



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

**CUANTIFICACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN
CHORITOS (*MYTILUS CHILENSIS*) VIVOS Y COCIDOS
CONGELADOS PARA EXPORTACIÓN, PROVENIENTES DE
CHILOÉ, X REGIÓN DE LOS LAGOS, CHILE.**

PÍA LORETO GONZÁLEZ PÉREZ

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario.**

**Departamento de Medicina Preventiva
Animal.**

Profesora Guía: Dra. Anita Soto Cortés MV, MSP

Santiago, Chile

2011



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CENCIAS VETERINARIAS

**CUANTIFICACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN
CHORITOS (*MYTILUS CHILENSIS*) VIVOS Y COCIDOS
CONGELADOS PARA EXPORTACIÓN, PROVENIENTES DE
CHILOÉ, X REGIÓN DE LOS LAGOS, CHILE.**

PÍA LORETO GONZÁLEZ PÉREZ

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario.**

**Departamento de Medicina Preventiva
Animal.**

NOTA FINAL:

		Calificación	Firma
Profesora Guía:	Anita Soto Cortés	-----	-----
Profesora Consejera:	Pilar Oviedo Hannig	-----	-----
Profesor Consejero:	Pedro Smith Schuster	-----	-----

Santiago, Chile

2011

Esta Memoria de Título forma parte del Proyecto de Investigación “Evaluación y Optimización de los Factores que Influyen en la Inocuidad de Alimentos en base a Recursos Marinos y Desarrollo de los Alimentos Funcionales, Componentes o Subproductos de Éstos”, financiado por el Programa Domeyko Alimentos de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile 2008- 2010.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todos aquellos que colaboraron en la realización de esta memoria de título, especialmente a:

Dra. Anita Soto, por haberme dado la posibilidad de realizar este estudio, contando siempre con su apoyo, dedicación y orientación.

Dra. Pilar Oviedo, por toda su colaboración, paciencia y disposición para darme consejo y ayuda cada vez que fue requerida.

Dr. Pedro Smith, por su ayuda y disposición para aconsejarme a abordar y presentar temas en el estudio realizado.

Personal del Laboratorio de Inocuidad de Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, principalmente a la **Srta. Pamela Muñoz** por su buena disposición y colaboración en el trabajo práctico del análisis de muestras.

A mi compañera de Memoria de Título, **Srta. Viviana Arroyo**, por su apoyo, ayuda y buenos momentos que pasamos durante todo el tiempo que trabajamos juntas.

Además, quiero agradecer a todos quienes me colaboraron en el **Departamento de Medicina Preventiva Animal**, como el **Dr. Pedro Ábalos** y el **Dr. Patricio Retamal**, que me ayudaron desinteresadamente, me aconsejaron y asistieron cada vez que fue necesario. Quiero enfatizar mis agradecimientos a la **Sra. Patricia Álvarez**, por toda su colaboración y guía en este proceso de realización de la Memoria de Título.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y amigos, cuya confianza y paciencia me impulsaron a esforzarme cada día.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
TABLA DE CONTENIDOS	i
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS	iii
1. RESUMEN	iv
1. ABSTRACT	v
2. INTRODUCCIÓN	1
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
3.1 Características del Género <i>Listeria</i>	2
3.1.1 Identificación de Especies	3
3.1.2 Ecología de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	4
3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	6
3.2.1 Subtipificación, genómica y serovares de <i>L. monocytogenes</i>	7
3.2.2 Patogenia y Virulencia	8
3.3 Listeriosis	10
3.3.1 Listeriosis en Humanos	10
3.3.2 Patrones Epidemiológicos de Listeriosis	12
3.3.3 Dinámicas de Transmisión de Listeriosis	14
3.3.4 Portadores Asintomáticos	15
3.3.5 Infecciones de Humanos	16
3.3.6 Manifestaciones Clínicas	20
a) Listeriosis durante el Embarazo	20
b) Listeriosis Invasiva en Adultos	22
c) Enfermedad No Invasiva: Gastroentérica	23
3.3.7 Listeriosis en Chile	25
3.3.8 Diagnóstico y Tratamiento	26
3.3.9 Prevención	28
3.4 Productos Hidrobiológicos y Listeriosis	30

	Página
3.4.1 Crecimiento y Supervivencia en Productos Hidrobiológicos	32
3.5 Miticultura	35
3.5.1 Cultivo del Mejillón	37
a) Balsas de Cultivos	38
b) Long - Line	39
3.5.2 Producción y Cosecha	39
a) La Obtención de Semilla	39
b) El Encordado	40
c) El Desdoble	40
d) La Cosecha y Selección	40
3.6 Planta Procesadora de Choritos	41
3.6.1 Procesamiento de la Materia Prima	44
4. OBJETIVOS	49
4.1 OBJETIVO GENERAL	49
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
5. MATERIAL Y MÉTODOS	50
5.1 Obtención de Muestras	50
5.2 Método de Análisis	51
5.3 Planes de Muestreo y Criterios Microbiológicos	51
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
7. CONCLUSIONES	60
8. BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	67
ANEXO 1.	67
ANEXO 2.	68
ANEXO 3.	71
ANEXO 4.	77

INDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

	Página
TABLAS	
Tabla 1. Tiempos de muerte térmica de <i>L. monocytogenes</i> en diferentes productos hidrobiológicos.	34
Tabla 2. Deficiencias especificadas en el manual de procedimientos sección 1 para la habilitación de plantas pesqueras y buques factoría.	43
Tabla 3. Alimentos LPC que no favorece el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> .	53
Tabla 4. Requisitos microbiológicos: criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos.	54
CUADROS	
Cuadro 1. Resultados del recuento de <i>L. monocytogenes</i> en choritos vivos y cocidos congelados.	56
FIGURAS	
Figura 1. Ciclo intracelular de <i>Listeria</i> .	19
Figura 2. Diseño de inoculación para la prueba de CAMP para <i>L. monocytogenes</i> en una placa de agar sangre de carnero.	68

1.RESUMEN

Con el propósito de cuantificar la presencia de *Listeria monocytogenes* en choritos vivos (*Mytilus chilensis*) y choritos cocidos congelados procesados en una planta procesadora que los comercializan para exportación, se analizaron 40 unidades de muestra de choritos vivos y 40 unidades de muestra de choritos cocidos congelados obtenidas en una planta procesadora ubicada en la Isla Grande de Chiloé, X Región de Chile. La toma de muestras se realizó en ocho oportunidades, entre los meses de Abril y Julio del año 2010. Los planes de muestreos y los criterios microbiológicos se realizaron según el Reglamento Sanitario de Alimentos y el Reglamento Europeo de Criterios Microbiológicos en Productos Alimenticios, debido a que éste es el mercado de destino del producto final.

El total de unidades de muestras analizadas mostraron valores inferiores a 10 ufc/g de *L. monocytogenes*, lo que las hace aptas para el consumo humano según los estándares establecidos. De lo anteriormente expuesto se evidencia la baja presencia de *L. monocytogenes* en los choritos vivos y cocidos congelados examinados, lo que puede interpretarse como un bajo riesgo para la población consumidora. Hubo una colonia de *Listeria* spp. en una unidad de muestra de chorito cocido congelado, obtenida del sexto muestreo. Según los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas de identificación de especies del género *Listeria*, la colonia corresponde a *L. welshimeri*, considerada una listeria apatógena.

Las principales conclusiones de este estudio son que los niveles de *L. monocytogenes* encontrados en choritos vivos y cocidos congelados analizados cumplen con la normativa nacional y la establecida en la Unión Europea para este producto. La detección de una colonia *Listeria* spp. en alimentos o elementos relacionados con su manufactura puede indicar la presencia de *L. monocytogenes*, debido a que pueden coexistir bajo las mismas condiciones. A pesar de los pocos casos documentados de infecciones humanas por otras especies del género *Listeria*, éstos podrían ser resultado de una baja patogenicidad para los humanos, o que no se han descubierto aún los mecanismos con los que estas especies apatógenas están provocando casos de listeriosis no notificados o identificados erróneamente debido a la falta de investigación al respecto.

1. ABSTRACT

In order to quantify the presence of *Listeria monocytogenes* in live mussels (*Mytilus chilensis*) and in cooked frozen mussels, were analyzed 40 samples units of live mussels and 40 samples units of frozen cooked mussels obtained in a processing plant that marketed abroad located in the Isla Grande de Chiloe, X Region of Chile. The sampling was conducted on eight occasions, between April and July 2010. The sampling plans and microbiological criteria were performed according to the Chilean Food Health Regulations and the European Regulation for Microbiological Criteria for Foodstuffs, because that is the target market of the final product.

The total samples units showed values below 10 cfu/g of *L. monocytogenes*, which makes them suitable for human consumption according to established standards. From the above mentioned, the low presence of *L. monocytogenes* in frozen cooked mussels and live mussels examined, can be interpreted as a low risk to the consumer population. There was a colony of *Listeria* spp. on frozen cooked mussels sample unit, obtained from the sixth sample. According to the results of biochemical tests to identify species of the genus *Listeria*, the colony corresponds to *L. welshimeri*, considered an apathogenic listeria.

The main conclusions of this study are that levels of *L. monocytogenes* found in live and frozen cooked mussels tested fulfill the national and european regulations for this product. Also, the fact that a *Listeria* spp. colony is found in food or items related to their manufacture, it may indicate the presence of *L. monocytogenes*, because they can coexist under the same conditions. Despite the few documented cases of human infections with other species of *Listeria*, these may be the result of low pathogenicity for humans, or that have not yet discovered the mechanisms by which these species are causing cases of listeriosis that are not being reported or identified properly due to the lack of investigation.

2.INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un microorganismo ubicuo que sobrevive por mucho tiempo en los alimentos, en el suelo, en las excretas animales, y en el agua, por lo que constituye una gran preocupación para la industria agroalimentaria. La gravedad y la alta letalidad que presenta la enfermedad provocada por este patógeno ha generado que en las últimas décadas la listeriosis sea considerada mundialmente como una de las principales zoonosis emergentes de transmisión alimentaria.

La eliminación del riesgo asociado a *L. monocytogenes* de la mayoría de los alimentos exige un control higiénico estricto, pero las características de este agente son tales que resulta impracticable y a la vez una labor imposible pretender que absolutamente todos los alimentos estén exentos de este microorganismo. Es por ello, que el objetivo debería ser la eliminación de la bacteria del entorno donde son procesados los alimentos y pretender disminuir la presencia del agente en el producto final, para así reducir y controlar el riesgo para la salud pública.

