



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



**“MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS PRESENTES EN
MYTILUS CHILENSIS VIVOS Y COCIDOS CONGELADOS PRODUCIDOS
EN UNA PLANTA DE EXPORTACIÓN DE CHILOÉ”**

Viviana Alejandra Arroyo Jousse

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

PROFESORA GUÍA: DRA. ANITA SOTO CORTÉS

SANTIAGO-CHILE
2011



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



“MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS PRESENTES EN
MYTILUS CHILENSIS VIVOS Y COCIDOS CONGELADOS PRODUCIDOS EN
UNA PLANTA DE EXPORTACIÓN DE CHILOÉ”

VIVIANA ARROYO JOUSSE

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: ANITA SOTO CORTÉS
PROFESORA CONSEJERO: PILAR OVIEDO HANNIG
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO SMITH SCHUSTER

SANTIAGO, CHILE

2011

Esta memoria forma parte del proyecto "Evaluación y Optimización de los factores que influyen en la Inocuidad de Alimentos en base a recursos marinos y desarrollo de los Alimentos Funcionales, componentes o subproductos de éstos"

Financiado por Programa Domeyko Alimentos
Universidad de Chile

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora guía, Dra. Anita Soto, gracias por haberme dado la oportunidad de hacer esta Memoria de Título, por la confianza entregada y por haberme dado la posibilidad de entrenarme y aprender acerca de la metodología práctica de la Microbiología de Alimentos. Muchas gracias por sus consejos, críticas y sugerencias.

A mis profesores consejeros, Dra. Pilar Oviedo y Dr. Pedro Smith, por sus comentarios y correcciones a esta Memoria, la cual no habría resultado de la misma manera sin ellos.

A todos los funcionarios del Departamento de Medicina Preventiva Animal, muchas gracias por su ayuda, sin la cual no habría sido posible el desarrollo de este estudio.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres por haberme apoyado y por haberme dado la oportunidad de estudiar esta carrera y por motivarme siempre a superar cualquier dificultad que se me presente. Quiero agradecer también a mi pololo, por haberme acompañado durante esta etapa y por su apoyo incondicional. También quiero dar las gracias a mis amigos por haber estado a mi lado durante este periodo, por sus consejos y buenos deseos.

RESUMEN

Los choritos (*Mytilus chilensis*), son filtradores por lo que acumulan en su interior microorganismos presentes en el agua; por esta razón es importante estudiar la presencia de microorganismos indicadores y patógenos en este producto, ya que su cantidad depende principalmente de la calidad del agua de la que provenga además de su correcta manipulación y procesamiento.

Se realizaron 8 muestreos a una planta procesadora de choritos en Chiloé, cada uno constituido por 5 unidades de muestra de choritos vivos y 5 de choritos cocidos congelados. Se realizaron los siguientes análisis: Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), Número Más Probable (NMP), de coliformes y coliformes fecales, recuento de *S. aureus* coagulasa positiva y NMP *E. coli* β -glucuronidasa positiva y detección de *Salmonella*. Se estudió además si cumplían con lo estipulado por el Ministerio de Salud, el Servicio Nacional de Pesca y por la Unión Europea.

Luego de realizados los análisis se pudo determinar que para el RAM, todas las muestras analizadas resultaron aptas para su comercialización y los recuentos fueron siempre mayores en choritos vivos. Lo mismo ocurrió para los coliformes fecales, totales y *E. coli*, en donde su NMP fue menor en los choritos cocidos congelados y en todos los casos cumplieron con las exigencias sanitarias. En el caso de *S. aureus* también se encontraron valores de recuentos menores en los choritos cocidos congelados, pero una de las 4 partidas analizadas no cumple con lo necesario para ser exportada ni para ser comercializada en Chile puesto que tiene cargas microbianas mayores a las permitidas. *Salmonella* no se encontró en ninguna de las 80 unidades de muestra estudiadas. Se puede concluir que los *Mytilus chilensis* extraídos de una zona tipo B son de excelente calidad sanitaria, sin embargo, se debe tener un mayor cuidado con la manipulación del producto luego de su cocción, y con su almacenamiento posterior.

ABSTRACT

Mytilus chilensis are filtering animals which lead to the accumulation of microorganisms, within their body, from the water where they grow. For this reason is important to study the presence and quantity of pathogens and indicator microorganisms in this product, because the amount of these elements and the quality of this product depends on the characteristics of the water and the appropriated processing and manipulation of them.

8 sampling were done in a processing plant in Chiloé, each of them constituted with 5 samples units of crude *Mytilus* and 5 of boiled and frozen *Mytilus*. The following analysis were done: Count of Aerobic Microorganisms (CAM), Most Probably Number (MPN) of Coliforms and Fecal Coliforms and MPN of β -glucuronidase-positive-*E. coli* and the detection of *Salmonella*. Besides, it was studied if they fulfill the Health Department, the National Department of Fish and the European Union's sanitary requirements.

After finishing the analysis it was establish for the CAM that all the samples were suitable for its commercialization and the counts were always bigger in boiled and frozen mussels. The same happened with the coliforms, fecal coliforms and *E. coli*'s Most Probably Number, which were fewer in boiled and frozen products than fresh products. A similar case occurred regarding the count of *S. aureus*, but 1 of the 4 samplings didn't fulfill the sanitary requisites to be commercialize either in Chile or abroad since it contained higher counts of microorganisms than permitted by law. *Salmonella* wasn't detected in any of the 80 studied samples.

It can be concluded that *Mytilus chilensis* extracted in Type B zones have a good sanitary quality; however, they have to be manipulated more carefully after its boiling process and their further storage.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	pág. 1
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	pág. 2
3.- OBJETIVOS.....	pág. 18
3.1.- Objetivo General	
3.2.- Objetivos Específicos	
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	pág. 19
4.1.- Obtención de Muestras	
4.2.- Análisis Microbiológicos	
4.2.1.- Microorganismos Indicadores.....	pág. 20
4.2.1.1.- Aerobios Mesófilos	
4.2.1.2.- Coliformes totales y Fecales	
4.2.1.3.- <i>S. aureus</i> coagulasa positiva	
4.2.2.- Microorganismos Patógenos.....	pág. 21
4.2.2.1.- <i>E. coli</i> glucuronidasa positiva	
4.2.2.2.- <i>Salmonella</i>	
4.3.- Planes de Muestreo y Criterios Microbiológicos.....	pág. 21
4.4.- Análisis Estadístico.....	pág. 25
4.4.1.- Datos Cualitativos	
4.4.2.- Datos Cuantitativos	
5.- RESULTADOS.....	pág. 26
6.- DISCUSIÓN.....	pág. 39
7.- CONCLUSIONES.....	pág. 47
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	pág. 49
9.- ANEXOS.....	pág. 56

ÍNDICE DE CUADROS

- 1.- Cuadro N° 1: Clasificación en Categorías según.....pág. 8
cantidad y tipo de Deficiencias
- 2.- Cuadro N° 2: Especificaciones microbiológicas para..... pág. 22
Pescados y productos de la pesca
(incluyendo crustáceos, moluscos y cefalópodos). Chile.
- 3.- Cuadro N° 3: Criterios Microbiológicos para los..... pág. 23
Productos de la Pesca. Unión Europea.
- 4.- Cuadro N° 4: Planes de muestreo y determinaciones.....pág. 24
microbiológicas para moluscos bivalvos. Chile
- 5.- Cuadro N° 5: Resultados Análisis Microbiológicos 13 Abril.....pág. 27
- 6.- Cuadro N° 6: Resultados Análisis Microbiológicos 21 Abril.....pág. 28
- 7.- Cuadro N° 7: Resultados Análisis Microbiológicos 06 Mayo..... pág. 29
- 8.- Cuadro N° 8: Resultados Análisis Microbiológicos 19 Mayo..... pág. 30
- 9.- Cuadro N° 9: Resultados Análisis Microbiológicos 02 Junio.....pág. 31
- 10.- Cuadro N° 10: Resultados Análisis Microbiológicos 16 Junio.....pág. 32
- 11.- Cuadro N° 11: Resultados Análisis Microbiológicos 30 Junio.....pág. 33
- 12.- Cuadro N° 12: Resultados Análisis Microbiológicos 08 Julio..... pág. 34
- 13.- Cuadro N° 13: t de Student para RAM..... pág. 36
- 14.- Cuadro N° 14: t de Student para *E. coli*..... pág. 37
- 15.- Cuadro N° 15: t de Student para *S. aureus*..... pág. 38

1.- INTRODUCCIÓN

La superficie marítima de Chile corresponde a 5.205.999 km² de los cuales 1.934.433 km² son parte del territorio marítimo oceánico y 120.827 km² corresponden al mar territorial del país, mientras que 3.150.739 km² corresponden a la zona económica exclusiva de Chile. Frente a esta gran superficie marítima, una de las actividades económicas más importantes a nivel nacional la conforma la pesca y la acuicultura.

Si bien, dentro de la acuicultura, la producción de salmones es el rubro más relevante, actualmente la producción de moluscos bivalvos, en especial de mitílidos, es un área con un gran potencial de desarrollo y crecimiento, en especial si Chile logra entrar a nichos de mercado de mayor precio como la Unión Europea. Para esto se debe asegurar la entrega de un producto de calidad, tanto sanitaria como organoléptica.

Los moluscos bivalvos en general, y los choritos en particular, son organismos filtradores. Este mecanismo de alimentación favorece la contaminación de los mismos, puesto que bioconcentran las sustancias (minerales y metales, así como también microorganismos), presentes en el ambiente marino en el que viven. Dependiendo de la calidad del agua en donde se encuentren es su susceptibilidad a una mayor o menor contaminación.

Es por esta razón que es importante analizar los peligros microbiológicos presentes en los choritos vivos así como en el producto final (choritos cocidos congelados, por ejemplo), para determinar si son productos inocuos para el consumidor.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Actualmente existe en el mundo alrededor de 6.100 millones de habitantes, cifra que, según las proyecciones realizadas por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), aumentará a los 7.200 millones el 2015 y a 8.300 millones el 2030 (FAO, 2002), por lo que surge la necesidad de producir mayores cantidades de alimentos para la población, perfilándose la agricultura y la acuicultura como alternativas para esto (FAO, 2000).

A nivel mundial la acuicultura ha aumentado su importancia con respecto a la pesca. El año 1970 su contribución al suministro de pescado, crustáceos y moluscos correspondió a un 3,9% mientras que en el año 2006 subió a un 36%. La acuicultura ha presentado un crecimiento promedio anual de un 7% en los últimos años. Sin embargo este crecimiento no ha sido uniforme; lideran la lista las regiones de América Latina y el Caribe con un crecimiento promedio anual de un 22%. En cuanto a la producción según tipo de especie, la acuicultura aporta actualmente un 76% de la producción mundial de peces de agua dulce y un 65 % de la producción de moluscos (FAO, 2009).

La acuicultura en Chile se desarrolla entre los años 1921 y 1973 sobre la base de cultivos extensivos y semi-intensivos. Sin embargo, en la década del 80 se inició la acuicultura comercial y la apertura de la misma al comercio internacional gracias al despegue de la industria salmonera (Norambuena, 2005). La acuicultura cada vez es de mayor importancia económica a nivel nacional, ya que desde el año 1990 ha presentado una tasa de incremento promedio anual de un 18,4% (Uriarte, 2008).

La salmonicultura es el sector de mayor relevancia económica dentro de la acuicultura, ubicando a Chile como el segundo productor mundial de salmónidos (31% de la producción total). El año 2006 se produjeron aproximadamente 800.000 toneladas de salmón en Chile, con un crecimiento de un 10% con respecto al año 2004 (FAO, 2009). En segundo lugar de importancia, se encuentra la producción de

moluscos correspondiendo, en el año 2006, a un 13,5% de la producción total (Uriarte, 2008).

El cultivo de moluscos bivalvos en Chile se inicia el año 1960, debido al agotamiento de los bancos naturales lo que motivó al Estado a iniciar un programa de investigación para el desarrollo de los mismos. Para lograr esto se establecieron centros de cultivo estatales los cuales se ubicaban principalmente en la localidad de Calbuco y la Isla de Chiloé (Plaza *et al.*, 2005).

Posteriormente, se inicia la mitilicultura el año 1961, a cargo de la Universidad Austral de Chile y del Instituto de Fomento Pesquero, con la producción y cultivo de especies como: chorito (*Mytilus chilensis*), cholga (*Aulacomya ater*), y choro zapato (*Choromytilus chorus*), (Uriarte, 2008). En 1970 se inicia el cultivo de choritos a gran escala, creándose para ello dos centros: uno en Chiloé y otro en Aysén. Con la producción de ambos se abastecieron, en 1972, dos industrias conserveras que produjeron un total de 360.000 latas de 220 g cada una (González *et al.*, 1978).

En 1982 ya se habían establecido en el país cerca de 21 centros de cultivo, desde los que se cosecharon 1.389 toneladas de chorito y 240 toneladas de choro zapato. A principios de los '90 el cultivo de *Mytilus chilensis* comenzó a aumentar su importancia relativa y en 1995 los choritos cultivados ya representaban el 52% del desembarque total de la especie. A partir de 1996 la industria experimentó un crecimiento importante y se proyectó como una de las actividades más promisorias de la acuicultura chilena (Plaza *et al.*, 2005).

