



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CHORITOS (*Mytilus chilensis*)  
FRESCOS Y COCIDOS CONGELADOS ENVASADOS AL  
VACÍO, PROVENIENTES DE UNA PLANTA EXPORTADORA,  
UBICADA EN PUERTO MONTT, CHILE.

**RODOLFO CASAS CÁRCAMO**

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



CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CHORITOS (*Mytilus chilensis*)  
FRESCOS Y COCIDOS CONGELADOS ENVASADOS AL  
VACÍO, PROVENIENTES DE UNA PLANTA EXPORTADORA,  
UBICADA EN PUERTO MONTT, CHILE.

## RODOLFO CASAS CÁRCAMO

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

NOTA FINAL: .....

NOTA                      FIRMA

PROFESORA GUÍA                      : ANITA SOTO CORTÉS                      .....                      .....

PROFESORA CONSEJERA : PILAR OVIEDO HANNIG                      .....                      .....

PROFESORA CONSEJERA : AUDREY GREZ VILLARROEL                      .....                      .....

SANTIAGO, CHILE

2011

**Esta memoria se realizó en el marco del proyecto: “Evaluación y optimización de los factores que influyen en la inocuidad de alimentos en base a recursos marinos y desarrollo de alimentos funcionales con componentes o subproductos de estos”, financiado por el programa Domeyko Alimentos de la Universidad de Chile.**

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	8
RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Acuicultura mundial y tendencias.....	3
2.1.1 Acuicultura en Chile .....	3
2.1.2 Miticultura en Chile .....	4
2.1.3 Exportaciones de chorito .....	4
2.2 Microorganismos en los alimentos. ....	5
2.2.1 Microorganismos indicadores.....	5
2.2.1.1 Microorganismos aerobios mesófilos .....	6
2.2.1.2 Coliformes fecales (bacterias enteréricas indicadoras).....	7
2.2.2 Microorganismos patógenos .....	7
2.2.2.1 Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) .....	9
2.2.2.2 <i>Salmonella spp.</i> .....	11
2.2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
2.2.2.4 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.3 Procesamiento de choritos cocidos congelados envasados al vacío. ....	19
2.3.1 Envasado al vacío .....	20
2.3.2 Cocción .....	20
2.3.3 Congelación.....	21

3. OBJETIVO GENERAL.....	22
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
5.1 Obtención de la muestra. ....	23
5.2 Análisis realizados .....	23
5.3 Planes de muestreo y criterios microbiológicos. ....	24
5.4 Análisis de resultados .....	28
6. RESULTADOS .....	30
7. DISCUSIÓN .....	34
8. CONCLUSIONES .....	39
9. BIBLIOGRAFÍA .....	41
10. ANEXOS .....	49
ANEXO 1. Detalle de resultados de análisis microbiológicos de las 10 tomas de muestra de choritos frescos y choritos cocidos congelados envasados al vacío. ....	49

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias patógenas transmitidas por productos hidrobiológicos. ....	8
Cuadro 2. Tipos de enfermedades transmitidas por productos hidrobiológicos.....	11
Cuadro 3. Límites microbiológicos y plan de muestreo para choritos frescos. ....	24
Cuadro 4. Límites microbiológicos y plan de muestreo para choritos cocidos congelados .	25
Cuadro 5. Plan de muestreo y determinaciones microbiológicas para moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos congelados frescos. ....	27
Cuadro 6. Plan de muestreo y determinaciones microbiológicas para moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos congelados cocidos. ....	27
Cuadro 7. Requisitos microbiológicos: criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos (Reglamento (CE) N° 1441/2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).....	28
Cuadro 8. Requisitos microbiológicos: criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos (Reglamento (CE) N° 1441/2007 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).....	28
Cuadro 9. Unidades de muestras de choritos frescos que exceden los límites exigidos por cada análisis microbiológico.....	31
Cuadro 10. Unidades de muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío que exceden los límites exigidos por cada análisis microbiológico. ....	32

Cuadro 11. Análisis de varianza entre los resultados de RAM de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. ....32

Cuadro 12. Análisis de varianza entre los valores de *S. aureus* de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. ....33

## **AGRADECIMIENTOS**

A las doctoras Anita Soto y Pilar Oviedo, por permitirme trabajar en su Departamento realizando mi memoria y por compartir conmigo sus conocimientos.

A la doctora Audrey Grez, por la buena disposición y ayuda entregada en la corrección de esta memoria.

A mi padre y hermanas, que confiaron en mí y siempre me apoyaron para sacar adelante esta ardua tarea.

A Ximena, por su paciencia y cariño incondicional.

Y especialmente a mi madre, a quien amo y extraño enormemente, ya que en vida me dio todo el amor, comprensión, disciplina y enseñanzas necesarias para que fuera una persona correcta y pudiera lograr todo mis sueños.



## RESUMEN

Uno de los objetivos más importantes para Chile es ubicarse, durante esta década, dentro de las diez primeras naciones exportadoras de alimentos. Esta meta sería alcanzable gracias a diversos rubros como la fruta, vinos, salmones y otros productos del mar, como el chorito (*Mytilus chilensis*), el cual es uno de los productos hidrobiológicos que ha tenido una mayor tasa de crecimiento en las últimas décadas en Chile, tanto en producción como en exportaciones hacia diversos mercados.

El chorito, por alimentarse a través de la filtración de material particulado presente en el agua, posibilita la acumulación de microorganismos o toxinas en el interior de sus carnes, lo que genera un potencial riesgo sanitario en este producto. Es por esto que el análisis de la calidad sanitaria de este tipo de productos toma mucha importancia.

Por lo anterior, el principal objetivo de este estudio estuvo dirigido a determinar la calidad microbiológica de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Para esto, se tomaron, desde una planta exportadora de choritos ubicada en Puerto Montt, 10 muestras de choritos frescos, con 5 unidades de muestra cada una, y 10 muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío, con 5 unidades de muestra cada una, dando un total de 50 unidades de muestras de choritos frescos y 50 unidades de muestra de choritos cocidos congelados envasados al vacío, con el fin de realizar a cada unidad de muestra 5 pruebas microbiológicas: Determinación de Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y coliformes fecales, para determinar si estos productos son aptos desde el punto de vista sanitario para poder ser distribuidos dentro de Chile y en el mercado europeo.

Los resultados de choritos frescos demostraron que 1 muestra no cumplieron con los requisitos para su distribución en Chile, debido a exceder el límite microbiológico establecido para coliformes fecales, y 4 muestras no cumplieron con los requisitos para su distribución en el mercado europeo, debido a exceder el límite microbiológico establecido para *Staphylococcus aureus*. A su vez, los resultados de choritos cocidos congelados envasados al vacío demostraron que 6 muestras no cumplieron con los requisitos sanitarios

para ser comercializados en Chile ni en el mercado europeo, debido a exceder el límite microbiológico establecido para *S. aureus*.

Los resultados obtenidos demostraron también cantidades aceptables de *Escherichia coli* y de Aerobios Mesófilos así como la ausencia de *Salmonella* en todas las unidades de muestras de choritos frescos y choritos cocidos congelados envasados al vacío.

En conclusión, 1 muestra de choritos frescos y 6 muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío no cumplieron con los límites microbiológicos establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile para la distribución de estos productos a nivel nacional, y 4 muestras de choritos frescos y 6 muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío no cumplieron con los límites microbiológicos establecidos por el mercado europeo, para su exportación a dicho continente.

## ABSTRACT

One of the most important objectives of Chile today is to be located during this decade in the top ten food-exporting nations worldwide. This aim would be achievable due to various items such as fruit, wine, salmon and other seafood, such as mussels (*Mytilus chilensis*), which is the seafood products who has had the higher rate of growth in recent decades in Chile, both in production and exports to major markets.

The mussel feed by filtering particulate matter from water, and this allows the microorganisms or toxins accumulation in their flesh, creating a potential risk health in this product. This is why the analysis of the mussels sanitary quality takes a lot of importance.

Therefore, the main objective of this study was to determine the microbiological quality of fresh mussels and cooked frozen vacuum-packed mussels. For this, were taken from a mussel exporting company located in Puerto Montt, 10 fresh mussels samples, with 5 units samples for each sampling, and 10 cooked frozen vacuum-packed mussels samples, with 5 units samples for each sampling, giving a total of 50 fresh mussel units samples and 50 frozen cooked mussel vacuum-packed units samples respectively, in order to do in each unit sample 5 microbiological testing: Determination of total plate count (RAM), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and fecal coliforms, to determine whether these products complied with the sanitary requirements to be distributed in Chile or in the european market.

Fresh mussels results showed that 1 sample did not meet the requirements for distribution in Chile, due to exceeding microbiological limit established for fecal coliform, and 4 samples did not meet the requirements for distribution in the european market due to exceed the microbiological limit established for *Staphylococcus aureus*. In turn, the frozen cooked vacuum-packed mussels results showed that 6 samples did not meet the sanitary requirements for their distribution in Chile or the european market due to exceed the microbiological limit set for *S. aureus*.

The results also showed acceptable amounts of *Escherichia coli* and aerobic mesophilic microorganisms (RAM) and absence of *Salmonella* in all units samples of fresh mussels and cooked frozen vacuum-packed mussels analyzed.

In conclusion, 1 fresh mussel sample and 6 frozen cooked vacuum-packed mussels samples did not meet the sanitary requirements for their distribution in Chile and 4 fresh mussel samples and 6 frozen cooked vacuum-packed mussels samples do not meet the microbiological limits set by European market for the export of these products to this continent.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años uno de los objetivos de Chile ha sido convertirse en una potencia alimentaria, aspirando a ubicarse durante esta década dentro de las diez primeras naciones exportadoras de alimentos a nivel mundial, distribuyendo sus productos en todos los rincones del planeta. Esta meta sería alcanzable gracias a diversos rubros como la fruta, salmones, vinos, alimentos procesados, carnes y otros productos del mar.

Desde el punto de vista pesquero y acuicultor, Chile es un país privilegiado. Frente a sus costas se encuentran ecosistemas de gran productividad, lo que evidentemente le otorga ventajas como productor de recursos pesqueros y de acuicultura, altamente valorados y demandados en los mercados mundiales.

Chile aspira a materializar exportaciones por US\$5.300 millones en productos del mar al año 2015, siendo el doble de lo que alcanza a comercializar esta industria en la actualidad, en los más de 60 mercados de destino con los cuales el país mantiene relaciones de negocios, por lo que el sector acuícola y mitícola nacional, como industrias que destinan una gran proporción de su producción a la exportación, deberán seguir creciendo para suplir la demanda internacional y seguir adecuando sus instalaciones y manejos sanitarios para cumplir en forma efectiva con la creciente normativa sanitaria para la inocuidad y calidad de los alimentos establecida por los mercados de destino.

Es por ésto que la inocuidad alimentaria cobra progresiva importancia, ya que obliga al país a contar con tecnologías que permitan una detección precisa, rápida y en niveles cada vez más finos, de cualquier sustancia o agente, que estén presentes en alimentos del mar, que puedan alterar la calidad de éstos y/o causar una Enfermedad Transmitida por los Alimentos (ETA).

Los sistemas relacionados con la inocuidad de los alimentos, y en particular los que otorgan garantías de calidad a los productos hidrobiológicos destinados a exportación, requieren conocimiento de información microbiológica de éstos, con el fin de ser capaces de tomar decisiones correctas en el momento que ocurre un problema, o incluso, para evitar su surgimiento (Rosmini *et al.*, 2002).

Los análisis microbiológicos, como métodos para prevenir el daño microbiológico o como un índice sanitario de los procesos de producción de alimentos se basan en la toma de muestras de materias primas y del producto final (Rosmini *et al.*, 2002).

Estos métodos deben proporcionar las bases necesarias para poder emitir, desde el punto de vista legal, dictámenes sobre la calidad e inocuidad microbiológica de los alimentos, especialmente cuando estos son objeto de un comercio internacional (ICMSF, 2000a).