Los casos y brotes de listeriosis humana se han asociado a una gran diversidad de alimentos, en los que se incluyen los moluscos bivalvos. El mejillón chileno o chorito (*Mytilus chilensis*), es un producto que se consume regularmente en el país, además de ser destinado a mercados extranjeros como la Unión Europea. Según las cifras del año 2003, los productos congelados, significaron 8.199 toneladas, de un total de 8.880 toneladas exportadas, el resto de las exportaciones corresponden a productos en conservas con 665 toneladas equivalentes al 7% y a productos vivos enfriados con 15 toneladas (Plaza *et al.*, 2005). En el año 2009, se notificó un desembarque total de choritos en el país de 176.021 toneladas. Según los datos de la empresa chilena TechnoPress S.A publicados en un artículo de su revista Aqua especializada en el área de acuicultura en el país, la industria que movió más de US\$ 64 millones en el 2006 con un incremento de un 60% respecto al año anterior, proyecta tasas de crecimiento de un

20% anual. Es por esto que para el 2012 se espera superar los US\$ 140 millones en embarques (Chile, SERNAPESCA, 2009; TechnoPress S.A, 2007).

Debido a la importancia de esta producción, resulta relevante determinar mediante un análisis microbiológico, la condición sanitaria de este producto hidrobiológico en lo que respecta a *L. monocytogenes*, y para ello se implementará el método de recuento de la bacteria en este producto, según la norma oficial vigente que se ha emitido en Chile para realizar la enumeración de *L. monocytogenes* en alimentos.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *LISTERIA*

Murray y sus colegas en 1926, aislaron una bacteria corta, Gram positiva, de forma bacilar, a la que denominaron *Bacterium monocytogenes*, porque infectaba a los monocitos presentes en la sangre. Pirie en 1930, aisló un microorganismo parecido en hígado de gerbillos por lo que lo denominó *Listerella hepatolytica*. Finalmente en 1940, se cambió dicha definición por la de *Listeria monocytogenes* debido a que *Listerella* había sido adoptada anteriormente para un grupo de mohos productores de mucílago (Rocourt y Buchrieser, 2007).

El género *Listeria* al que pertenece *L. monocytogenes*, es una bacteria no esporulada, anaerobia facultativa, oxidasa negativa y catalasa positiva, que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente: en el suelo, los vegetales, la carne, la leche, el pescado y también ha sido aislada de productos marinos congelados (Rocourt y Buchrieser, 2007; Bell y Kyriakides, 1998). Está formado por siete especies: *L. grayi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* subespecie *ivanovii*, *L. ivanovii* subespecie *londoniensis*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, de las que *L. monocytogenes* es el único patógeno humano aunque, *L. seeligeri* y *L. ivanovii* en raras ocasiones han estado implicadas en infecciones a personas (Bell y Kyriakides, 1998; Walker, 2004).

3.1.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Todas las especies de *Listeria* son fenotípicamente muy similares, pero pueden distinguirse por combinaciones de las siguientes pruebas: hemólisis, producción de ácido desde D-xilosa, L- ramnosa, alfa metil D-manosida, y manitol. Las coincidencias fenotípicas son consistentes con la homología genómica evidente entre las diferentes especies. Recientes estudios indican que *L. monocytogenes* y *L. innocua* difieren notoriamente en motilidad y en la producción de flagelina a 37°C de temperatura, que resulta ser la proteína estructural de los flagelos. Cepas de *L. monocytogenes* son casi inmóviles y producen una reducida o casi nula cantidad de flagelina, mientras que las cepas de *L. innocua* producen una gran cantidad de flagelina (Rocourt y Buchrieser, 2007).

La hemólisis es una característica clave para definir la especie de *Listeria*. Aislamientos de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* muestran zonas de beta hemólisis angostas y ligeramente claras. *L. ivanovii* muestra una zona ancha de beta hemólisis, claramente definidas, en contraste con *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi* que no son hemolíticas. *L. innocua* puede producir una zona de hemólisis verdosa dependiendo del medio a usar. *L. monocytogenes* resulta ser hemolítica en sangre de distintos orígenes, como de cordero, caballo, vaca, cobayo, lechón y humano. Se han desarrollado varios métodos para determinar la actividad hemolítica, especialmente para cepas hemolíticamente débiles, como lo son *L. seeligeri* y *L. monocytogenes* tales como, examinación de la hemólisis bajo las colonias; incubación prolongada por 48 horas; incubación por pocas horas a 4°C; placas con una delgada capa de agar sangre; diversos medios de cultivo; tubos de prueba y técnicas de microplaca con eritrocitos en suspensión; adición de una sustancia exógena proveniente de *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus* y *L. ivanovii* al agar sangre; y la prueba de Christie Atkins Munch-Petersen, abreviada como CAMP (**Anexo 1.**). En esta última prueba mencionada, se evidencian las interacciones de cepas de *Listeria* spp. con cepas de los microorganismos de referencia como *S. aureus* y/o *R. equi*. Las especies interactúan de la siguiente manera con estos microorganismos de referencia: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri* con

S. aureus, y *L. ivanovii* con *R. equi*. Las exosustancias que producen *S. aureus* y *R. equi* al interactuar con las cepas en estudio son esfingomielinasa C y colesterol oxidasa, respectivamente. (Rocourt y Buchrieser, 2007).

La hemolisina es el mayor factor de virulencia de *L. monocytogenes*. Existen tres especies en el género *Listeria* – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri* – que son hemolíticas y se ha demostrado recientemente que poseen grupos de genes de virulencia, sin embargo sólo dos, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, son patógenas en condiciones naturales y de laboratorio. *L. ivanovii* es principalmente responsable de provocar aborto en animales, es por ello, que la patogenicidad no debería ser presumida por la observación de solamente la hemólisis. Escasas cepas de *L. monocytogenes* no hemolíticas han sido observadas y a pesar de que existan estas cepas atípicas, el ejecutar pruebas rutinarias de patogenicidad de *L. monocytogenes* no son recomendadas. Pruebas adicionales, especialmente para distinguir *L. monocytogenes* de *L. innocua* han sido propuestas, como: la detección de la actividad de la fosfolipasa C; hidrólisis de D - alanina - p – nitroanilida; hidrólisis de DL – alanina – beta – naftilamida; e hidrólisis de sustrato de naftilamida (Rocourt y Buchrieser, 2007).

3.1.2 ECOLOGÍA DE *LISTERIA* SPP. Y *L. MONOCYTOGENES*

Listeria spp. está generalmente considerada como una especie ubicua en el medio ambiente. *L. monocytogenes*, por ejemplo, es capaz de sobrevivir y crecer en la tierra y en el agua. Estas bacterias han sido detectadas en varios medios acuáticos: agua superficial de canales y lagos, de zanjas y terrenos cercanos al mar, en efluentes de agua dulce que desaguan al mar, además en aguas servidas y se ha detectado que tiene la capacidad de sobrevivir al tratamiento de las aguas (Domínguez, 2010; Parihar, 2004). También ha sido encontrada en mar abierto, pero sólo en un número reducido, aun así se ha documentado la sobrevivencia del microorganismo en al menos tres semanas, y probablemente por más tiempo, lo cual depende de la temperatura del agua y la resistencia de *L. monocytogenes* (Bremer *et al.*, 2003).

L. monocytogenes ha estado presente en alimento para animales, en condiciones de granja y en ambientes donde se procesan alimentos (Sauders y Wiedmann, 2007). Aunque muchos estudios indican que *L. monocytogenes* y *L. innocua* podrían representar las especies del género más comunes de encontrar en ambientes naturales, otros estudios consideran de mayor prevalencia otras especies pertenecientes al género, en ambientes naturales específicos. *L. monocytogenes* se ha encontrado a menudo en mataderos; en plantas de elaboración y conservación de alimentos; establecimientos de *catering*; entre otras más, inclusive cuando se aplican medidas de higiene correctas (Domínguez, 2010).

En contraste con otras bacterias no esporuladas que producen enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), *L. monocytogenes* aparentemente está capacitada para sobrevivir grandes periodos de tiempo en condiciones adversas. La habilidad de este microorganismo de colonizar, multiplicarse, y persistir en ambientes y maquinaria donde se procesan alimentos, refleja su capacidad para sobrevivir en ambientes naturales por períodos prolongados. La información disponible sobre la resistencia al estrés y las características de sobrevivencia de las especies del género *Listeria* son muy limitadas comparada con aquellas disponibles sobre *L. monocytogenes*. Estudios experimentales en que se compara la resistencia al estrés entre *L. monocytogenes* y las demás especies del género, que incluyeron la estimación de la sobrevivencia, su crecimiento en condiciones de estrés térmico, estrés en condiciones de sal, baja actividad de agua, en presencia de varios agentes antimicrobianos y con varias condiciones de estrés combinadas, apoyan la hipótesis de que todas las especies de *Listeria* comparten características de resistencia al estrés similares (Sauders y Wiedmann, 2007).

Recientes secuenciaciones del genoma de una cepa de *L. monocytogenes* y una cepa de *L. innocua* también muestran que estas dos especies comparten un alto número de genes que codifican varios componentes de un sistema de respuesta a un potencial estrés, incluyendo proteínas reguladoras, de transporte, y reguladores de transcripción. Además debe tenerse en cuenta que las bacterias son un resultado evolutivo en el que se pueden transmitir propiedades no sólo de un

linaje o de un serovar a otro, sino de una especie bacteriana a otra (Domínguez, 2010; Sauders y Wiedmann, 2007).

3.2 LISTERIA MONOCYTOGENES

L. monocytogenes es un bacilo Gram positivo pequeño de 0,4 a 0,5 μm de diámetro y 0,5 a 2 μm de largo, no esporulado, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, catalasa positivo y expresa la hemolisina P a través de hemólisis en agar sangre. Rara vez se han obtenido cepas catalasa negativo y de hecho se ha observado que la actividad de la catalasa es baja ante un medio donde la concentración de glucosa es de un 10%. Es un microorganismo homofermentativo y oxida compuestos intermedios de la glicólisis. Posee actividad glucosa oxidasa y NADH oxidasa. Estos bacilos cortos aparecen de forma aislada, en parejas o en cadenas cortas y se pueden confundir con *Streptococcus pneumoniae* o *Enterococcus* al microscopio. *L. monocytogenes* posee flagelos peritricos, que le otorgan el movimiento característico de tumbos que se evidencia entre 20°C y 25°C de temperatura (Farber y Peterkin, 1991; Parihar, 2004; Rocourt y Buchrieser, 2007; Murray *et al.*, 2002). En este movimiento de tumbos, las células comienzan a enroscarse y retorcerse, aumentando con rapidez sus rotaciones excéntricas antes de que bruscamente se muevan con velocidad en varias direcciones. Se ha descrito que tiene la habilidad de crecer en condiciones adversas como a temperaturas extremas, describiéndose un rango entre 1 a 2°C hasta 45°C aunque según estudios se ha establecido que su crecimiento óptimo es a temperaturas entre 30°C y 37°C (Walker, 2004; Miettinen, 2006; Rocourt y Buchrieser, 2007). *L. monocytogenes* puede crecer en ambientes con pH entre 4,5 hasta 9,2, siendo óptimo a pH 7. Puede desarrollarse en ambientes con concentraciones altas de sal. Su sobrevivencia a pH más bajo y a concentraciones de sal mayores al 10% depende fundamentalmente de la temperatura. Es uno de los pocos patógenos que puede crecer con actividad de agua (a_w) menores al 0,93, por lo que tolera condiciones de deshidratación (Rocourt y Buchrieser, 2007).