Actualmente, esta actividad se desarrolla mediante la captura de semillas desde bancos naturales, los cuales se concentran principalmente en la X región, específicamente en Chiloé y Calbuco, debido a la calidad de sus aguas y a las condiciones climáticas favorables para su crecimiento. Estas características determinan a la región como la más importante en cuanto a la producción de este recurso, concentrando Chiloé un 70% de la misma equivalentes a 50 mil toneladas y

Calbuco produce 20 mil toneladas de materia prima destinada a proceso (Plaza *et al.*, 2005).

El cultivo de mitílicos se divide en etapas; la primera de ellas corresponde a la captación de semillas o larvas utilizando colectores de polietileno suspendidos en lugares cercanos a poblaciones adultas naturales (González *et al.*, 1978). Éstas corresponden a las Zonas de Producción o Extracción que se clasifican de acuerdo a su condición sanitaria, la que determinará el uso tecnológico que podrá atribuírsele al producto extraído (Chile SERNAPESCA, 2011a).

El Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), clasifica las zonas de extracción en tres categorías (Chile SERNAPESCA, 2011a):

- La primera corresponde al tipo A, que son aquellas áreas de producción cuyos recursos pueden ser destinados a consumo humano directo y ser exportados en vivo, frescos refrigerados o procesados. Los moluscos bivalvos provenientes de estos sectores, en cuanto a su calidad microbiológica, deben presentar menos de 230 *E. coli* por cada 100 gramos de carne y líquido intervalvar determinado por la técnica del Número Más Probable (NMP), utilizando 5 tubos y 3 diluciones, y no deben presentar *Salmonella* en una muestra de 25 gramos.

- La segunda categoría corresponde al tipo B para depuración, reinstalación o aplicación de tratamientos térmicos aprobados. Los moluscos obtenidos de dicha zona no deberán presentar más de 4.600 *E. coli* por cada 100 gramos de carne con la técnica del NMP, en el 90 % de los resultados y el 10 % restante no podrá ser superior a 46.000 *E. coli* en 100 gramos de carne. Estos moluscos, previo a su consumo podrán ser sometidos a depuración (centros habilitados con estanques con agua de mar limpia¹, en los que son mantenidos vivos durante el tiempo necesario para reducir su contaminación), o reinstalación (traslado de mariscos a zonas autorizadas con el propósito de disminuir las sustancias contaminantes que presenten para hacerlos aptos para consumo humano); luego de terminar el proceso elegido debe cumplir con lo estipulado para las zonas tipo A. Además podrán someterse, previo a su consumo a alguno de los procesos térmicos establecidos en la norma técnica CTT/NT1 (Chile SERNAPESCA, 2011c):
 - Tratamiento térmico de esterilización.
 - Inmersión en agua hirviendo hasta alcanzar una temperatura interna mínima de 90°C en el punto más frío del recurso, manteniéndola por un tiempo igual o superior a 90 segundos.
 - Cocción de 3 a 5 minutos en un recipiente cerrado a una temperatura entre 120° a 160°C y una presión entre 2 y 5 kg/cm² y su posterior desconchado y congelación a -20°C.
 - Cocción por vapor bajo presión en un recipiente cerrado donde se respete lo estipulado en el punto anterior y esté garantizada la homogeneidad de la distribución de calor en el mismo.

¹ **Agua de mar limpia:** agua de mar natural, artificial o purificada o el agua salobre que no contenga microorganismos, sustancias nocivas o plancton marino tóxico en cantidades que puedan afectar directa o indirectamente a la calidad sanitaria de los productos alimenticios (Chile SERNAPESCA, 2011a)

- Por último, las zonas pueden clasificarse como tipo C de reinstalación por periodos largos de tiempo o aplicación de tratamientos térmicos adecuados. Los moluscos procedentes de estas zonas, no deben presentar un NMP superior a 46.000 *E. coli* por 100 gramos de carne y líquido intervalvar, en una prueba NMP en la que se utilicen 5 tubos y 3 diluciones y sólo podrán destinarse a consumo humano luego de someterse a un tratamiento en un centro de depuración, zona de reinstalación durante un periodo no inferior a dos meses o a algún tratamiento térmico establecidos en la norma CTT/NT1.

Luego de la extracción, se inicia la etapa de crecimiento o engorda para la cual existen dos técnicas de cultivo en suspensión, que permiten elevar la tasa de crecimiento y el rendimiento en carne de esta especie. El sistema denominado “longline” usada preferentemente en ríos angostos y profundos consiste en una línea madre hecha de un cabo de aproximadamente 2,5 cm que va de un extremo al otro del río, apoyada por boyas metálicas o plásticas; desde ella se cuelgan las cuerdas de cultivo. La otra técnica es la llamada en balsa la cual consiste en un marco (metálico o de madera), de una superficie aproximada de 16 m² que descansa sobre 4 flotadores. De esta estructura pueden colgarse entre 600 a 1000 cuerdas. En Chile se utilizan cuerdas de 7 a 8 metros de largo atravesada cada 25 a 30 cm por palillos plásticos que evitan el desprendimiento de las semillas (González *et al.*, 1978).

La siguiente etapa corresponde al procesamiento de la materia prima. En Chile, existen aproximadamente 454 plantas de procesamiento, de éstas 259 plantas autorizadas se encuentran ubicadas en la región de los Lagos (Vera, 2006). En general el procesamiento del *Mytilus chilensis* considera las siguientes etapas:

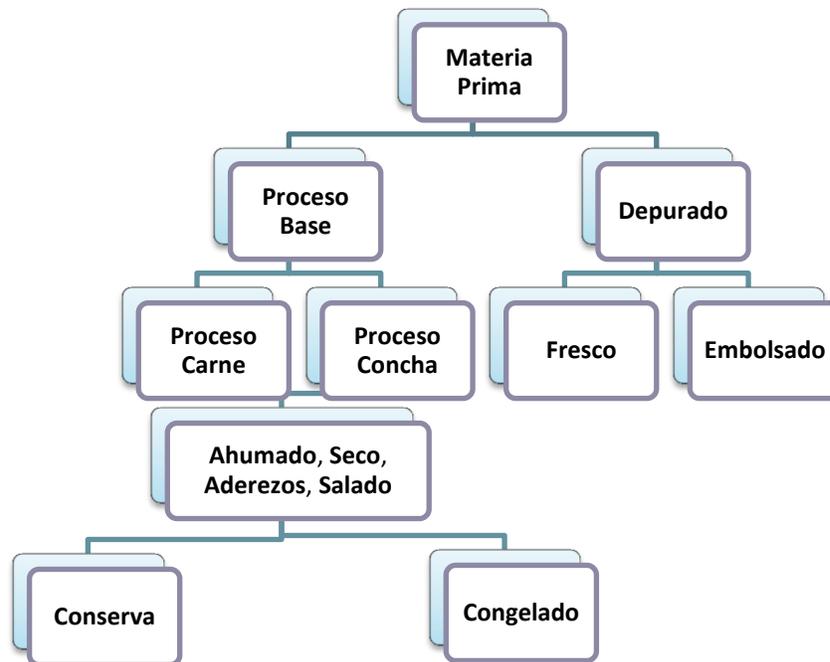


Ilustración N° 1. Esquema del Procesamiento del *Mytilus chilensis*

* Fuente: VERA, 2006. Identificación y Estudio de Cluster Exportadores Regionales. Región de los Lagos. pp: 27 – 74.

En su mayoría, las plantas de procesamiento de choritos presentan equipos específicos para este recurso, por lo que no procesan otras especies de bivalvos. Una planta procesadora contiene una línea de proceso básico primario y varias alternativas de término, dependiendo del destino final del producto (Vera, 2006).

Al igual que las zonas de extracción, las plantas pesqueras en donde se procesa este recurso son clasificadas en distintas categorías de acuerdo a su calidad. Esta categorización es realizada por el Servicio Nacional de Pesca (Chile SERNAPESCA, 2011b), mediante la Pauta de inspección de infraestructura y

manejo sanitario para plantas de exportación de productos pesqueros dedicados al consumo humano.

Las plantas pesqueras de exportación se clasifican en relación al grado y tipo de deficiencias que presenten (Ver Cuadro 1):

Cuadro N° 1. Clasificación Plantas Pesqueras en Categorías según cantidad y tipo de Deficiencias.

CATEGORÍA	Deficiencia			
	MENOR	MAYOR	SERIA	CRÍTICA
A	0 - 6	0 – 5	0	0
B	≥ 7	6 – 10	1	0
C		≥ 11	2 – 4	0
D			5 – 7	0
No Certificable			≥ 8	≥ 1

* Fuente: Chile. SERNAPESCA. Servicio Nacional de Pesca. 2011. Habilitación de Plantas Pesqueras y Buques Factoría **In**: Programa de Habilitación de Plantas Pesqueras, Buques Factoría y Embarcaciones. Manual de Procedimientos. Sección 1. HPB/MP1. 30p.

El Servicio Nacional de Pesca (Chile SERNAPESCA, 2011b) clasifica estas deficiencias según su gravedad:

- **Deficiencia Crítica (CR):** es aquella que no cumple con los requisitos de infraestructura del establecimiento, manejo sanitario del proceso y/o inocuidad del producto, obteniendo un alimento que representa una amenaza para la salud pública.
- **Deficiencia Seria (S):** aquella en la que no existe una adecuada infraestructura del establecimiento, ni un correcto manejo sanitario del proceso y/o inocuidad del producto, lo cual puede generar un alimento alterado.

- Deficiencia Mayor (MY): corresponde a aquella que no cumple con los requisitos de infraestructura y manejo sanitario y/o inocuidad del proceso lo que podría deteriorar la calidad del producto sin llegar a ser crítica.
- Deficiencia Menor (MN): aquella que no está en concordancia con los requisitos de infraestructura y manejo sanitario y/o inocuidad cuyo impacto sobre el alimento afecta levemente la higiene general del mismo.

Las plantas procesadoras destinadas exclusivamente para procesar el chorito, en la Región de Los Lagos serían 27, de las cuales, habría sólo una clasificada como A, 24 como B y 2 como C (Vera, 2006).

Para exportar a la Unión Europea la planta pesquera debe solicitar su habilitación en la Dirección Regional de SERNAPESCA, siempre y cuando se trate de una planta pesquera categoría A o B y su Programa de Aseguramiento de Calidad (PAC), haya sido aprobado. Para mantenerse dentro del listado de plantas autorizadas para la exportación a la Unión Europea se realiza una inspección anual en profundidad y una visita mensual para la verificación de las condiciones de habilitación y el adecuado funcionamiento del PAC. Los establecimientos categorizados como B deberán presentar un cronograma de trabajo tendiente a solucionar todas las deficiencias detectadas en la inspección. Finalmente, aquellos establecimientos que elaboran productos destinados a la comunidad Europea, sólo podrán recibir materias primas procesadas de plantas autorizadas para exportar a dicho mercado (Chile SERNAPESCA, 2011b).

La industria mitilicultora en Chile ha crecido exponencialmente. En la última década ha aumentado en más de 20 veces sus producciones lo que la convierte en la con mayor potencial de crecimiento luego de la salmonicultura (Plaza *et al.*, 2005).

El chorito, se sitúa geográficamente en ambos hemisferios, tanto en aguas tropicales como templadas. En Chile se encuentran desde Iquique hasta el Estrecho de Magallanes, concentrándose principalmente en zonas de baja salinidad, en sectores estuarinos-salobres (mezcla de agua dulce con agua de mar). Los choritos viven agrupados en bancos en áreas protegidas o expuestas, principalmente en rocas adheridos al sustrato por un biso o también en el fondo a profundidades no superiores a 10 metros (Plaza *et al.*, 2005).

El chorito pertenece a la clase Bivalvia y a la familia *Mytilidae*, posee una concha alargada de dos valvas, de tamaño mediano y provista de estrías concéntricas de crecimiento. El biso corresponde a un conjunto de filamentos a través de los cuales logra mantenerse fijo al sustrato sobre el que se encuentra, teniendo la capacidad de regenerar el biso por lo que si se suelta de un sustrato puede adherirse a otro. Entre ambas valvas se ubica el cuerpo, que corresponde al tejido blando y que se encuentra cubierto por una estructura llamada manto que recubre todos los órganos internos (Plaza *et al.*, 2005).

Los mitílidos maduran sexualmente durante el primer año de vida, siempre y cuando exista la cantidad de alimento y las condiciones ambientales adecuadas que permitan la formación de gametos. Éstos (óvulos y espermios), son liberados al agua donde se produce la fertilización y la generación de un nuevo individuo, el cual atraviesa por distintos estados larvarios hasta alcanzar la etapa de post-larva, caracterizada por ser de un tamaño menor a 1 mm, poseer un pie móvil con el que se desplaza para ubicar alguna superficie donde fijarse. Luego de adherirse a un sustrato sufre una metamorfosis adquiriendo la apariencia de un adulto y recibe el nombre de pre semilla; a partir de esta etapa sólo aumenta su tamaño hasta alcanzar su talla comercial (Plaza *et al.*, 2005), sin embargo, esta especie presenta una amplia variabilidad en su crecimiento lo que implica que no todos alcanzan la talla comercial al mismo tiempo, lo que dificulta su producción (Toro *et al.*, 2008)

Los mitílidos son organismos filtradores, capturan el alimento a través de sus branquias; consumen microalgas y material particulado presente en el agua (Plaza *et al.*, 2005).