Por todo lo anteriormente señalado, surgió el interés de conocer la calidad microbiológica de “choritos” (*Mytilus chilensis*) provenientes de una planta procesadora ubicada en Puerto Montt, con el fin de estudiar y poner en práctica los métodos de análisis microbiológicos que se usan para determinar el estado sanitario de estos productos.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Acuicultura mundial y tendencias**

La producción de la acuicultura mundial ha incrementado notoriamente en los últimos 50 años, saltando de una producción de menos de un millón de toneladas a comienzos de la década de 1950, a una producción de 51,7 millones de toneladas registrada para el año 2006, lo que representó un 36% de la producción pesquera mundial para ese año, con un valor de US\$78.800 millones.

En la actualidad, la acuicultura crece a un ritmo mayor que cualquier otro sector o industria destinada a la elaboración de productos de origen animal, con una tasa de crecimiento medio anual del 8,7% en todo el mundo desde 1970 (FAO, 2008), a diferencia de la pesca de captura que cesó su crecimiento a mediados de la década de 1980, siendo China el mayor productor acuícola del mundo, con el 49% de la producción mundial y América Latina y el Caribe el sector que presenta la mayor tasa de crecimiento medio anual, con un 22% (FAO, 2008).

Por su parte, la producción de moluscos provenientes de la miticultura llegó al año 2006 a una producción mundial de 14,1 millones de toneladas, lo que representó para ese año el 27% de la producción acuícola total, con un valor de US\$ 11.900 millones (FAO, 2008).

#### **2.1.1 Acuicultura en Chile**

La pesca y la acuicultura, luego de la minería y el sector forestal, son la tercera actividad productiva de mayor importancia en Chile, según retornos por exportación, y por su parte, el sector acuícola, es el que ha tenido mayor desarrollo en la economía chilena, presentando desde 1990 una tasa de incremento promedio anual en torno al 18,4% (Uriarte, 2008).

Siguiendo las tendencias mundiales, la participación de la acuicultura en los desembarques totales nacionales, ha crecido rápida y sostenidamente desde un 1,3% (70 mil toneladas) en 1990, hasta un 18,1% (870.845 toneladas) en el año 2008, en donde la cosecha de peces representó el 73% de la cosecha total, la cosecha de moluscos un 24% y la cosecha de algas un 3%. Estas cosechas provinieron de 1177 centros de acuicultura, y de éstos, 423 centros

cosecharon peces, 502 cosecharon moluscos y 252 cosecharon algas (Chile, Sernapesca, 2008).

Chile además, se encuentra ubicado entre los 10 principales productores y exportadores de productos hidrobiológicos para el consumo humano a nivel mundial (FAO, 2008), lo que se debe principalmente a la salmonicultura y miticultura, primera y segunda actividad acuícola de mayor importancia en el país, respectivamente, siendo el sector miticultor el que presenta la mayor tasa de crecimiento anual promedio.

### 2.1.2 Miticultura en Chile

En Chile, el cultivo de mitílidos se centra en 3 especies: el chorito o mejillón (*Mytilus chilensis*), el choro (*Choromytilus chorus*) y la cholga (*Aulacomya ater*). Las tres especies se encuentran en fase de desarrollo industrial, sin embargo, el chorito es el mitílido que ha alcanzado mayor impacto económico y social (Uriarte, 2008), y ya desde el año 2006 el 100% de la producción de choritos en Chile proviene de cultivos, cuando hace 20 años atrás cerca del 100% de la producción provenía de la captura de bancos naturales (Uriarte, 2008).

En el año 2008, la producción chilena de choritos alcanzó las 187.064 toneladas. De éstas, el 70% se obtuvo entre los meses de enero a mayo, el 99,9% provino de La X Región de Los Lagos (186.889 toneladas), y el 92% se elaboró como producto congelado, mientras que un 6,3% como conserva y un 1,6% como producto fresco-enfriado (Chile, Sernapesca, 2008).

### 2.1.3 Exportaciones de chorito

Según publicaciones de la empresa TechnoPress S.A. a través de su marca AQUA.cl, dedicada al desarrollo y posicionamiento a nivel interno y global de la industria acuícola-pesquera, las exportaciones de chorito durante el año 2009 experimentaron una baja de un 15% en relación al volumen y un 28% en valor en comparación con el año 2008, que fue el año más próspero, hasta la fecha, para las exportaciones nacionales de choritos, con 35.000 toneladas exportadas y US\$ 131.882 de ingresos (Directorioaqua, 2010a).



Sin embargo, en el primer tercio del año 2010, la exportación aumentó nuevamente, llegando a 18.100 toneladas exportadas en el acumulado entre enero y abril de ese año, con un total de US\$ 41.100, esto es 41% y 26% más, respectivamente, en comparación a los valores obtenidos durante el mismo período el año 2009. No obstante, los retornos obtenidos por las exportaciones durante el año 2010, son un 21% más bajo que los del año 2008. Esto se debe a la continua baja de precio por kilo de producto exportado, el cual fue de 2,8 US\$/kg el año 2008, 2,5 US\$/kg el 2009, y 2,3 US\$/kg en el 2010 (Directorioaqua, 2010b).

El principal país importador de choritos nacionales entre enero y abril el año 2010 fue España, con un 26% del volumen total (4.661 toneladas) y un 32% del retorno (US\$ 12.959), siguiéndole Francia e Italia (Directorioaqua, 2010b).

## **2.2 Microorganismos en los alimentos.**

Los alimentos consumidos por la población rara vez son de características estériles, ya que éstos en la mayoría de los casos están asociados con microorganismos. (Adams y Moss, 2008).

En el caso de los choritos, estos son moluscos bivalvos que se alimentan de microalgas y material particulado que captan a través de la filtración del agua que los rodea (Damaris *et al.*, 2010) y es este proceso de filtración que convierte a esta especie en potenciales vectores de agentes patógenos presentes en el agua de mar (incluyendo bacterias, virus y parásitos) (Love *et al.*, 2010), así como de toxinas marinas, pesticidas, desechos industriales, químicos, metales tóxicos y derivados de hidrocarburos por derrames de petróleo (Gosling, 1992; Pacheco y Olave, 2000; Campas *et al.*, 2007).

### **2.2.1 Microorganismos indicadores**

Se denomina de esta manera a microorganismos no patógenos, en su mayoría, pero que frecuentemente se asocian con ellos, y son utilizados para reflejar el riesgo de la presencia de microorganismos patógenos para los que no hay métodos de rutina para su detección. Su

uso se amplía corrientemente para designar especies o grupos de microorganismos cuya presencia en un alimento indica una exposición a condiciones que pueden causar contaminación por microorganismos peligrosos y/o permitir su crecimiento (ICMSF, 2000b).

Actualmente se usa la detección de microorganismos indicadores para revelar contaminaciones excesivas en alimentos frescos, métodos antihigiénicos de fabricación, contaminación de origen fecal, naso-faríngea o supurativa, condiciones incorrectas de almacenamiento en lo relativo al tiempo o a la temperatura y fallas en el procesamiento de los alimentos (ICMSF, 2000b).

Dentro de los microorganismos que se utilizan como indicadores de la calidad higiénica de alimentos se encuentran el Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), bacterias entéricas indicadoras (*E. coli*, coliformes fecales y enterobacteraceas) y otros microorganismos indicadores como *S. aureus* (ICMSF; 2000a).

#### 2.2.1.1 Microorganismos aerobios mesófilos

Los microorganismos aerobios mesófilos corresponden a un grupo de diferentes bacterias que se desarrollan en presencia de oxígeno a temperaturas medias entre 15°C y 45°C (Chile, INN, 2002a).

Los microorganismos mesófilos, muchos de origen humano o animal, incluyendo patógenos y numerosos tipos de los que alteran los alimentos, crecen a temperaturas moderadas, siendo el óptimo entre los 30 y 45 °C y una temperatura mínima de crecimiento que suele hallarse entre los 5 y 10 °C, y en un medio favorable, el tiempo de generación de muchos mesófilos a la temperatura óptima es de 0,5 horas, o menos aún (Umaña, 2007; ICMSF, 1984).

El hecho de que se desarrollen una gran cantidad de bacterias aeróbicas mesófilas en un alimento, indica que pudieron existir condiciones favorables a la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal, ya que todas las bacterias patógenas conocidas vehiculizadas por alimentos son mesófilas (ICMSF, 2000a).

Cuando el recuento de microorganismos aerobios mesófilos llega a  $10^6$  ufc (unidades formadoras de colonias) por gramo en un producto alimenticio, se supone que está comenzando, o está cerca de su deterioro (Ozogul *et al.*, 2004).

#### 2.2.1.2 Coliformes fecales (bacterias enteréricas indicadoras)

El término coliformes comprende a *E. coli* y diversas especies pertenecientes a otros géneros de la familia enterobacteraceae. Los coliformes están presentes en el suelo, agua, fecas, etc. y pueden ser patógenos para el hombre (ICMSF, 2000a).

Los coliformes, están conformados por microorganismos mesófilos aerobios y anaerobias facultativas, gram-negativos, no esporulados, que fermentan la lactosa, formando ácido y gas dentro de un período de 24 a 48 horas a temperatura de  $35\text{ °C} \pm 0,5\text{°C}$ . A este grupo pertenecen géneros bacterianos como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (Chile, INN, 2002d).

Los coliformes fecales representan a un grupo de microorganismos bacilares, no esporulados, gram-negativos, que fermentan la lactosa formando ácido y gas, dentro de un período de  $24 \pm 2$  horas a una temperatura de  $44,5 \pm 0,2\text{ °C}$ . Estos microorganismos están presentes en el intestino del hombre y otros animales de sangre caliente (Chile, INN, 2002d). Estos organismos pueden ser utilizados como indicadores de la posible presencia de patógenos de origen fecal en los alimentos y el agua (Richards y Watson, 2010). Una de las formas de realizar la determinación de coliformes fecales es mediante la técnica de Número Más Probable (Chile, INN, 2002d). Esta técnica, que cuantifica coliformes fecales, no es una prueba confirmatoria de *E. coli*, sino un método rápido y fiable que indica una alta posibilidad de presencia de *E. coli* (ICMSF, 2000a).

#### 2.2.2 Microorganismos patógenos

Son los microorganismos capaces de producir ETA (Enfermedad Transmitida por Alimentos). Las bacterias patógenas transmitidas por el consumo de productos hidrobiológicos se presentan en el Cuadro 1:

**Cuadro 1. Bacterias patógenas transmitidas por productos hidrobiológicos.**

		Modalidad de acción		Estabilidad de las toxinas al calor
		Infección	Toxina preformada	
Grupo 1 Bacterias Patógenas autóctonas	<i>Clostridium botulinum</i>		+	Baja
	<i>Vibrio</i> sp.	+		
	<i>V. Cholerae</i>		+	Baja
	<i>V. Parahaemolyticus</i>	+		
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+		
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	+		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	+		
	<i>Salmonella</i> sp.	+		
Grupo 2 Bacterias Patógenas no autóctonas	<i>Shigella</i>	+		
	<i>E. coli</i>	+		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		+	Alta

Fuente: FAO, 1997.

Las bacterias patógenas autóctonas son comunes y están ampliamente distribuidas en los medios acuáticos de diferentes lugares del mundo, pero la temperatura del agua tiene claramente un efecto selectivo sobre éstas, por lo tanto, los organismos psicrotóxicos (ejemplo, *C. botulinum* y *Listeria monocytogenes*) abundan en el Ártico y en los climas más fríos, mientras que los tipos mesofílicos (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*) representan parte de la flora natural de los mariscos de las zonas templadas o tropicales cálidas.

Si bien es verdad que todos los productos del mar que no han sido sometidos a un proceso bactericida pueden estar contaminados por uno o más de estos patógenos, normalmente el nivel de contaminación es bastante bajo, pero en el caso de los organismos filtradores,

pueden encontrarse niveles de contaminación con bacterias autóctonas capaces de producir enfermedad (FAO, 1997).

Las bacterias no autóctonas no son comunes en los medios acuáticos y llegan a los productos hidrobiológicos a través de la contaminación que se produce en las prácticas agropecuarias y procesos de elaboración, sin embargo, éstas tienen una importante participación en las ETA de origen marino.

En los últimos años en Chile se han registrado varios brotes de intoxicaciones asociadas al consumo de mariscos causadas por *Vibrio parahaemolyticus*, gastroenteritis por *Salmonella spp.*, hepatitis y el envenenamiento por toxinas marinas (Chile, Minsal, 2007).