3.2.1 SUBTIPIFICADO, GENÓMICA Y SEROVARES DE *L. MONOCYTOGENES*

El subtipificado molecular de *L. monocytogenes* puso de manifiesto cuatro líneas a las que se prefirió llamar linajes, clones epidémicos o complejos clonales; a los que se les denomina EC del I a IV, que más tarde se ampliaron a siete. En la mayoría de las áreas geográficas, el 65% de las cepas son del linaje EC II, distinguible fácilmente de los otros EC. La serotipificación ha sido una de las herramientas clásicas para estudios de casos epidemiológicos y esporádicos de *L. monocytogenes*, y muchos científicos lo consideran el "patrón de oro" para la tipificación de *L. monocytogenes*. Las cepas de *L. monocytogenes* difieren en determinantes antigénicas expresadas en la superficie celular. Tales variaciones antigénicas se producen por muchas estructuras superficiales diferentes, incluyendo los ácidos lipoteicoicos, proteínas de membrana y orgánulos extracelulares (por ejemplo, flagelos y fimbrias). Estas diferencias se pueden identificar por tipos serológicos (serotipos). Las cepas de especies de *Listeria* fueron divididos, en los serotipos basados en antígenos somáticos (O) y flagelares (H). Los antígenos flagelares, así como antígenos somáticos deben ser identificados como tipos de cepa de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b y 3c. Los serotipos restantes todos tienen los mismos antígenos flagelares (A, B y C). Los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b y 3c se pueden identificar con dos antisueros O (uno con anticuerpos frente al factor I y el otro con anticuerpos frente a los factores I y II) y tres antisueros H (uno con anticuerpos frente a los factores A y B, uno reacciona con C, y uno que reacciona con D). Con antisueros de O los factores V y VI, VII y IX, VIII, X, XI y XV, se puede tipificar cepas de los serotipos 4a, 4b, 4c, 4d, 5, 6a y 6b (Domínguez, 2010; Graves *et al.*, 2007).

El 95% de las listeriosis humanas, esporádicas o de brotes se deben a los serotipos 1/2a, 1/2b, 3b y sobre todo el 4b; sólo el 5% corresponde a los serovares 1/2a, 1/2c, 4d, 3a y una fracción representativa de los otros ocho serovares de los cuales un 35% son EC I. El serovar 4b causa casi la mitad de las listeriosis humanas, siendo relativamente escaso su aislamiento en los alimentos. Dentro de cada serovar, se pudo diferenciar las cepas por fagotipado, en conjunto con técnicas

como electroforesis de proteínas, o la técnica de las enzimas multiloculares, que separó a *L. monocytogenes* en dos grupos, uno que comprende los serovares 4b y los 1/2b de origen humano, y el otro con los serovares 1/2, procedentes de los alimentos y del ambiente. En un estudio italiano realizado entre 2002 y 2005, se obtuvieron 674 aislamientos de *L. monocytogenes* a partir de enfermos humanos, 558 de alimentos diversos y 59 de muestras del ambiente. Se comprobó que había 11 serotipos que aparecían en los aislamientos de los tres orígenes. Los serotipos predominantes fueron los siguientes: 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b (Domínguez, 2010).

3.2.2 PATOGENIA Y VIRULENCIA

La patogenicidad de *L. monocytogenes* para las personas depende, en gran parte, de la cepa, siendo ésta elevada para la mayoría, aunque algunas tienen escasa e incluso se han descrito raras cepas apatógenas. Aun así, se considera que todas las cepas de *L. monocytogenes* son potencialmente patógenas para la especie humana. No se ha establecido una relación entre la patogenicidad con la serovariedad, fagovariedad, ribovariedad (modelo de macrorrestricción del ADN), ni si la cepa procede de enfermos esporádicos, de un brote, de animales, de alimentos o del ambiente. La mayoría de estos microorganismos que ingresan con los alimentos resisten a la digestión gástrica, gracias a la fugacidad de su paso y a la actividad de su arginina desiminasa, cuyos genes se expresan mejor en anaerobiosis y en pH bajo. Desde el intestino y por vía hemolinfática accede a órganos, esencialmente al bazo y al hígado, de donde por la bilis puede llegar al intestino (Domínguez, 2010).

La patogenicidad se valora determinando la dosis infectante mínima en animales de experimentación y en los enfermos calculando, aproximadamente, el número de *L. monocytogenes* que debió haber ingerido con la cantidad de alimento consumido y las unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) encontradas en el mismo. Las técnicas de recuento no son enteramente fiables y el tiempo transcurrido entre el consumo y el análisis del alimento contaminado podría aumentar o disminuir su número. La patogenicidad se relaciona indirectamente con

las dosis letales, especialmente la DL50¹ que en el ratón es inferior a 10⁶, siendo de 10⁸-10⁹ en el caso de especies de *Listeria* avirulentas o en la membrana corioalantoidea o saco vitelino del embrión de pollo, en la que la DL50 de las cepas virulentas es de unos 10² (Domínguez, 2010).

En el hombre, se han realizado pruebas de patogenicidad sin embargo, los mecanismos de patogenicidad en humanos no son comprendidos con claridad, pero la infección depende de una variedad de factores que incluyen el estado inmunitario del hospedero, la cantidad de inóculo y la virulencia específica de la cepa de *L. monocytogenes* (Bell y Kyriakides, 1998). Según el reporte de análisis de riesgo de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo² (LPC) de la Organización Mundial de la Salud (WHO), los casos de listeriosis pueden ser reducidos significativamente si *L. monocytogenes* se mantiene bajo 1.000 ufc/g en alimento al momento de consumir. Buchanan *et al.* en el año 1997, por otra parte, predijo que habría 1 en 59 millones de posibilidades de ser infectado por consumir 50 gramos de pescado con 100 bacterias/gramo (Parihar, 2004).

La virulencia de las cepas de *L. monocytogenes* varía mucho; algunas son muy virulentas, otras poco o muy poco y en algunos casos raros no manifiestan virulencia alguna. No se ha observado correlación entre la virulencia y su origen (humano, animal, alimentario o ambiental) ni entre las características de las cepas y la virulencia (Domínguez, 2010).

¹ **DL50:** Dosis letal media es la dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca muerte del 50% de los animales a los que se haya administrado. El valor de la DL50 se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilogramo) (España, Ministerio de la Presidencia, 1998).

² **Alimento listo para el consumo:** Aquellos alimentos destinados por el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos. Un alimento que sólo se calienta antes de consumirlo, se considera LPC. (Chile, MINSAL, 2009a)

3.3 LISTERIOSIS

Listeriosis es el nombre que recibe el grupo de afecciones causadas por *L. monocytogenes*.

A diferencia de otros agentes patogénicos conocidos por generar grandes brotes que han marcado la historia por siglos, la historia de *L. monocytogenes* y la enfermedad que provoca, son de conocimiento reciente. Oficialmente comenzó al inicio del siglo XX, no obstante, la importancia de listeriosis como un peligro para la salud pública al igual que el papel relevante de los alimentos como su vía de transmisión, no fue reconocida sino hasta 1980. Desde ese año en adelante, se han declarado y estudiado en Europa y América del Norte al menos cinco brotes de listeriosis debidos a la ingestión de alimentos. El primero ocurrió en Canadá y afectó a 34 recién nacidos y a siete adultos, con una letalidad mayor del 28%. Las pruebas epidemiológicas y cultivos bacterianos demostraron que se debió a la ingestión de coles cultivadas en un campo abonado con estiércol de un rebaño de ovejas, varias de las cuales habían muerto de listeriosis (Domínguez, 2010; Painter y Slutsker, 2007).

3.3.1 LISTERIOSIS EN HUMANOS

Las diversas manifestaciones clínicas asociadas a la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva. La listeriosis invasiva se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo habitualmente estériles, como el útero grávido, el sistema nervioso central (SNC) o la sangre, o combinaciones de éstos. Este tipo de infecciones pueden producir secuelas, aunque la incidencia de éstas pocas veces se determina. Los casos de listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril por listerias) se han observado en algunos brotes en los que la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. Estos brotes se han producido generalmente tras la ingestión de dosis altas de la bacteria por personas previamente sanas (FAO, 2004).

La enfermedad humana por estos organismos se conoce como infrecuente, pero de gravedad y está limitada a varias poblaciones bien definidas que constituyen el grupo de riesgo, como los neonatos, los ancianos, las mujeres embarazadas y los pacientes con alteraciones en la inmunidad celular (Murray *et al.*, 2002).

La listeriosis se transmite a través de tres vías principales: contacto con los animales; infección entre recién nacidos en el hospital, debido a líquido amniótico contaminado que puede permanecer en paritorios, maternidades y material hospitalario, si no se limpia y desinfecta a fondo; e infección transmitida por los alimentos. El papel transmisor de la vía transplacentaria se considera como mínima. Es relevante destacar que en el ámbito pecuario, veterinarios y ganaderos manifiestan listeriosis cutáneas al atender el parto de vacas preñadas infectadas, por ello debiera reconocerse como una enfermedad profesional (Domínguez, 2010).

Aunque listeriosis es una fracción menor de las ETA conocidas, es una causa importante de un cuadro severo, correspondiendo a un 3,8% de las hospitalizaciones provocadas por ETA y un 27,6% de las muertes provocadas por ETA. El desarrollo y mejoramiento de las técnicas de laboratorio para detectar los subtipos de *L. monocytogenes* ha contribuido a una mejor comprensión de la listeriosis humana. A diferencia de otras infecciones comunes provocadas por ETA, como puede ser la salmonelosis, la cual en raras ocasiones es fatal, la listeriosis está asociada a una tasa de letalidad de aproximadamente un 20% (Domínguez, 2010; Painter y Slutsker, 2007).