Las principales formas de comercialización de este recurso son congelado y en conserva, y en muy bajas cantidades cocido o fresco congelado, puesto que, en su mayoría, es exportado. Los principales países a los que Chile exporta son: España, Portugal, Italia, Argentina y Estados Unidos (Uriarte, 2008). Según la Asociación Gremial de Mitilicultores de Chile (AMICHILE, 2010), se exportaron 38.571 t netas, de las cuales 35.716 t corresponden al producto congelado y 2.854 t al producto en conserva.

Todo alimento que se comercializa a nivel nacional debe cumplir con las exigencias sanitarias detalladas en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (Chile MINSAL, 2010). En cuanto a los productos que son exportados deben cumplir, además, con las exigencias sanitarias dictadas por el país comprador y por el Servicio Nacional de Pesca, el cual es el encargado de entregar tales certificados sanitarios. En el caso de exportar a la Unión Europea se debe cumplir, junto con lo dicho anteriormente, con el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (Chile SERNAPESCA, 2011a), y con lo especificado en los Programas de Certificación para productos pesqueros de exportación, sección 2 y sección 3 (Chile SERNAPESCA, 2011d y Chile SERNAPESCA, 2011e).

Para fijar la cantidad de microorganismos que se permiten dentro de un determinado alimento, se establecen Criterios Microbiológicos los cuales tienen por finalidad impedir o reducir la incidencia de enfermedades de origen alimentario. “Un Criterio Microbiológico determina la aceptabilidad de un producto o un lote de alimento basándose en la ausencia o presencia de un determinado microorganismo, parásito o una cantidad específica de toxinas o metabolitos por unidad de masa, volumen, área o lote”. Los criterios pueden ser más o menos exigentes dependiendo del tipo de alimento (si es más susceptible a contaminación o deterioro), al tipo de

consumidor al que está destinado (lactantes, ancianos, etc.), entre otros factores (James, 2005).

Dentro de estos criterios se establecen mínimos y máximos para los distintos microorganismos que podrían encontrarse en un alimento, los cuales se clasifican en indicadores o patógenos. Los microorganismos indicadores se utilizan para: determinar la calidad higiénica de un producto; predecir la posible presencia de un patógeno o sus toxinas; estimar la vida útil del alimento (James, 2005); siendo uno de sus principales objetivos revelar defectos de tratamiento que lleven a un alimento a convertirse en un peligro potencial para el consumidor (ICMSF, 2000).

Dentro de los microorganismos indicadores más frecuentemente utilizados, se puede nombrar:

- Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas:

Se utiliza para indicar la calidad sanitaria de los alimentos. Recuentos altos de estos microorganismos, en alimentos no perecibles, pueden significar materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario, mientras que en alimentos perecederos indican malas condiciones de almacenaje o de temperatura durante el mismo (ICMSF, 2000).

- Coliformes totales y fecales:

Se ha definido de forma práctica a los coliformes como aquellos microorganismos pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* y que se detectan por las pruebas para “coliformes”, como por ejemplo la técnica del Número Más Probable, y que comprende los géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* (ICMSF, 2000 y Chile. I.N.N., 2001). Los “Coliformes o coliformes totales”, fermentan la lactosa generando gas y

ácido dentro de un periodo de incubación de 24 a 48 horas a 35°C (Chile. I.N.N., 2001). Los “Coliformes fecales” corresponden a un grupo de microorganismos seleccionados por incubación de los inóculos procedentes de un caldo de enriquecimiento selectivo a temperaturas superiores a otros coliformes (44 - 45,5°C), (ICMSF, 2000) y que se encuentran presentes en el intestino del hombre y otros animales de sangre caliente (Chile. INN. 2001). Estos microorganismos son utilizados como indicadores de contaminación fecal y en alimentos que han recibido un tratamiento térmico la presencia de niveles altos de estas bacterias podría deberse a que el tratamiento fue inadecuado y/o existió contaminación después del mismo o multiplicación microbiana luego del procesamiento (ICMSF, 2000).

- *Staphylococcus aureus*:

Es una cocácea gram positiva que forma racimos (Murray *et al.*, 2007a); fermenta el manitol, produce la coagulación relativamente rápida del plasma de conejo (a diferencia de otras especies como *S. intermedius* que producen coagulación de forma retardada), es resistente a concentraciones de sal de entre 10 a 15% y es medianamente resistente a la desecación y al calor (Bhunja, 2008a). Su presencia en un alimento se interpreta como el resultado de la contaminación del mismo a partir de la piel, boca y las fosas nasales de los manipuladores de dicho alimento. Cuando se encuentran en alta cantidad, puede significar que las prácticas de limpieza y desinfección o el control de la temperatura no han sido adecuadas. Además de ser un microorganismo indicador, *S. aureus* es una bacteria patógena que, mediante la producción de enterotoxinas, es capaz de generar una intoxicación alimentaria caracterizada por vómitos, náuseas, diarrea, debilidad y malestar general (ICMSF, 2000); otro factor asociado a su virulencia es la formación de la enzima coagulasa, siendo ésta determinante para su diferenciación fenotípica, con otras especies de *Staphylococcus* (Klodzinska *et al.*, 2009). Si bien, la mayoría de los estafilococos productores

de intoxicaciones alimentarias son coagulasa positivas, se ha evidenciado la producción de enterotoxinas en especies coagulasa negativas (ICMSF, 2000). Intoxicaciones por *S. aureus* han sido asociadas a alimentos preparados con leche, carnes, jamones, pescados, entre otros, siendo un factor de riesgo la mantención de tales alimentos a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo puesto que la formación de enterotoxinas se produce generalmente entre los 10 a 46°C. Las enterotoxinas producidas por *S. aureus* son resistentes a altas temperaturas, incluso se mantienen activas luego de hervir durante 30 minutos (Bhunja, 2008a).

Los microorganismos patógenos asociados a los alimentos producen, generalmente, enfermedades gastroentéricas de distinta intensidad y duración. Entre las bacterias patógenas más comunes se encuentran las siguientes:

- Salmonella:

Es un bacilo gram negativo, fermentador y anaerobio facultativo (Murray *et al.*, 2007b). Crece a temperaturas de entre 5 – 45°C siendo su rango óptimo de crecimiento entre 35 – 37°C y es sensible a concentraciones altas de sal. Los principales alimentos asociados a brotes de salmonelosis corresponden a carnes, huevos, leche y sus derivados, sin embargo, se han reportado brotes asociados con frutas y verduras (Bhunja, 2008b). Los cuadros clínicos provocados por *Salmonella* pueden dividirse en dos categorías; las fiebres tifo-paratíficas (producidas por *S. typhi* y *S. paratyphi*), cuyo ingreso al organismo se debe a la ingesta de agua y/o alimento contaminado o por contacto directo, y que generalmente cursa con septicemia, fiebre continua, en la mayoría de los casos sin enteritis, y que afectan a los primates exclusivamente. Las salmonelosis producidas por otros tipos de salmonellas (que a diferencia de las dos anteriores son zoonóticas), cursan con gastroenteritis, que a veces puede complicarse con septicemia (ICMSF, 2000). Para prevenir una infección alimentaria por *Salmonella* son

importantes las medidas de higiene de los manipuladores de alimentos, la refrigeración de huevos y productos derivados de ellos, la cocción apropiada de los alimentos, entre otros (Bhunia, 2008b).

- *E. coli*:

Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo y fermentador de lactosa. Produce una gran variedad de enfermedades como sepsis, infección urinaria, meningitis (todas infecciones endógenas), y gastroenteritis; en ésta última la infección se adquiere de forma exógena (Murray *et al.*, 2007b). Brotes de gastroenteritis por *E. coli* han sido relacionados con alimentos como carne, productos derivados de la leche, mayonesa y diversos vegetales (Bhunia, 2008c). Dentro de las cepas que producen gastroenteritis se distinguen seis grupos: enterotoxigénica (ECET), enteropatógena (ECEP), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH), enteroagregativa (ECEA), y *E.coli* difusamente adherente (ECDA) (Murray *et al.*, 2007b). Dentro de las ECEH se encuentra el serotipo O157:H7 el cual produce un cuadro diarreico hemorrágico afebril, pudiendo generar complicaciones incluso mortales para niños pequeños, como el síndrome hemolítico urémico (SHU), que incluso puede dejar con secuelas al individuo (Margall *et al.*, 1997). Se transmite por vía oral-fecal siendo la carne de bovino el vehículo más frecuentemente asociado a infecciones con esta bacteria, principalmente por hamburguesas mal cocidas. Se ha descrito también brotes asociados a carne de pavo, salami, leche, yogurt, mayonesa, vegetales crudos y agua (Margall *et al.*, 1997). En cuanto a su diagnóstico de laboratorio, *E. coli* O157:H7 fermenta rápidamente la lactosa, pero la mayoría de ellas no fermenta el D-sorbitol o lo hace lentamente (CDC, 1994), y, a diferencia de otras cepas de *E. coli*, no presenta actividad β -glucuronidasa y se desarrolla mejor a temperaturas medias de 30 a 42°C, en comparación con el resto de las cepas de *E. coli* que crece mejor a temperaturas entre 44 a 45°C (Bhunia, 2008c).

Para prevenir una infección con *E. coli* se recomiendan medidas apropiadas de sanitización, cocción y recalentamiento de los alimentos junto con una apropiada refrigeración de los mismos (Bhunja, 2008c)

Para la aceptación de un alimento como inocuo para la salud de los consumidores, se establecen Criterios Microbiológicos, los cuales en base a una gama de valores microbiológicos permiten determinar la aceptación o rechazo de dicho alimento (Chile, MINSAL, 2010).

Los distintos parámetros a considerar en un alimento (microorganismos indicadores o patógenos), son clasificados en categorías de riesgo (Anexo N°1), en base a su peligrosidad y a sus condiciones posteriores de consumo y manipulación las cuales podrían disminuir, mantener o aumentar dicha peligrosidad (ICMSF, 1999). Junto con lo anterior se consideran además las características propias del alimento (pH, actividad de agua, etc.); el grupo consumidor al cual va dirigido (lactantes, niños, ancianos, etc.); su forma de preparación y consumo al igual que su forma de mantención y almacenamiento (Chile, MINSAL, 2010).

En las categorías de riesgo 1, 2 y 3 se utilizan parámetros cuyo objetivo es definir la vida útil y alteración del producto. En las categorías 4, 5 y 6 se definen como parámetros microorganismos indicadores como coliformes, enterobacteriaceas, etc. En las categorías 7, 8 y 9 se establecen como parámetros microorganismos, que, siendo patógenos se aceptan en bajos niveles como *S. aureus* y *B. cereus*. A partir de la categoría 10 se considera peligroso para la salud la presencia y/o concentración de ciertos microorganismos como *Salmonella*, *C. botulinum*, entre otros (ICMSF, 1999).

Los parámetros que se utilizan para determinar si los choritos tanto vivos como cocidos congelados (ver sección de Material y Métodos, Planes de muestreo y criterios microbiológicos), se encuentran clasificados en distintas categorías (ver Anexo N° 1), las que determinan que los límites de aceptación sean mayores o

menores. Por ejemplo, el recuento de bacterias mesófilas al pertenecer a la categoría más baja tiene límites de aceptación altos, siendo éstos un poco menores para los choritos cocidos. Los coliformes fecales y *E. coli* se encuentran dentro de la categoría de riesgo 4 puesto que aunque representan un peligro indirecto y bajo para la salud; la cocción de este producto (forma de consumo), disminuye este riesgo. Es por esta razón que, en comparación al RAM, los límites de aceptación son mucho menores sobre todo en el caso de *E. coli* en choritos cocidos congelados puesto que la manipulación posterior de este producto es prácticamente nulo y además están listos para ser consumidos.

S. aureus se clasifica en la categoría de riesgo 8 ya que su difusión es moderada y las condiciones de consumo y almacenamiento de este producto no generan cambios en la peligrosidad asociada a esta bacteria en caso de que se encuentre presente. Si bien los límites son los mismos que para *E. coli* sólo se acepta una unidad de muestra entre 10 a 100 ufc/g para *S. aureus*, de esta manera se aumenta la severidad del muestreo en relación con este parámetro.

Salmonella se clasifica en la categoría 10 porque su difusión es potencialmente extensa pero la cocción y congelación del producto disminuyen su peligrosidad. En este caso no se acepta ninguna unidad de muestra en la que se encuentre presente la bacteria, siendo así, de todos los parámetros analizados, el más severo.

3.- OBJETIVOS

3.1.- OBJETIVO GENERAL

Estudiar la presencia de microorganismos indicadores y patógenos en choritos vivos y cocidos congelados procesados en una planta de Chiloé, Chile.

