóctel fágico a 10^9 pfu/ml	Pulverización a MOI 10^3 , 10^5 , 10^7 y 10^9	Gota de 20 μ l a una MOI 10^4 sobre la carne
Muestreo	Mediante hisopo	Lavado con BPW	Lavado con agua estéril	Trituración con tampón SM
Reducción	$1 \log_{10}$ cfu/cm ² a los 2 días	$0,65 \log_{10}$ cfu/muslo al sexto y noveno día	93% de muestras negativas a MOI 10^7 y 10^9	$2-3 \log_{10}$ cfu/cm ² a los 8 días

En todos los casos, tras la aplicación fágica, el producto tratado se mantuvo a 4-5°C.

Es de resaltar que, por lo que se refiere a Europa, el Reglamento (CE) n° 589/2008 de la Comisión Europea establece que los huevos frescos no pueden sufrir ningún tipo de tratamiento o de refrigeración. No obstante, podría proponerse la desinfección de huevos frescos basada en fagos ya que su ingestión es inocua para el ser humano y, además, no alteran las características del producto. Sin embargo, nuestros resultados indican que este tipo de desinfección no consiguió reducir excesivamente la concentración de *Salmonella* (Tabla 4.21 y Figura 4.20). En nuestro trabajo, y también en el de otros autores (Himathongkham *et al.*, 1999; Cony *et al.*, 2008) hemos encontrado una elevada desviación estándar en la determinación de la concentración de *Salmonella*, incluso en el grupo control no tratado con fagos, lo cual explicaría, sólo en parte, que la eficacia del cóctel fágico fuera baja. Una de las causas de la falta de reproducibilidad de los resultados puede deberse a que no se ha conseguido una contaminación homogénea de la superficie de los huevos, lo cual puede atribuirse a las características de la propia matriz. Así, la cáscara del huevo es muy irregular y porosa, lo que puede justificar que en unos huevos las bacterias se fijen bien, mientras que en otros no. Otra causa podría ser la translocación de los microorganismos desde la superficie a las membranas de la cáscara, lo cual afectaría el efecto de los fagos. En este sentido, en condiciones muy similares a las utilizadas en este trabajo, se detectó la presencia de *Salmonella* en dichas membranas (Miyamoto *et al.*, 1998). Así, aunque la descontaminación con fagos es una opción aceptable, deberán realizarse futuros estudios para conocer el proceso de colonización del huevo por parte de *Salmonella*, lo cual sin duda ayudará a desarrollar una eficaz aplicación de la fagos a esta matriz.

117

No sólo los productos de origen animal son un vehículo de transmisión de *Salmonella* a humanos, sino que también los de origen vegetal pueden jugar este papel. Actualmente, tanto la presencia como la persistencia de este microorganismo en muchos vegetales, incluyendo la lechuga, es algo bien conocido (Ercolani, 1976; Mahon *et al.*, 1997; Wells y Butterfield, 1997; Kakiomenou *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1998; Mohle-Boetani *et al.*, 1999; Hedberg *et al.*, 1999; Burnett y Beuchat, 2000; Weissinger *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2001; Natvig *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2004). Además, el aumento de la asociación entre la ingestión de verduras frescas y los brotes

de toxiinfecciones alimentarias ha generado una gran preocupación, alertando sobre la posible contaminación de los vegetales con patógenos fecales en el entorno agrícola (Tauxe *et al.*, 1997). Estos alimentos presentan como potenciales fuentes de contaminación el suelo, las heces, abonos de estiércol no compostado o mal compostado, el agua de riego, el agua utilizada para aplicar fungicidas e insecticidas, polvo, insectos, animales salvajes y domésticos y la manipulación humana (Beuchat, 1996; Buck *et al.*, 2003).

Para prevenir que los posibles patógenos lleguen a los consumidores finales, en las industrias de productos vegetales frescos se utilizan diferentes procedimientos de descontaminación, siendo el cloro a 50-200 mg/l el más utilizado (Beuchat *et al.*, 1998). Sin embargo, este tratamiento, a pesar de reducir la contaminación inicial de vegetales mínimamente procesados, no elimina totalmente a los patógenos (Legnani y Leoni, 2004). Por ejemplo, el tratamiento de lechuga contaminada con *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 o *Salmonella* con cloro a una concentración de 200 mg/l consigue únicamente una reducción de estos patógenos inferior a 2 log (Lang *et al.*, 2004). La razón de la falta de eficacia de este proceso es desconocida, pero se postula que podría atribuirse a una disminución del poder oxidante del cloro debida a la alta carga orgánica de las plantas (Burnett y Beuchat, 2000) y también a una baja accesibilidad del cloro a los patógenos, ya sea por su internalización en tejidos de la planta o su agregación y formación de biopelículas (Lapidot *et al.*, 2006).

118

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la gran eficacia de la desinfección basada en fagos de vegetales mínimamente procesados, como es la lechuga romana lista para su consumo, ya que se obtuvo una reducción de 3,9 y 2,2 log₁₀ cfu/g de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, tras un tratamiento de inmersión de la lechuga en un medio líquido que contenía el cóctel fágico (Tabla 4.23 y Figura 4.21). Este tratamiento puede aplicarse tanto a nivel industrial como por el consumidor, de forma similar a la existente para algunos agentes desinfectantes comercializados para uso doméstico. Los datos bibliográficos sobre el uso de la desinfección de vegetales con fagos son contradictorios, ya que en un trabajo, con brotes de alfalfa, similar al descrito en esta memoria se obtuvieron resultados muy parecidos (Ye *et al.*, 2010), mientras que en otro estudio, realizado

también con este vegetal, el efecto no fue muy significativo (Kocharunchitt *et al.*, 2009). Ello puede deberse tanto a la distinta eficacia de los fagos utilizados, como a diferencias en las metodologías de cuantificación de *Salmonella* y de aplicación de los fagos.

Por otra parte, en este trabajo también se ha demostrado que la eficacia de los fagos que integran un preparado fágico puede ser distinta según se trate de cultivos de laboratorio o de matrices alimentarias. Así, mientras que el fago UAB_Phi78 a 25°C es, con diferencia, el que produce un mayor descenso de la concentración de *Salmonella* en cultivos líquidos (Figura 4.24), su efecto sobre esta bacteria en lechuga es muy bajo (Tabla 4.25 y Figura 4.23). En esta matriz alimentaria, el fago más relevante del cóctel es el UAB_Phi20. En relación con todo ello, podría especularse que, tal vez en otra matriz alimentaria, el mayor efecto desinfectante del cóctel lo ejercería uno de los otros dos fagos. Nuestros resultados apoyan claramente la recomendación de la EFSA (2009) respecto a que debe estudiarse el efecto de la desinfección con fagos en cada matriz y, además, también indican que estos trabajos deben realizarse para cada uno de los fagos que componen un cóctel fágico determinado.

6. Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

1. En las explotaciones animales, el porcentaje de aislamiento de fagos de *Salmonella* está relacionado con la prevalencia de su huésped. Además, el procedimiento de enriquecimiento selectivo para esta bacteria desarrollado en este trabajo favorece el aislamiento de sus fagos.
2. Casi la mitad de los fagos de *Salmonella* estudiados en este trabajo infecta a un mayor número de cepas diferentes de *S. Enteritidis* que de *S. Typhimurium*. Ello implica que, en el ambiente, estos fagos deben ser más eficaces sobre las distintas poblaciones de *S. Enteritidis* que de *S. Typhimurium*.
3. La diversidad de fagos aislados de granjas de aves es mayor que la de los obtenidos de granjas de cerdos, siendo además distintos entre ellos. No obstante, ambos grupos de fagos son capaces de infectar a cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* de diferente origen.
4. En este trabajo se ha seleccionado el fago UAB_Phi78 que pertenece al género tipo SP6 de la familia *Podoviridae*. Su genoma tiene un tamaño de 43.940 bp, un sistema de empaquetamiento de DNA mediante llenado de cápside y no codifica genes de virulencia conocidos.
5. El fago UAB_Phi78 es muy estable a las temperaturas de 25°C, 30°C y 37°C y a un rango de pH comprendido entre 4 y 9, si bien sufre una significativa inactivación a pH 2. Es estable a 4°C durante un año como mínimo, por lo que dicha temperatura es la más adecuada para su conservación.
6. La adición del fago UAB_Phi78 a un combinado integrado por los fagos UAB_Phi20 y UAB_Phi87 produce a 37°C un mayor descenso de la concentración de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* que el obtenido con dicho combinado.
7. La desinfección mediante pulverización con el cóctel fágico a 10^{10} cfu/ml de la piel de cerdo produce un descenso de 4 y 2 \log_{10} cfu/cm² de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, a las 6 h de tratamiento. Este tipo de aplicación podría ser utilizada antes del transporte de los animales y en el corral de espera de los mataderos.
8. La desinfección mediante inmersión en el cóctel fágico a 10^9 cfu/ml de carne de pollo y posterior mantenimiento a 4°C durante 7 días, produce una reducción de

2,2 y 0,9 \log_{10} cfu/g de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente. Este tipo de tratamiento puede aplicarse tanto en determinados puntos del procesamiento industrial de la carne, como durante la refrigeración de productos cárnicos.

9. La pulverización con el cóctel fágico a 10^{10} cfu/ml de huevos frescos, mantenidos durante 2 horas a temperatura ambiente, únicamente produce un descenso de 0,9 \log_{10} cfu/cm² de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. Este tratamiento sería aplicable antes de la comercialización de huevos frescos.
10. El tratamiento de lechuga mediante inmersión en un cóctel fágico a 10^9 cfu/ml produce una reducción de 3,9 y 2,2 \log_{10} cfu/g de la concentración de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, respectivamente, a los 60 min de tratamiento. Esta aplicación es apta para ser utilizada en las industrias productoras de verduras frescas envasadas y también por el propio consumidor.
11. La eficacia individual de los fagos que componen un cóctel fágico, no se corresponde necesariamente con su efecto sobre una matriz determinada. Por ello, es necesario estudiar dicha eficacia no sólo *in vitro* sino también en las diferentes matrices de aplicación.

7. Bibliografía

- Abedon S.T., Herschler T.D., Stopar D. 2001. Bacteriophage Latent-Period Evolution as a Response to Resource Availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9):4233-4241.
- Abuladze T., Li M., Menetrez M.Y., Dean T., Senecal A., Sulakvelidze A. 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20):6230-6238.
- Adams M. H. 1959. Bacteriophages. Interscience Pub. New York.
- Alban L., Stärk K.D.C. 2005. Where should the effort be put to reduce the Salmonella prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Preventive Veterinary Medicine*, 68:63-79.
- Ackermann H.W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 154(4):245-251.
- Ackermann H.W. 2005. Bacteriophage Classification, pp. 67-89. *In*: Kutter E., Sulakvelidze A. (editores). *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Florida, EE.UU.
- Ackermann H.W. 2007. 5500 phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152:227-243.
- Atterbury R.J., Connerton P.L., Dodd C.E.R., Rees C.E.D., Connerton I.F. 2003. Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8):4511-4518.
- Atterbury R.J., Van Bergen M.A. P., Ortiz F.M., Lovell A., Harris J.A., De Boer A., Wagenaar J.A., Allen V.M., Barrow P.A. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14):4543-4549.

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl, K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 1. Greene/Wiley-Interscience, New York.
- Bach S.J., McAllister T.A., Veira D.M., Gannon V.P.J., Holley R.A. 2003. Effect of bacteriophage DC22 on *Escherichia coli* O157:H7 in artificial rumen system (Rusitec) and inoculated sheep. *Animal Research*, 52:89-101.
- Bajaj B.K., Sharma V., Koul S., Thakur R. L. 2003. Incidence of *Salmonella* in poultry and meats and growth inhibition of *Salmonella* Enteritidis by organic acids. *Journal of Food Science and Technology*, 40(5):556-558.
- Bardina C. 2007. Aïllament de bacteriofags de les serovarietats Enteritidis i Typhimurium de *Salmonella enterica*. Trabajo de investigación del Programa de Máster en Biotecnología Avanzada, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Bardina C. 2011. Estudio sobre terapia fágica contra *S. enterica* en *Gallus gallus*. Trabajo de investigación del Programa de Doctorado en Biotecnología, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Barrow P.A., Soothill J.S. 1997. Bacteriophages therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*, 5(7):268-271.
- Becker H.J., Heide J.V.D., Fenigsen-Narucka U., Peters R. 1987. Fate of salmonellas and competing flora in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. *Journal of Applied Bacteriology*, 62:97-104.
- Berchieri Jr. A., Lovell M.A., Barrow P.A. 1991. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. *Research in Microbiology*, 142:541-549.

- Berends B.R., Urlings H.A.P., Snijders J.M., van Knapen F. 1996. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*, 30(1-2):37-53.
- Berends B.R., van Knapen F., Mossel D.A., Burt S.A., Snijders J.M. 1998. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. *International Journal of Food Microbiology*, 44:207-217.
- Bernhardt T.G., Wang I.N., Struck D.K., Young R. 2002. Breaking free: "Protein antibiotics" and phage lysis. *Research in Microbiology*, 153:493-501.
- Beuchat L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59:204-216.
- Beuchat L.R., Nail B.V., Adler B.B., Clavero M.R.S. 1998. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *Journal of Food Protection*, 61(10):1305-1311.
- Bigwood T., Hudson J.A., Billington C., Carey-Smith G.V., Heinemann J.A. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiology*, 25:400-406.
- Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., Trostel A.N., Powell B., Carlton R., Merrill C.R. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*, 70:204-210.
- Borie C., Albala I., Sánchez P., Sánchez M. L., Ramírez S., Navarro C., Morales M. A., Retamales J., Robeson J. 2008. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. *Avian Diseases*, 52:64-67.