#### 2.2.2.1 Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA)

Enfermedad Transmitida por los Alimentos (ETA) es un término que se aplica a todas las enfermedades que se adquieren por medio del consumo de alimentos contaminados, las que pueden ser clasificadas como infecciones o intoxicaciones (FAO/OMS, 2005).

Las infecciones son causadas por la invasión y multiplicación directa de microorganismos como bacterias, virus o parásitos dentro de un organismo superior.

Las intoxicaciones son enfermedades provocadas por la ingestión de alimentos contaminados con toxinas o productos metabólicos de microorganismos formados en tejidos de plantas o animales o por sustancias químicas que se incorporan a los alimentos en forma accidental, incidental o intencional en cualquier momento, desde su producción hasta el consumo (FAO, 2009).

Los diferentes tipos de intoxicaciones son:

- Intoxicaciones alimenticias naturales: ocurren por el consumo de alimentos de origen animal o vegetal que en su estado natural poseen sustancias altamente tóxicas. Por ejemplo, la intoxicación con veneno paralizante ocurre por el consumo de mariscos bivalvos frescos contaminados o por el consumo de pescado que contiene una toxina mortal denominada tetradontoxina (FAO, 2009).

- Intoxicaciones de origen microbiano: ocurren por el consumo de alimentos contaminados por toxinas producidas por bacterias y hongos patógenos, parásitos y virus (FAO/OMS, 2005).
- Intoxicaciones por plagicidas: generalmente ocurren por la ingestión de compuestos organoclorados y organofosforados en frutas y verduras o por mal uso durante el almacenamiento o el acondicionamiento y la desinfección de bodegas y camiones (FAO/OMS, 2005).
- Intoxicaciones por otros elementos químicos: como arsénico, cadmio, cromo, manganeso, mercurio, nitratos, nitritos, plomo, talio, mercurio, cobre, selenio, níquel y litio, ya sea en el agua, en los productos cárnicos o en los recipientes metálicos (FAO/OMS, 2005).

Las ETA constituyen un problema de salud pública y se reconoce cada vez más la importancia de sus repercusiones sobre la salud de la población, ya sea por la frecuencia con la que ocurren, como por el impacto social que pueden causar, afectando a una persona o a grupos de ellas y variando desde ligeros síntomas hasta la muerte. Algunas enfermedades transmitidas por alimentos, si bien son conocidas, se consideran emergentes porque están ocurriendo con mayor frecuencia y/o han ocasionado brotes epidemiológicos en varios países poniendo en evidencia la fragilidad de los programas de prevención y control de ETA. Es de destacar que las alergias por hipersensibilidad individual a ciertos alimentos no se consideran ETA (FAO, 2009).

Los tipos de ETA producidos por el consumo de productos hidrobiológicos se presentan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Tipos de enfermedades transmitidas por productos hidrobiológicos**

Tipo de enfermedad		
Infección	Bacteriana	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Shigella</i> spp.
	Viral	Hepatitis A, Norovirus, Hepatitis E
	Parasítica	Nematodos, Cestodos, Trematodos
	Toxi-infección	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
Intoxicaciones	Microbiana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium botulinum</i>
	Biotoxinas	Ciguatera, Veneno Paralizante del molusco (VPM), Diarreico (VDM), Amnésico (VAM), Neurotóxico (VNM), Histamina
	Químicas	Metales pesados: Mercurio, Cadmio, Plomo, Dioxinas

Fuente: FAO, 2003

Entre los agentes patógenos que se pueden encontrar en choritos se destacan *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los que se detallan a continuación.

#### 2.2.2.2 *Salmonella* spp.

Bacilos gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, móviles por cilios peritricos, no encapsulados. Pueden resistir la congelación, la desecación y mantienen su infectividad por semanas en hielo, alimentos, tierra o agua. *Salmonella* tiene tres tipos de antígenos: O somáticos, H flagelar y Vi de Superficie. Adicionalmente, los lipopolisacáridos de membrana, al ser liberados por lisis, actúan como endotoxinas (Chile, INN, 2002c).

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Adam y Moss, 2008), y posee más de 2000 serotipos. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y crece en límites de pH comprendidos entre 4,5 y 9, pudiendo colonizar en el tubo intestinal de una gran variedad de mamíferos, aves, reptiles, e incluso insectos (Ettinger y Feldman, 2002).

El cuadro clínico suele estar limitado a la invasión de la mucosa con signos típicos de enterocolitis aguda o puede desarrollar una septicemia potencialmente fatal con signos típicos de una enfermedad sistémica o incluso una coagulación intravascular diseminada. Las formas leves generan gastroenteritis con típicos síntomas de náuseas, vómitos y diarrea, no obstante, son autolimitantes y la infección se localiza en la mucosa y linfonódulos mesentéricos.

La infección se genera a través de la ruta fecal-oral, principalmente por ingestión de agua o alimentos contaminados, pudiendo sobrevivir en el ambiente por largos períodos de tiempo (Ettinger y Feldman, 2002).

La salmonelosis se encuentra en todo el mundo y es considerada una de las enfermedades zoonóticas más importantes. Asimismo, *Salmonella spp.* es uno de los patógenos de mayor relevancia en las enfermedades transmitidas por los alimentos en el mundo (Del Cerro *et al.*, 2003) atribuyéndosele por año 1,4 millones de casos de personas enfermas y aproximadamente 500 muertes (Li *et al.*, 2004).

Huevos, aves, carnes y productos cárnicos preparados insuficientemente cocidos son los vehículos más comunes de salmonelosis para los humanos (Martínez *et al.*, 2000), permitiendo que las salmonelas sobrevivan, o permitiendo la contaminación en forma cruzada con otros alimentos que son consumidos sin cocción (Adams y Moss, 2008).

Las medidas de control de la infección alimentaria producida por *Salmonella spp.* están orientadas a la higiene del lugar donde se cocina, cocinar los alimentos adecuadamente y evitar la contaminación cruzada entre alimentos cocidos y frescos. Otras medidas son la adquisición de productos alimenticios garantizados, y/o pasteurizados y la refrigeración rápida de los alimentos con el fin de evitar temperaturas templadas durante periodos largos de tiempo que contribuyan al desarrollo y multiplicación de estos gérmenes.



### 2.2.2.3 *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria gram-positiva, anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulante, con forma de coco y con un diámetro entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , pudiéndose encontrar aislada, en pares o formando racimos; la presencia de la actividad de catalasa se utiliza para diferenciarla de otros géneros pertenecientes a la familia Micrococcaceae.

*Staphylococcus aureus* es la única especie colonizadora del ser humano que produce la enzima coagulasa (Murray *et al.*, 2006), y además, las colonias de esta bacteria presentan una coloración dorada debido a los pigmentos carotenoides que forman durante su crecimiento.

La pared de *S. aureus* está formada por peptidoglicanos y ácidos teitoicos; posee un genoma circular; los genes que regulan la virulencia y la resistencia a los antibióticos se encuentran en cromosomas y en elementos extracromosómicos, que se transfieren entre diferentes cepas y especies de *Staphylococcus* o con otras especies de bacterias gram-positivas (Pereira *et al.*, 2009).

Este microorganismo puede presentar crecimiento bacteriano bajo las siguientes condiciones:

- **Temperatura:** 7 °C a 48,5 °C, con un rango óptimo de 30°C a 37°C.
- **pH:** 4,2 a 9,3 con un rango óptimo de 7 a 7,5.
- **Atmósfera:** Presenta un mejor crecimiento en ambientes oxigenados. El crecimiento disminuye en un 80% en presencia de CO<sub>2</sub> comparado al crecimiento en presencia de O<sub>2</sub> atmosférico (Le Loir *et al.*, 2003).
- **Actividad de Agua (a<sub>w</sub>):** Es muy resistente a la desecación, soportando un a<sub>w</sub> de 0,85, siendo su a<sub>w</sub> óptima de 0,99 (Le Loir *et al.*, 2003). *Staphylococcus aureus* se considera una bacteria patógena tolerante a a<sub>w</sub> reducidas, pudiendo desarrollarse hasta en valores de a<sub>w</sub> de 0,83.
- **Concentración de NaCl:** Soporta una concentración mayor al 25% (Le Loir *et al.*, 2003).

El espectro de infecciones por *S. aureus* varía de simples infecciones de folículos cutáneos a shock tóxico, dependiendo de numerosos factores de virulencia. Por otra parte, la

intoxicación alimentaria por *S. aureus*, depende de un solo tipo de factor de virulencia: las enterotoxinas.

Las enterotoxinas estafilocócicas son exoproteínas termoestables, solubles en agua y soluciones salinas, que forman una sola cadena con un peso molecular que va desde 26.000 a 29.600 Da (Normanno *et al.*, 2005).

Se han identificado 14 tipos de enterotoxinas, las cuales son muy estables y resistentes a la mayoría de las enzimas proteolíticas, como pepsina y tripsina, por lo tanto, logran mantener su actividad en el tracto digestivo después de la ingestión.

Estas enterotoxinas son nombradas de la siguiente forma: A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N y O; se caracterizan porque todas tienen actividad pirógena (superantígeno) y la mayor parte de ellas también presenta actividad emética (Le Loir *et al.*, 2003).

Se estima que la dosis infecciosa necesaria para inducir intoxicación alimentaria por enterotoxinas en las personas es alrededor de 0,1 ug, lo que varía con la sensibilidad y características del huésped (Le Loir *et al.*, 2003).

El ambiente necesario para que esta bacteria pueda sintetizar enterotoxinas es el siguiente:

- **Temperatura:** 10°C a 45°C, con un rango óptimo de 35°C a 40°C.
- **pH:** 4.8 a 9.0, con un rango óptimo de 5.3-7.0.
- **Atmósfera:** Existe una mayor producción en presencia de oxígeno.
- **Actividad del Agua ( $a_w$ ):**  $0.86 \geq 0.99$ , con un óptimo de  $\geq 0.90$ .
- **Concentración de NaCl:** debe ser menor al 12% (Le Loir *et al.*, 2003).

Las enterotoxinas son muy resistentes al calor, por ejemplo, el tiempo de supervivencia de la enterotoxina B en 149°C es de 100 minutos con un  $a_w$  de 0,99 y de 225 minutos en un  $a_w$  de 0,90 (Le Loir *et al.*, 2003).

Además debe destacarse que es muy difícil prever el impacto del tratamiento térmico sobre la actividad de estas toxinas, ya que depende del tipo y concentración de ellas junto con las características del alimento. Lo que sí está claro, es que las enterotoxinas pueden resistir

temperaturas y pH que fácilmente destruirían a las bacterias que las sintetizan (Le Loir *et al.*, 2003).

Los síntomas de una intoxicación alimentaria por *S. aureus* son de intensidad variable, y entre los signos más comunes están calambres abdominales, náuseas, vómitos y diarrea. Estos síntomas aparecen en forma rápida, pudiendo presentarse desde los 30 minutos a las 8 horas trascurrida la ingesta. La remisión espontánea por lo general se observa después de 24 horas (Normanno *et al.*, 2005).

A pesar de que la intoxicación por *S. aureus* transmitidas por los alimentos es una enfermedad leve, generalmente autolimitada (Dinges *et al.*, 2000), se requiere hospitalización en aproximadamente el 10% de los casos. Sin embargo, la intoxicación alimentaria por estafilococo representa una carga social considerable en términos de gastos de hospital, pérdida de días de pacientes que trabajan y la productividad, junto con los problemas y el costo de la eliminación de los alimentos contaminados (Normanno *et al.*, 2005).

Algunas cepas, llamadas "cepas endémicas", están presentes en algunas plantas de procesamiento de animales. Como consecuencia de esto, los productos alimenticios pueden contaminarse durante o después de la elaboración. *Staphylococcus aureus* se ha aislado de varios alimentos como carne y productos cárnicos, productos de pollo, leche y productos lácteos, alimentos fermentados, verduras, productos de la pesca, entre otros (Normanno *et al.*, 2005; Tamarapu *et al.*, 2001).

El principal reservorio de *S. aureus* es el hombre, estimándose que un 30% de las personas son portadores sanos, especialmente en sus fosas nasales, laringe, piel y mucosas, y a través de ellas se contaminan vestimentas, piel y ambientes de preparación de alimentos.

Las moscas son también importantes vectores de estas bacterias; como quedó comprobado en el estudio de Rey y Silvestre en donde el 80% de las moscas capturadas en lugares donde se venden, preparan o fabrican alimentos tiene *S. aureus* (Rey y Silvestre, 2005).