3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos en choritos vivos y cocidos congelados.
- Cuantificar el número de *S. aureus* coagulasa positiva en choritos vivos y cocidos congelados.
- Determinar el Número Más Probable de coliformes totales y fecales en choritos vivos y cocidos congelados.
- Determinar el Número Más Probable de *E. coli* β -glucuronidasa positiva en choritos vivos y cocidos congelados.
- Determinar la presencia de *Salmonella* spp. en choritos vivos y cocidos congelados.
- Verificar si los choritos vivos y cocidos congelados cumplen con la normativa requerida por Chile y por la Unión Europea.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS

En este estudio se analizaron choritos provenientes de una planta procesadora tipo B ubicada en la isla de Chiloé, Chile.

Este estudio se constituyó de 8 muestreos compuestos cada uno por 5 unidades de muestra de choritos vivos y 5 unidades de muestra de choritos cocidos congelados de un kilo cada una, conformando un total de 80 unidades de muestra en total.

Las muestras fueron recibidas, procesadas y analizadas en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos de la Universidad de Chile.

Éstas fueron transportadas, por vía terrestre², en el interior de una caja isotérmica con gel-pack para mantener las muestras a una temperatura de 0 a 4°C para los choritos vivos mientras que los congelados se mantuvieron en ese estado hasta su análisis (la temperatura fue registrada al momento en que las muestras fueron recepcionadas en el laboratorio para verificar que llegaron en condiciones óptimas luego del traslado, y se controló que los choritos cocidos efectivamente estuvieran congelados). Las muestras fueron inmediatamente procesadas; se comenzó con el desconche de los choritos vivos (se realizó de forma manual, con un cuchillo de punta roma; se utilizaron guantes quirúrgicos los cuales eran cambiados entre cada unidad de muestra). Se tomaron 10 gr y 25 gr de cada unidad de muestra de choritos vivos y cocidos congelados en bolsas estériles, para la realización de todos los análisis.

² Duración del viaje de aproximadamente 18 hrs.

4.2.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS:

4.2.1.- Microorganismos Indicadores

4.2.1.1.- Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos (RAM).

Este análisis, y la homogenización de la muestra, se realizaron para los choritos vivos y cocidos congelados según lo descrito en la Norma Chilena Oficial NCh2659.Of2002 “Productos Hidrobiológicos – Determinación de microorganismos aerobios mesófilos – Técnica de recuento en placa a 35°C”.

4.2.1.2.- Determinación de Coliformes Totales y Fecales.

Este análisis, y la homogenización de la muestra, se realizaron para los choritos vivos, según lo descrito en la Norma Chilena Oficial NCh2732.Of2002 “Moluscos bivalvos – Determinación de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* – Técnica del Número más Probable (NMP)”. Y para los choritos cocidos congelados el análisis se realizó según lo descrito en la Norma Chilena Oficial NCh2635/1.Of2000 “Productos Hidrobiológicos – Determinación de coliformes y coliformes fecales – Técnica del Número Más Probable (NMP)”

4.2.1.3.- Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva.

Este análisis, y la homogenización de la muestra, se realizaron para choritos vivos y cocidos congelados de acuerdo a lo descrito en la Norma Chilena Oficial NCh2671.Of2002 “Productos hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva – Técnica de recuento en placa en agar Baird-Parker”.

4.2.2.- Microorganismos Patógenos

4.2.2.1.- Determinación de *Escherichia coli* β-glucuronidasa positiva.

Este análisis, y la homogenización de la muestra, se realizaron para los choritos vivos y cocidos congelados, según lo descrito en la Norma Chilena Oficial NCh3056.Of2007 “Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* β-glucuronidasa positiva – Técnica del número más probable utilizando 5-bromo-4cloro-3indolil-β-D-glucuronido”.

4.2.2.2.- Detección de *Salmonella* spp.

Este análisis (cualitativo), y la homogenización de la muestra, se llevó a cabo según lo estipulado por la Norma Chilena Oficial NCh2675.Of2002 “Productos hidrobiológicos – Detección de *Salmonella*”, para choritos vivos y cocidos congelados.

4.3.- PLANES DE MUESTREO Y CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS:

Los análisis realizados en este estudio se determinaron en base a los criterios microbiológicos y parámetros establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos y por SERNAPESCA en el Programa de Certificación Norma Técnica Sección 2 y 3, en donde se exige el cumplimiento del Reglamento CE de la Unión Europea en concordancia con lo indicado en los cuadros N° 2, 3 y 4 presentados a continuación.

Cuadro N° 2. Especificaciones microbiológicas para Pescados y productos de la pesca (incluyendo crustáceos, moluscos y cefalópodos). Chile.

Moluscos Bivalvos Frescos						
Parámetro	Categoría	Clases	n	c	Límite Por Gramo	
					m	M
Rcto. Aerobios Mesóf.	1	3	5	3	5x10 ⁵	10 ⁶
Coliformes fec. en 100g	4	3	5	3	2,3x10 ²	4x10 ²
<i>Salmonella</i> en 25 g	10	2	5	0	0	---
Pescados y Mariscos Precocidos o Cocidos Congelados						
Parámetro	Categoría	Clases	n	c	Límite Por Gramo	
					m	M
Rcto. Aerobios Mesóf.	1	3	5	3	10 ⁵	5x10 ⁵
<i>E. Coli</i> ³	4	3	5	3	10	10 ²
<i>S. aureus</i>	8	3	5	1	10	10 ²
<i>Salmonella</i> en 25 g	10	2	5	0	0	---

Fuente: CHILE. MINSAL. 2010. Reglamento Sanitario de los Alimentos. pp: 69 – 84.

³ Como se puede inferir del cuadro, al observar el límite máximo (M) y mínimo (m) establecidos para *E. coli*, el análisis debiera hacerse mediante una técnica de recuento en placa. Sin embargo, como este producto será exportado, y, según lo indicado por el Programa de Laboratorios de SERNAPESCA se debe utilizar como método de análisis la enumeración de *Escherichia coli* β -glucuronidasa-positiva. (CHILE. SERNAPESCA, 2011f).

Cuadro N° 3. Criterios Microbiológicos para los Productos de la Pesca. Unión Europea.

Criterios de Seguridad Alimentaria						
Categoría de Alimento	Parámetro	Plan de Muestreo		Límites		Fases en las que se aplica el criterio.
		n	c	m	M	
Crustáceos y Moluscos Cocidos	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		Productos Comercializados durante su vida útil
	<i>S. aureus</i> coagulasa (+)	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g	Final del proceso de fabricación ⁴
Moluscos Bivalvos Vivos	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		Productos Comercializados durante su vida útil
	<i>E. coli</i> *	1**	0	230 NMP/100 g carne y líquido intravalvar		Productos Comercializados durante su vida útil

* La *E. coli* se utiliza en este caso como indicador de contaminación fecal.

** Una muestra conjunta de un mínimo de 10 animales.

Fuente: Unión Europea. Reglamento (CE) 2073/2005. Actualización Diciembre 2007

Como se aprecia en el cuadro N° 3 la Unión Europea exige como parámetros a medir en los choritos *Salmonella*, *E. coli* y *S. aureus* coagulasa positiva.

⁴ Los resultados de las pruebas demuestran la calidad microbiológica del proceso analizado (Chile SERNAPESCA, 2011e)

Cuadro N° 4. Planes de muestreo y determinaciones microbiológicas para moluscos bivalvos. Chile.

Moluscos Bivalvos Crudos				
Determinaciones microbiológicas	Límites		Plan Muestreo	
	m	M	n	c
Recuento total (g)	5x10 ⁵	10 ⁶	5	3
<i>E. coli</i> (NMP/g)	100	500	5	3
<i>Salmonella</i> (25 g)	Ausencia		5	0
<i>S. aureus</i> (ufc/g)	100	500	5	2
Moluscos Bivalvos Cocidos Congelados				
Determinaciones microbiológicas	Límites		Plan Muestreo	
	m	M	n	c
Recuento total (g)	10 ⁵	5x10 ⁵	5	3
<i>E. coli</i> (NMP/g)	10	100	5	3
<i>Salmonella</i> (25 g)	Ausencia		5	0
<i>S. aureus</i> (ufc/g)	10	100	5	1

Fuente: Chile. Sernapesca. Servicio Nacional de Pesca. 2011. Requisitos Sanitarios y Planes de muestreo para la Certificación Sanitaria de Productos Pesqueros de Exportación. **In:** Programa de Certificación. Norma Técnica. Sección 2. CER/NT2. pp: 24 – 26.

4.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con el propósito de determinar si existe una diferencia significativa en la carga microbiana presente en los choritos de cada partida antes y después de ser cocidos y congelados, se realizaron las siguientes pruebas estadísticas.

4.4.1.- Datos Cualitativos:

De la detección en alimentos de *Salmonella* spp. se obtuvo resultados que corresponden a variables cualitativas nominales (presencia/ausencia), por lo que se estableció la realización de una prueba de Comparación de Proporciones.

4.4.2.- Datos Cuantitativos:

Para verificar si la diferente carga microbiana encontrada entre choritos vivos y cocidos congelados para los análisis cuantitativos realizados en ambos grupos (RAM, *S. aureus* y *E. coli*), se debe a variaciones significativas se realizó la prueba de t de Student de comparación de medias.

5.- RESULTADOS

Al estudiar la presencia de microorganismos indicadores y patógenos en choritos vivos y cocidos congelados procesados en una planta de Chiloé, se destaca el hecho que, respecto de los patógenos analizados, *Salmonella* spp. no fue detectada en ninguna de las 40 unidades de muestra de choritos vivos ni en las 40 unidades de muestra de choritos cocidos congelados⁵.

Respecto de los otros patógenos estudiados y de los microorganismos indicadores, a continuación se presentan los resultados obtenidos en cada análisis realizado, para cada uno de los muestreos, tanto para choritos vivos como cocidos congelados.

⁵ Por los resultados obtenidos no se pudo realizar la prueba de Comparación de Proporciones

Cuadro N° 5. Resultados Análisis Microbiológicos 13 Abril 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	E. coli* NMP/g	S. aureus Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	5,8 x 10 ²	40	20	0,8	1,8 x 10 ²
	2	5,9 x 10 ²	20	< 1,8	3,1	1,4 x 10 ²
	3	6,9 x 10 ²	18	< 1,8	0,2	1,7 x 10 ²
	4	7,0 x 10 ²	45	45	0,5	1,7 x 10 ²
	5	1,1 x 10 ³	210	45	< 0,2	3,0 x 10 ²
Congelado cocido	1	5,8 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	< 0,2	2,0 x 10 ¹
	2	5,4 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	3	1,5 x 10 ³	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	4	5,3 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	5	8,8 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

Como se observa en este cuadro la cantidad de microorganismos presentes en los choritos cocidos es bastante menor en relación a los choritos crudos en todos los análisis exceptuando el RAM, en donde la variación no es tan acentuada. En el caso de *S. aureus* en los choritos vivos se encontraron recuentos muy por encima del límite máximo permitido por el RSA, sin embargo, este producto se comercializa cocido congelado en donde los recuentos no superan las 20 ufc/g por lo que esta partida cumple con lo requerido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos y por la Unión Europea y es apta para la comercialización tanto a nivel nacional como internacional.

Cuadro N° 6. Resultados Análisis Microbiológicos 21 Abril 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> * NMP/g	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	$3,8 \times 10^2$	60	60	< 0,2	$9,5 \times 10^1$
	2	$4,5 \times 10^2$	110	110	0,5	$3,5 \times 10^1$
	3	$2,6 \times 10^2$	18	< 1,8	< 0,2	$5,5 \times 10^1$
	4	$4,2 \times 10^2$	18	< 1,8	< 0,2	$7,5 \times 10^1$
	5	$2,2 \times 10^2$	68	40	1,3	< 10
Congelado cocido	1	$3,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	2	$1,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	0,8	< 10
	3	$2,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	4	$1,5 \times 10^1$	18	18	< 0,2	< 10
	5	< 10	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

En este caso se observa una disminución en el recuento de aerobios mesófilos entre los choritos vivos y los cocidos, al igual que en los otros análisis. Vemos que a diferencia del muestreo anterior se encontraron coliformes fecales y totales en una de las unidades de muestra de choritos cocidos, pero no se encontró *S. aureus* coagulasa positiva en los choritos cocidos congelados y el recuento en los choritos vivos fue menor que en el muestreo anterior. Esta partida es apta para consumo.