- Botteldoorn N., Herman L., Rijpens N., Heyndrickx M. 2004. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9):5305-5314.
- Boughton C., Leonard F.C., Egan J., Kelly G., O'Mahony P., Markey B.K., Griffin M. 2004. Prevalence and number of *Salmonella* in Irish retail pork sausage. *Journal Food of Protection*, 67:1834-1839.
- Braden C.R. 2006. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 43:512-517.
- Breitbart M., Hewson I., Felts B., Mahavy J.M., Nulton J., Salamon P., Rohwer F.E., 2003. Metagenomic analysis of an uncultured viral community from human feces. *Journal of Bacteriology*, 185:6220-6223.
- Brüssow H. 2005. Phage therapy: the *E.coli* experience. *Microbiology*. 151(Pt7):2133-2140.
- Bruttin A., Brussow H. 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49:2874-2878.
- Buck J.W., Walcott R.R., Beuchat L.R. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress*, 10.1094/PHP-2003-0121- 01-RV.
- Burnett S.L., Beuchat L.R. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25:281-287.
- Callaway T.R., Edrington, T.S., Brabban, A.D., Kutter, B.M., Anderson, R.C., Nisbet, D.J. 2006. Use of bacteriophage to reduce *E. coli* O157:H7 in the intestinal tract and on the hides of cattle [abstract], p. 53. *In: Proceedings of the 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing Escherichia coli Infections*, October 29-November 1, 2006, Melbourne, Australia.

- Callaway T.R., Edrington T.S., Brabban A., Kutter E., Karriker L., Stahl C., Wagstrom E., Anderson R.C., Genovese K., McReynolds J., Harvey R., Nisbet D.J. 2010. Occurrence of *Salmonella*-specific bacteriophages in swine feces collected from commercial farms. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(7):851-856.
- Campbell J.V., Mohle-Boetani J., Reporter R., Abbott S., Farrar J., Brandl M., Mandrell R., Werner S.B., 2001. An outbreak of *Salmonella* serotype Thompson associated with fresh cilantro. *Journal of Infectious Diseases*, 183:984-987.
- Carlton R.M., Noordman W.H., Biswas B., de Meester E.D., Loessner M.J. 2005. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3):301-312.
- Casjens S.R. 2008. Diversity among the tailed bacteriophages that infect the *Enterobacteriaceae*. *Research in Microbiology*, 159(5):340-348.
- Casjens S.R., Thuman-Commike P.A. 2011. Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. *Virology*, 411(2):393-415. 131
- Castelo M.M., Kang D.H., Siragusa G.R., Koohmaraie M., Berry E.D. 2001. Evaluation of combination treatment processes for the microbial decontamination of pork trim. *Journal of Food Protection*, 64(3):335-342.
- Castellan D.M., Kinde H., Kass P.H., Cutler G., Breitmeyer R.E., Bell D.D., Ernst R.A., Kerr D.C., Little H.E., Willoughby D., Riemann H.P., Ardans A., Snowdon J.A., Kuney D.R. 2004. Descriptive study of california egg layer premises and analysis of risk factors for *Salmonella enterica* serotype Enteritidis as characterized by manure drag swabs. *Avian Diseases*, 48(3):550-561.
- Catalano C.E., Cue D., Feiss M. 1995. Virus DNA packaging: the strategy used by phage λ . *Molecular Microbiology*, 16:1075-1086.

CDC. 2008. Center for Disease Control and Prevention. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services.

Cervený K.E., DePaola A., Duckworth H., Gulig P.A. 2002. Phage therapy of local and systemic disease caused by *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infection and Immunity*, 70:6251-6262.

Chibani-Chennoufi S., Sidoti J., Bruttin A., Kutter E., Sarker S., Brüssow H. 2004. In vitro and in vivo bacteriolytic activities of *Escherichia coli* phages: implications for phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48:2558-2569.

Chighladze E., Alavidze Z., Brown T., Pasternack G., Morris J.G., Sulakvelidze A. 2001. Application of lytic bacteriophages for reducing contamination of poultry with selected *Salmonella* serotypes. *101st General Meeting of the American Society for Microbiology*, Orlando, Florida, USA.

132 Chung Y.H., Kim S.Y., Chang Y.H. 2003. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from foods in Korea from 1993 to 2001. *Journal of Food Protection*, 66:1154-1157.

Cony H.C., Vieira S.L., Berres J., Gomes H.A., Coneglian J.L.B., Freitas D.M. 2008. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. *Ciência Rural*, 38(5):1407-1412.

Cook K.A., Dobbs T.E., Hlady W.G., Wells J.G., Barrett T.J., Puhf N.D., Lancette G.A., Bodager D.W., Toth B.L., Genese C.A., Highsmith A.K., Pilot K.E., Finelli L., Swerdlow D.L. 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *Journal of American Medical Association*, 280:1504-1509.

- Corry J.E.L., Allen V.M., Huson W.R., Breslin M.G., Davies R.H. 2002. Sources of salmonella on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. *Journal of Applied Microbiology*, 92:424-432.
- Cruchaga S., Echeita A., Aladueña A., García-Peña J., Frias N., Usera M.A. 2001. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47:315-321.
- d'Herelle F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 165:373-375.
- d'Herelle F. 1926. *The Bacteriophage and Its Behavior*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
- De Reu K., Grijspeerdt K., Messens W., Heyndrickw M., Uyttendaele M., Debevere J., Herman L. 2006. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 112:253-260.
- Dobbins A.T., George Jr. M., Basham D.A., Ford M.E., Houtz J.M., Pedulla M.L., Lawrence J.G., Hatfull G.F., Hendrix R.W. 2004. Complete genomic sequence of the virulent *Salmonella* bacteriophage SP6. *Journal of Bacteriology*, 186(7):1933-1944.
- Doermann A.H. 1952. The intracellular growth of bacteriophages. I. Liberation of intracellular bacteriophage T4 by premature lysis with another phage or with cyanide. *Journal of General Physiology*, 35:645-656.
- Donalson L.M., McReynolds J.L., Kim W.K., Chalova V.I., Woodward C.L., Kubena L.F., Nisbet D.J., Ricke S.C. 2008. The influence of a fructooligosaccharide prebiotic combined with alfalfa molt diets on the gastrointestinal tract fermentation, *Salmonella* Enteritidis infection, and intestinal shedding in laying hens. *Poultry Science*, 87:1253-1262.