*Staphylococcus aureus* puede ser eliminado de los alimentos a través de un tratamiento térmico (pasteurización) o por la competencia con otras especies microbianas (en los

alimentos fermentados), mientras que las enterotoxinas pueden resistir la mayoría de los tratamientos utilizados durante el procesamiento de alimentos (Le Loir *et al.*, 2003).

#### 2.2.2.4 *Escherichia coli*

Microorganismo que corresponde a una bacteria mesófila del género *Escherichia*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que producen ácido y gas a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  mediante la fermentación de lactosa. Su hábitat normal es el intestino del hombre y de otros animales de sangre caliente (Chile, INN, 2002d).

Al ser *E. coli* un germen cuyo hábitat normal es el tracto intestinal del hombre y de los animales, su presencia en alimentos indica una contaminación directa o indirecta de origen fecal, lo que no constituye con certeza contaminación con microorganismos patógenos como *Salmonella spp.*, pero sí un riesgo de que pudieran estar presentes.

Para el género *E. coli* se describen más de 300 serotipos y para determinar el grupo patógeno al que pertenecen se desarrolló un esquema de serotipificación que varía continuamente y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo y la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indican el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodríguez, 2002).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ECET), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (ECEH o ECVT o ECST), enteroinvasiva (ECEI), enteropatógena (ECEP), enteroagregativa (ECEA) y adherencia difusa (ECAD).

*E. coli* enterotoxigénica (ECET): Colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias y su principal mecanismo de patogenicidad es la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST).

Son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir una diarrea pasajera. La enfermedad tiene un

periodo de incubación de 14 a 50 hrs. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ECET puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave (Rodríguez, 2002).

*E. coli* enterohemorrágica (ECEH): El periodo de incubación de ECEH es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas.

Su principal mecanismo de patogenicidad es la citotoxina STX y la contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 10<sup>8</sup> ufc (Rodríguez, 2002).

Dentro de este grupo se encuentra la cepa *E. coli* O157:H7, la cual no fermenta el sorbitol y no produce β-glucuronidasa y puede producir principalmente el síndrome urémico hemolítico. Se puede encontrar en bovinos, cabras y con menos frecuencia en cerdos y pollos; su principal reservorio es el intestino de ganado bovino. También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales como lechuga, rábanos, alfalfa; además en productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados, aun cuando estos alimentos tengan un pH de 3.4, condición en la que puede sobrevivir varios días. La transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche o agua contaminada; también puede ser de persona a persona o debida a los manipuladores de alimentos. Hay estudios que sugieren la importancia de la mosca doméstica como vector en la transmisión de *E. coli* O157:H7.

También hay cepas sorbitol positivo, y sus serotipos son diferentes del O157:H7. El cuadro clínico causado por las cepas no-O157 se caracteriza por diarrea acuosa con dolor abdominal y colitis hemorrágica. Las cepas no-O157 son capaces de causar brotes o casos aislados de diarrea y en ocasiones no se logra establecer la fuente de contaminación, aunque se sabe que se pueden aislar de los mismos alimentos que las cepas de serotipo O157:H7 y también de carne de ternera, pescado y mariscos.

*E. coli* enteroinvasiva (ECEI): El grupo ECEI son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas, y su mecanismo de patogenicidad es la invasión del epitelio del colon. Los síntomas característicos en personas infectadas por ECEI son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ECET. Las cepas ECEI se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Rodríguez, 2002).

*E. coli* enteropatógena(ECEP): ECEP fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad, la cual está mediada por pilis o fimbrias rizadas.

ECEP puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea y afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos.

Los reservorios de ECEP pueden ser niños y adultos con o sin síntomas y el cuadro clínico que produce se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (Rodríguez, 2002).

*E. coli* enteroagregativa (ECEA): En el mecanismo de patogenicidad de ECEA está implicada la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de ECEA para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea.

El sitio blanco de daño de ECEA puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente y en niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. Algunas veces el cuadro

clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómito y sin o con poca fiebre (Rodríguez, 2002).

*E. coli* de adherencia difusa (ECAD): Las cepas ECAD no forman microcolonias cuando se adhieren a células y se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.

Los resultados de aislamientos indican que el grupo más frecuente es el enterotoxigénico (48%), seguido por el enteroinvasivo (9%), el enteropatógeno (4%) y el enterohemorrágico (1%). Además, se encontró que la presencia de *E. coli* es mayor durante los meses húmedos y calurosos y afecta principalmente a niños menores de cinco años.

Cuando un laboratorio reporta el aislamiento de *E. coli* en un cuadro de diarrea, se debe tener presente su importancia como agente causal de cuadros graves de diarrea principalmente en niños menores de cinco años y no sólo considerarla como una bacteria de flora normal (Rodríguez, 2002).

### **2.3 Procesamiento de choritos cocidos congelados envasados al vacío.**

Los choritos pueden ser consumidos frescos o ligeramente cocidos, sin embargo, debido a su naturaleza filtradora, necesita de algún tipo de procesamiento que garantice y extienda su conservación y asegure su inocuidad para que pueda ser comercializado a diferentes partes del mundo (FAO, 2003).

Existen varias técnicas de procesamiento para la conservación de los choritos como la cocción, congelación, ahumado, salado, las conservas, entre otros (FAO, 2003).

Un correcto procesamiento asegura la destrucción de la mayoría de los microorganismos presentes en el alimento, y una extensión de la fase de latencia de las bacterias supervivientes, cesando su multiplicación y prolongando así la estabilidad del producto (Umaña, 2007).

En la actualidad, los procesamientos que se basan en el control de la temperatura, como la refrigeración, cocción y congelación, se consideran tecnologías muy eficaces para la conservación de alimentos, por ser tecnologías limpias y por preservar significativamente la

calidad sensorial y nutricional de los alimentos, además de poderse realizar con costos asumibles comercialmente (Umaña, 2007).

El control y la manipulación de la temperatura se encuentran entre los factores más críticos necesarios para el logro de un suministro alimenticio que reúna las propiedades sanitarias correctas (FAO, 1999) y sin duda es el más importante de los factores ambientales que afectan la viabilidad y el desarrollo microbiano (FAO, 2003). Según Umaña, el procesamiento de alimentos a través del aporte de mucho frío o calor constituye la forma más efectiva y eficiente de reducir la contaminación en las industrias alimentarias (Umaña, 2007), lo que es imprescindible para lograr un alimento con las propiedades sanitarias correctas (FAO, 1999), no obstante, es necesario recordar que para efectuar un correcto procesamiento térmico, de cualquier temperatura dada, es importante tanto la temperatura como el tiempo de exposición a la misma (ICMSF, 1984; Umaña, 2007).

#### 2.3.1 Envasado al vacío

Al colocar los choritos en envases sellados al vacío, tanto la respiración de los tejidos musculares como la respiración de la flora acompañante, hacen que al cabo de poco tiempo se consuma el oxígeno y aumente el dióxido de carbono de la atmósfera en el interior del envase. Ésto, sumado a la baja gradual del pH, debido al crecimiento de las bacterias lácticas, limita la velocidad de crecimiento de los organismos aeróbios típicamente responsables de la alteración, de forma que la vida media del producto aumenta en más del 50% (Murcia *et al.*, 2003; FAO, 2003). Pero para lograr los beneficios microbiológicos, la temperatura de almacenamiento de los productos envasados al vacío debe ser lo más baja posible, ya que al aumentar la temperatura disminuye la solubilidad del dióxido de carbono (Ozogul *et al.*, 2004).

#### 2.3.2 Cocción

El objetivo de la cocción en mariscos es destruir las células vegetativas bacterianas, así como los mohos y levaduras (FAO, 2002; ICMSF, 1984), por lo tanto, en los mariscos que han sufrido el proceso de cocción, los niveles medios observados de cualquier bacteria son de 5 a 6 log menos que los mariscos frescos que no han sufrido tratamiento alguno. Por lo tanto, los mariscos cocidos representan un riesgo de enfermedad mucho menor para los



consumidores (Depaola *et al.*, 2009). A su vez, cuando los choritos son inmersos en agua hirviendo, éstos se esterilizan después de 2 minutos y medio (FAO, 2001).

### 2.3.3 Congelación

La congelación consiste en la aplicación de temperaturas a los alimentos por debajo de cero grados centígrados, de forma que parte del agua del alimento se convierte en hielo. Al mismo tiempo, como el agua se solidifica, se produce una desecación del alimento, lo que contribuye de forma significativa a una mejor conservación. La temperatura de congelación de elección a nivel internacional es de  $-18^{\circ}\text{C}$ , ya que por debajo de ésta se estima que no es posible la proliferación de bacterias, por lo que disminuye la posibilidad de alteración y se reducen los riesgos para la salud (Umaña, 2007).

Para asegurar que se cumpla una congelación y almacenamiento adecuado, debe medirse la temperatura, en la superficie y en el centro térmico del alimento, y la del ambiente en que la congelación y el almacenamiento se efectúan, lo que implica obtener una medida precisa de la temperatura en el punto en que la medición se verifica y seleccionar localizaciones suficientemente representativas para obtener no sólo un promedio razonable, sino también un conocimiento idóneo de las variaciones de la temperatura (ICMSF, 1984; Umaña, 2007).

La congelación de los choritos se realiza en un túnel de congelación que trabaja en rangos de  $-25$  a  $-35^{\circ}\text{C}$ , y la temperatura del producto al final del proceso no supera los  $-18^{\circ}\text{C}$  en el centro térmico o los  $-21,5^{\circ}\text{C}$  al ser medida en la superficie de los choritos.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la calidad microbiológica de choritos (*Mytilus chilensis*) frescos y cocidos congelados envasados al vacío, provenientes de una planta exportadora ubicada en Puerto Montt, Chile.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Determinar el recuento de aerobios mesófilos en choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío.
- 2.- Determinar la presencia de *Salmonella spp.* en choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío.
- 3.- Determinar el Número Más Probable (NMP) de *Escherichia coli* en choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío.
- 4.- Determinar el Número Más Probable (NMP) de coliformes fecales en choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío.
- 5.- Determinar *Staphylococcus aureus* en choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío.
- 6.- Evaluar si los choritos frescos y choritos cocidos congelados envasados al vacío provenientes de una planta exportadora ubicada en Puerto Montt cumplen tanto con las normas microbiológicas para su distribución en Chile como con las normas microbiológicas para su exportación a la comunidad europea.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Obtención de la muestra.

Se obtuvieron muestras de materia prima (choritos frescos) y del producto final (choritos cocidos congelados envasados al vacío), de la misma partida o lote de alimento, provenientes de una planta exportadora, ubicada en Puerto Montt, Chile.

Se efectuaron 10 tomas de muestra integradas cada una por 5 unidades de muestra de choritos frescos y 5 unidades de muestra de choritos cocidos congelados envasados al vacío, teniendo cada unidad de muestra un peso de 500 gramos.

Las unidades de muestra llegaron en una caja sellada, a una temperatura de 0-4°C en el caso de las unidades de muestras de choritos frescos, y a -18°C en el caso de las muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío, y fueron analizadas en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### 5.2 Análisis realizados

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas microbiológicas en choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío:

- Determinación del Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), a través de la técnica de recuento en placa a 35 °C, según la Norma Chilena 2659.Of2002 (Chile, INN, 2002).
- Determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella spp*, según la Norma Chilena 2675.Of2002 (Chile, INN, 2002).
- Cuantificación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, a través de la técnica del recuento en placa en agar Baird Parker, según la Norma Chilena 2671.Of2002 (Chile, INN, 2002).
- Determinación de *Escherichia coli* glucuronidasa-positiva, a través de la técnica del Número Más Probable (NMP) utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol-B-D-glucuronido, según la Norma Chilena 3056. Of2007 (Chile, INN, 2007).
- Determinación de coliformes fecales, a través de la técnica del Número Más Probable (NMP), según la Norma Chilena 2732.Of2002 (Chile, INN, 2002).