Cuadro N° 7. Resultados Análisis Microbiológicos 06 Mayo 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> * NMP/g	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	$1,5 \times 10^3$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$1,4 \times 10^2$
	2	$8,5 \times 10^2$	20	< 1,8	2,2	$2,1 \times 10^2$
	3	$7,6 \times 10^2$	18	18	0,2	$9,5 \times 10^1$
	4	$6,0 \times 10^2$	45	45	< 0,2	$2,5 \times 10^1$
	5	$5,6 \times 10^2$	45	45	< 0,2	$1,2 \times 10^2$
Congelado cocido	1	$4,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$1,0 \times 10^1$
	2	$7,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$1,0 \times 10^1$
	3	$5,5 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$0,5 \times 10^1$
	4	$2,5 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$1,0 \times 10^1$
	5	$4,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

En esta partida, a diferencia de las dos anteriores, se observa la presencia de *S.aureus* coagulasa positiva en 9 de las 10 unidades de muestra analizadas, estando en 3 de las unidades de muestra de choritos vivos por sobre lo permitido, sin embargo, se observa un menor recuento en los choritos cocidos congelados estando éstos dentro de los rangos de aceptación dados por el Reglamento Sanitario. También se aprecia una disminución de la carga de aerobios mesófilos entre choritos vivos y frescos, al igual que para el resto de los análisis. Esta partida también es apta para consumo y comercialización nacional e internacional.

Cuadro N° 8. Resultados Análisis Microbiológicos 19 Mayo 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> * NMP/g	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	$4,0 \times 10^1$	130	45	< 0,2	< 10
	2	$2,2 \times 10^2$	93	< 1,8	< 0,2	$3,0 \times 10^1$
	3	$2,8 \times 10^2$	490	< 1,8	1,3	$1,4 \times 10^1$
	4	$7,0 \times 10^2$	490	18	2,3	$2,4 \times 10^2$
	5	$9,9 \times 10^2$	3500	20	< 0,2	$3,4 \times 10^2$
Congelado cocido	1	$8,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$1,2 \times 10^3$
	2	$7,5 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$5,5 \times 10^1$
	3	$1,8 \times 10^3$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$4,3 \times 10^2$
	4	$1,3 \times 10^3$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$3,1 \times 10^2$
	5	$9,8 \times 10^2$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	$2,9 \times 10^2$

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

Aquí, a diferencia de los muestreos anteriores, se evidencian altos recuentos de *S. aureus* coagulasa positiva tanto en choritos vivos como en choritos cocidos congelados, siendo incluso mayor el recuento en los choritos cocidos. Esta partida no cumple con lo estipulado por el Reglamento Sanitario de los Alimentos ni por lo exigido por el reglamento CE de la Unión Europea, por lo tanto, no es apta para su consumo ni exportación.

Cuadro N° 9. Resultados Análisis Microbiológicos 02 Junio 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> * NMP/g	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	1,5 x 10 ²	140	40	0,4	1,0 x 10 ¹
	2	3,4 x 10 ²	78	45	2,2	9,5 x 10 ¹
	3	2,6 x 10 ²	230	130	1,3	3,5 x 10 ¹
	4	2,7 x 10 ²	68	40	2,3	9,0 x 10 ¹
	5	1,7 x 10 ²	93	93	0,5	4,8 x 10 ¹
Congelado cocido	1	3,0 x 10 ¹	< 1,8	< 1,8	< 0,2	1,0 x 10 ¹
	2	7,0 x 10 ¹	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	3	1,5 x 10 ¹	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	4	3,0 x 10 ¹	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	5	3,0 x 10 ¹	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

Esta partida cumple con los requisitos presentados tanto por el RSA como por la Unión Europea por lo que es apta para su consumo y comercialización.

Cuadro N° 10. Resultados Análisis Microbiológicos 16 Junio 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> * NMP/g	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	2,1 x 10 ³	1700	150	0,8	< 10
	2	1,4 x 10 ³	220	110	0,5	< 10
	3	2,6 x 10 ³	92	20	< 0,2	< 10
	4	1,5 x 10 ³	270	68	0,5	< 10
	5	2,2 x 10 ³	260	61	< 0,2	< 10
Congelado cocido	1	3,0 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	2	2,0 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	0,8	< 10
	3	1,9 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	0,8	< 10
	4	2,9 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	5	1,1 x 10 ²	< 1,8	< 1,8	0,2	< 10

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

En este caso los Recuentos de aerobios fueron mayores que en los muestreos anteriores, sin embargo se encuentran dentro de los rangos de aceptación. A diferencia de los otros muestreos realizados, no se encontró *S. aureus* en ninguna de las unidades de muestra analizadas. Sólo en una de las unidades de muestra de choritos vivos se evidenció un alto recuento de coliformes totales, pero no de fecales. Esta partida es apta para consumo y no constituye ningún riesgo para la salud de las personas.

Cuadro N° 11. Resultados Análisis Microbiológicos 30 Junio 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> * NMP/g	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	$1,4 \times 10^3$	490	790	0,7	$0,9 \times 10^1$
	2	$6,6 \times 10^3$	93	93	1,7	$5,0 \times 10^1$
	3	$1,6 \times 10^3$	240	170	0,5	$1,5 \times 10^1$
	4	$2,1 \times 10^3$	330	490	0,05	< 10
	5	$1,6 \times 10^3$	83	93	1,1	$1,3 \times 10^2$
Congelado cocido	1	$2,0 \times 10^2$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	2	$9,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	3	$7,5 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	4	$9,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	5	$7,0 \times 10^1$	20	< 1,8	< 0,2	< 10

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

En este caso, al igual que en el anterior, también se evidenció altos recuentos de aerobios mesófilos en los choritos vivos, disminuyendo éstos considerablemente en los choritos cocidos congelados. En relación a los coliformes fecales se encontraron 2 unidades de muestra con valores de NMP por sobre lo máximo permitido, sin embargo los choritos cocidos congelados cumplen con lo reglamentado y es por esto que esta partida es apta para consumo y exportación.

Cuadro N° 12. Resultados Análisis Microbiológicos 07 Julio 2010

Muestra	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	Coliformes totales	Coliformes fecales	<i>E. coli</i> * NMP/g	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g
Materia prima (Vivo)	1	$6,1 \times 10^2$	320	320	1,3	$0,5 \times 10^1$
	2	$1,6 \times 10^3$	260	170	17	$2,1 \times 10^2$
	3	$9,5 \times 10^2$	390	220	2,3	$2,5 \times 10^1$
	4	$1,1 \times 10^3$	320	320	1,3	$5,0 \times 10^1$
	5	$9,4 \times 10^2$	3500	230	3,3	$1,0 \times 10^1$
Congelado cocido	1	$1,2 \times 10^2$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	2	$3,5 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	0,2	$0,5 \times 10^1$
	3	$2,5 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	4	$3,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10
	5	$2,0 \times 10^1$	< 1,8	< 1,8	< 0,2	< 10

* Enumeración *E. coli* Glucuronidasa (+)

** Coliformes totales y fecales en choritos vivos = NMP/100g

*** Coliformes totales y fecales en choritos cocidos congelados = NMP/g

En este cuadro se observa que en los choritos vivos una unidad de muestra presentó una alta cantidad de coliformes totales, mientras que dos unidades de muestra presentaron 320 NMP/100g de coliformes fecales lo que está dentro de los valores aceptados por el reglamento para tal parámetro. Sólo una de las unidades de muestra de choritos vivos presenta un recuento mayor al permitido de *S. aureus*, sin embargo, los choritos cocidos congelados cumplen con la normativa para todos los parámetros analizados, de manera tal que esta partida es apta para consumo.

Para determinar si la diferente carga microbiana evidenciada entre choritos vivos y cocidos congelados se debe a la cocción y congelamiento de este producto, se realizó un test estadístico de comparación de medias entre dos grupos independientes (t de Student); a continuación se presentan los cuadros de resultados de dichos análisis⁶.

En los cuadros N° 13, 14 y 15 se observan los resultados de los análisis estadísticos realizados.

⁶ En el Anexo N° 2 se muestran los valores utilizados, en cada muestreo, para la realización de los análisis estadísticos. Los valores fueron transformados a escala logarítmica para lograr una distribución normal de los mismos. Son estos valores logarítmicos los que se usaron para el análisis estadístico.

Cuadro N° 13. Resultado Comparación de medias, para el Recuento de Aerobios Mesófilos, entre choritos vivos y choritos cocidos congelados ($p < 0,05$).

Muestreo	Choritos Vivos			Choritos Cocidos Congelados		
	Media (log)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Media (log)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	2,85	0,1	3,9	2,87	0,2	6,8
2	2,52*	0,1	5,4	0,99	0,6	58,6
3	2,90*	0,2	5,9	1,64	0,2	10,3
4	2,45	0,5	22,2	2,63	0,7	25,9
5	2,36*	0,1	6,3	1,49	0,2	15,9
6	3,28*	0,1	3,5	2,31	0,2	7,6
7	3,34*	0,3	8,3	1,99	0,2	9,2
8	3,00*	0,2	5,0	1,56	0,3	19,5

* Diferencia significativa entre ambos grupos (Vivos vs Cocidos Congelados)

Para el RAM se encontraron diferencias significativas entre las medias de los muestreos 2, 3 y del quinto al octavo.

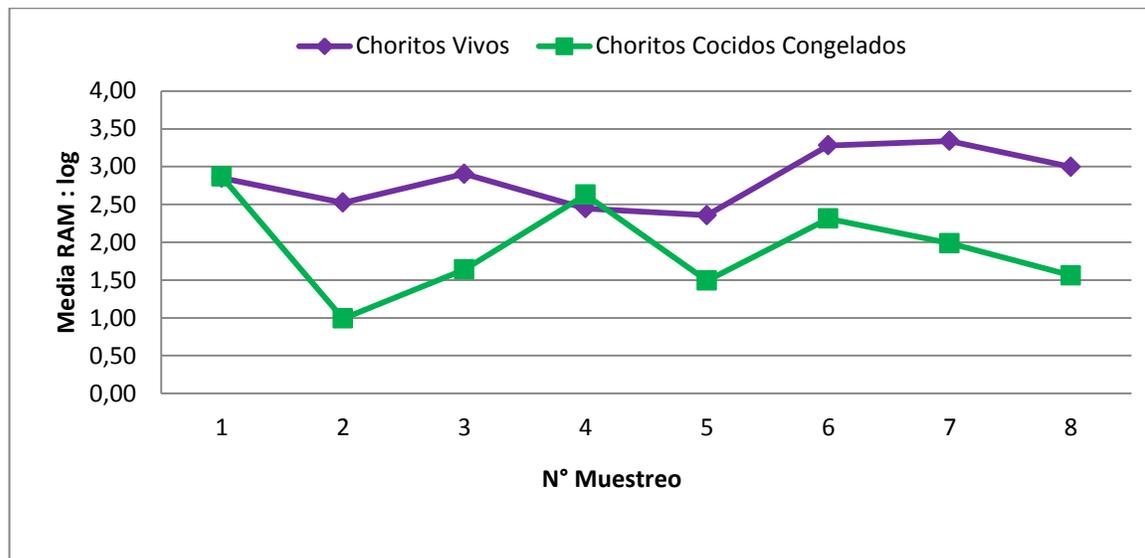


Gráfico N° 1. Comparación de medias, para el Recuento de Aerobios Mesófilos, entre choritos vivos y choritos cocidos congelados.

Cuadro N° 14. Resultado Comparación de medias, para el Número Más Probable de *E. coli* β -glucuronidasa positiva, entre choritos vivos y choritos cocidos congelados ($p < 0,05$).

Muestreo	Choritos Vivos			Choritos Cocidos Congelados		
	Media (log)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Media (log)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	0,24	0,2	91,9	0,08	0	0
2	0,16	0,1	79,4	0,11	0,1	69,3
3	0,16	0,2	116,5	0,08	0	0
4	0,22	0,2	91,7	0,08	0	0
5	0,34*	0,2	51,5	0,08*	0	0
6	0,15	0,1	49,0	0,15	0,1	64,0
7	0,24*	0,2	65,3	0,08*	0	0
8	0,63*	0,4	59,1	0,08*	0	0

* Diferencia significativa entre ambos grupos (Vivos vs Cocidos Congelados)

Para la *E. coli*, las diferencias fueron significativas sólo en los muestreos 5, 7 y 8.

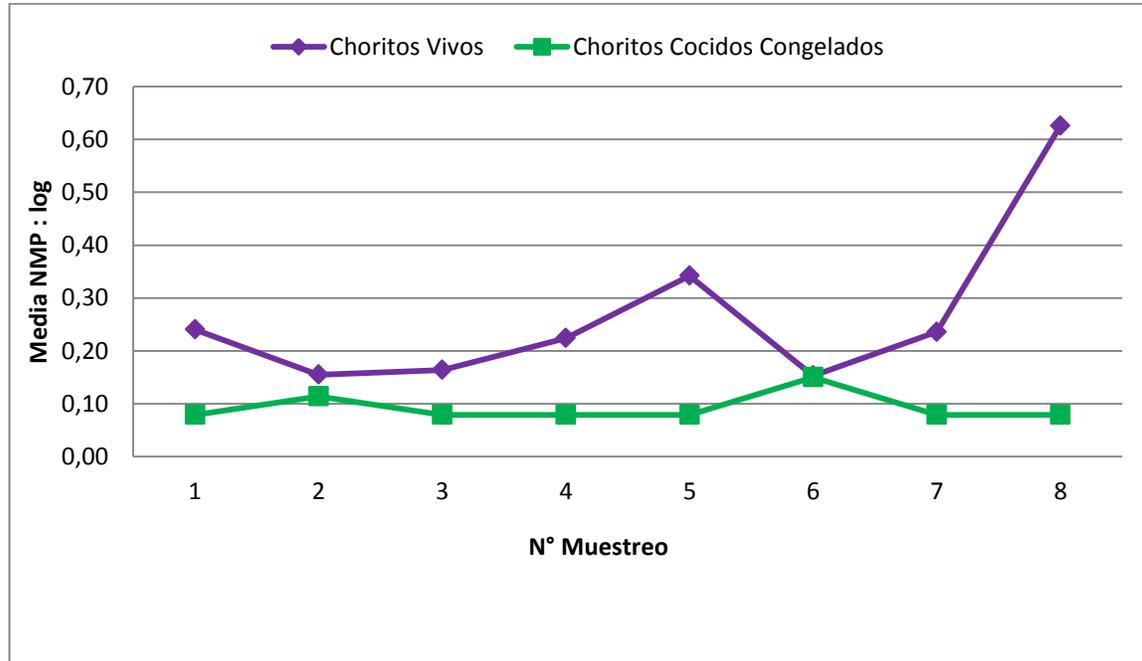


Gráfico N°2. Comparación de medias, para el Número Más Probable de *E. coli* β -glucuronidasa positiva, entre choritos vivos y choritos cocidos congelados.