- Donoghue D.J. 2003. Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poultry Sciences*, 82:618-621.
- Doyle M.P., Erickson M.C. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science*, 85(6):960-973.
- Dubal Z.B., Paturkar A.M., Waskar V.S., Zende R.J., Latha C., Rawool D.B., Kadam M.M. 2004. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. *Meat Science*, 66(4):817-821.
- Duffy E.A., Belk K.E., Sofos J.N., Bellinger G.R., Pape A. Smith G.C. 2001. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *Journal of Food Protection*, 64:172-178.
- Dufrenne J., Ritmeester V., Van Asch E.D., Van Leusden F., De Jonge R. 2001. Quantification of the contamination of chicken and chicken products in the Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. *Journal of Food Protection*, 64(4):538-541.
- Dykes G.A., Moorhead S.M. 2002. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1):71-81.
- EFSA. 2004. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on biological hazards on a request from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *The EFSA Journal*, 114:1-74.
- EFSA. 2006. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004. *The EFSA Journal*, 310:1-678.

- EFSA. 2009. European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from European Commission on the use and mode of action of bacteriophages in food production. *The EFSA Journal*, 1076:1-26.
- EFSA. 2010. European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 8(1):1496.
- EFSA. 2011. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 2011; 9(3):2090.
- Ellermeier C.D., Sauch J.M. 2006. The *Genus Salmonella*, part 3, section 3.3, pp. 123-158. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. The Prokaryotes, vol. 6. Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer, New York.
- Ellis E.L., Delbrück M. 1939. The growth of bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 22:365-384.
- Ercolani G.L., 1976. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. *Applied and Environmental Microbiology*, 31:847-852.
- ERS. 2011. Economic Research Service. United States Department of Agriculture. Foodborne Illness Cost Calculator: *Salmonella*. http://www.ers.usda.gov/Data/FoodborneIllness/salm_Intro.asp.
- Farzan A., Friendship R.M., Dewey C.E., Warriner K., Poppe C., Klotins K. 2006. Prevalence of *Salmonella* spp. on Canadian pig farms using liquid or dry-feeding. *Preventive Veterinary Medicine*, 73(4):241-254.

- Filho A.R.L., Higgins J.P., Higgins S.E., Gaona G., Wolfenden A.D., Tellez G., Hargis B.M. 2007. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. *Poultry Science*, 86:1904-1909.
- Fiorentin L., Vieira N.D., Barioni W. 2004. *In vitro* characterization and *in vivo* properties of salmonellae lytic bacteriophages isolated free range layers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6(2):121-128.
- Fiorentin L., Vieira N.D., Barioni W. 2005a. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*, 34(34):258-263.
- Fiorentin L., Vieira N.D., Barioni W. 2005b. Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella* Enteritidis in experimentally contaminated chicken cuts. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(4):255-260.
- Fletcher D.L. 2006. Influence of sampling methodology on reported incidence of *Salmonella* in poultry. *Journal of AOAC International*, 89(2):512-516.
- Fujisawa H., Morita M. 1997. Phage DNA packaging. *Genes to Cells*, 2:537-545.
- Furuse K. 1987. Distribution of coliphages in the general environment general considerations, pp. 87–124. *In*: Goyal S.M., Gerba C., Bitton G. (editors). *Phage Ecology*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Garcia P., Martinez B., Obeso J. M., Rodriguez A. 2008. Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47:479-485.
- Gill C.O, Bryant J. 1997. Decontamination of carcasses by vacuum-hot water cleaning and steam pasteurizing during routine operations at a beef packing plant. *Meat Science*, 47(3/4):267-276.

- Giovannini A., Prencipe V., Conte A., Marino L., Petrini A., Pomilio F., Rizzi V., Migliorati G. 2004. Quantative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. *Food Control*, 15(2):139-144.
- Goode D., Allen V.M., Barrow P.A. 2003. Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8):5032-5036.
- Goyal S.M., Gerba C.P., Bitton G. 1987. Phage Ecology. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Gray L.D. 1995. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*, pp. 450-456. In: Murray P.R., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C., Tenover F.C. (editores). *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington.
- Greer G.G. 1982. Psychrotrophic bacteriophages for beef spoilage pseudomonads. *Journal of Food Protection*, 45(14):1318-1325.
- Greer G.G. 1986. Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth and beef spoilage. *Journal of Food Protection*, 49(2):104-109.
- Greer G.G., Dilts B.D. 1990. Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 10(3-4):331-342.
- Greer G.G., Dilts B.D. 2002. Control of *Brochothrix thermosphacta* spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages. *Journal of Food Protection*, 65(5):861-863.
- Grizard D., Barthomeuf C. 1999. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction, Nutrition, Development*, 39:563-588.
- Guenther S., Huwyler D., Richard S., Loessner M.J. 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied Environmental Microbiology*, 75(1):93-100.

- Gutiérrez D., Martín-Platero A.M., Rodríguez A., Martínez-Bueno M., Gracia P., Martínez B. 2011. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 322:90-97.
- Guttman B., Raya R., Kutter E. 2005. Basic Phage Biology, pp. 29-66. *In*: Kutter E., Sulakvelidze A. (editores). *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Florida, EE.UU.
- Hadas H., Einav M., Fishov I., Zaritsky A. 1997. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology*, 143:179-185.
- Hedberg C.W., Angulo F.J., White K.E., Langkop C.W., Schell W.L., Stobierski M.G., Schuchat A., Besser J.M., Dietrich S., Hesel L., Griffin P.M., McFarland J.W., Osterholm M.T. 1999. Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. The Investigation Team. *Epidemiology and Infection*, 122:385-393.
- Hendrix R.W., Smith M.C.M., Burns R.N., Ford M.E., Hatfull G.F. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(5):2192-2197.
- Hendrix R.W. 2003. Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5):506-511.
- Henning U., Hashemol-Hosseini S. 1994. Receptor recognition by T-even-type coliphages, pp. 291-298. *In*: Karam J. D., Drake J. W., Kreuzer K. N., Mosig G., Hall D. H., Eiserling F. A., Black L. W., Spicer E. K., Kutter E., Carlson K., Miller E. S. (ed.), *Molecular biology of bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Hernández A.M. 2007. Aislamiento, caracterización y detección precoz de bacteriófagos de *Streptococcus thermophilus* en la industria láctea. Trabajo de investigación del Programa de Doctorado en Biología Funcional y Molecular, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo.
- Higgins J.P., Higgins S.E., Guenther K.L., Huff W., Donoghue A.M., Donoghue D.J., Hargis B.M. 2005. Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poultry Science*, 84(7):1141-1145.
- Higgins J.P., Higgins S.E., Vicente J.L., Wolfenden A.D., Telle, G., Hargis B.M. 2007. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal broilers. *Poultry Science*, 86:1662-1666.
- Himathongkham S., Riemann H., Ernst R. 1999. Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella enteritidis* – Implications for egg testing. *International Journal of Food Microbiology*, 49:161-167.
- Holt J.G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, New York. 139
- Hong Y.P., Conway W.S. 2007. Combined application of bacteriophage and *Gluconobacter asai* in reducing *Listeria monocytogenes* in honeydew melon pieces. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 48:365-369.
- Housby J.N., Mann N. H. 2009. Phage therapy. *Drug Discovery Today*, 14:536-540.
- Huff W.E, Huff G.R., Rath N.C., Balog J.M., Donoghue A.M. 2005. Alternative to antibiotics: utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent food borne pathogens. *Poultry Science*, 84(4):655-659.
- Hume M., Nisbet D., DeLoach J. 1997. *In vitro* ¹⁴C-amino acid fermentation by CF3™, a characterized continuous-flow competitive exclusion culture of caecal bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 83:236-242.