### 5.3 Planes de muestreo y criterios microbiológicos.

Los límites microbiológicos y plan de muestreo utilizados en este estudio se basaron en el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile, actualizado el año 2010, que insta las condiciones sanitarias de los productos alimenticios destinados para consumo humano a nivel nacional (cuadros 3 y 4), así como también en la Normas Técnicas Sección 2 y 3 (CER-NT2 y CER-NT3), establecidas por el programa de certificación de productos de exportación del Servicio Nacional de Pesca (Chile, Sernapesca, 2011a; Chile, Sernapesca, 2011b). La norma CER-NT2 establece los requisitos sanitarios estándares, sin distinción de mercado de destino, que se deben cumplir para exportar productos pesqueros (cuadros 5 y 6), y la norma CER-NT3 establece los requisitos sanitarios específicos a cumplir por mercado de destino e incluye los requisitos para exportar a la comunidad europea (cuadros 7 y 8). Ambas normas son necesarias de cumplir para exportar choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío a la comunidad europea.

**Cuadro 3. Límites microbiológicos y plan de muestreo para choritos frescos.**

Parámetros Microbiológicos	Categoría	Clase	n	c	Límite por gramo	
					m	M
RAM	1	3	5	3	$5 \times 10^5$	$10^6$
Coliformes fecales en 100 g.	4	3	5	3	$2,3 \times 10^2$	$4 \times 10^2$
Salmonella en 25 g.	10	2	5	0	0	---

Fuente: Chile, Minsal, Reglamento Sanitario de los Alimentos, 2010.

**Cuadro 4. Límites microbiológicos y plan de muestreo para choritos cocidos congelados**

Parámetros Microbiológicos	Categoría	Clase	n	c	Límite por gramo	
					m	M
RAM	1	3	5	3	10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>
<i>E. coli</i>	4	3	5	3	10	10 <sup>2</sup>
Salmonella en 25 g.	10	2	5	0	0	---
<i>S. aureus</i>	8	3	5	1	10	10 <sup>2</sup>

Fuente: Chile, Minsal, Reglamento Sanitario de los Alimentos, 2010.

En donde:

- **n:** número de unidades de muestras a ser examinadas.
- **c:** número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M”.
- **m:** valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.
- **M:** valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.
- **Categoría:** La categoría indica la severidad del programa de muestreo del alimento en cuestión, relacionando el grado de peligrosidad que representa el alimento para la salud, dado por las especies microbianas para las que se realizará el análisis, con las condiciones posteriores de manipulación a las que el lote normalmente se expondrá en lo que se refiere al efecto sobre la tasa microbiana y el correspondiente cambio de peligrosidad.

La **Categoría 1** indica que el alimento no tiene un peligro directo para la salud.

La **Categoría 4** indica que el alimento presenta un peligro para la salud bajo e indirecto. Además, indica que existe un grado de peligrosidad reducido en las condiciones normales en las que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo.

La **Categoría 8** indica que el alimento presenta una clase de peligro moderado, directo y de difusión limitada. Además, indica que no existen cambios de peligrosidad en las condiciones normales en las que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo.

La **Categoría 10** indica que el alimento presenta una clase de peligro moderado, directo y de difusión potencialmente extensa. Además, indica que existe un grado de peligrosidad reducido en las condiciones normales en las que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo.

- **Clase:** Un Plan de 2 clases es un plan de muestreo en donde la calidad de un producto, de acuerdo con los criterios microbiológicos, puede dividirse en dos grados: "aceptable" y "rechazable", basado en comprobar la presencia o ausencia de microorganismos. Un plan de 2 clases queda descrito por  $n$  y  $c$ .

Un Plan de 3 clases es un plan de muestreo en donde la calidad de un producto, de acuerdo con los criterios microbiológicos, puede dividirse en tres grados: "aceptable", "medianamente aceptable" y "rechazable". La clase aceptable tiene como límites 0 y  $m$ ; la clase medianamente aceptable tiene como límites  $m$  y  $M$ , y la rechazable, son aquellos valores superiores a  $M$ . Un plan de tres clases queda descrito por  $n$ ,  $c$ ,  $m$  y  $M$  (Chile, Minsal, 2010).

**Cuadro 5. Plan de muestreo y determinaciones microbiológicas para moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos congelados frescos.**

Parámetros Microbiológicos	Categoría	Clase	n	c	Límite por gramo	
					m	M
RAM	1	3	5	3	$5 \times 10^5$	$10^6$
<i>E. coli</i>	4	3	5	3	$10^2$	$5 \times 10^2$
Salmonella en 25 g.	10	2	5	0	0	---
<i>S. aureus</i>	8	3	5	1	$10^2$	$5 \times 10^2$

Fuente: Chile, Sernapesca, 2011a.

**Cuadro 6. Plan de muestreo y determinaciones microbiológicas para moluscos bivalvos, gasterópodos, tunicados y equinodermos congelados cocidos.**

Parámetros Microbiológicos	Categoría	Clase	n	c	Límite por gramo	
					m	M
RAM	1	3	5	3	$10^5$	$5 \times 10^5$
<i>E. coli</i>	4	3	5	3	10	$10^2$
Salmonella en 25 g.	10	2	5	0	0	---
<i>S. aureus</i>	8	3	5	1	10	$10^2$

Fuente: Chile, Sernapesca, 2011a.

**Cuadro 7. Requisitos microbiológicos: Criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos (Reglamento (CE) N° 1441/2007 que modifica el Reglamento (CE) N°2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).**

Moluscos bivalvos vivos	Parámetros microbiológicos	Categoría	Clase	n	c	Límite por gramo	
						m	M
	<i>E. coli</i>	4	3	1	0	---	230 NMP/100g
	<i>Salmonella</i> en 25 g.	10	2	5	0	0	---

Fuente: Unión Europea, 2007.

**Cuadro 8. Requisitos microbiológicos: Criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos (Reglamento (CE) N° 1441/2007 que modifica el Reglamento (CE) N°2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios).**

Moluscos bivalvos procesados	Parámetros microbiológicos	Categoría	Clase	n	c	Límite por gramo	
						m	M
	<i>E. coli</i>	4	3	5	2	1	10
	<i>Salmonella</i> en 25 g.	10	2	5	0	0	---
	<i>S. aureus</i>	8	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>

Fuente: Chile, Sernapesca, 2011b; Unión Europea, 2007.

#### 5.4 Análisis de resultados

Los resultados de cada prueba microbiológica fueron evaluados en base a los límites microbiológicos establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile y por las Normas Técnicas Sección 2 (CER-NT2) y Sección 3 (CER-NT3) del Servicio Nacional de Pesca, con el fin de determinar si cumplen con los requisitos microbiológicos tanto para su distribución a nivel nacional como para la exportación hacia la comunidad europea.

Adicionalmente se realizaron análisis de varianza de una vía para el efecto del procesamiento de los choritos (frescos y cocidos congelados envasados al vacío), en donde



las variables respuestas o dependientes analizadas fueron los resultados del Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM) y cuantificación de *S. aureus* coagulasa-positiva, con un nivel de significación definido ( $\alpha=5\%$ ). El valor de las variables respuestas analizadas fue transformado a logaritmos debido al tipo exponencial de replicación de los microorganismos.

El modelo de los análisis de varianza efectuados se presenta a continuación:

$$Y_i = \mu + P_i + \varepsilon_i \quad \text{con } i=1,2$$

Donde:

$Y_i$  = respuesta al i-ésimo nivel de factor Procesamiento (P)

$\mu$  = media paramétrica de la población

$P_i$  = efecto del i-ésimo nivel del factor P

$\varepsilon_i$  = error aleatorio asociado a la observación i-ésima

Además, se realizó la prueba de comparaciones de Tukey para determinar la existencia de diferencias significativas entre los niveles del factor procesamiento.

## 6. RESULTADOS

En las pruebas de Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), determinación de *E.coli* glucuronidasa-positiva y determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp., el total de las unidades de muestras analizadas (100), que comprenden choritos frescos (50) y cocidos congelados envasados al vacío (50), tuvieron valores bajo el límite “m” establecido para estos parámetros por el RSA y las Normas Técnicas Sección 2 (CER-NT2) y Sección 3 (CER-NT3) (Chile, Sernapesca, 2011a; Chile, Sernapesca, 2011b) como queda demostrado en los Cuadros 9 y 10.

Por su parte, en la prueba de determinación de coliformes fecales, de las 50 unidades de muestra de choritos frescos analizadas, el 98% de estas (49) tuvieron valores inferiores al límite “m”, y solo el 2% (1) sobrepasó el valor de “M” para este parámetro (Cuadro 9), mientras que de las 50 unidades de muestra de choritos cocidos congelados al vacío analizadas, el 100% de estas tuvieron valores por bajo al límite “m” para este parámetro (Cuadro 10).

Por último, en la prueba del recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa-positiva, de las 50 unidades de muestras analizadas de choritos frescos, 64% de éstas (32) tuvieron valores bajo el límite “m”, 24% (12) entre “m” y “M” y 12% de las muestras (6) superaron el límite “M” (Cuadro 9); de las 50 unidades de muestras analizadas de choritos cocidos congelados envasados al vacío, 52% de las unidades de muestras (26) tuvieron valores bajo el límite “m”, 18% (9) entre “m” y “M” y el 30% de las muestras (15) superaron el límite “M” (Cuadro 10).

En base a esto se determinó la aceptación o rechazo de los lotes originarios de las unidades de muestras analizadas, según los límites microbiológicos establecidos para cada prueba por el RSA y las Normas Técnicas Sección 2 (CER-NT2) y Sección 3 (CER-NT3). Así, 9 de 10 tomas de muestra de choritos frescos (materia prima) fueron catalogadas como aceptadas y 1 como rechazada (tomas de muestra n° 8) por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Cuadro 9); a su vez, 6 de 10 tomas de muestra de choritos frescos (materia prima) fueron catalogadas como aceptadas y 4 como rechazadas (tomas de muestra n° 4, 5, 6 y 7) por las Normas Técnicas CER-NT2 y CER-NT3 (Cuadro 9). Y en el caso de

las tomas de muestra de choritos cocidos congelados envasados al vacío (producto final), 4 fueron catalogadas como aceptadas y 6 como rechazadas (tomas de muestra n° 3, 4, 5, 6, 8 y 9) tanto por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile como por las Normas Técnicas CER-NT2 y CER-NT3 (Cuadro 10).

**Cuadro 9. Unidades de muestras de choritos frescos que exceden los límites exigidos por cada análisis microbiológico.**

Número de muestras	RAM		<i>E. coli</i>		Colif. fecales		<i>S. aureus</i>		<i>Salmonella spp.</i>		Requisitos nacionales	Requisitos de UE	
	c	>M	C	>M	c	>M	c	>M	c	>M	RSA	CER-NT2	CER-NT3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A
4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	A	R	R
5	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	A	R	R
6	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	A	R	R
7	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	A	R	R
8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	R	A	A
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	A	A	A
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A

En donde:

Unidades de muestras: conjunto de unidades que se examinan y conforman la muestra.

c: número de unidades de muestra que pueden tener una cantidad de microorganismos entre m y M (si c es mayor al permitido por RSA o CER-NT2 o CER-NT3 el alimento es rechazado)

>M: cantidad de microorganismos que representan un riesgo para la salud (por lo que siempre debe ser cero; si es mayor a cero, el alimento se rechaza inmediatamente)

A: Aceptación del lote de donde proviene la muestra

R: Rechazo del lote de donde proviene la muestra

**Cuadro 10. Unidades de muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío que exceden los límites exigidos por cada análisis microbiológico.**

Número de muestras	RAM		<i>E. coli</i>		Colif. Fecales		<i>S. aureus</i>		<i>Salmonella spp.</i>		Cumple requisitos nacionales	Cumple requisitos de UE	
	c	>M	C	>M	c	>M	c	>M	c	>M	RSA	CER-NT2	CER-NT3
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A
3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	R	R	R
4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	R	R	R
5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	R	R	R
6	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	R	R	R
7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	A	A	A
8	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	R	R	R
9	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	R	R	R
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	A	A	A

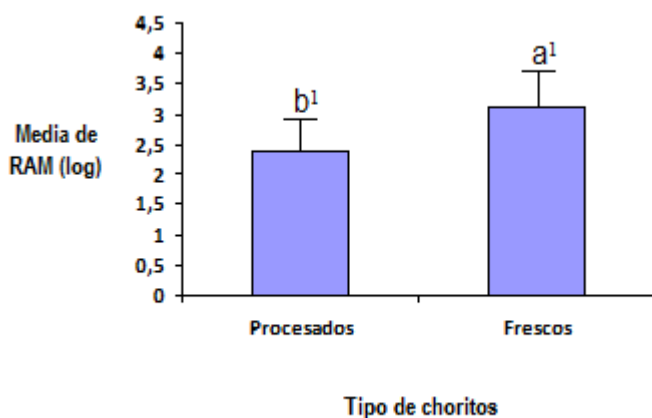
A partir del análisis de varianza efectuado entre los resultados de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío para la prueba de Recuento de Aerobios Mesófilos (cuadro 11) se puede afirmar que el Procesamiento sí influye sobre la variable Recuento de Aerobios Mesófilos, para el nivel de significación definido ( $\alpha=5\%$ ).