Muchos brotes se producen entre poblaciones dispersas geográficamente en largos periodos de tiempo y afectan a relativamente pocos individuos expuestos, lo que hace difícil su reconocimiento y a menudo se reconoce con retraso. Sobre todo, existe evidencia importante que demuestra que la mayoría de los casos de listeriosis son causados por infecciones provenientes de los alimentos, usualmente por alimentos LPC contaminados, alimentos refrigerados y con frecuencia por recontaminación de alimentos previamente cocidos. Aunque está considerado que *L. monocytogenes* puede ingresar en muchos, y posiblemente en todos los puntos

de la cadena de procesamiento de alimentos, la materia prima parece ser de particular importancia como fuentes de introducción de *L. monocytogenes* en el sistema de elaboración de productos alimentarios. La incidencia que tiene la contaminación de los alimentos en las infecciones humanas puede ser rastreada en las plantas de procesamiento, sin embargo, la contribución que se genera en la etapa de almacenamiento y la manera en que son manejados en los hogares o restaurantes, no está claramente definida aún. El rol de las materias primas (como por ejemplo, carne, leche) como una fuente directa de contaminación con *L. monocytogenes* en productos LPC es probablemente mínima debido a la aplicación de tratamientos de calor que generalmente matan de manera eficiente a *L. monocytogenes*, suficientemente para proveer de un margen apropiado de seguridad. Aunque animales infectados o ambientes de producción contaminados raramente aparecen como una causa directa de las infecciones humanas, la fuente animal puede jugar un importante rol en productos derivados de animales que no son procesados antes de consumirse (por ejemplo, leche cruda). Adicionalmente, excretas desde animales infectados o animales de descarte infectados, pueden representar una fuente de contaminación del alimento (Norton y Braden, 2007).

3.3.2 PATRONES EPIDEMIOLÓGICOS DE LISTERIOSIS

En comparación con otras enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos, varias características de la listeriosis, incluyendo la incidencia relativamente baja y el largo período de incubación, hacen difícil la identificación de los brotes, el que se ha establecido como un rango general entre 7 y 60 días, lo que dificulta, en primer lugar, la identificación del alimento causante de la infección, y en segundo lugar, el que los casos que llegan a los centros sanitarios son aquellos que se dan en personas susceptibles de desarrollar cuadros graves, por lo que sólo se ve la punta del iceberg (García *et al.*, 2006; Painter y Slutsker, 2007). En informes que se han realizado para monitorear los nuevos casos anuales en la población en Europa y en América del Norte, la incidencia anual resulta estar entre 2 a 7 casos/millón de personas. La incidencia depende mucho de cómo y dónde se hizo la declaración, ya que difiere si se hace en la comunidad o en los hospitales, así como

de la cultura sanitaria del país y su población, de la gravedad de cada caso o del criterio diagnóstico. La incidencia real depende fundamentalmente de la cantidad de alimentos conservados y LPC que se ingieran, de las técnicas y modo de procesar los alimentos y de las medidas de higiene tomadas en la industria alimentaria. Otro factor importante de destacar es que la tasa de mortalidad de las infecciones sintomáticas por *Listeria* es más alta que la de casi todas las otras ETA conocidas (Domínguez, 2010; Murray *et al.*, 2002).

Aunque la incidencia puede variar, es probable que de vez en cuando, la mayor parte de productos no procesados o ligeramente elaborados estén contaminados con especies del género *Listeria* como *L. monocytogenes*. Por lo tanto, debe esperarse la presencia de este microorganismo en la mayoría de productos alimentarios de esta naturaleza. Es por esto que debe evaluarse el riesgo que *L. monocytogenes* supone para los procesos de producción de alimentos y para la seguridad potencial del producto terminado. En los Estados Unidos (EE. UU.) se han identificado a las carnes LPC y quesos sin pasteurizar como fuentes que con mayor frecuencia están involucrados en brotes de listeriosis desde 1998 a 2006 (Bell y Kyriakides, 1998; Painter y Slutsker, 2007). Este dato en conjunto con la tendencia creciente al consumo de alimentos mínimamente procesados y sin conservantes, obliga igualmente a mantener una higiene óptima, meta ocasionalmente difícil de alcanzar. La preocupación pública y de las entidades reguladoras relacionadas con el peligro que representa este microorganismo ha conducido a la implementación, por parte de muchos países, de normas microbiológicas obligatorias con el fin de regular los niveles de *L. monocytogenes* en los alimentos. Además, se han llevado a cabo acciones concertadas para el control de este microorganismo en los alimentos mediante el aumento de los estándares de higiene, la reformulación de los alimentos y la reducción de los períodos de conservación de los productos (Bell y Kyriakides, 1998; Domínguez, 2010).

3.3.3 DINÁMICAS DE TRANSMISIÓN DE LISTERIOSIS

A pesar de la información que se ha obtenido sobre la prevalencia de *L. monocytogenes* en el ambiente, aún existe desconocimiento sobre aspectos de la dinámica de transmisión de *L. monocytogenes*. Aun así, este microorganismo está ampliamente distribuido en el medio ambiente, por lo que es muy probable que humanos y animales tengan un contacto frecuente con esta bacteria desde variados tipos de fuentes, siendo los alimentos la fuente más común de infección. Considerando la aparente alta exposición de los humanos y animales a *L. monocytogenes*, y la rara ocurrencia en la manifestación de un cuadro clínico, aflora el cuestionamiento de la importancia de las infecciones de humanos y animales para la sobrevivencia de *L. monocytogenes*. Por otra parte, las infecciones en humanos y/o animales pueden representar una parte crítica de la sobrevivencia del agente, proveyéndose de un mecanismo que le permite una rápida multiplicación de un alto número de bacterias y una amplia gama de ambientes para dispersarse (Sauders y Wiedmann, 2007).

L. monocytogenes puede ser un patógeno “accidental” en humanos o en rumiantes de granja, representando un hospedero terminal que no contribuye de manera crítica en la sobrevivencia de la especie. En última instancia, la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en el medioambiente, incluyendo posiblemente algunas especies hospederos no identificados como por ejemplo, protozoos, vertebrados menores u otros mamíferos aparte de humanos y rumiantes, pueden ser el punto crítico de evolución para el triunfo de esta bacteria. Se ha postulado que la expresión de los genes de virulencia y síntesis de factores de virulencia fuera del hospedero puede representar una carga, comprometiendo la habilidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir en ambientes naturales y limitando la posible transmisión (Sauders y Wiedmann, 2007).

La repercusión clínica, así como la carga de listerias que se ha llegado a identificar en los animales, varía mucho entre las diferentes especies y dentro de cada una hay diferencias individuales atribuibles a la inmunidad antibacteriana. Al

igual que en la especie humana la alteración del SNC en los animales es muy relevante. Se ha visto, basándose en más de 200 casos de listeriosis en bovinos, ovinos y caprinos que *L. monocytogenes* llega al SNC migrando por los axones del trigémino y de otros pares craneales. La consiguiente encefalitis se extiende a las regiones del cerebro rostral verosímilmente por migración axonal intracerebral (Domínguez, 2010).

En ambientes donde se procesan alimentos se han hecho un número considerable de estudios cruzados y longitudinales para establecer la diversidad de los subtipos y la ecología de *L. monocytogenes*, pero sólo algunos estudios han probado específicamente la transmisión de *Listeria* entre el ambiente natural y el de las plantas donde se procesan alimentos. A partir de estudios longitudinales que se han efectuado en diferentes tipos de plantas procesadoras, se ha demostrado que una alta diversidad de cepas de *L. monocytogenes* existen en diferentes alimentos y en ambientes de procesamiento de los mismos (Sauders y Wiedmann, 2007).

En muchas plantas de procesamiento se han identificado cepas de *L. monocytogenes* persistentes y transitorias, aunque existen algunas plantas en que sólo aparecen cepas transitorias. Cepas persistentes pueden estar presentes en plantas procesadoras por meses, inclusive más de doce años. Aunque está claro que existen y persisten una gran diversidad de cepas de *L. monocytogenes* en estos ambientes, la información de cómo estas cepas ingresan es limitada. Una pobre higiene en la planta de procesamiento, aumenta el riesgo de la persistencia y supervivencia de *L. monocytogenes* en ellas, con la subsecuente posible contaminación de los productos (Sauders y Wiedmann, 2007).

3.3.4 PORTADORES ASINTOMÁTICOS

L. monocytogenes puede ser frecuentemente recuperado desde un amplio espectro de alimentos, en ocasiones desde el tracto gastrointestinal de animales sanos. Se han realizado numerosos estudios sobre portadores fecales de *L. monocytogenes* entre diferentes poblaciones humanas, y se ha obtenido una tasa variada de portadores. Algunas de estas variaciones puede ser atribuidas a

diferentes poblaciones estudiadas, técnicas de cultivo, la cantidad de heces obtenidas de cada individuo, el manejo de las deposiciones y si los resultados se informaron como un punto de prevalencia o una prevalencia acumulada (Painter y Slutsker, 2007).

Entre las investigaciones revisadas, el punto de prevalencia para personas sanas con una exposición desconocida con *Listeria*, fue entre 0,6% y 3,4%. Entre los estudios de personas expuestas a *Listeria*, las tasas de portadores fecales son mayores. Además de existir la permanencia de *L. monocytogenes* y otras especies del género *Listeria* en las heces humanas, también se ha establecido que especies del género *Listeria* sobreviven en los dedos después de lavadas las manos (Domínguez, 2010).

Se han descrito elevados índices de portadores fecales entre las personas con exposición ocupacional. Kampelmacher *et al.* en el año 1972, informaron de las altas tasas de portadores fecales entre los trabajadores de laboratorio que tienen contacto diario con *L. monocytogenes* (77% de 26), pero las tasas también fueron altas entre los trabajadores de oficina que no tenían contacto con el microorganismo (62% de 26) (Painter y Slutsker, 2007).

3.3.5 INFECCIÓN EN HUMANOS

La infección pasa por las siguientes fases: Cuando *Listeria* penetra con los alimentos por vía oral, éstas son captadas por células fagocíticas, como presentadoras de antígenos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, células todas ellas muy importantes en la inmunidad innata y en la adquirida que constituyen una primera línea defensiva frente al microorganismo. Al fagocitarse, forman un fagosoma, que se aproxima a uno o a varios lisosomas con los que contactan y uniéndose sus membranas forman un fagolisosoma, donde habitualmente sus enzimas y la acidez, digieren a muchas bacterias, incluyendo su membrana celular. Estas enzimas pueden pasar al medio y destruir desde fuera a las células no infectadas. Este tipo de digestión no afecta a las especies de *Listeria*, que son resistentes a pH bajos y que están protegidas por su arginina desiminasa,

que se expresan mejor en un pH bajo, como el de los fagolisosomas. *Listeria* sale del fagosoma por un mecanismo listeriolisínico, crítico para la patogenicidad de la bacteria; de hecho las especies deficientes de la listeriolisina son apatógenas. La listeriolisina O (LLO), es el principal responsable de la hemólisis y actúa rompiendo las membranas de los fagolisosomas y de las vacuolas permitiendo en menos de 30 minutos, la salida al citosol de *L. monocytogenes* donde se está multiplicando. Resulta ser una enzima tóxica, con actividad lisogénica, que desde el interior de la vacuola abre poros en la doble membrana vacuolar, permitiendo salir a la bacteria y pasar de célula a célula (Dominguez, 2010).