- Huynh T.T.T., Aarnink A.J.A., Verstegen M.W.A., Gerrits W.J.J., Heetkamp M.J.W., Kemp B., Canh T.T. 2005. Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. *Journal of Animal Science*, 83:1385-1396.
- ICTV. 2009. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy List 2009. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>.
- Isaacson R.E., Firkins L.D., Weigel R.M., Zuckermann F.A., DiPietro J.A. 1999. Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella* Typhimurium among experimental infected pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 60:1155-1158.
- Islam M., Morgan J., Doyle M.P., Phatak S.C., Millner P., Jiang X. 2004. Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 1(1):27-35.
- 140 Jacob C.J., Powell D.A. 2009. Where Does Foodborne Illness Happen—in the Home, at Foodservice, or Elsewhere—and Does It Matter? *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(9):1121-1123.
- Jardine J.J., Anderson D.W. 2006. DNA Packaging in double-stranded DNA phages, pp. 49-65. *In*: Calendar R. (editor). *The Bacteriophages*. Oxford University Press, New York.
- Joerger R.D. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*, 82:640-647.
- Kakiomenou K., Tassou C., Nychas G.-J. 1998. Survival of *Salmonella* enteritidis and *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(3):383-387.
- Keller L.H., Benson C.E., Krotec K., Eckroade R.J. 1995. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity*, 63:2443-2449.

- Kennedy J.E.J., Bitton G. 1987. Bacteriophages in foods, pp. 289-316. *In*: Goyal S.M., Gerba C.P., Bitton G. (editores). Phage Ecology. John Wiley & Sons, New York.
- Keppel F., Fayet O., Georgopoulos C. 1988. Strategies of bacteriophage DNA replication, pp. 145-262. *In*: Calendar R. (editor). The Bacteriophages. Plenum Press, New York.
- King D.E., Lucia L.M., Castillo A., Acuff G.R., Harris K.B., Savell J.W. 2005. Evaluation of peroxyacetic acid as a post-chilling intervention for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef carcass surfaces. *Meat Science*, 69(3):401-407.
- Kocharunchitt C., Ross T., McNeil D.L. 2009. Use of bacteriophages as biocontrol agents to control *Salmonella* associated with seed sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 128:453-459.
- Kropinski A.M., Sulakvelidze A., Konczy P., Poppe C. 2007. *Salmonella* phages and prophages. Genomics and practical aspects. *Methods in Molecular Biology*, 394:133-175.
- Krylov V.N. 2001. Phage Therapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, prospects, safety, limitations. *Russian Journal of Genetics*, 37(7):715-730.
- Kutter E., Raya R., Carlson K. 2005. Molecular mechanisms of phage infection, pp. 165-222. *In*: Kutter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press, Florida, EE.UU.
- Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8:317-327.
- Lang M.M., Harris L.J., Beuchat L.R. 2004. Survival and recovery of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* on lettuce and parsley as affected by method of inoculation, time between inoculation and analysis, and treatment with chlorinated water. *Journal of Food Protection*, 67:1092-1103.

- Lapidot A., Romling U., Yaron S. 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 109:229-233.
- Legnani P.P., Leoni E. 2004. Effect of processing and storage conditions on the microbiological quality of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 39:1061-1068.
- Libby S.J., Halsey T.A., Altier C., Potter J., Gyles C.L. 2008. *Salmonella*, pp. 143-168. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 3rd ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Lo Fo Wong D.M.A., Hald T., van der Wolf P.J., Swanenburg M. 2002. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. *Livestock Production Science*, 76(3):215-222.
- 142 Loc Carrillo C., Atterbury R.J., el-Shibiny A., Connerton P.L., Dillon E., Scott A., Connerton I.F. 2005. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:6554-6563.
- Mahon B.E., Ponka A., Hall W.N., Komatsu K., Dietrich S.E., Siitonen A., Cage G., Hayes P.S., Lambert-Fair M.A., Bean N.H., Griffin P.M., Slutsker L. 1997. An international outbreak of *Salmonella* infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Journal of Infectious Diseases*, 175:876-882.
- Mathews C.K., Kutter E., Mosig G., Berget P.B. (editores). 1983. *Bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- MARM, 2011a. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. El sector de la carne de aves en cifras: Principales indicadores económicos en 2010. <http://www.marm.es/app/VocWAI/Inicio.aspx?tg=introduccion>.

- MARM, 2011b. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales indicadores económicos en 2010. <http://www.marm.es/app/VocWAI/Inicio.aspx?tg=introduccion>.
- Mattick K.L., Bailey R.A., Jorgensen F., Humphrey T.J. 2002. The prevalence and number of *Salmonella* in sausages and their destruction by frying, grilling or barbecuing. *Journal Applied Microbiology*, 93:541-547.
- McLaughlin M.R., Balaa M.F., Sims J., King R. 2006. Isolation of *Salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons. *Journal of Environmental Quality*, 35:522-528.
- McLaughlin M.R., King R.A. 2008. Characterization of *Salmonella* bacteriophages isolated from swine lagoon effluent. *Current Microbiology*, 56:208-213.
- Merril C.R., Biswas B., Carlton R., Jensen N.C., Creed G.J., Zullo S., Adhya S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:3188-3192.
- Messens W., Grijspeerdt K., Herman L. 2006. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science*, 47:554-560.
- Methner U., Barrow P.A., Martin G., Meyer H. 1997. Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonisation in newly hatched SPF chickens using live, attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. *International Journal of Food Microbiology*, 35(3):223-230.
- Miller S.I., Hohmann E.L., Pegues D.A. 1995. *Salmonella* (including *Salmonella typhi*), pp. 2013-2033. *In*: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (editores). *Principles and Practice of Infections Diseases*, 4th ed. Churchill Livingstone, New York.