Cuadro N° 15. Resultado Comparación de medias, para el Recuento de *S. aureus* coagulasa positiva, entre choritos vivos y choritos cocidos congelados ($p < 0,05$).

Muestreo	Choritos Vivos			Choritos Cocidos Congelados		
	Media (log)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Media (log)	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
1	2,27*	0,1	5,5	1,06*	0,1	12,7
2	1,63*	0,4	23,7	1,00*	0	0
3	1,99*	0,4	17,7	0,94*	0,1	14,4
4	1,71	0,7	41,4	2,48	0,5	19,4
5	1,63*	0,4	24,4	1,00*	0	0
6	1,00	0	0	1,00	0	0
7	1,39	0,5	36,1	1,00	0	0
8	1,42	0,6	44,2	0,94	0,1	14,4

* Diferencia significativa entre ambos grupos (Vivos vs Cocidos Congelados)

En relación al *S. aureus* coagulasa positiva existe una diferencia significativa en los 3 primeros muestreos y en el quinto tal como se aprecia en el gráfico. También se observan los altos recuentos obtenidos en los análisis realizados el 19 Mayo (Cuadro N°8), en los choritos cocidos congelados, sobrepasando éstos a los valores obtenidos en los vivos.

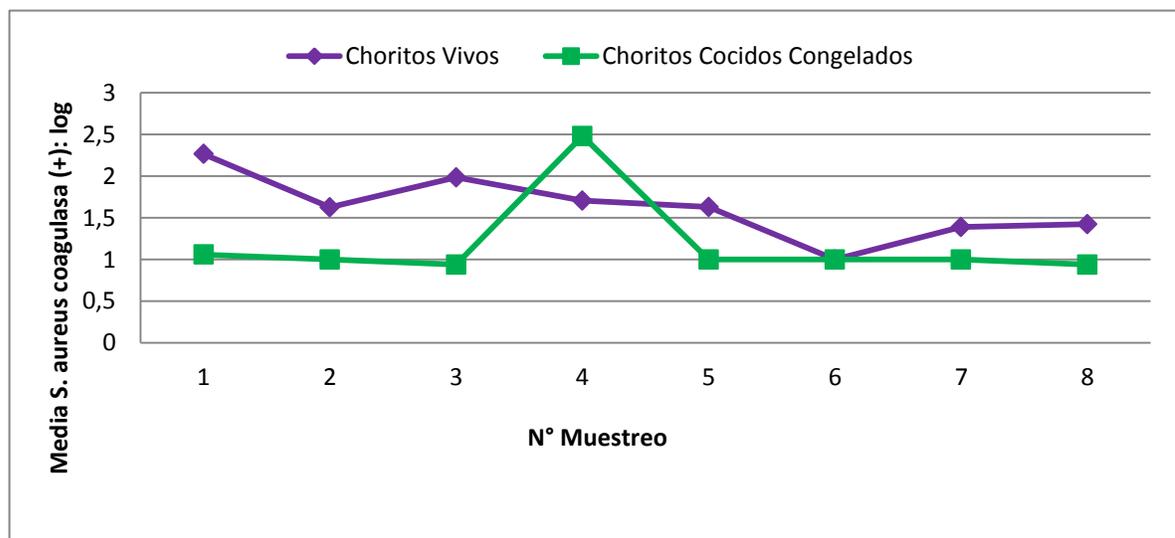


Gráfico N°3. Comparación de medias, para el Recuento de *S. aureus* coagulasa positiva, entre choritos vivos y choritos cocidos congelados.

6.- DISCUSIÓN

Para caracterizar, desde el punto de vista microbiológico a los choritos vivos y cocidos congelados para exportación y consumo nacional, se estudió la presencia de microorganismos indicadores y patógenos en los mismos.

Esta caracterización es importante puesto que al ser organismos filtradores acumulan sustancias y microorganismos (incluso en cantidades mayores a la carga inicial presente en su medio acuático), contenidos en el agua haciéndoselos llegar, posteriormente, a los consumidores, ya que en general este tipo de marisco es consumido crudo o ligeramente cocido (Lee *et al.*, 2008). Esto constituye un riesgo para todos los consumidores en general, pero de especial importancia en individuos susceptibles, en donde una intoxicación por el consumo de moluscos crudos puede llegar a ser grave e incluso mortal. Personas inmunodeprimidas (cáncer, VIH, etc.), niños pequeños, ancianos y personas con enfermedades como diabetes mellitus, epilepsia, patologías renales y hepáticas pueden desarrollar enfermedades de mayor gravedad que individuos sanos (Oliveira *et al.*, 2010).

Sin embargo, la acumulación de microorganismos dentro de los choritos, no constituye la única forma de contaminación de éstos. Distintos microorganismos pueden ingresar al molusco durante su procesamiento mediante el aire, por falta de higiene de los manipuladores o de los utensilios utilizados, (USA. FDA, 2011a), siendo especialmente peligrosa su contaminación con bacterias patógenas luego de su cocción. La primera razón para esto, es que la cocción elimina microorganismos saprófitos que actúan compitiendo por nutrientes con las bacterias patógenas, que, al verse libre de sus competidores, pueden multiplicarse con mayor facilidad; en segundo lugar, esto es importante porque luego de ser cocidos no son nuevamente procesados y, por lo tanto, son consumidos tal cual por los consumidores (USA. FDA, 2011b)

Dentro de los microorganismos patógenos, uno de los más importantes corresponde a *Salmonella* spp., la cual puede ingresar a ambientes acuáticos a través de animales silvestres o domésticos o debido a una mala disposición de los residuos animales y humanos (contaminación fecal del agua), (Amagliani *et al.*, 2011). Por otro lado, la FDA (U.S. Food Drug Administration), ha demostrado la presencia de *Salmonella* en una gran variedad de peces y moluscos, incluyendo productos listo para consumo, ligeramente cocinados y moluscos crudos (Amagliani *et al.*, 2011), por lo que es importante verificar si en *Mytilus chilensis* extraídos y producidos en Chiloé existe la presencia de esta bacteria.

De las 80 unidades de muestra analizadas durante este estudio, en ninguna de ellas se encontró *Salmonella* spp. lo que indica un status sanitario de buena calidad, tanto de la materia prima como de las aguas en donde fue cultivada. Es importante destacar que los *Mytilus chilensis* extraídos desde una zona de extracción tipo B cumplen con los requisitos y estándares sanitarios chilenos y de la Unión Europea por lo que son productos sanos y aptos para su comercialización tanto nacional como internacional.

Siguiendo con las bacterias patógenas, *E. coli* es la segunda en importancia luego de *Salmonella*. Si bien *E. coli* puede producir enfermedad luego de la ingestión de algún alimento contaminado, también es un buen indicador de contaminación fecal en los alimentos (Lee *et al.*, 2008). *E. coli* constituye un riesgo para los consumidores de este tipo de producto puesto que es una bacteria que presenta dosis infectivas bajas (se requiere de una pequeña cantidad del microorganismo para producir enfermedad), (USA. FDA, 2011a), siendo especialmente peligrosa la cepa de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, que puede producir colitis hemorrágica en niños y adultos pudiéndose complicar con el Síndrome Hemolítico Urémico en niños menores de 10 años (Murray *et al.*, 2007b). La técnica utilizada en este estudio para medir el NMP de *E. coli* fue seleccionada por ser altamente sensible y específica para *E. coli* (mide la presencia de la enzima β -glucuronidasa, la cual es producida por *E. coli* y no por otras enterobacterias),

(Bhunia, 2008c); sin embargo, no detecta el serotipo O157:H7, lo cual no es requerido en este tipo de alimento puesto que no existen antecedentes de contaminación de moluscos bivalvos por esta bacteria, por lo que no constituiría un riesgo asociado al consumo de este producto.

E. coli es una bacteria que no resiste temperaturas mayores a 50°C (USA. FDA, 2011c), por lo que la cocción es una alternativa para disminuir la carga bacteriana presente en moluscos crudos. Esto queda en evidencia en este estudio, puesto que la tendencia observada fue un NMP de *E. coli* menor en moluscos cocidos congelados que en los vivos, existiendo una diferencia significativa ($p < 0,05$), entre las medias de ambos en los análisis realizados el 2 y 30 de Junio y en el del 7 de julio (Cuadro N° 14), y el NMP en las 80 unidades de muestra analizadas está muy por debajo de lo exigido tanto por el Ministerio de Salud a través del RSA (Cuadro N° 2) y por SERNAPESCA (Cuadro N° 4) y la UE (Cuadro N°3), por lo tanto, las 8 partidas estudiadas cumplen con los requisitos de exportación y de comercialización nacional.

Otros indicadores de contaminación fecal (aunque no tan específicos como *E. coli*), corresponden a los coliformes fecales, el cual es un subgrupo de los coliformes totales; en general, el NMP de coliformes totales es siempre mayor o igual que el NMP de coliformes fecales, lo que sucedió en este estudio, excepto en el muestreo del 30 Junio (Cuadro N°11), en donde 3 de las unidades de muestra de choritos vivos analizadas mostraron un valor mayor para los coliformes fecales en comparación con los coliformes totales. Lo anterior se pudo deber a que, la prueba del NMP entrega, como su nombre lo indica, el valor más probable de microorganismos presentes en una cierta cantidad de muestra de un alimento, siendo este valor una probabilidad estadística por lo que cae dentro de un rango que varía según los límites de confianza. Esta prueba, a diferencia de un recuento en placa es capaz de medir cantidades menores de microorganismos por gramo ($< 1,8$ NMP ufc), y cuando los valores son bajos la precisión de la prueba es mayor (el rango estadístico en donde se encuentra el NMP de microorganismos presentes es

más acotado), en cambio cuando la cantidad de microorganismos aumentan, la precisión de la prueba del NMP disminuye y el rango del NMP aumenta. Por lo tanto, lo ocurrido en el análisis realizado el 11 de Junio, al ser valores altos de coliformes, la diferencia entre los valores de los coliformes totales y fecales de los choritos vivos se explica por esta menor precisión de la prueba, en donde el mayor valor de los coliformes fecales se debe, probablemente, a que esta medición haya caído cerca del límite superior del rango para ese NMP, mientras que para los coliformes totales su NMP haya caído cercano al menor valor del rango de aceptación.

Al igual que en el caso de la *E. coli*, los valores de NMP para los coliformes fecales fueron bastante menores para las 40 unidades de muestra de choritos cocidos congelados. En los choritos vivos, en el muestro N° 7 (Cuadro N° 11), dos de las 5 unidades de muestra analizadas presentaron valores superiores al máximo permitido por el RSA (Cuadro N° 2), por lo que esta partida no es apta para su comercialización en Chile a menos que se comercialicen cocidos congelados, lo mismo en el caso de ser exportada a la Unión Europea.

Otro indicador de importancia lo constituye el Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), que se utiliza principalmente como predictor general de la calidad microbiológica de un alimento. En este recuento se incluyen bacterias (que pueden ser patógenas o no), de diversos géneros y características pero que se desarrollan a temperaturas medias (alrededor de los 35°C). Se podría pensar que existe una relación positiva entre altos recuentos de aerobios y altos recuentos de otras bacterias como *E. coli* o *S. aureus*. En una memoria de título desarrollada este mismo año (Casas, en desarrollo), en donde se analizaron choritos vivos y cocidos congelados al vacío provenientes de una zona de extracción tipo A, en Chiloé, se buscó la existencia de una correlación entre el RAM y el NMP de *E. coli* y entre el RAM y el recuento de *S. aureus* coagulasa positiva, y se determinó que no existe tal correlación ($p < 0,05$). El crecimiento óptimo de *E. coli* es a 44,5 °C, por lo que no debieran desarrollarse a la temperatura de incubación en la que se realiza el

recuento de aerobios mesófilos, por lo que la no relación entre ambas es esperable. *S. aureus* en cambio, se incuba a temperaturas medias (35°C), al igual que el RAM, pero *S. aureus* es una bacteria que requiere de condiciones especiales de crecimiento y que podría no desarrollarse si encuentra mucha competencia dentro del medio en el que se encuentra.