Las cepas no hemolíticas no producen listeriolisinas por lo que no pasan al citosol. La listeriolisina se expresa constitutivamente en los lisosomas de las células presentadoras de antígenos acumulándose en los macrófagos a medida que se forman los fagolisosomas (Domínguez, 2010).

Es importante destacar que *L. monocytogenes* es una de las bacterias más invasiva conocidas, disponiendo de numerosos factores de virulencia que le permiten no sólo sobrevivir, sino también multiplicarse, tanto en células fagocíticas como no fagocíticas, siendo capaz de cruzar la barrera intestinal, transplacentaria y hematoencefálica del hospedero, pero la ruta normal de la infección es por el cruce de barreras intestinales particularmente a través de las células M de las placas de Peyer. En caso de que las células objetivo sean los eritrocitos, las hemolisinas destruyen su pared, liberándose su hemoglobina, con lo que cambia el aspecto opaco y turbio de la suspensión de glóbulos rojos, del líquido en el que tiene lugar la reacción, y pasa a rojo transparente (Domínguez ,2010; Parihar, 2004).

En las células no fagocíticas como pueden ser los enterocitos u hepatocitos, *L. monocytogenes* se adhiere a ellas primero y luego de forma activa penetra en su interior. Esta bacteria se une a receptores superficiales de las células diana, activando vías de señales específicas del hospedero, de las que forma parte la IspC, proteína inmunógena, cuyos dominios carbono terminales son ligandos anclados en la pared de la bacteria, con actividad péptidoglicano hidrolasa, que degrada al péptidoglicano bacteriano (Domínguez, 2010).

Las especies del género *Listeria* adheridas a la membrana celular inducen a la membrana plasmática, a emitir a su alrededor unas protrusiones, que rodean progresivamente a *Listeria* formando una bolsa en la que llega a encerrarse rodeada de una vacuola, semejante a un fagosoma con doble membrana (**Figura N. 1**). La actina A o ActA, codificada por el gen actA, es una proteína de membrana con una región hidrófoba carbono terminal anclada en la membrana de uno de los polos bacterianos que se polimeriza continuamente formando microfilamentos que se unen a uno de los extremos de la *Listeria*, a la que recubren, como una especie de nube de microfilamentos, cuya densidad va disminuyendo hasta ser casi inaparente en el polo opuesto. El acúmulo de clatrina, proteína que recubre las vesículas en el proceso de transporte entre membranas, reordena la actina. La polimerización proporciona energía necesaria para que *L. monocytogenes* se desplace en el citoplasma celular y posteriormente para que pase a una célula contigua, propagando la infección ya que *L. monocytogenes* no puede ser atacada por los factores séricos y celulares inmunitarios (Domínguez, 2010).

El genoma de *L. monocytogenes* dispone de una familia de al menos 11 genes, los InI, que varían según el serovar. Estos genes InI codifican unas proteínas de membrana específicas de especie, llamadas internalinas (inI). Estas fueron descubiertas al observar que las cepas virulentas tenían genes que faltaban en las avirulentas. Las InI son esenciales para abrir poros en el fagosoma. Las fracciones interna y la transmembranaria de estas proteínas son las más importantes y se sintetizan en la fase exponencial del crecimiento. Durante la lisis de la membrana de las vacuolas o fagosomas también intervienen la lecitinasa y la fosfolipasa C, codificada por el gen plcB. La fosfolipasa C procede de la escisión de su precursora, pre-fosfolipasa C, originada por efecto del gen plcB. La fosfolipasa C escinde a la fosfatidilcolina (en cuyo caso se denomina PC-PLC), a la fosfatidilserina y a la fosfatidiletanolamina. También intervienen en la virulencia otras sustancias, incluidas una segunda fosfolipasa, Zn-metaloproteasa, una proteína de superficie. El gen mpl es el primero del operón codificador de una proteasa (Domínguez, 2010).

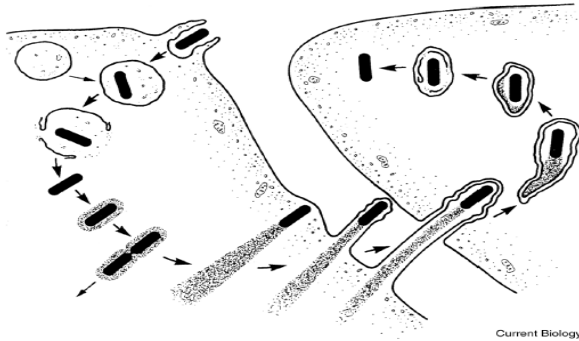


FIGURA N. 1. Ciclo intracelular de *Listeria*

La bacteria invade a las células del hospedero, escapa de ellas en una vacuola y desarrolla una cola de actina que propulsa a la bacteria dentro del citoplasma y genera suficiente fuerza para generar protrusiones en células adyacentes. Este ciclo facilita la transmisión y colonización directa de célula a célula.

(Merz y Higgs, 2003)

Se desconoce si la LLO coadyuva a la lisis de la vacuola de doble membrana. La listeriolisina y las fosfolipasas, PI-PLC y PC-PLC, están codificadas por genes que se agrupan en dos regiones del cromosoma bacteriano y se expresan de manera termodependientemente, llegando a un máximo a 37°C. En el citosol de la célula hospedadora (y en la fase exponencial del crecimiento en caldo enriquecido), *L. monocytogenes* expresa intensamente genes cuyas proteínas, activan vías de señales específicas del hospedero que intervienen en su metabolismo, inducen la síntesis de la pared celular, median la síntesis de proteínas, adaptan el metabolismo bacteriano a los agentes estresantes, especialmente al oxidativo, inducen la síntesis de su pared, modifican sus péptidoglicanos, liberan péptidos neuramínicos y activan a sus genes de virulencia superficiales y a los mecanismos que anulan las defensas del hospedador, incluyendo la resistencia a los péptidos catiónicos. En el citosol, esta bacteria se divide cada 60 minutos, de modo que se multiplica rápidamente. En los enterocitos se produce una extensa transcripción que remodela y activa a los genes de virulencia (Domínguez, 2010).

El ciclo total de la infección celular desde la adhesión de la bacteria a la membrana hasta su salida, dura unos siete días. Las bacterias libres se multiplican activamente y pasan a células contiguas por un mecanismo no lítico diseminándose por los órganos. Algunas células infectadas son fagocitadas por células con capacidad autofágica, degradándose en el compartimento auto lisosómico. Este es un mecanismo defensivo intrínseco del hospedero contra las bacterias intracelulares como *Streptococcus* grupo A, *Shigella flexneri* y *L. monocytogenes*. Aun así, estas bacterias pueden evitar la autofagia, soslayando el reconocimiento autofágico, sobreviviendo y multiplicándose en el citosol, habiéndose encontrado colas de cometa y la formación de protrusiones sin sufrir la defensa inmunitaria. *L. monocytogenes* puede pasar del citosol al compartimento extracelular y de éste a la sangre, que la difunde por los órganos, especialmente hígado, bazo y médula, en los que puede formar focos infecciosos (Domínguez, 2010).

3.3.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

a) Listeriosis durante el Embarazo

Las infecciones con *L. monocytogenes* en embarazadas pueden resultar en aborto, mortinato, parto prematuro o infección neonatal. Esta infección puede ocurrir en cualquier período del embarazo, pero está más frecuentemente documentado durante el tercer trimestre de gestación. Se ha establecido que embarazadas están más propensas a contraer la enfermedad, debido al tropismo de la internalina a las moléculas de E-caderina presentes en los sinciotrofoblastos (Parihar, 2004). Debido a que no se realizan cultivos bacterianos desde abortos espontáneos o mortinatos de manera rutinaria, resulta difícil estimar de manera precisa la proporción de pérdidas fetal que podrían ser atribuidas a una infección por *L. monocytogenes* durante la gestación. Se ha obtenido mortalidad fetal en embarazadas que han sido diagnosticadas con listeriosis una tasa de que oscila entre el 16% y 45% (Painter y Slutsker, 2007).

En una revisión bibliográfica reciente, se ha establecido que 20% de los casos de listeriosis en embarazadas, provoca abortos espontáneos o mortinatos, de

las gestaciones restantes, el 63% resulta en una infección neonatal. La mayoría de los casos de listeriosis en embarazadas ocurren en mujeres sanas. Entre los casos identificados, sólo el 4% tiene una posible condición predisponente como puede ser el uso de corticoesteroides, diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico o infección con VIH. Las embarazadas con gestaciones múltiples pueden tener un riesgo mayor de contraer listeriosis. La mayoría de los casos de listeriosis neonatal que presentan un cuadro grave, presenta una sintomatología no específica y con frecuencia se manifiesta como un cuadro que no requiere mayor atención, generalmente presentando fiebre, dolor de cabeza, mialgia o síntomas gastroentérico, lo que correspondería a la fase bacterémica de la infección (Painter y Slutsker, 2007). Aunque las especies de *Listeria* tienen como objetivo a las mujeres embarazadas, algunas son portadoras asintomáticas, que llegan a término felizmente dando a luz hijos sanos. Debe hacerse énfasis en que las mujeres infectadas en un embarazo no necesariamente sufren el mismo problema en los siguientes (Domínguez, 2010).

El líquido amniótico puede contener unas 10^8 ufc/ml, que pueden contaminar paritorios, maternidades y todo el material, si no se limpia y desinfecta a fondo. *L. monocytogenes* se ha aislado de las secreciones cervico-vaginales de puérperas, pero su papel transmisor es mínimo y, hasta ahora, no se ha encontrado *L. monocytogenes* en las secreciones orofaríngeas de personas sanas. Las infecciones de los fetos con *L. monocytogenes*, se piensa que es a través de la transmisión transplacentaria luego de la bacteremia materna, aunque, algunas infecciones pueden ocurrir de manera ascendente dispersado por colonización vaginal (Domínguez, 2010). Las infecciones intrauterinas pueden desencadenar un parto prematuro, amnionitis, aborto espontáneo, mortinatos o infección neonatal temprana. En una serie de casos existe evidencia de una corioamnionitis en todos los casos de infección neonatal temprana (Painter y Slutsker, 2007).