- Miyamoto T., Horie T., Baba E., Sasai K., Fukata T., Arakawa A. 1998. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. *Journal of Food Protection*, 61:350-353.
- Mohle-Boetani J.C., Reporter R., Werner S.B., Abbott S., Farrar J., Waterman S.H., Vugia D.J., 1999. An outbreak of *Salmonella* serogroup Saphra due to cantaloupes from Mexico. *Journal of Infectious Diseases*, 180:1361-1364.
- Narushin V.G. 2005. Egg geometry calculation using the measurements of length and breadth. *Poultry Science*, 84:482-484.
- Natvig E.E., Ingham S.C., Ingham B.H., Cooperband L.R., Roper T.R. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6):2737-2744.
- Neidhardt F.C. (editor jefe), Curtiss III R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, vol. 2. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- O'Flynn G., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Coffey A. 2004. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3417-3424.
- Olsen J.E., Brown D.J., Madsen M., Bisgaard M. 2003. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *Journal of Applied Microbiology*, 94:826-835.
- Pala T.R., Sevilla A. 2004. Microbial contamination of carcasses, meat, and equipment from an Iberian pork cutting plant. *Journal of Food Protection*, 67:1624-1629.

Pipek P., Houska M., Hoke K., Jeleniková J., Kýhos K., Sikulová M. 2006. Decotamination of pork carcasses by steam and lactic acid. *Journal of Food Engineering*, 74:224-231.

Rakhuba D.V., Kolomiets E.I., Dey E.S., Novik G.I. 2010. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology*, 59(3):145-55.

Raya R.R., Varey P., Oot R.A., Dyen M.R., Callaway T.R., Edrington T.S., Kutter E.M., Braban A.D. 2006. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:6405-6410.

Reglamento (CEE) n° 2092/91 del Consejo de 24 de junio de 1991 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 198.

145

Reglamento (CE) n° 178/2002 del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de la Unión Europea, L 31.

Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea, L 325/1.

Reglamento (CE) n° 1003/2005 de la Comisión de 30 de junio de 2005 por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto al objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de salmonela en las manadas reproductoras de *Gallus gallus* y se modifica el Reglamento (CE) n° 2160/2003. Diario Oficial de la Unión Europea, L 170.

Reglamento (CE) n° 1091/2005 de la Comisión de 12 de julio de 2005 por el que se aplica el Reglamento (CE) no 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los requisitos de uso de métodos específicos de control en el marco de los programas nacionales de control de la salmonela. Diario Oficial de la Unión Europea, L 182/3.

Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 338.

146

Reglamento (CE) n° 1168/2006 de la Comisión de 31 de julio de 2006 por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto al objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de determinados serotipos de salmonela en las gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* y se modifica el Reglamento (CE) n° 1003/2005. Diario Oficial de la Unión Europea, L 211/5.

Reglamento (CE) n° 646/2007 de la Comisión de 12 de junio de 2007 por el que se aplica el Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo en cuanto al objetivo comunitario de reducción de la prevalencia de la *Salmonella enteritidis* y la *Salmonella typhimurium* en los pollos de engorde y se deroga el Reglamento (CE) n° 1091/2005. Diario Oficial de la Unión Europea, L 151/21.

Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 322/13.

Reglamento (CE) n° 589/2008 de la Comisión de 23 de junio de 2008 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a las normas de comercialización de los huevos. Diario Oficial de la Unión Europea, L 163/6.

Rohwer F., Edwards R. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*, 184:4529-4535.

Roos W.H., Ivanovska I.L., Evilevitch A., Wuite G.J.L. 2007. Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(12):1484-1497.

Salyers A.A. (editor). 1995. Antibiotic resistance transfer in the mammalian intestinal tract: implications for human health, food safety and biotechnology. Springer-Verlag, New York.

147

SAS v9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Schiller L.R. 2009. A germy world. Food-borne infections in 2009. *Nature reviews*. 6:197-198.2009.

Schoeni J.L., Glass K.A., McDermott J.L., Wang A.C. 1995. Growth and penetration of *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Heidelberg* and *Salmonella Typhimurium* in eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 24:385-393.

Scholl D., Rogers S., Adhya S., Merrill C.R. 2001. Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 75(6):2509-2515.

- Scholl D., Adhya S., Merril C.R. 2002. Bacteriophage SP6 is closely related to phages K1-5, K5, and K1E but encodes a tail protein very similar to that of the distantly related P22. *Journal of Bacteriology*, 184(10):2833-2836.
- Schwarz S., Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32:201-225.
- Shelobolina E.S., Sullivan S.A., O`Neil K.R., Nevin K.P., Lovley D.R. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2959-65.
- Shere K.D., Goldberg M.B., Rubin R.H. 1998. *Salmonella* infections, pp. 699-712. In: Gorbarch S.L., Bartlett J.G., Blacklow N. R. *Infectious Diseases*, 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- 148 Sinell H.J., Pietzch O., Klingbell H., Benner M. 1990. Estimation of most probable number in retail samples of minced pork. *International Journal of Food Microbiology*, 11:135-142.
- Sklar I.B., Joerger R.D. 2001. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in chickens. *Journal of Food Safety*, 21:15-29.
- Skurnik M.I., Strauch E. 2006. Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296:5-14.
- Slader J., Domingue G., Jørgensen F., McAlpine K., Owen R.J., Bolton F.J., Humphrey T.J. 2002. Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Applied Environmental Microbiology*, 68(2):713-719.

Soares L.F. 1997. Utilização de Ácidos orgânicos na redução da carga microbiana de carcaças de frango. Trabajo de investigación del Programa de Máster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, Brasil.

SPAD (Système Portable pour l'Analyse des Données, Centre International de Statistiques et d'Informatique Appliquées (C.I.S.I.A.), Saint Mandé, France).

Spricigo D.A., Matsumoto S.R., Espindola M.L., Ferraz S.M. 2008. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiça frescal suína. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 28(4):779-785.

Steven A.C., Heymann J.B., Cheng N., Trus B.L., Conway J.F. 2005. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(2):227-236.

Su L.H., Chiu C.H. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, 30:210-219.

149

Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris Jr. J.G. 2001. Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3):649-659.

Sulakvelidze A., Barrow P. 2005. Phage therapy in animals and agribusiness, pp. 335-380. *In*: Kutter E., Sulakvelidze A. (editores). *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press, Florida, EE.UU.

Sulakvelidze A., Pasternack G.R. 2010. Industrial and regulatory issues in bacteriophages applications in food production and processing, pp. 297-326. *In*: Sabour P.M., Griffiths M.W. (editores). *Bacteriophages in the control of food- and waterborne pathogens*. ASM Press, Washington, DC.

Summers W.C. 2005. History of phage research and phage therapy, pp. 3-17. *In*: Waldor M.K., Friedman D.I., Adhya S.L. *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. ASM Press, Washington.