**Cuadro 11. Análisis de varianza entre los resultados de RAM de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío.**

F.V	SC	GI	CM	F	p-valor
Procesamiento	12,91	1	12,91	20,26	<0,0001
Error	62,44	98	0,64		
Total	75,39	99			

A su vez, la prueba de Tukey dió como resultado que sí existen diferencias significativas entre los niveles del factor procesamiento (frescos y cocidos congelados envasados al vacío) en la prueba de Recuento de Aerobios Mesófilos (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Medias de RAM para choritos procesados y frescos**



<sup>1</sup> = Barras con letras distintas indican diferencias significativas (Tukey,  $p < 0,05$ ).

El análisis de varianza efectuado entre los resultados de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío para la prueba de cuantificación de *Staphylococcus aureus* indicó que el procesamiento no influye significativamente sobre la variable cuantificación de *Staphylococcus aureus* (cuadro 12).

**Cuadro 12. Análisis de varianza entre los valores de *S. aureus* de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío.**

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Procesamiento	0,84	1	0,84	1,74	0,1908
Error	47,38	98	0,48		
Total	48,22	99			

## 7. DISCUSIÓN

El principal motivo de rechazo de las muestras choritos frescos y de cocidos congelados envasados al vacío provenientes de la planta exportadora que participó en el presente estudio fue la superación de los límites establecidos para el microorganismo *S. aureus* coagulasa positivo.

La importancia de *S. aureus* coagulasa positivo como causa de eliminación de partidas de choritos también quedó en evidencia en otro estudio realizado en Chile en el cual se analizó la calidad microbiológica de choritos frescos y procesados utilizando los mismos parámetros que los efectuados en esta memoria (Arroyo, 2011), y en donde el parámetro que produjo el rechazo de 1 toma de muestra (de 8) de choritos procesados fue también la cuantificación de *S. aureus* coagulasa positivo.

En la actualidad, *S. aureus* es considerado como un importante problema de Salud Pública (Pereira *et al.*, 2009) y las intoxicaciones alimentarias producidas por esta bacteria son una causa frecuente de Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) en todo el mundo (Kérouantona *et al.*, 2007).

Existen varias condiciones que se asocian con el crecimiento de estafilococos en los alimentos, tales como una manipulación inadecuada y falta de higiene, retraso en el procesamiento, almacenamiento inadecuado, mala higiene personal, contaminación cruzada, contaminación post-proceso o una combinación de cualquiera de éstas (Simon y Sanjeev, 2007). Sin embargo, la presencia de *S. aureus* en productos hidrobiológicos generalmente indica higiene deficiente o contaminación de origen humano post tratamiento. (Chile, INN, 2002b; Figueroa *et al.*, 2002).

Los resultados de las pruebas realizadas ponen de relieve la no existencia de estrictas medidas higiénicas y preventivas que eviten la presencia de *S. aureus* en los choritos (Pereira *et al.*, 2009), haciendo hincapié en la necesidad de mejorar y mantener las normas higiénicas y sanitarias a lo largo de toda la cadena alimentaria, así como también la necesidad de instruir a los trabajadores en la forma en que se aplican estas prácticas (Normanno *et al.*, 2005). Además, debido a que una parte importante de las contaminaciones microbianas que se producen en los choritos son causadas por equipos

sucios y por el propio diseño de los equipos, es vital que las instalaciones de éstos se diseñen pensando en su programa de limpieza y sanitización para mantener bajo control la calidad sanitaria de los productos finales (Pereira *et al.*, 2009).

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo relativamente extendido en el medio ambiente y es un hallazgo común en los humanos (Figueroa *et al.*, 2002). De hecho, 20 a 30% de las personas adultas sanas son portadores persistentes de *S. aureus* en la nariz, garganta o en infecciones de la piel y 50% a 60% son portadores intermitentes (OMS, 2006; Figueroa *et al.*, 2002), siendo éste el motivo de por qué el contacto a través de las manos es la vía de transmisión más frecuente (OMS, 2006), y también el motivo de por qué este microorganismo puede ser fácilmente transferido a los alimentos durante su manipulación (Pereira *et al.*, 2009; Simon y Sanjeev, 2007).

Según Normanno *et al.* (2005), hay una gran probabilidad de que los alimentos puedan contaminarse con *S. aureus*, debido a su ubicuidad en los humanos, ambiente y animales. Ésto hace necesario que se tomen estrictas medidas sanitarias en las operaciones de procesamiento y manipulación de los alimentos, así como un estricto control de las medidas de prevención para evitar el crecimiento bacteriano y la consiguiente producción de toxinas de *S. aureus* (Muñoz *et al.*, 2008).

En un estudio realizado en Chile por Figueroa *et al.* (2002) se determinó que el 34% de los manipuladores de alimentos eran portadores de *S. aureus* a nivel retrofaríngeo y el 19% estaba colonizado con cepas enterotoxigénicas, lo que hace necesario establecer políticas de educación y capacitación de manipuladores para evitar la transmisión de este agente al alimento.

Es conocido que el factor de virulencia más notable asociado a este microorganismo son las enterotoxinas termoestables que causan el síndrome de intoxicación alimentaria (Pereira *et al.*, 2009). Así, diferentes estudios han demostrado que el 69 a 74% de los estafilocos coagulasa positivos aislados de diferentes alimentos resultan ser enterotoxigénicos, presentando uno (12%) o más genes (88%) para la formación de enterotoxinas (Pereira *et al.*, 2009; Lawrynowicz-Paciorek *et al.*, 2007). Esto señala el riesgo potencial de los consumidores al ingerir alimentos en donde haya existido la multiplicación de *S. aureus*

coagulasa positivos, debido a la posible formación de enterotoxinas (Normanno *et al.*, 2005).

Además de la higiene deficiente en los equipos de procesamiento o la contaminación de origen humano post tratamiento, otra posible causa de los recuentos de *S. aureus* obtenidos en este estudio puede ser la acción selectiva de los tratamientos térmicos efectuados en los choritos cocidos congelados, así como también la acción selectiva del envasado al vacío. Ello porque *S. aureus* puede sobrevivir en envases sellados al vacío y en productos mantenidos congelados ya que es resistente al shock del frío y la congelación no lo afecta (ICMSF, 1984; Jay, 2000). No obstante, su crecimiento, y sobre todo su capacidad para formar enterotoxinas se ven inhibidas en una limitada disponibilidad de oxígeno y en temperaturas inferiores a 10° C (Le Loir *et al.*, 2003). Sin embargo, es posible contraer una intoxicación alimentaria mediante la ingesta de un alimento que se haya mantenido congelado pero en donde se hayan generado toxinas previamente (ICMSF, 1984).

Asimismo, el proceso de congelación, al reducir la  $a_w$  de los alimentos, elimina una mayor proporción de bacterias gram-negativas, debido a que son más sensibles a  $a_w$  reducidas, lo que genera el decrecimiento de la competencia para las bacterias gram-positivas que sobreviven a la congelación (Jay, 2000). Además, *S. aureus* es la única bacteria patógena que se desarrolla en valores de  $a_w$  entre 0,93 y 0,85, siendo el principal peligro para la salud en alimentos con  $a_w$  reducidas (Le Loir *et al.*, 2003)

Con respecto al empleo de calor como tratamiento térmico, la mayoría de las bacterias muere tras unos minutos a 70-80°C y en los alimentos húmedos ninguna bacteria resiste más que una exposición de segundos a 100°C. Por ello, los tratamientos que no llegan a destruir por completo la microflora original dejan una población residual que se impone posteriormente en éstos (ICMSF, 1984; Jay, 2000).

En el caso de las bacterias mesófilas, las más termosensibles pueden ser destruidas con una exposición de 10 minutos a 55°C, y las más termoresistentes requieren para su destrucción, una exposición de 10 minutos a una temperatura de 70°C (ICMSF, 1984; Jay, 2000). Esto explicaría por qué se obtuvieron, tanto en este estudio como en el realizado por Arroyo (Arroyo, 2011), valores más bajos de microorganismos en las unidades de muestras de



choritos cocidos congelados al vacío que en las unidades de muestra de choritos frescos en las pruebas de RAM y enumeración de *E. coli* glucuronidasa-positiva.

Por otra parte, la total destrucción de las bacterias de *Salmonella spp.* en un alimentos se puede lograr a 90°C en 1 minuto, por lo que es considerada una bacteria termosensible (Adam y Moss, 2008). Ello explicaría la ausencia de *Salmonella spp.* en las 50 unidades de muestras analizadas de choritos cocidos congelados envasados al vacío, así como también en las 40 unidades de muestras de choritos procesados analizadas en el estudio de Arroyo (Arroyo, 2011).

En general, la composición microbiológica de los choritos frescos es un reflejo de las aguas desde donde se cosechan, por lo que el agua en donde crecen los choritos tiene un papel muy importante en la calidad microbiológica de los productos finales (Vernocchi *et al.*, 2007; Jay, 2000). Por lo tanto, los resultados de las pruebas efectuadas a los choritos frescos en este estudio sugieren una excelente calidad de las aguas de donde los choritos son cosechados, ya que el 98% (49) de las unidades de muestra de choritos frescos presentaron resultados aceptables y sin riesgo para la salud pública en las pruebas que tienen relación con los microorganismos presentes en el agua, es decir RAM y determinación de coliformes fecales, y solo el 2% de las unidades de muestra de choritos frescos, es decir, una unidad de muestra, presentó un resultado inaceptable para la prueba de determinación de coliformes fecales.

La adecuada calidad de las aguas de la décima región, en donde son cultivados y cosechados la mayoría de los choritos producidos en Chile se vuelve a demostrar en los resultados del estudio realizado por Arroyo (2011), en donde se analizaron 40 unidades de muestra de choritos frescos provenientes de ésta, y se obtuvieron resultados aceptables y sin riesgo para la salud pública en todas las unidades de muestra para las pruebas de Recuento de Aerobios Mesófilos y coliformes fecales.

Al investigar la calidad microbiológica de choritos, Vernocchi *et al.* (2007), sugiere una relación entre la temporada de cosecha de los choritos y su calidad microbiológica, ya que al disminuir la temperatura del agua de mar aumenta la capacidad de filtración de los choritos, por el incremento de la actividad metabólica de éstos, lo que genera, al momento de cosecharlos, recuentos microbiológicos más altos (Ramón y Richardson, 1992;

Vernocchi *et al.*, 2007). Esta relación fue confirmada en el estudio de Vernocchi *et al.* (2007), en donde los resultados microbiológicos de los choritos cosechados en los meses de invierno no fueron aceptables según las normas italianas y europeas, a diferencia de los resultados microbiológicos de los choritos cosechados en los meses con mayor temperatura ambiental, que sí fueron aceptables. No obstante, en el presente estudio, los resultados de las pruebas que tienen relación con la carga de microorganismos presentes en el agua y con la capacidad filtradora de los choritos, vale decir RAM y determinación de coliformes fecales, fueron aceptables a lo largo de todo el año, tanto en choritos frescos como en choritos cocidos congelados envasados al vacío.

Finalmente, es importante recalcar que los resultados de todas las pruebas microbiológicas efectuadas tanto en choritos frescos como en choritos cocidos congelados envasados al vacío son exclusivamente válidos para la planta exportadora de choritos que participó en el presente estudio y son válidos para un periodo acotado de tiempo, que comprendió entre septiembre de 2008 a julio de 2009.