Al igual que en los casos anteriores, el RAM fue bastante menor en los choritos cocidos congelados que en los choritos vivos, por lo tanto, podría decirse que la cocción es un buen método para mejorar la calidad microbiológica general de un producto alimenticio. Esta diferencia fue significativa ($p < 0,05$), en todos menos en los análisis realizados el 13 de Abril y el 19 de Mayo (Cuadro N° 13). En el muestreo del 13 de Abril (Cuadro N° 8), 2 unidades de muestra de choritos cocidos congelados presentaron recuentos mayores que los choritos vivos. Esta excepción podría deberse a una contaminación posterior del producto asociada principalmente a su manipulación luego de la cocción. De las 80 muestras analizadas para el RAM, ninguna sobrepasó los niveles exigidos por las normativas planteadas anteriormente en este trabajo, por lo que serían alimentos aptos para su consumo y que presentan una buena calidad higiénica.

Finalmente, *S. aureus* es una bacteria que se utiliza como indicador de mala manipulación de los alimentos. Se sabe que *S. aureus* se ubica principalmente en el tracto respiratorio superior y son habitantes naturales de la piel de personas y animales de sangre caliente (Dwight y Biberstein, 2004 y Bhunia, 2008a).

Es importante evitar la contaminación excesiva de esta bacteria en los alimentos, puesto que aunque sus dosis infectivas sean altas (USA. FDA, 2011a), son capaces de producir enterotoxinas resistentes al calor y a las enzimas digestivas, que causan intoxicaciones alimentarias mediante la estimulación del centro del vómito a nivel central (Dwight y Biberstein, 2004), por lo que aunque el alimento sea cocinado estas toxinas no serán destruidas.

En un trabajo realizado en Brasil el año 2008 (Oliveira *et al.*, 2008), se comparó el recuento de *S. aureus* en moluscos posterior a la cocción (en agua y al vapor), luego de ser contaminados artificialmente y bajo dos tipos de almacenamiento. En este estudio se determinó que el recuento de *S. aureus* fue mayor en moluscos que fueron contaminados precocidos a aquellos que fueron contaminados crudos, tanto para aquellos grupos que fueron mantenidos en refrigeración como en aquellos que fueron mantenidos a temperatura ambiente. Dentro de los métodos térmicos que se utilizaron, la cocción en agua hirviendo fue más eficiente en la disminución de la carga microbiana en estos moluscos. Esto demuestra que la cocción es un método eficiente para disminuir la carga de esta bacteria en moluscos, y que por sobre todo es importante evitar la contaminación posterior a la cocción de estos alimentos, ya que al estar listos para su consumo esta contaminación constituye un riesgo para los consumidores.

En este estudio se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), entre las medias de los recuentos de choritos vivos y los recuentos en choritos cocidos congelados en los 3 primeros muestreos y en el quinto (Cuadro N° 15), y se mantuvo la tendencia de disminución de tales recuentos en los choritos cocidos congelados. Sin embargo, en el muestreo del 19 de Mayo (Cuadro N° 8), se observó en los choritos cocidos valores de recuento que sobrepasan a los obtenidos para los choritos vivos en ese mismo muestreo.

El análisis de *S. aureus* es realizado en choritos vivos para determinar la calidad higiénica de la materia prima y por lo tanto de su lugar de extracción, y en los choritos cocidos para determinar la calidad higiénica de su manipulación, siendo ésta especialmente importante porque luego de la cocción este alimento es prácticamente consumido tal cual. Es por esto que las exigencias son menores en los choritos vivos en relación a este parámetro. Según lo establecido en la Norma técnica Sección 2 del Programa de Certificación de SERNAPESCA, no está permitida la exportación de una partida que contenga 2 unidades de muestra entre 100 y 500 ufc/g, y no se acepta ninguna por sobre 500 ufc/g (Cuadro N° 4). Según

este criterio no podrían exportarse los choritos vivos provenientes de las partidas analizadas en el muestreo del 13 de Abril y del 6 de Mayo (Cuadros N° 5 y 7); sin embargo como se discutió antes, este producto es exportado principalmente cocido congelado.

Para el caso de los choritos cocidos congelados, los límites de aceptación son menores, por lo que según lo indicado por el RSA (Cuadro N°2) y por el Servicio Nacional de Pesca (Cuadro N° 4) no podría haber más de una unidad de muestra con recuentos entre 10 y 100 ucf/g. En cuanto a la exportación, la Unión Europea no permite productos que presenten más de 2 unidades de muestra entre 100 y 1000 ufc/g (Cuadro N° 3). El muestreo del 19 de Mayo (Cuadro N° 8) no cumplió con lo estipulado por ninguno de estos 3 organismos, por lo que tanto su comercialización en Chile como su exportación a la Unión Europea no serían posibles, y esta partida no es apta para consumo. En la Memoria de Título realizada por Rodolfo Casas (Casas, En Desarrollo), en choritos extraídos de una zona tipo A, se analizaron 10 partidas de las cuales 6 no resultaron aptas para su consumo debido a un excesivo contenido de *S. aureus*, observándose además que la carga microbiana fue mayor para los choritos cocidos congelados al vacío que para los vivos. Esto corrobora que la contaminación por *S. aureus* no ocurre y no depende principalmente de la calidad microbiológica del agua de la zona de donde son extraídos sino más bien de su manipulación posterior.

Luego de este estudio se puede apreciar que la calidad microbiológica del *Mytilus chilensis* extraído de una zona de producción tipo B es buena, ya que la bacteria que se encontró en mayor número durante este análisis (*S. aureus* coagulasa positiva), se asocia principalmente a malas prácticas de manipulación de los alimentos en la planta procesadora y no a la calidad microbiológica de la materia prima; ahí la importancia de una cuidadosa vigilancia y capacitación de los manipuladores de alimentos en plantas productoras de alimentos.

En resumen, como se trabajó con una planta cuyo producto final corresponde a choritos cocidos congelados, éstos pueden ser exportados a la Unión Europea, exceptuando la partida correspondiente al cuarto muestreo, realizado el 19 de Mayo, (Cuadro N°8) la que no fue apta, además, para su comercialización a nivel nacional.

7.- CONCLUSIONES

En este estudio se estableció qué:

- El Recuento de Aerobios Mesófilos en choritos vivos y cocidos congelados fue menor en estos últimos y presentó un rango relativamente parejo y similar en todas las partidas analizadas, indicando una calidad microbiológica general buena, tanto en la materia prima, como en el producto final analizado.
- El recuento de *S. aureus* coagulasa positiva en una de las partidas fue mayor en los cocidos congelados que en los vivos, por lo que su comercialización en Chile no es posible, ni tampoco su exportación a la Unión Europea, indicando una inadecuada manipulación luego de su procesamiento.
- El Número Más Probable de coliformes fecales en choritos vivos cumplió en todos los muestreos realizados con lo estipulado por el Reglamento Sanitario de los Alimentos salvo en la séptima partida estudiada, lo que no afecta la comercialización del producto cocido congelado.
- El NMP de *E. coli* β -glucuronidasa positiva fue menor en los choritos cocidos congelados y todas las muestras analizadas cumplieron con todas las normativas. Estos bajos recuentos además indican una baja contaminación fecal de estos mariscos.
- En ninguna de las 80 muestras analizadas se observó la presencia de *Salmonella* spp. por lo que, en relación a este parámetro todas las partidas analizadas pueden ser exportadas a la Unión Europea y ser comercializadas dentro del país, además de constituirse como un alimento seguro al no

presentar esta bacteria, que corresponde a un gran peligro para los consumidores.

- Finalmente, 7 de las 8 partidas analizadas cumplieron con todos los requisitos estipulados para asegurar su calidad y su inocuidad a los consumidores, establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos, y además 7 de las 8 partidas estudiadas son aptas para ser exportadas según lo estipulado por el Servicio Nacional de Pesca y por la Unión Europea.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- **AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G.F.** 2011. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. FRIN-03764. pp: 1 – 9.

- **AMICHILE. ASOCIACIÓN GREMIAL DE MITILICULTORES DE CHILE.** 2010. Exportaciones de Moluscos Seleccionados (Extracción y Cultivo). [en línea] <<http://www.dapel.cl/contenido/pdf/Marzo/04LISTA-RankingChoritos-OtrasEspeciesMar-2010Pag1-3.pdf>> [Consulta: 25-05-2010]

- **BHUNIA, A.** 2008a. *Staphylococcus aureus*. **In:** Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis. Editorial Springer. Nueva York, Estados Unidos. pp: 126 – 134.

- **BHUNIA, A.** 2008b. *Salmonella* entérica. **In:** Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis. Editorial Springer. Nueva York, Estados Unidos. pp: 201 – 215.

- **BHUNIA, A.** 2008c. *Escherichia coli*. **In:** Foodborne Microbial Pathogens. Mechanisms and Pathogenesis. Editorial Springer. Nueva York, Estados Unidos. pp: 183 – 200.

- **CASAS, R.** En desarrollo. Calidad Microbiológica de choritos (*Mytilus chilensis*), frescos y cocidos congelados envasados al vacío, provenientes de una planta exportadora, ubicada en puerto Montt. Memoria para optar al Título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile.

- **CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.** 1994. E. coli O157:H7: Procedure for Isolation and Identification from Stool Specimens. [en línea] <<http://wonder.cdc.gov/wonder/prevguid/p0000445/p0000445.asp>> [Consulta: 22-06-2010]

- **CHILE. INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2001. Norma Chilena Oficial NCh2635/1.Of2001. Productos Hidrobiológicos – Determinación de coliformes – Parte 1: Determinación de coliformes y coliformes fecales – Técnica del número más probable (NMP).

- **CHILE. INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2002. Norma Chilena Oficial NCh2659.Of2002. Productos Hidrobiológicos – Determinación de microorganismos aerobios mesófilos – Técnica de recuento en placa a 35°C.

- **CHILE. INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2002. Norma Chilena Oficial NCh2671.Of2002. Productos Hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva – Técnica de recuento en placa en agar Baird-Parker.

- **CHILE. INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2002. Norma Chilena Oficial NCh2675.Of2002. Productos Hidrobiológicos – Detección de *Salmonella*.

- **CHILE. INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2002. Norma Chilena Oficial NCh2732.Of2002. Moluscos Bivalvos – Determinación de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* – Técnica Número Más Probable (NMP).

- **CHILE. INN. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN.** 2007. Norma Chilena Oficial NCh3056Of.2007. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* β -glucuronidasa positiva – Técnica del Número Más Probable utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido.

- **CHILE. MINSAL. MINISTERIO DE SALUD.** 2010. Título V - De los Criterios Microbiológicos. Reglamento sanitario de los alimentos. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. In: Diario Oficial 13 Mayo 1997. Actualizado Junio 2010. pp: 69-84.

- **CHILE. SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA.** 2011a. Clasificación y Monitoreo de las áreas de extracción de Moluscos Bivalvos Unión Europea In: Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos. Norma Técnica Sección 2. SMB/NT2. 16 p.

- **CHILE. SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA.** 2011b. Habilitación de Plantas pesqueras y buques factoría In: Programa de Habilitación de Plantas pesqueras, Buques factoría y Embarcaciones. Manual de Procedimientos Sección 1. HPB/MP1. 30 p.

- **CHILE. SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA.** 2011c. Requisitos para la Aprobación de los Informes de Tratamientos Térmicos Utilizados en la Elaboración de Productos Pesqueros Cocidos o en Conserva, destinados a Exportación. In: Programa de Control de Tratamientos Térmicos. Norma Técnica Sección 1. CTT/NT1. 8 p.

- **CHILE. SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA.** 2011d. Requisitos Sanitarios y Planes de Muestreo para la Certificación Sanitaria de Productos Pesqueros de Exportación. In: Programa de Certificación. Norma Técnica Sección 2. CER/NT2. pp: 24 – 26.

- **CHILE. SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA.** 2011e. Requisitos Sanitarios para la Certificación de Productos Pesqueros de Exportación, de acuerdo con los Mercados de Destino. In: Programa de Certificación. Norma Técnica Sección 3. CER/NT3. pp: 32 – 45.

- **CHILE. SERNAPESCA. SERVICIO NACIONAL DE PESCA.** 2011f. Métodos de Análisis Microbiológicos para Productos Pesqueros de Exportación. **In:** Programa de Laboratorios. Norma Técnica Sección 7. LAB/NT7. 9 p.

- **DWIGHT, H.; BIBERSTEIN, E.** 2004. *Staphylococci*. **In:** Dwight, H.; MacLachlan, N.; Richard, W. (Eds). Veterinary Microbiology. Editorial Blackwell Publishing Professional. Iowa, Estados Unidos. pp: 153 – 158.