- Swanenburg M., van der Wolf P.J., Urlings H.A.P., Snijders J.M.A., van Knapen F. 2001. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *International Journal of Food Microbiology*, 70:231-242.
- Tauxe R., Kruse H., Hedberg C., Potter M., Madden J., Wachsmuth K. 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *Journal of Food Protection*, 60:1400-1408.
- Teuber M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4:493-499.
- Toro H., Price S.B., McKee A.S., Hoerr F.J., Krehling J., Perdue M., Bauermeister L. 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Diseases*, 49:118-24.
- Twort F.W. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186(4814):1241-1243.
- Udayamputhoor R.S., Hariharan H., Van Lunen T.A., Lewis P.J., Heaney S., Price L., Woodward D. 2003. Effects of diet formulations containing proteins from different sources on intestinal colonization by *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 67(3):204-212.
- Van Immerseel F., Russell J.B., Flythe M.D., Gantois I., Timbermont L., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R. 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, 35(3):182-188.
- Viazis S., Akhtar M., Feirtag J., Diez-Gonzalez F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and trans-cinnamaldehyde. *Food Microbiology*, 28:149-157.

- Von Jagow C., Teufer T. 2007. Which path to go? European Food and Feed Law 3: 136-145. http://www.ebifoodsafety.com/331/images/EFFL3_2007.pdf.
- Wagenaar J.A., Van Bergen M.A.P., Mueller M.A., Wassenaar T.M., Carlton R.M. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary Microbiology*, 109:275-283.
- Wang I., Smith D.L., Young R. 2000. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Review of Microbiology*, 54:799-825.
- Wang S., Zhao W., Raza A., Friendship R., Johnson R., Kostrzynska M., Warriner K. 2010. Prevalence of *Salmonella* infecting bacteriophages associated with Ontario pig farms and the holding area of a high capacity pork processing facility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90:2318-2325.
- Warris P.D., Brown S.N., Edwards J.E., Knowles T.G. 1998. Effect of lairage time on levels of stress and meat quality in pigs. *Animal Science*, 66:255-261.
- Weissinger W.R., Chantarapanont W., Beuchat L.R. 2000 Survival and growth of *Salmonella bairdson* in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2):123-131.
- Wells J.M., Butterfield J.E. 1997. *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Diseases*, 81(8):867-872.
- White P.L., Baker A.R., James W.O. 1997. Strategies to control *Salmonella* and *Campylobacter* in raw poultry products. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 16(2):525-541.
- Wilcock B.P., Schwartz K.J. 1993. Salmonellosis, pp. 570-583. *In*: LEMAN A.D. Diseases of swine. 7th ed. Wolfe, Lodon.

- Ye J., Kostrzynska M., Dunfield K., Warriner K. 2010. Control of *Salmonella* on sprouting mung bean and alfalfa seeds by using a biocontrol preparation based on antagonistic bacteria and lytic bacteriophages. *Journal of Food Protection*, 73(1):9-17.
- Young R. 2005. Phage lysis, pp. 92-127. *In*: Waldor M.K., Friedman D.I., Adhya S.L. *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. ASM Press, Washington.
- Zhang-Barbera L., Turnerb A.K., Barrow P.A. 1999. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine*, 17:2538-2545.

Agradecimientos

En la realización de este trabajo han participado, de una manera u otra, muchas personas a las que, a pesar de mis breves palabras, les estoy profundamente agradecido (espero no haber olvidado a nadie).

Para comenzar, dar gracias a todos los integrantes del *Departament de Genètica i de Microbiologia* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, especialmente a los profesores Jordi Barbé y Montserrat Llagostera por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y realizar mi trabajo de tesis.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo y la paciencia de la Dra. Monserrat Llagostera, a quien tengo que agradecer el haber confiado en un veterinario brasileño para trabajar en un mundo de biólogos y biotecnólogos, por su dedicación a mi trabajo, por aportar puntos de vista diferentes y por todas las explicaciones, correcciones y críticas constructivas hechas a este trabajo.

También me gustaría agradecer a la Dra. M. Pilar Cortés, mi codirectora de tesis, por la defensa constante y férrea de lo que es correcto, su preocupación por que estuviera bien aquí y, como no podría ser diferente, a las correcciones de mi *portañol*.

153

Igualmente agradezco a: Dra. Esther Julián por haber permitido hacer parte de los experimentos en su laboratorio; Dra. Núria Gaju por el préstamo de aparatos; *Servei de Microscopia* de la UAB y *Servei de Estadística* por los análisis realizados; *Laboratori de Sanitat Animal* del DARP; *Serveis de Microbiologia* del Hospital Vall d'Hebrón y del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau por facilitar las cepas de *Salmonella* utilizadas en este trabajo y al Laboratorio de Diagnóstico General por facilitar las muestras para el aislamiento de los fagos.

Sin duda, lo mejor de estos años han sido todas las personas con quienes he convivido. Al principio, existía un cierto prejuicio mutuo que, con el paso del tiempo y un poco de paciencia con el idioma y las diferencias culturales, mis compañeros se revelaron como personas con una gran carga humanitaria y brillantez, de las que he aprendido mucho y a las que nunca olvidaré. Así pues, quiero dar las gracias a: S. Campoy por estar

siempre a disposición, explicando todo siempre de una manera muy didáctica y sencilla; Joan, por sus chistes (no siempre comprensibles), por las *converses* en el desayuno (“*Barça, Barça, Barça, Barça, Barça, Barça, Barça, Barça, Barça, independència...*”) y por su gran trabajo en el lab, sin él esto no andaría (comprobadísimo en vacaciones); Escribano, por estar siempre tan serena y a disposición cuando es necesario, por los guaranás, por bajar la temperatura del aire a hurtadillas y haberme presentado sus bichitos: Pug, Lila y *Miniyo*; Carlota (mi primera “jefa”) por todo lo que me ha enseñado, su paciencia, sentido de humor, persistencia (nunca me olvidaré de los largos días con los ratones y con los pollos) y por demostrarme que esquiar no es lo mío; Vanessa, por su amistad, por la sonrisa y por los consejos (¿Quién más invitaría una persona que acaba de conocer a pasar las Navidades con su familia?); el hipocondriaco Gerard, por su compañerismo, por enseñarme un *català correcte* y por aceptar siempre con buen humor mis “chinchadas” (quien diría que el concepto inicial de posible psicópata pasara a ser un gran compañero de viaje); Jesús, por ese humor ácido, seco, sarcástico... por enseñarme como pronunciar la “c” (“¿Qué *haCCces?*”) y como limpiar el laboratorio (no limpiándolo); Teixi, por ser mi salvadora en los momentos de “desespero”, estando siempre dispuesta a ayudar; *A la elchina* Medina, por cada vez que no me ha pegado por decir que era tan extranjera como yo, por su preocupación constante con el bienestar de todas las personas, por enseñarnos a diseccionar un pollo concienzudamente (antes de comerlo); Lissidí, por ser tan “indignada”, por estar siempre ahí cuando he necesitado resolver dudas “biotecnológicas” o, simplemente, quejarme; Mayola y Fede, por las *converses* durante la comida, que de tan insólitas sonaban a chiste; Meri, por intentar hacer creer que no pensaba como estos dos, lo que hacía todo más gracioso; Anna, Neus, Estela y Paula que a pesar del poco tiempo de convivencia demostraron ser personas muy valerosas; “El Verd” Serra, por ser tan buena persona y por su contribución en el trabajo (¿Cuántos miles de test de la gota y centenares de extracciones de DNA hiciste?); mis compañeras *sudakas* Natàlia (sí, *amb accent obert*), Gloria, Luisa y Yuly Po que permitieron sentirme un poco más próximo de mi tierra (A ver si nos vemos por allá!); los niños de los fagos, Carla y Colom, por ese afán de aprender, haciendo también que yo me esforzara más; *Cookie*, por traer