## 8. CONCLUSIONES

En esta memoria se pudo determinar qué:

El Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM) presentó valores aptos para el consumo en todas las muestras analizadas, lo que indica una calidad microbiológica general buena, tanto en la materia prima (choritos frescos) como en el producto final (choritos procesados).

La determinación del NMP de *E. coli* presentó valores aptos para el consumo en todas las muestras analizadas. Estos resultados indican que tanto choritos frescos como cocidos congelados envasados al vacío presentan una muy baja contaminación de origen fecal en general.

Se determinó la ausencia de *Salmonella spp* en todas las muestras de choritos frescos y de choritos cocidos congelados envasados al vacío, lo cual es de suma relevancia para la salud pública, debido a que esta bacteria representa un peligro importante para los consumidores.

En el análisis de NMP de coliformes fecales en choritos cocidos congelados envasados al vacío, se obtuvieron valores aptos para el consumo en todas las muestras analizadas.

No obstante, en una muestra de choritos frescos se obtuvo un valor microbiológico de NMP de coliformes fecales no apto para el consumo, de acuerdo a lo establecido por el Reglamento Sanitario de los Alimentos, lo que implica algún grado de contaminación de origen fecal en el lote originario de la muestra en cuestión.

Al realizar la cuantificación de *S. aureus* coagulasa positiva en choritos frescos, en 4 muestras se obtuvieron valores no aptos para el consumo, y al efectuar la cuantificación de *S. aureus* coagulasa positiva en choritos cocidos congelados envasados al vacío, en 6 muestras se obtuvieron valores no aptos para el consumo. Estos resultados ponen en relieve el riesgo potencial que tienen los consumidores de estos productos, y subrayan la necesidad de mejorar ya sea las prácticas de higiene y manipulación o los métodos de procesamiento en la planta exportadora.

Finalmente, 1 muestra de choritos frescos y 6 muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío no cumplieron con los requisitos microbiológicos establecidos por el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile para la comercialización de estos productos dentro del territorio chileno, y 4 muestras de choritos frescos y 6 muestras de choritos cocidos congelados envasados al vacío no cumplieron con los requisitos microbiológicos establecidos por las Normas del Servicio Nacional de Pesca para la exportación de estos productos hacia la comunidad europea.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- **ADAMS, M.; MOSS, M.** 2008. Food Microbiology. 3ª ed. The Royal Society of Chemistry. Guildford, UK. 477 p.
- **CAMPAS, M.; PRIETO, B.; MARTY, J.** 2007. Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety. *Talanta*. 72 (3):884–895.
- **CHILE. INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN).** 2002a. NCh 2659.Of2002 Productos hidrobiológicos - Determinación de microorganismos aerobios mesófilos - Técnica de recuento en placa. 15 enero 2002. 15 p.
- **CHILE. INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN).** 2002b. NCh 2671.Of2002 Productos hidrobiológicos – Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva - Técnica de recuento en placa en agar Baird-Parker. 24 enero 2002. 16 p.
- **CHILE. INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN).** 2002c. NCh 2675.Of2002 Productos hidrobiológicos – Detección de *Salmonella*. 13 marzo 2002. 19 p.
- **CHILE. INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN).** 2002d. NCh 2732.Of2002 Moluscos bivalvos – Determinación de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* – Técnica Número Más Probable (NMP). 19 julio 2002. 31 p.
- **CHILE. INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN).** 2007. NCh 3056.Of2007 Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal – Método para la enumeración de *Escherichia coli* B-glucuronidasa-positiva – Técnica del número más probable utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-glucuronido. 23 febrero 2007. 13 p.
- **CHILE. MINSAL (MINISTERIO DE SALUD).** 2007. Situación Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Chile. Departamento de Epidemiología.

División de Planificación Sanitaria. Ministerio de Salud. [Diapositivas]. Santiago, Chile. 28 diapositivas.

- **CHILE. MINSAL (MINISTERIO DE SALUD).** 2010. Decreto Supremo N° 977/96 Reglamento Sanitario de los Alimentos. Santiago, Chile. 13 de mayo de 1997. Actualizado 25 de junio del 2010. 174 p.

- **CHILE. SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA).** 2008. Anuario estadístico 2008. 329 p.

- **CHILE. SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA).** 2011a. Programa de certificación. Norma Técnica Sección 2: Requisitos sanitarios y planes de muestreo para la certificación sanitaria de productos pesqueros de exportación. 102 p.

- **CHILE. SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA).** 2011b. Programa de certificación. Norma Técnica Sección 3: Requisitos sanitarios para la certificación de productos pesqueros de exportación, de acuerdo con los mercados de destino. 71 p.

- **DAMARIS, A.; MEUJO, A.; DION, K.; JIANGNAN, BOWLING, J.; JIANPING, L.; HAMANNAC, M.** 2010. Reducing Oyster-Associated Bacteria Levels Using Supercritical Fluid CO<sub>2</sub> as an Agent of Warm Pasteurization. *Int J Food Microbiol.* 138(12): 63–70.

- **DEL CERRO, A.; SOTO, M.; MENDOZA, M.** 2003. Virulence and microbial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolates from samples of animal origin. *Food Microbiology.* 20(4):431-438.

- **DEPAOLA, A.; JONES, J.; NOE, K.; BYARS, R.; BOWERS, J.** 2009. Survey of postharvest-processed oysters in the United States for levels of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot.* 72(10):2110-3.

- **DINGES, M.; ORWIN, P.; SCHLIEVERT, P.** 2000. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin. Microbiol. Rev. 13:16–34.
  
- **DIRECTORIOAQUA.** 2010a. Exportaciones de otras especies: Enero – Diciembre 2008 y 2009. [En línea].  
<[http://www.directorioaqua.com/contenido/pdf/est\\_dic/04%20LISTA-Ranking%20Choritos-Otras%20Especies%20DIC-2009%20Pag1-3.pdf](http://www.directorioaqua.com/contenido/pdf/est_dic/04%20LISTA-Ranking%20Choritos-Otras%20Especies%20DIC-2009%20Pag1-3.pdf)> [consulta:20-08-2010].
  
- **DIRECTORIOAQUA.** 2010b. Exportaciones de otras especies: Enero - Abril 2009 y 2010. [en línea]. <<http://www.directorioaqua.com/contenido/pdf/Abril/04%20LISTA-Ranking%20Choritos-Otras%20Especies%20ABR-2010%20Pag1-3.pdf>> [consulta:20-08-2010].
  
- **ETTINGER, S; FELMAN, E.** 2002. Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 2274 p.
  
- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION).** 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. 174 p.
  
- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION).** 1999. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. 144 p.
  
- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION).** 2001. Processing Mussels, Cockles and Whelks. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. 14 p.
  
- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION).** 2002. Nutrición humana en el mundo desarrollado. Departamento de Agricultura de la FAO. Roma, Italia. 509 p.

- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION).** 2003. Fisheries Issues: Utilization and trade. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia. 23 p.
  
- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION).** 2008. El estado de la pesca y la acuicultura 2008. Roma, Italia. 218 p.
  
- **FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION).** 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Roma, Italia. 187 p.
  
- **FAO/OMS (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD).** 2005. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de Alimentos para las Américas y el Caribe. San José, Costa Rica. 5 p.
  
  
- **FIGUEROA, GUILLERMO; NAVARRETE, PAOLA; CARO, MARICELA; TRONCOSO, MIRIAM; FAÚNDEZ, GUSTAVO.** 2002. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. Revista Médica de Chile. 130: 859-864.
  
- **GOSLING, E. M.** 1992. The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and cultura. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 588 p.
  
- **ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS).** 1984. Ecología microbiana de los alimentos 1: Factores que afectan la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. 2 ed. Acribia. Zaragoza, España. 317 p.



- **ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS).** 2000a. Microorganismos de los alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración. 2 ed. Acribia. Zaragoza, España. 454 p.
  
- **ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS).** 2000b. Microorganismos de los alimentos 2: Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. 2 ed. Acribia. Zaragoza, España. 215 p.
  
- **JAY, M.** 2000. Modern food microbiology. 6th ed. Aspen Publishers, Inc. Maryland, Estados Unidos. 637 p.
  
- **KÉROUANTONA, A.; HENNEKINNEA, J.; LETERTREA, C.; PETITA, L.; CHESNEAUB, O.; BRISABOISA A.; DE BUYSER, M.** 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiology.* 115(3):369-375
  
- **LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M.; KOCHMAN, M.; GROCHOWSKA, A.; WINDYGA, B.** 2007. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 117:319–323.
  
- **LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M.** 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2 (1): 63-76.
  
- **LI, Q.; SHERWOOD, J.; LOGUE, C.** 2004. The prevalence of *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 on bison carcasses during processing. *Food Microbiology.* 21(6):791-799.
  
- **LOVE, D.; LOVELACE, G.; SOBSEY, M.** 2010. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters

(*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. *Int J Food Microbiol.* 143(3):211-7

- **MARTINEZ, E.; SOTO, S.; HERNANDEZ, J.** 2000. Incidencia de patógenos en productos cárnicos y métodos para prevenirlos. *Carnetec.* 7(4):44-47.

- **MERCK.** 2010. ChromoCult TBX Agar. Selective agar for the detection and enumeration of *Escherichia coli* in foodstuffs, animal feed and water. [en línea]. <[http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/TBX\\_Agar\\_116122\\_Brochure\\_engl.pdf](http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/TBX_Agar_116122_Brochure_engl.pdf)> [consulta:21-11-2010].

- **MILLER, E.; CULLOR, J.** 2002. Seguridad alimentaria. En Hand, M. Nutrición clínica en pequeños animales. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina. 18 p.

- **MUÑOZ, D.; GRAU DE MARIN, C.; MARTINEZ, C.; MARVAL, H., ZERPA, A.** 2008. Prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. y enterobacterias en carne de pepitona, Arca zebra, comercializada en Cumaná, Venezuela. [en línea]. *Zootecnia Trop.* 26(4):505-513.

- **MURCIA, M.; MARTÍNEZ, M.; VERA, A.** 2003. Extending the shelf-life and proximate composition stability of ready to eat foods in vacuum or modified atmosphere packaging. *Food Microbiology.* 20:671–679

- **MURRAY, P.; PFALLER, M.; ROSENTHAL, S.** 2006. *Microbiología Médica.* 5ª ed. Elsevier. Madrid, España. 974 p.

- **NORMANNO, G.; FIRINUB, A.; VIRGILIOB, S.; MULAB, G.; DAMBROSIOA, A.; POGGIUB, A.; DECASTELLIC, L.; MIONID, R.; SCUOTAE, S.; BOLZONIF, G.; DI GIANNATALEG, E.; SALINETTIH, A.; LA SALANDRAI, G.; BARTOLIJ, M.; ZUCCONB, F.; PIRINOB, T.; SIASB, S.; PARISII, A.; QUAGLIAA, N.;**

**CELANOVA, G.** 2005. Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiology*. 98(1):73-79.

- **OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD).** 2006. Guías para la calidad del agua potable. 3ª ed. Ginebra, Suiza. 398 p.

- **OZOGUL, F.; POLAT, A.; OZOGUL, Y.** 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. 85:49–57

- **PACHECO, E; OLAVE, S.** 2000. Cultivo de choritos en la zona sur de Chile. Proyecto “Innovaciones en la tecnología de cultivo de chorito (*Mytilus chilensis*), tendientes a mejorar la calidad y rentabilidad de la actividad mitícola en la X Región”. Instituto de Fomento Pesquero. Valparaíso, Chile. 23 p.

- **PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P.** 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology*. 26:278–282

- **REY, A.; SILVESTRE, A.** 2005. Comer sin riesgos 2: Las enfermedades transmitidas por alimentos. 2 ed. Pais. Editorial Hemisferio Sur. 300 p.

- **RICHARDS, G.; WATSON, M.** 2010. Fluorogenic Membrane Overlays to Enumerate Total and Fecal *Escherichia coli* and Total Vibrionaceae in Shellfish and Seawater. *Int J Microbiol*. 9 p.

- **RODRÍGUEZ, G.** 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex*. 44(5):464-475.

- **ROSMINI, M.; SIGNORINI, M.; SCHNEIDER, R.; BONAZZA, J.** 2002. Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk. *Food Control*. 15(1):39-44.
  
- **SIMON, S.; SANJEEV, S.** 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*. 18:1565–1568
  
- **TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J.; DRAKE, M.** 2001. Development of a multiplex Polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.* 64:664–668.
  