- **FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** 2000. Alimentos y Población: la FAO anticipa. [en línea]. <<http://www.fao.org/Noticias/2000/000704-s.htm>> [Consulta: 20-11-2010]

- **FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** 2002. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. [en línea] <<http://www.fao.org/DOCREP/004/Y3557S/y3557s06.htm>> [Consulta: 21-06-2011]

- **FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** 2009. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. **In:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp: 18 - 28

- **GONZÁLEZ, L.; HERNÁNDEZ, J.; SANTA CRUZ, S.** 1978. Algunos aspectos de la Tecnología de los Cultivos Marinos en Chile. **In:** Simposio sobre Acuicultura en América Latina. Montevideo, Uruguay. 26 Noviembre a 2 Diciembre. FAO, Informes de Pesca, n°159, v.1.

- **ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS.** 1999. Métodos de Muestreo para Análisis Microbiológicos. Principios y Aplicaciones específicas **In:** Microorganismos de los Alimentos. v.2. 2ª ed. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. pp: 18 - 28

- **ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS.** 2000. Significado de los Microorganismos y de sus toxinas en los Alimentos. Su significado y métodos de enumeración In: Microorganismos de los Alimentos. v.1. 2^a ed. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España. pp: 3-32

- **JAMES, M.** 2005. Establecimiento de Criterios Microbiológicos para la aceptación de un Lote In: Microbiología Moderna de los Alimentos. Capítulo 5. 5^a ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp: 99-112

- **KLODZINSKA, E.; SZUMSKI, M.; HRYNKIEWICZ, K.; DZIUBAKIEWICZ, E.; JACKOWSKI, M; BUSZEWSKI, B.** 2009. Differentiation of *Staphylococcus aureus* strains by CE, zeta potential and coagulase gene polymorphism. Electrophoresis 2009, 30: 3086-3091.

- **LEE, R.; LOVATELLI, A.; ABABOUC, L..** 2008. Why Depurate? In: Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. Capítulo 2. Roma, Italia. pp: 5 – 12

- **MARGALL, N.; DOMÍNGUEZ, A.; PRATS, G.; SALLERAS, L.** 1997. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Rev. Esp. de Salud Pública. 71(5): 437 – 443.

- **MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M.** 2007a. *Staphylococcus* y microorganismos relacionados In: Murray, P.; Rosenthal, K.; Pfaüer, M. (Eds.). Microbiología Médica. Capítulo 22. 5^a ed. Editorial Elsevier. Madrid, España. pp: 221 – 236.

- **MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M.** 2007b. *Enterobacteriaceae* In: Murray, P.; Rosenthal, K.; Pfaüer, M. (Eds.). Microbiología Médica. Capítulo 31. 5^a ed. Editorial Elsevier. Madrid, España. pp: 323 – 338.

- **NORAMBUENA, R.; GONZÁLEZ, L.** 2005. Visión general del sector acuícola nacional - Chile. **In:** National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Roma, Italia [en línea]
<http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_chile/es> [Consulta: 28-05-2010].

- **OLIVEIRA, E.; ANTUNES, J.; FABIANE, E.; PORTO, E.; ROSA, C.; OETTERER, M.** 2008. Quality of Mussels cultivated and commercialized in Ubatuba, SP, Brazil – Monitoration *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* growth after post-harvest processing. ISSN. 28(1): 152 – 159.

- **OLIVEIRA, J.; CUNHA, A.; CASTILHO, F.; ROMALDE, J.L.; PEREIRA, M.J.** 2010. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspective – A mini-review. Food Control. 22: 805 – 816

- **PLAZA, H.; ORTÚZAR, Y.; GONZÁLEZ, M.; AROS, J.** 2005. Estado de Situación y Perspectivas de la Industria del Chorito. FishingPartners Ltda. [en línea]
<<http://www.fishingpartners.cl/publicacion.php?id=1>> [Consulta: 28-05-2010]

- **TORO, J; ALCAPÁN, A; STEAD, R.** 2008. Cruzamientos Interpoblacionales en *Mytilus chilensis*, un bivalvo de importancia comercial y sus efectos sobre el crecimiento en longitud de la valva durante la etapa larval. **In:** Archivos de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. 40(3): 299 – 300.

- **UNIÓN EUROPEA. REGLAMENTO (CE) N° 2073/2005.** 2007. Relativo a los Criterios Microbiológicos aplicables a los Productos Alimenticios. **In:** Diario Oficial de la Unión Europea. 27 Diciembre 2007. pp: 17-29 [en línea]
<<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R2073:20071227:ES:PDF>> [Consulta: 5-06-2010]

- **URIARTE, I.** 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile **In:** Lovatelli, A; Farías, A; Uriarte, I (Eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. **In:** Taller técnico regional de la FAO. 20-24 Agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, Italia. pp: 61-75.

- **USA. FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011a. Pathogenic Bacteria Growth and Toxin Formation (other than *Clostridium botulinum*) as a Result of Time and Temperature Abuse. **In:** Guidance for the Industry: Fish and Fishery Products Hazards and Control Guidance. Capítulo 12. 4ª ed. pp: 209 – 243.

- **USA. FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011b. Pathogenic Bacteria Survival Through Cooking or Pasteurization **In:** Guidance for the Industry: Fish and Fishery Products Hazards and Control Guidance. Capítulo 16. 4ª ed. pp: 315 – 330.

- **USA. FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.** 2011c. Bacteria Pathogen Growth and Inactivation. **In:** Guidance for the Industry: Fish and Fishery Products Hazards and Control Guidance. Apéndice 4. 4ª ed. pp: 417 – 437.

- **VERA, W.** 2006. Identificación y Estudio de Cluster Exportadores Regionales. Región de los Lagos. pp: 27 – 74.

ANEXO N°1

Categorías de Riesgo según clase de peligro y condiciones de manipulación y almacenamiento del alimento.

Clase de peligro	Condiciones normales en las que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo		
	Grado de peligrosidad reducido	Sin cambio de peligrosidad	Aumenta la peligrosidad
Sin peligro directo para la salud.(contaminación general, vida útil y alteración)	Categoría 1 3 clases n=5 c=3	Categoría 2 3 clases n=5 c=2	Categoría 3 3 clases n=5 c=1
Peligro para la salud bajo, indirecto	Categoría 4 3 clases n=5 c=3	Categoría 5 3 clases n=5 c=2	Categoría 6 3 clases n=5 c=1
Moderado, directo, difusión limitada	Categoría 7 3 clases n=5 c=2	Categoría 8 3 clases n=5 c=1	Categoría 9 3 clases n=5 c=1
Moderado, directo, difusión potencialmente extensa	Categoría 10 2 clases n=5 c=0	Categoría 11 2 clases n=10 c=0	Categoría 12 2 clases n=20 c=0
Grave, directo	Categoría 13 2 clases n=15 c=0	Categoría 14 2 clases n=30 c=0	Categoría 15 2 clases n=60 c=0

Fuente: Chile. MINSAL. 2010. DTO N° 977196. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Diario Oficial 13 Mayo 1997. Actualizado Junio 2010.

En base a estas categorías de riesgo se define la severidad del programa de muestreo, determinándose el número de unidades de muestra que serán examinadas (n), la cantidad máxima de unidades de muestra defectuosas (c) y el tipo de plan de muestreo. En el plan de muestreo de 2 clases se divide la calidad del producto en dos grados de calidad: “aceptable” y “rechazable”, en cuanto a la comparación entre la presencia o ausencia de microorganismos o si la tasa microbiológica es inferior o superior a un nivel crítico establecido (c). En un plan de 3 clases la calidad de un producto se divide en tres grados: “aceptable” (límites de 0 a m , siendo m un valor del parámetro microbiológico bajo el cual el alimento no representa riesgo para la salud), “medianamente aceptable” (límites de m a M , siendo M un valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud), y “rechazable” (aquellos valores superiores a M). En el caso de un plan de muestreo de 3 clases, c se define como: el número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre m y M para que el alimento sea aceptable (Chile MINSAL, 2010).

ANEXO N° 2

Resumen transformación de datos para la realización del análisis estadístico.

Muestreo 1	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	580	2,763	0,8	0,255	175	2,243
	2	590	2,771	3,1	0,613	140	2,146
	3	690	2,839	0,2	0,079	170	2,230
	4	700	2,845	0,5	0,176	170	2,230
	5	1100	3,041	-0,2	0,079	300	2,477
Choritos Cocidos Congelados	1	580	2,763	-0,2	0,079	20	1,301
	2	540	2,732	-0,2	0,079	-10	1,000
	3	1500	3,176	-0,2	0,079	-10	1,000
	4	530	2,724	-0,2	0,079	-10	1,000
	5	880	2,944	-0,2	0,079	-10	1,000

Muestreo 2	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	380	2,580	-0,2	0,079	95	1,978
	2	450	2,653	0,5	0,176	35	1,544
	3	260	2,415	-0,2	0,079	55	1,740
	4	420	2,623	-0,2	0,079	75	1,875
	5	220	2,342	1,3	0,362	-10	1,000
Choritos Cocidos Congelados	1	30	1,477	-0,2	0,079	-10	1,000
	2	10	1,000	0,8	0,255	-10	1,000
	3	20	1,301	-0,2	0,079	-10	1,000
	4	15	1,176	-0,2	0,079	-10	1,000
	5	10	1,000	-0,2	0,079	-10	1,000

Muestreo 3	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	1500	3,176	-0,2	0,079	140	2,146
	2	850	2,929	2,2	0,505	210	2,322
	3	760	2,881	0,2	0,079	95	1,978
	4	600	2,778	-0,2	0,079	25	1,398
	5	560	2,748	-0,2	0,079	120	2,079
Choritos Cocidos Congelados	1	40	1,602	-0,2	0,079	10	1,000
	2	70	1,845	-0,2	0,079	10	1,000
	3	55	1,740	-0,2	0,079	5	0,699
	4	25	1,398	-0,2	0,079	10	1,000
	5	40	1,602	-0,2	0,079	-10	1,000

Muestreo 4	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	40	1,602	-0,2	0,079	-10	1,000
	2	220	2,342	-0,2	0,079	30	1,477
	3	280	2,447	1,3	0,362	14	1,146
	4	700	2,845	2,3	0,519	240	2,380
	5	990	2,996	-0,2	0,079	340	2,531
Choritos Cocidos Congelados	1	80	1,903	-0,2	0,079	1200	3,079
	2	75	1,875	-0,2	0,079	55	1,740
	3	1800	3,255	-0,2	0,079	430	2,633
	4	1300	3,114	-0,2	0,079	310	2,491
	5	980	2,991	-0,2	0,079	290	2,462

Muestreo 5	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	150	2,176	0,4	0,146	10	1,000
	2	340	2,531	2,2	0,505	95	1,978
	3	260	2,415	1,3	0,362	35	1,544
	4	270	2,431	2,3	0,519	90	1,954
	5	170	2,230	0,5	0,176	48	1,681
Choritos Cocidos Congelados	1	30	1,477	-0,2	0,079	10	1,000
	2	70	1,845	-0,2	0,079	-10	1,000
	3	15	1,176	-0,2	0,079	-10	1,000
	4	30	1,477	-0,2	0,079	-10	1,000
	5	30	1,477	-0,2	0,079	-10	1,000

Muestreo 6	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	2100	3,322	0,8	0,255	-10	1,000
	2	1400	3,146	0,5	0,176	-10	1,000
	3	2600	3,415	-0,2	0,079	-10	1,000
	4	1500	3,176	0,5	0,176	-10	1,000
	5	2200	3,342	-0,2	0,079	-10	1,000
Choritos Cocidos Congelados	1	300	2,477	-0,2	0,079	-10	1,000
	2	200	2,301	0,8	0,255	-10	1,000
	3	190	2,279	0,8	0,255	-10	1,000
	4	290	2,462	-0,2	0,079	-10	1,000
	5	110	2,041	0,2	0,079	-10	1,000

Muestreo 7	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	1400	3,146	0,7	0,230	9	0,954
	2	6600	3,820	1,7	0,431	50	1,699
	3	1600	3,204	0,5	0,176	15	1,176
	4	2100	3,322	0,05	0,021	-10	1,000
	5	1600	3,204	1,1	0,322	130	2,114
Choritos Cocidos Congelados	1	200	2,301	-0,2	0,079	-10	1,000
	2	90	1,954	-0,2	0,079	-10	1,000
	3	75	1,875	-0,2	0,079	-10	1,000
	4	90	1,954	-0,2	0,079	-10	1,000
	5	70	1,845	-0,2	0,079	-10	1,000

Muestreo 8	n	Recuento Aerobios Mesófilos Ufc/g	log	<i>E. coli</i> NMP/g	log	<i>S.aureus</i> Coagulasa (+) Ufc/g	log
Choritos Vivos	1	610	2,785	1,3	0,362	5	0,699
	2	1600	3,204	17	1,255	210	2,322
	3	950	2,978	2,3	0,519	25	1,398
	4	1100	3,041	1,3	0,362	50	1,699
	5	940	2,973	3,3	0,633	10	1,000
Choritos Cocidos Congelados	1	120	2,079	-0,2	0,079	-10	1,000
	2	35	1,544	0,2	0,079	5	0,699
	3	25	1,398	-0,2	0,079	-10	1,000
	4	30	1,477	-0,2	0,079	-10	1,000
	5	20	1,301	-0,2	0,079	-10	1,000