Las infecciones neonatales pueden ser prevenidas con tratamiento antibiótico durante la gestación. Existen casos descritos que sugieren que la infección neonatal fetal o inclusive embrionaria no siempre es seguida de una

listeriosis en la madre, para la cual el tratamiento ha sido pospuesto o no dado. Sin embargo, debido a las consecuencias adversas de la listeriosis en la madre y la disponibilidad de un tratamiento efectivo, es prudente el evaluar cualquier episodio febril durante el embarazo con cultivos de sangre. No está recomendado que mujeres con historial asociado a listeriosis experimenten una rutina de chequeo antimicrobiano o profilaxis antimicrobiana durante sus posteriores embarazos. No obstante, una orientación dietaria para evitar alimentos de altos riesgos debería ser dada (Painter y Slutsker, 2007).

La listeriosis neonatal se divide en dos formas, la de comienzo temprano donde la manifestación clínica de esta infección es severa y generalmente fatal donde el feto puede morir en el útero acompañado o no de un aborto espontáneo. La segunda forma es de comienzo tardío, ésta puede ocurrir desde la primera semana de nacido a varias semanas después de haber sido dado a luz. Recién nacidos usualmente nacen sanos de madres con embarazos sin complicaciones, presentando más frecuentemente una meningitis luego de nacidos. Estas formas clínicas asemejan los patrones de la enfermedad vistos en neonatos con infecciones por *Streptococcus* grupo B, y de esta manera se sugieren diferentes modos de transmisión para las dos formas (Parihar, 2004; Painter y Slutsker, 2007).

b) Enfermedad Invasiva en Adultos

Este agente es una causa importante de meningitis bacteriana en adultos y la tasa de letalidad es de aproximadamente 30%. Puede que hayan aumentado los casos de meningitis en adultos causados por este agente, debido a una mejora en los programas de vacunación contra la meningococcemia y meningitis causada por neumococo. Adultos con listeriosis presentan con mayor frecuencia sepsis, meningitis o meningoencefalitis. Los síntomas asociados a alteraciones en el sistema nervioso pueden ser fiebre que se debe generalmente a la bacteremia, malestar, ataxia, convulsiones y un estado mental alterado. Resulta interesante que, en contraste con la meningitis ocasionada por otros patógenos, aproximadamente un tercio de los pacientes con meningitis por listerias inicialmente no evidencian signos de afección de las meninges. Las infecciones focales son raras y usualmente

son resultado de la diseminación de una fase bacterémica anterior. La endocarditis por *L. monocytogenes* ocurre primariamente en pacientes con una lesión cardíaca subyacente, incluyendo válvulas prostéticas o porcinas, y es clínicamente indistinguible de otras causas de endocarditis (Painter y Slutsker, 2007).

Varias condiciones clínicas están asociadas con listeriosis en adultos, estos incluyen neoplasias malignas, trasplantes de órganos, terapia inmunosupresora, infecciones con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), niños e individuos de edad avanzada, generalmente, debido a que estas condiciones provocan una disminución de la inmunidad celular. El cáncer, especialmente el proceso maligno linforreticular, ha sido asociado con listeriosis en muchos estudios. Es necesario considerar la genética, los hábitos y la edad como factores importantes en la patogénesis de la enfermedad. En lo que respecta al factor genético, el polimorfismo genético de los receptores de membrana en células del hospedero, como la E-caderina, pueden llevar a diferencias en la susceptibilidad a *L. monocytogenes*. El hábito del consumo de antiácidos o inhibidores de la bomba H⁺, pueden disminuir la acidez del estómago y con ello, *L. monocytogenes* puede evadir el efecto del ácido gástrico. El abuso de alcohol puede estar relacionado con la forma gastroentérica de la listeriosis debido a tener un sistema inmune deteriorado. A pesar de la fuerte asociación entre la baja inmunidad y una listeriosis invasiva en adultos, muchos casos no involucran una condición predisponente. En un informe, se estableció que 30% de los pacientes con meningitis y 11% de ellos con bacteremia causada por *L. monocytogenes*, no tenían una condición predisponente. En otro informe, entre 24 al 37% de los pacientes con infecciones del líquido cefalorraquídeo (LCR) con *Listeria* no han tenido condiciones preexistentes conocidas (Parihar, 2004; Painter y Slutsker, 2007).

c) Enfermedad No Invasiva: Gastroentérica

La información acerca de diversas investigaciones sobre brotes, sugiere que *L. monocytogenes* causa una gastroenteritis febril en hospederos normales. El primer brote por gastroenteritis febril se vincula al consumo de leche chocolatada servida en un picnic. El factor que guía a pensar en una gastroenteritis febril versus

una enfermedad invasiva no está claro aún. Se ha asociado con una listeriosis no invasiva la susceptibilidad de las personas con mayor riesgo a una listeriosis invasiva, pero no los factores de riesgo del hospedero en cuestión. Las diferencias en las cepas podría explicar los diferentes síntomas, pero no se ha observado diferencia hasta la fecha ya que las cepas causantes de una gastroenteritis no invasiva también causan listeriosis invasiva. En estudios realizados sobre las características patogénicas de las cepas de *Listeria*, no se ha encontrado diferencia entre cepas asociadas a la enfermedad invasiva y aquellas asociadas a la gastroenteritis. Debido a que no hay indicación de una enterotoxina de *Listeria*, se ha planteado la hipótesis de que la gastroenteritis febril es debido a una invasión limitada de la mucosa intestinal. La dosis infectante de *L. monocytogenes* necesaria para causar listeriosis o el cuadro de gastroenteritis no está completamente entendida. La densidad de *Listeria* en los alimentos implicados en brotes de gastroenteritis febril han estado en un rango de 3×10^1 ufc/g hasta $1,6 \times 10^9$ ufc/g, con un promedio de 10^5 ufc/g. La dosis suficiente para causar listeriosis invasiva en personas susceptibles está poco estudiado, pero se piensa que debe ser mucho menor (Painter y Slutsker, 2007).

La incidencia de esta gastroenteritis es difícil de establecer, debido a que las deposiciones provenientes de pacientes con diarrea son rara vez analizadas en un cultivo para *L. monocytogenes*. Cuando en un brote se sospecha de *L. monocytogenes* se deberían tomar las medidas para notificar al laboratorio, para que se realice un cultivo específico para esta bacteria. El microorganismo es frecuentemente cultivado desde los alimentos, pero debido a que es comúnmente encontrado en muchos alimentos, el recuperar *L. monocytogenes* desde los alimentos, casi nunca es suficiente para verificar la fuente de la infección, a menos que la cepa identificada en los enfermos esté relacionada epidemiológicamente con la encontrada en los alimentos analizados (Painter y Slutsker, 2007).

Aunque mucho se ha aprendido acerca de la listeriosis epidémica, la mayoría de los casos de listeriosis en humanos se producen esporádicamente. En los EE.UU., la notificación de enfermedades y los datos de altas hospitalarias se han

utilizado para estimar el número de casos de listeriosis esporádica. Sin embargo, tales métodos son generalmente poco sensibles y da lugar a una subestimación de la verdadera incidencia de listeriosis en la población. Las diferencias en las tasas de incidencia deben interpretarse en el contexto de los métodos utilizados para la verificación de los casos y presentación de informes en cada país. Sin una metodología consistente para estimar la incidencia, es difícil evaluar tendencias o comparar las tasas entre los países (Painter y Slutsker, 2007).

3.3.7 LISTERIOSIS EN CHILE

En el período de 1990 y 2000, se realizaron los primeros estudios en alimentos presentes en mercado de Santiago, demostrando presencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos procesados (3,6%), mariscos (11,6%), helados (3,6%) y queso crema (0,8%) (Schobitz *et al.*, 2009). Hasta el año 2007, los casos informados en Chile se mantenían en tasas estables. El Instituto de Salud Pública (ISP) recibía anualmente menos de 50 muestras, y en la Región Metropolitana de Santiago se promediaron 23 casos entre los años 2006 y 2007 (Chile, MINSAL, 2008).

A partir del año 2008 han habido informes de casos de listeriosis transmitida a través de los alimentos, si bien ya había sido diagnosticada su presencia en casos clínico, la escasa información sobre la prevalencia de este patógeno a nivel de la industria de alimentos chilena se debió en parte a que la detección en alimentos no estaba incluida en el Reglamento Sanitario de Alimentos, sino a partir de Diciembre del año 2009 (Schobitz *et al.*, 2009). Esta es la situación en el brote del año 2008 ocurrido en la Región Metropolitana, en diferentes establecimientos públicos y privados, principalmente del sector oriente de la capital, por el consumo de una determinada marca de queso blando, lo cual tuvo como consecuencia la muerte de cinco personas y 119 personas afectadas. Durante el año 2009 se notificaron 73 casos. De los notificados, nueve correspondieron a la Región Metropolitana y uno a la Región de O'Higgins. Del total de casos notificados, se reportaron 17 fallecidos, con una tasa de letalidad del 25%. Todos los casos correspondieron a los grupos de

riesgo anteriormente mencionados. La mayoría de los casos presentaron el diagnóstico de sepsis o meningitis por listeria y la mayoría fueron notificadas por el sistema público de salud (Chile, MINSAL, 2009b; Chile, MINSAL, 2011). El alimento identificado como responsable fue una cecina de una determinada marca, detectándose posteriormente el patógeno en diversos productos cárnicos de la misma empresa. En ambos casos, hubo retiro de productos del mercado con cuantiosas pérdidas económicas y pérdida de credibilidad del público para los productos en cuestión. Estos fueron los primeros casos en Chile donde se asociaron alimentos del mercado, con personas enfermas o fallecidas de listeriosis. Sin embargo, a nivel clínico ya se había diagnosticado la infección pero con una frecuencia baja de 16 casos entre los años 2001 y 2005, correspondiendo cuatro de ellas a mujeres embarazadas (Schobitz *et al.*, 2009).

Hasta la semana epidemiológica 52 del año 2010, se notificaron 68 casos de listeriosis (0,4 por cien mil habitantes), cifra inferior a la registrada en igual periodo del año 2008 y 2009 (165 y 73 casos respectivamente). Se notificaron 15 fallecidos (letalidad 22%), nueve correspondientes a adultos mayores y/o con patologías crónicas asociadas, cuatro recién nacidos y dos casos sin factor de riesgo aparente (un adulto de 29 años y un niño de tres años). Seis de los fallecidos pertenecían a la Región Metropolitana. La mayoría de los casos presentaron como diagnóstico la sepsis o meningitis por listeria (Chile, MINSAL, 2011).