- **UMAÑA, E.** 2007. Conservación de alimentos: Refrigeración/Congelación. Fundación para la Innovación Tecnológica Agropecuaria. 88 p.
  
- **URIARTE, I.** 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. En A. Lovatelli, A. Farías e I Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. FAO: Actas de Pesca y Acuicultura. Puerto Montt, Chile. 14 p.
  
- **UNIÓN EUROPEA.** 2007. Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la comisión relativa a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 18 p.
  
- **VERNOCCHI, P.; MAVEI, M.; LANCIOTTI, R.; SUZZI G.; GARDINI, F.** 2007. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea. *Food Control*. 18:1575–1583.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. Detalle de resultados de análisis microbiológicos de las 10 tomas de muestra de choritos frescos y choritos cocidos congelados envasados al vacío.

Cuadro 1. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°1.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$3,0 \times 10^2$	2,48	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	2	$5,2 \times 10^2$	2,72	<0,2	<1,8	$5,0 \times 10^1$	1,70	Ausencia
	3	$2 \times 10^1$	1,30	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	4	$1 \times 10^1$	1,00	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	5	<10	0,95	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>1,69</b>				<b>1,1</b>	
<b>Producto final (Cocido Congelado y envasado al Vacío)</b>	1	$3,5 \times 10^2$	2,54	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	2	$7,2 \times 10^2$	2,86	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	3	$6 \times 10^1$	1,78	<0,2	<1,8	10	1,00	Ausencia
	4	$9 \times 10^1$	1,95	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	5	$5 \times 10^1$	1,70	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>2,17</b>				<b>0,96</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli* β-Glucuronidasa positiva

Cuadro 2. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°2.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$3 \times 10^1$	1,48	<0,2	43	<10	0,95	Ausencia
	2	$3 \times 10^1$	1,48	<0,2	<1,8	$1,0 \times 10^2$	2,00	Ausencia
	3	$8 \times 10^2$	2,90	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	4	$1,2 \times 10^3$	3,08	<0,2	15	<10	0,95	Ausencia
	5	$2 \times 10^3$	3,30	<0,2	9,2	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>2,45</b>				<b>1,16</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$4 \times 10^1$	1,60	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	2	$3 \times 10^1$	1,48	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	3	$2 \times 10^1$	1,30	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	4	$1 \times 10^1$	1,00	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	5	<10	0,95	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>1,27</b>				<b>0,95</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva

Cuadro 3. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°3.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$3 \times 10^2$	2,48	2,3	<1,8	10	1,00	Ausencia
	2	$7,6 \times 10^2$	2,88	2,3	<1,8	$3,5 \times 10^1$	1,54	Ausencia
	3	$7 \times 10^2$	2,85	2,3	<1,8	$2,0 \times 10^1$	1,30	Ausencia
	4	$1,2 \times 10^2$	2,08	9,4	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	5	$3,6 \times 10^2$	2,56	13	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>2,57</b>				<b>1,15</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$5 \times 10^1$	1,70	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	2	$6 \times 10^1$	1,78	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	3	$4,1 \times 10^2$	2,61	<0,2	<1,8	$2,0 \times 10^1$	1,30	Ausencia
	4	$6,2 \times 10^2$	2,79	<0,2	<1,8	$5,0 \times 10^1$	1,70	Ausencia
	5	$6,1 \times 10^2$	2,79	<0,2	<1,8	$5,0 \times 10^1$	1,70	Ausencia
<b>Promedio (log)V</b>			<b>2,33</b>				<b>1,32</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva

Cuadro 4. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°4.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$4,5 \times 10^2$	2,65	0,2	<1,8	$7,0 \times 10^1$	1,85	Ausencia
	2	$1,2 \times 10^3$	3,08	<0,2	9,2	$2,5 \times 10^2$	2,40	Ausencia
	3	$9,1 \times 10^2$	2,96	0,2	<1,8	$1,5 \times 10^2$	2,18	Ausencia
	4	$1,8 \times 10^3$	3,26	0,2	<1,8	$4,1 \times 10^2$	2,61	Ausencia
	5	$2,2 \times 10^3$	3,34	0,8	<1,8	$1,8 \times 10^2$	2,26	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,06</b>				<b>2,26</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$2,0 \times 10^3$	3,30	<0,2	<1,8	$1,6 \times 10^2$	2,20	Ausencia
	2	$2,3 \times 10^3$	3,36	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	3	$2,5 \times 10^2$	3,40	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	4	$4,0 \times 10^2$	2,60	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	5	$7,0 \times 10^2$	2,85	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,10</b>				<b>1,2</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva



Cuadro 5. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°5.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$6,7 \times 10^{-2}$	2,83	<0,2	2,0	$2,0 \times 10^1$	1,30	Ausencia
	2	$1,5 \times 10^{-3}$	3,18	0,5	2,0	$4,5 \times 10^{-2}$	2,65	Ausencia
	3	$1,8 \times 10^{-3}$	3,26	0,5	<1,8	$7,2 \times 10^{-2}$	2,86	Ausencia
	4	$2,0 \times 10^{-3}$	3,30	<0,2	<1,8	$2,0 \times 10^{-2}$	2,30	Ausencia
	5	$1,4 \times 10^{-3}$	3,15	<0,2	<1,8	$2,1 \times 10^{-2}$	2,32	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,14</b>				<b>2,29</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$1,8 \times 10^{-3}$	3,26	<0,2	<1,8	$4,6 \times 10^{-2}$	2,66	Ausencia
	2	$1,2 \times 10^{-3}$	3,08	<0,2	<1,8	$1,4 \times 10^{-2}$	2,15	Ausencia
	3	$1,1 \times 10^{-3}$	3,04	<0,2	<1,8	$2,7 \times 10^{-2}$	2,43	Ausencia
	4	$2,4 \times 10^{-3}$	3,38	<0,2	<1,8	$1,6 \times 10^{-2}$	2,20	Ausencia
	5	$1,8 \times 10^{-3}$	3,26	<0,2	<1,8	$1,7 \times 10^{-2}$	2,23	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,20</b>				<b>2,33</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva

Cuadro 6. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°6.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$6,6 \times 10^3$	3,82	11	17	$8,9 \times 10^2$	2,95	Ausencia
	2	$1,5 \times 10^4$	4,18	4,9	7,2	$1,8 \times 10^3$	3,26	Ausencia
	3	$1,4 \times 10^4$	4,15	54	34	$1,2 \times 10^3$	3,08	Ausencia
	4	$8,8 \times 10^3$	3,94	22	11	$1,4 \times 10^3$	3,15	Ausencia
	5	$8,7 \times 10^3$	3,94	31	7,2	$9,4 \times 10^2$	2,97	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>4,01</b>				<b>3,08</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$1,3 \times 10^3$	3,11	<0,2	<1,8	$2,0 \times 10^2$	2,30	Ausencia
	2	$3,8 \times 10^3$	3,58	<0,2	<1,8	$1,9 \times 10^2$	2,28	Ausencia
	3	$6,3 \times 10^2$	2,80	<0,2	<1,8	$1,0 \times 10^2$	2,00	Ausencia
	4	$1,7 \times 10^3$	3,23	<0,2	<1,8	$3,8 \times 10^2$	2,58	Ausencia
	5	$4,7 \times 10^3$	3,67	<0,2	<1,8	$3,4 \times 10^2$	2,53	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,28</b>				<b>2,34</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva

Cuadro 7. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°7.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$2,6 \times 10^3$	3,41	<0,2	<1,8	$8,5 \times 10^1$	1,93	Ausencia
	2	$2,3 \times 10^3$	3,36	0,2	14	$1,2 \times 10^2$	2,08	Ausencia
	3	$2,4 \times 10^3$	3,38	<0,2	7	$2,3 \times 10^2$	2,36	Ausencia
	4	$2,2 \times 10^3$	3,34	0,8	<1,8	$1,6 \times 10^2$	2,20	Ausencia
	5	$1,3 \times 10^3$	3,11	0,8	<1,8	$1,5 \times 10^2$	2,18	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,32</b>				<b>2,15</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$2 \times 10^1$	1,30	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	2	$1 \times 10^1$	1,00	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	3	$6 \times 10^1$	1,78	<0,2	<1,8	$1,0 \times 10^1$	1,00	Ausencia
	4	$3 \times 10^1$	1,30	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	5	$6 \times 10^1$	1,78	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>1,43</b>				<b>0,96</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva

Cuadro 8. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°8.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$1,4 \times 10^4$	4,15	4,9	13	<10	0,95	Ausencia
	2	$7,8 \times 10^3$	3,89	4,9	2400	<10	0,95	Ausencia
	3	$6,7 \times 10^3$	3,83	3,3	13	$3,0 \times 10^1$	1,48	Ausencia
	4	$1,8 \times 10^4$	4,26	7,9	17	<10	0,95	Ausencia
	5	$6,9 \times 10^3$	3,84	11	130	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,99</b>				<b>1,06</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$3,4 \times 10^2$	2,53	<0,2	<1,8	$8,0 \times 10^1$	1,90	Ausencia
	2	$8,3 \times 10^2$	2,92	<0,2	<1,8	$2,0 \times 10^1$	1,30	Ausencia
	3	$5,0 \times 10^2$	2,70	<0,2	<1,8	$6,0 \times 10^1$	1,78	Ausencia
	4	$3,8 \times 10^2$	2,58	<0,2	<1,8	$6,0 \times 10^1$	1,78	Ausencia
	5	$4,2 \times 10^2$	2,62	<0,2	<1,8	$4,0 \times 10^1$	1,60	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>2,67</b>				<b>1,67</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva

Cuadro 9. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°9.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$7,4 \times 10^3$	3,87	1,3	23	<10	0,95	Ausencia
	2	$1,4 \times 10^4$	4,15	7,9	27	$1,3 \times 10^2$	2,11	Ausencia
	3	$2,0 \times 10^3$	3,30	0,8	49	$1,0 \times 10^1$	1,00	Ausencia
	4	$6,5 \times 10^3$	3,81	140	33	<10	0,95	Ausencia
	5	$3,8 \times 10^3$	3,58	0,8	17	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,74</b>				<b>1,19</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$1,2 \times 10^3$	3,08	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	2	$1,1 \times 10^3$	3,04	<0,2	<1,8	$2,5 \times 10^2$	2,40	Ausencia
	3	$8,4 \times 10^2$	2,92	<0,2	<1,8	$1,6 \times 10^2$	2,20	Ausencia
	4	$9,5 \times 10^2$	2,98	<0,2	<1,8	$2,1 \times 10^2$	2,32	Ausencia
	5	$4,1 \times 10^2$	2,61	<0,2	<1,8	$1,2 \times 10^2$	2,08	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>2,93</b>				<b>1,99</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva

Cuadro 10. Análisis microbiológicos de choritos frescos y cocidos congelados envasados al vacío. Toma de muestra N°10.

Muestra	n	RAM (ufc/g)	RAM (log)	<i>E. coli</i> * (NMP/g)	Colif. Fecales NMP/100g	<i>S.aureus</i> Coag + (ufc/g)	<i>S.aureus</i> Coag + (log)	<i>Salmonella</i> spp. (en 25 g)
<b>Materia prima (choritos frescos)</b>	1	$3,0 \times 10^3$	3,48	1,3	8,3	<10	0,95	Ausencia
	2	$1,6 \times 10^3$	3,20	<0,2	13	$4,0 \times 10^1$	1,60	Ausencia
	3	$1,9 \times 10^3$	3,28	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	4	$1,2 \times 10^3$	3,08	0,2	8	<10	0,95	Ausencia
	5	$9,2 \times 10^2$	2,96	0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>3,20</b>				<b>1,08</b>	
<b>Producto final (Cocidos Congelados envasados al Vacío)</b>	1	$1,4 \times 10^1$	1,15	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	2	$8,6 \times 10^1$	1,93	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	3	$6 \times 10^1$	1,78	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	4	$2 \times 10^1$	1,30	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
	5	$7 \times 10^1$	1,85	<0,2	<1,8	<10	0,95	Ausencia
<b>Promedio (log)</b>			<b>1,60</b>				<b>0,95</b>	

\*Determinación de *Escherichia coli*  $\beta$ -Glucuronidasa positiva