siempre esa alegría al lab y por inspirarnos con este deseo de crecer como persona (Al final, tuve que hacer un “Feibu”); “los Otros” (Mallorquí, Naroa, Agnès, Garrido, Bigués y Tomás) por la compañía y *converses* en los desayunos; mis amigos mexicanos, en especial Rosa, por los viajes, por permitir que conociera y respetara un poco más su cultura y, principalmente, por hacer más fácil estos años en el Viejo Mundo.

Por último, aunque no por ello menos importante, *agradecer todo o apoio recebido de meus amigos desde o Brasil e, acima de tudo, de toda minha família, que sempre acreditou que era capaz de ir mais longe e sempre me transmitiu os valores necessários para conseguí-lo.*

A los de aquí, espero veros otra vez... con preferencia al otro lado del charco.

A todos, Muchas Gracias/*Moltes Gràcies/Muito Obrigado.*

Anexo: Medios y Soluciones

1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo y algunas de las soluciones empleadas fueron esterilizados mediante calor húmedo en un autoclave durante 15 min a 121°C. El agua utilizada en todos los medios de cultivos fue agua ultrapura de grado Mili-Q (MQ). Los medios sólidos, tras su esterilización, se dejaron enfriar hasta una temperatura de 50°C, momento en el que se añadieron los suplementos adecuados, en caso de ser necesario y se dispensaron en placas de Petri (Sterilin) en condiciones de esterilidad.

1.1. Medio LB

Medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento de *Salmonella*.

LB	
Triptona (Pronadisa)	10 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	5 g
NaCl (Panreac)	10 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

Para la obtención de LB sólido y LB blando se añaden 17 g y 7 g de agar-agar (Difco), respectivamente.

157

1.2. Agua peptonada

Medio de cultivo líquido utilizado para el enriquecimiento bacteriano.

Agua peptonada	
Agua peptonada (Merck)	25,5 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

1.3. Medio Müller –Kauffman

Medio de cultivo líquido con tetrionato utilizado para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*.

Müller - Kauffman	
Medio Müller –Kauffman (MKTTn)(Merck)	89,5 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

Solución de yodo – yoduro de potasio	
Yodo (Merck)	4 g
KI (Merck)	5 g
Agua grado MQ	Hasta 20 ml

Este medio no debe autoclavarse. La mezcla se hierve durante 5 min, se enfría rápidamente en hielo y se almacena a 4°C hasta un máximo de 10 días. Antes de su utilización se añaden 20 ml de la solución de yodo-yoduro de potasio por litro de medio Müller-Kauffman.

1.4. Medio XLD

Medio de cultivo sólido para la selección y detección de *Salmonella*.

XLD	
Medio XLD (Pronadisa)	55,2 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

Este medio no debe ser esterilizado en autoclave. Se calienta sin hervir hasta que esté totalmente disuelta.

2. Tampones y soluciones

2.1. Solución de sulfato de magnesio (MgSO₄) 10 mM

MgSO ₄ 10 mM	
MgSO ₄ (Panreac)	1,56 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

Es necesario agitar bien la solución hasta la disolución total de las sales. Se esteriliza en autoclave.

2.2. Tampón SM

SM	
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	50 mL
NaCl (Panreac)	5,84 g
MgSO ₄ (Panreac)	1,56 g
Gelatina (Oxoid)	0,1 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

2.3. Solución de cloruro de sodio (NaCl) 0,9%

NaCl 0,9%	
NaCl (Panreac)	9 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

2.4. EDTA 0,5 M pH 8,0

EDTA 0,5 M pH 8	
EDTA 0,5 M (Sigma)	186,12 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

Ajustar el pH con NaOH 1N.

2.5. Tampón TE pH 7,5

TE	
EDTA 0,5M pH 8	2 ml
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	1 ml
Agua grado MQ	Hasta 100 ml

2.6. Tampón TAE 50X

TAE 50X	
Trizma Base (Sigma)	242 g
EDTA 0,5M pH 8 (Sigma)	100 ml
Ácido acético glacial (Panreac)	57 ml
Agua grado MQ	Hasta 1 l

2.7. Tampón de carga

159

Solución transportadora 6X	
Glicerol (Panreac)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0,25 g
Azul de bromofenol (Panreac)	0,25 g
EDTA 0,5M pH 8 (Sigma)	2 ml
Agua grado MQ	Hasta 100 ml

2.8. Tampón TE (PFGE)

TE	
EDTA 0,5M pH 8	200 µl
Tris-HCl 1M pH 7,4 (AppliChem)	1 ml
Agua grado MQ	Hasta 100 ml

2.9. Tampón de lisis (PFGE)

Tampón de lisis (base)	
EDTA (Sigma)	9,3 g
Trizma Base (Sigma)	0,3 g
Agua grado MQ	Hasta 237,5 ml
N-lauroil sarcosina 20%	12,5 ml

N-lauroil sarcosina 20%	
N-lauroil sarcosina (Sigma)	20 g
Agua grado MQ	Hasta 100 ml

Ajustar el pH a 9-9,5 con NaOH 10N.

2.10. Tampón TBE 10X (PFGE)

TBE 50X	
Trizma Base (Sigma)	121,1 g
Ácido bórico (Sigma)	61,8 g
EDTA (Sigma)	0,745 g
Agua grado MQ	Hasta 1 l

ERRATA

La desinfección basada en bacteriófagos como herramienta de biocontrol de *Salmonella* en alimentos

Denis A. Spricigo

Cerdanyola del Vallès, 18 de noviembre de 2011.

Página	Línea	Dice	Debe decir
123	25	10^{10} cfu/ml	10^{10} pfu/ml
123	30	10^9 cfu/ml	10^9 pfu/ml
124	5	10^{10} cfu/ml	10^{10} pfu/ml
124	9	10^9 cfu/ml	10^9 pfu/ml