Aun cuando la frecuencia de la enfermedad es baja en la población, para la industria procesadora de un alimento sospechoso es costoso el retiro de productos del mercado lo cual, además, va acompañado de la pérdida de prestigio de la empresa y pérdidas en las ventas por temor y rechazo de la población (Schobitz *et al.*, 2009).

3.3.8 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

El diagnóstico de listeriosis invasiva, depende del aislamiento de *L. monocytogenes* en una localización normalmente estéril, como la sangre o el líquido cefalorraquídeo. Debido a que el microorganismo puede ser confundido en la

tinción de Gram con un contaminante difterioide, la evaluación bacteriológica completa debe hacerse. La recuperación del microorganismo a partir de muestras de materia fecal es muy útil cuando se sospecha de la gastroenteritis febril, pero el aislamiento de las heces por sí mismo no es diagnóstico, porque existen portadores asintomáticos. Para documentar un brote de gastroenteritis febril, la tasa de aislamiento entre las personas sintomáticas debe ser significativamente mayor que en las personas asintomáticas (Painter y Slutsker, 2007).

La identificación de *L. monocytogenes* por el uso de métodos de anticuerpos fluorescentes o la utilización de las sondas de ADN junto con la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser útil para algunas muestras. Ensayos experimentales para anticuerpos contra listeriolisina O han sido útiles en algunos estudios epidemiológicos y se han utilizado para apoyar el diagnóstico de listeriosis con cultivo de LCR negativo (Painter y Slutsker, 2007).

Los ensayos controlados para determinar el tratamiento óptimo con antibióticos para la listeriosis no se han realizado. El tratamiento de elección ha sido el uso de la dosis alta de amoxicilina endovenosa (EV) (dos a tres gramos, tres a cuatro veces al día), con una dosis adicional de gentamicina (360 mg, una vez al día) para adultos no embarazadas. El papel que juegan los aminoglucósidos es poco conocido, ya que penetra de mala manera en las células y puede ser ineficaz en el hospedero vivo. De hecho *L. monocytogenes* se ha multiplicado a pesar de las altas concentraciones de los aminoglucósidos en el ambiente extracelular. La mayoría de estas bacterias pueden mantenerse en el medio extracelular en los casos de meningitis (Painter y Slutsker, 2007).

La combinación de sulfametoxafol - trimetoprim fácilmente entra en las células y mata a *L. monocytogenes*. Esta combinación de fármacos ha demostrado su eficacia en pacientes con listeriosis que tienen hipersensibilidad a la penicilina. En comparación con las aminopenicilinas, las nuevas quinolonas pueden tener una mayor actividad bactericida, ya que cruzan la barrera hematoencefálica en el SNC, y se acumulan en las células hospederas, sin embargo, los estudios clínicos no se han realizado. La capacidad de *L. monocytogenes* para crecer y sobrevivir dentro de

las células, probablemente explica la escasa respuesta a los fármacos bacteriostáticos y la lenta respuesta a la penicilina. Los fármacos bacteriostáticos como el cloranfenicol o tetraciclina se han asociado con altas tasas de fracaso en el tratamiento, por lo que no se recomiendan. Las cefalosporinas no se recomiendan para el tratamiento porque tienen una baja afinidad con la proteína de unión a la penicilina que posee *Listeria* (Painter y Slutsker, 2007).

Las recaídas han sido informadas en pacientes inmunodeprimidos después de dos semanas de tratamiento con penicilina. Debido a que muchos de estos pacientes inmunodeprimidos tienen una menor capacidad para eliminar las células infectadas, el tratamiento antibiótico durante unas tres a seis semanas es prudente. Un curso del tratamiento sensato puede ser de dos semanas para la listeriosis durante el embarazo, dos a tres semanas para la listeriosis neonatal, dos a cuatro semanas para los adultos no inmunodeprimidos con meningitis y bacteriemia, o para las infecciones complicadas tales como la endocarditis (Painter y Slutsker, 2007).

3.3.9 PREVENCIÓN

El reconocimiento de que la mayoría de la listeriosis humana es a través de los alimentos ha dado lugar a medidas de control que han reducido la incidencia de listeriosis.

Entre los años 2001 y 2003, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA), el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y el Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA) dieron a conocer un plan de acción nacional contra *Listeria* para ayudar a guiar los esfuerzos de control de la industria, en entidades reguladoras y funcionarios de salud pública de ese país. Los planes se dirigieron a varios puntos de acción, incluyendo un aumento de la orientación normativa con respecto a la fabricación de alimentos LPC. También en 2003, después de un gran brote vinculados a delicatessen de pavo, el USDA emitió nuevas regulaciones destinadas a reducir aún más la contaminación con *L. monocytogenes* de carne LPC y productos de aves de corral. Las recomendaciones dietéticas para los consumidores que se han publicado también pueden haber contribuido a la disminución de la incidencia de la enfermedad. Las fuentes de alimentos no

comerciales, tales como queso de leche cruda, siguen siendo fuentes de listeriosis, especialmente entre las mujeres de América Latina (Painter y Slutsker, 2007). En Chile, a mediados del año 2009, se realizó una Consulta Pública dirigida por la División de Políticas Públicas Saludables y su Promoción del Departamento de Alimentos y Nutrición perteneciente al Ministerio de Salud con el que se resolvieron medidas de control y prevención de listeriosis para los consumidores además de integrarse los criterios microbiológicos para *L. monocytogenes* en el Reglamento Sanitario de Alimentos a finales del año 2009.

Para las personas que tienen un mayor riesgo de contraer listeriosis, incluyéndose en este grupo aquellas que están embarazadas o inmunodeprimidos, se pueden tomar medidas específicas en la dieta diaria para disminuir el riesgo. Estas personas deben evitar los alimentos de alto riesgo, tales como perros calientes, carnes frías o fiambres (especialmente delicatessen en rodajas), a menos que estén recalentados y bien calientes, quesos blandos a menos que tengan etiquetas que indican claramente que están hechos con leche pasteurizada; leche cruda sin pasteurizar; patés refrigerados o pasta de carne untable (en lata o patés no perecederos). Además, se deben evitar que los jugos de salchichas y carnes frías o provenientes de otros paquetes de carnes frías toquen otros alimentos o que toquen las superficies de preparación de alimentos, y lavarse las manos luego de ser manipuladas (Painter y Slutsker, 2007).

La dieta y las medidas de preparación de alimentos se han recomendado para el público en general, que deben disminuir el riesgo no sólo de la listeriosis, sino también de otras enfermedades comúnmente transmitidas por los alimentos, como la salmonelosis y la campylobacteriosis. Estas medidas incluyen la cocción de los alimentos crudos de origen animal, lavado de verduras crudas antes de comerlas, mantención de las carnes crudas separadas de verduras; alimentos cocinados y alimentos LPC; evitar la leche cruda (no pasteurizada) o los alimentos hechos con leche cruda; y lavar manos, cuchillos y tablas de cortar después de manipular alimentos crudos (Painter y Slutsker, 2007).

3.4 PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS Y LISTERIOSIS

Se han registrado varios pequeños brotes de listeriosis que han sido relacionados con los mariscos, incluida carne de cangrejo, mejillones ahumados, trucha, y el pescado ahumado en frío (Norton y Braden, 2007). Los posibles contribuyentes a que se den con menor frecuencia estos brotes o que sean más reducidos podrían incluir la frecuencia relativamente baja de consumo por un gran segmento de la población, o por una característica inherente del proceso de la matriz alimentaria o la producción de este tipo de alimentos, que afectan la capacidad de los microorganismos de generar cuadros clínicos una vez consumido. Aunque también es posible que los brotes se produzcan, pero no hayan sido detectados (Jinneman *et al.*, 2007). Si bien la incidencia de *L. monocytogenes* en moluscos cultivados en sitios de crecimiento monitoreado es baja, las ocasiones cuando la contaminación de *L. monocytogenes* ha ocurrido, se le ha adjudicado a un manejo y procesamiento inadecuado de un cultivo (Bremer *et al.*, 2003).

Como ya se ha mencionado *L. monocytogenes* es ubicua en la naturaleza, por lo tanto, las muchas criaturas acuáticas como peces, ostras, camarones, cangrejos, langostas, calamares y ostiones cosechados de los ambientes naturales pueden ser fuentes potenciales de *Listeria* en la dieta humana. Muchos de estos productos están sometidos a una variedad de métodos de procesamiento que pueden inactivar a *Listeria* en la materia prima, pero como se ha planteado con anterioridad, *Listeria* también puede presentarse durante el procesamiento, por las condiciones de saneamiento, las prácticas de fabricación, o por la contaminación post-procesamiento. La naturaleza psicotrófica de *L. monocytogenes* permite su supervivencia o incluso su multiplicación durante el almacenamiento refrigerado e inclusive en situaciones de abuso de temperatura. Esto es de especial interés para aquellos productos que reciben tratamiento térmico mínimo o nulo antes de su consumo (Jinneman *et al.*, 2007). La temperatura de almacenamiento de los alimentos es un factor importante que influye en el riesgo de multiplicación de

L. monocytogenes en alimentos perecederos. Su almacenamiento a 5 ° C, e incluso a temperaturas inferiores a ésta, puede retrasar pero no impedir su multiplicación en algunos de estos alimentos (Domínguez, 2010)

Se han emitido por la FDA de los EE.UU que en más de 120.660 Kilogramos (Kg) de pescados y mariscos LPC nacionales o importados, este patógeno se encuentra habitualmente en el 7,6% de todos los productos comercializados en los EE.UU. El primero de varios casos de listeriosis positivamente vinculados con el consumo de pescado o marisco no se informó hasta 1989, cuando una mujer de 54 años de edad en Italia contrajo meningitis listérica cuatro días después de consumir pescado al vapor de la que se aisló *L. monocytogenes* más tarde (Jinneman *et al.*, 2007).

Rocourt *et al.*, el año 2000, clasificaron a los productos marinos en base a factores de riesgo como:

Alto riesgo – moluscos, ostras con concha, sashimi, producto marinos preservados ligeramente (NaCl < 6% (w/w) en fase de agua, pH > 5), pescado salado, marinado, fermentado, ahumado frío, medianamente cocido.

Bajo riesgo – Pescado semi preservado (NaCl > 6% (w/w) en fase agua, pH <5), pescado cocido, seco salado y ahumado, pescado fresco (Parihar, 2004).

En EE.UU. y tras un programa de vigilancia durante el período 1991-1996 llevado a cabo por la FDA, un total de 218 productos derivados de crustáceos (cangrejo, camarones y langostinos, langostas y cangrejos) fueron positivos a *L. monocytogenes*, obteniéndose un mayor número de positivos en el cangrejo, con 142 muestras positivas. Quince muestras de mariscos fueron positivas para *L. monocytogenes* donde la categoría incluye mejillones, ostras, almejas, vieiras y caracoles. En lo que respecta a los peces existían 231 muestras positivas para *L. monocytogenes*, con 164 de éstas pertenecientes a productos de pescados y mariscos ahumados. El resto de las muestras positivas a *L. monocytogenes* representaron un grupo diverso de productos, incluyendo lo siguiente: tres muestras

de calamares, nueve muestras de anguila; 19 muestras de huevas de caviar, 17 muestras de pescados y mariscos, 13 muestras de ensalada, paté o mousse de mariscos; y desde hisopados del procesamiento en línea se obtuvieron 94 muestras positivas (Jinneman *et al.*, 2007).

Antes de 1987, se sabía muy poco acerca del comportamiento de *Listeria* spp. en pescados y mariscos. Desde entonces, una serie de estudios se han centrado en el crecimiento, inhibición y resistencia térmica de *L. monocytogenes* en diferentes productos. Estudios más recientes han incorporado métodos de caracterización molecular para rastrear la difusión de cepas de *L. monocytogenes* en los centros de procesamiento de mariscos. Además de los pasos efectuados en los centros donde son procesados los productos hidrobiológicos, *L. monocytogenes* ha encontrado un nicho ecológico para el crecimiento en los alimentos refrigerados LPC que tiene una vida útil más larga. Durante el almacenamiento *L. monocytogenes* puede sobrevivir y multiplicarse en muchas materias primas alimenticias. Son muchas las células supervivientes de *L. monocytogenes* que se lesionan o dañan por calentamiento, congelación u otros tratamientos habituales en el procesamiento de mariscos. *L. monocytogenes* expuestas a un estrés calórico son menos patógenas que las no estresadas, debido a que la energía que normalmente se dedica a la patogénesis se dirige a contrarrestar a los agentes estresantes (Domínguez, 2010). Ha sido bien documentado la persistencia de *L. monocytogenes* en las instalaciones de procesamiento de pescado ahumado, con lo que se establece una reserva ambiental que es difícil de eliminar (Jinneman *et al.*, 2007).

3.4.1 CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA EN PRODUCTOS

HIDROBIOLÓGICOS

Los productos marinos crudos y procesados han sido considerados como excelentes sustratos para el crecimiento de la mayoría de los agentes comunes de las ETA, sobre todo si los mariscos se mantienen a una temperatura inadecuada; el comportamiento de *L. monocytogenes* en particular en los productos finales también

se ha estudiado. Según datos recogidos por Lovett *et al.* en el año 1988, *L. monocytogenes* creció rápidamente (tiempo de generación \cong 12 horas) en las muestras inoculadas de camarón crudo, cangrejo, surimi, pescado blanco además de que el patógeno alcanzó una población máxima superior a 10^8 ufc/g en los cuatro productos durante los siguientes 14 días con un almacenamiento a 7°C. Dos años más tarde, Brackett y Beuchat, también informaron de que *L. monocytogenes* fue creciendo y mantuvo un nivel similar de patogenicidad en carne de cangrejo artificialmente contaminada, durante 14 días de almacenamiento a una temperatura entre 5 a 10°C. Cuando se realizó el estudio en bagres que fueron almacenadas a 4°C, las poblaciones de *L. monocytogenes* aumentaron lentamente (1 a 1,5 \log_{10}) durante los primeros 12 días y luego disminuyó por debajo de 1,5 \log_{10} en el día 16. Durante el almacenamiento, las poblaciones de psicrótrofos aumentaron de 10^3 a más de 10^7 ufc/g, lo que refuerza la idea de que *L. monocytogenes* puede sobrevivir fácilmente en el frigorífico en los alimentos crudos, aun cuando en gran medida superados en número por otros contaminantes naturales. Hoffman *et al.*, el año 2003, lograron recuperar *L. monocytogenes* de camarones contaminados de laboratorio (inóculo inicial \cong 10^5 ufc/g) después de 90 días de almacenamiento a -20°C. Debido a esto se ha hecho evidente que este patógeno es bastante resistente a las temperaturas bajo cero (Jinneman *et al.*, 2007).

En la última década la participación de mariscos LPC como posibles productos de riesgo de provocar listeriosis, ha provocado preocupaciones acerca de cuán adecuados son los tratamientos del proceso de cocción que se utilizan actualmente para mariscos crudos. Desde éstos estudios iniciales se ha determinado el tiempo de muerte térmica de *L. monocytogenes* en diferentes mariscos y pescados. Budu-Amoako *et al.*, el año 1992, determinó el tiempo de muerte térmica de *L. monocytogenes* en muestras de 25 gramos inoculados para contener 10^7 ufc/g. Los resultados de estos estudios se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Tiempos de muerte térmica de *L. monocytogenes* en diferentes productos hidrobiológicos.

T°(°C)	Productos					
	Carne de langosta (n: 19)	Jaiba o Cangrejo Azul (n: 51)	Carne de cola de cangrejo (n: 26)	Mejillón en Salmuera (n: 17)	Salmón (n: 30)	Bacalao (n: 30)
	Valores D ³ (minutos)					
50.0		40.43				
51.6	97.0					
55.0	55.0	12.00	10.23			
56.0				48.09		
57.2	8.3					
58.0				16.25	10.73	7.28
60.0	2.39	2.61	1.98	9.45		
62.0				5.49	4.48	1.98
62.7	1.06			1.85	2.07	0.87
65.0			0.19		0.87	0.28
68.0					0.15	0.15
70.0					0.07	0.03

Fuente: Jinneman *et al.*, 2007. Tabla 15.8 Thermal Death Times of *L. monocytogenes* in Different Seafoods and Fish, Chapter 15: Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Fish and Seafood in *Listeria*. Listeriosis, and Food Safety, página 644.

³ **Valor D:** Es el tiempo de exposición a un factor letal (por ejemplo, el calor o radiación) necesario para inactivar el 90% de la población de un microorganismo específico a una determinada dosis del factor nocivo. El valor D es una medida de resistencia del microorganismo a factores nocivos por tanto a mayor valor D, mayor es la resistencia (Lado y Yousef, 2007).

En el caso de que el tiempo y las temperaturas anteriormente descritas en esta sección hayan sido monitoreados para diferentes productos hidrobiológicos, entonces los retiros recientes de estos productos puede que sean debido a probables contaminaciones del post-procesamiento (Jinneman *et al.*, 2007).

Reconociendo que *L. monocytogenes* es más probable que contamine la superficie de un producto hidrobiológico, en lugar de su interior, varios estudios han evaluado el uso de diferentes tratamientos para inhibir o inactivar *L. monocytogenes* en la superficie del producto ya terminado. Muchas herramientas han sido puestas a prueba para tal cometido, los ácidos orgánicos con los cuales pueden ser marinados los mariscos, han demostrado ser un método eficaz para reducir la posibilidad de la presencia de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento de productos marinados antes de su retiro de los centros de procesamiento, a pesar de que no logra eliminarla por completo. Estudios también indican que la inmersión de productos como el camarón, mejillón, langosta, cangrejo y vieiras en ácidos orgánicos podría ser útil en la disminución de los niveles de *Listeria* antes y durante el almacenamiento congelado (Jinneman *et al.*, 2007).

3.5 MITILICULTURA

La mitilicultura es el nombre que recibe la actividad de cultivo de moluscos bivalvos. El concepto, proviene del hecho de que estas especies han sido clasificadas científicamente dentro de una misma familia llamada *Mitilidae*. Dentro de las especies de mitílidos más importantes que se cultivan en Chile tenemos el Choro Zapato (*Choromitilus chorus*) con 3%, La Cholga (*Aulacomya ater*) con 7% y el Mejillón Chileno o Chorito (*Mytilus chilensis*) con un 90% (Guerrero, 2006).

La producción mundial de choritos corresponde a un 20% de la producción silvestre y un 80% al cultivado. De acuerdo a estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), unos 50 países generan la oferta mundial de mitílidos, que alcanzó para el año 2002 la cantidad de 1.708 mil toneladas. De este volumen, 1.444 mil toneladas correspondieron a la producción proveniente de centros de cultivo. Entre los principales países

cultivadores se encuentran China, España, Tailandia, Italia, Nueva Zelandia y Francia. Por su parte, Chile se posiciona como el octavo país en cuanto a volumen cosechado en el año 2002. En nuestro país, la acuicultura se desarrolla fundamentalmente en ambientes marinos costeros y, secundariamente, en ambientes dulceacuícolas (ríos y lagos). La actividad se ha concentrado casi totalmente en dos zonas del país: Regiones III y IV donde se produjo 31.144 toneladas, correspondiente al 5% de la cosecha nacional del año 2003 y las Regiones X, XIV y XI que aportaron 560.240 toneladas, equivalentes al 92%, el mismo año (Guerrero, 2006; FAO, 2005). La tendencia de la producción continúa para la incorporación de mecanización y tecnología, lo que trae aparejado un fuerte proceso de integración vertical e incorporación de nuevos inversionistas y aumento del tamaño de las instalaciones. Actualmente, el 99,8% de la producción de choritos del país, se realiza en los mares interiores de la región de Los Lagos, asimismo gran parte de las plantas procesadoras comparten este territorio. Esta condición de concentración geográfica incluye las diferentes fases de la cadena de valor, hasta su expedición a los mercados internacionales (Chile, PROCHILE, 2006).

La mitilicultura comercial consiste básicamente en mantener grandes cantidades de semillas de mitílicos, hasta que estos crecen a una talla comercial apta para su venta. La mantención de estos mitílicos se realiza usando implementos e infraestructura que permita su correcto desarrollo, a los cuales se les da el nombre de unidades de cultivos. En el caso del chorito, éste ha sido explotado y comercializado en grandes volúmenes desde los años 30, aproximadamente (Guerrero, 2006; Plaza *et al.*, 2005). La Región de Los Lagos dispone de un clima privilegiado para el desarrollo de la mitilicultura de diferentes especies, presentando zonas abrigadas con aguas tranquilas y menos profundas no expuestas marcadamente a las inclemencias del viento, gracias a sus innumerables ensenadas, bahías y archipiélagos. Asimismo, es importante destacar atributos de las aguas, tales como temperatura (13°C de promedio anual), pH estable, bajos contenidos de gases y de sólidos en suspensión, entre otros (Guerrero, 2006).

3.5.1 CULTIVO DEL MEJILLÓN

El Chorito denominado en algunos mercados de destino como Chorito, mejillón, mussel, cozze, moule, mexilhão, posee una concha de dos valvas, de tamaño alargado-mediano (máximo 85 mm.), valvas provistas de estrías concéntricas de crecimiento y recubierta de un periostraco pardo, negruzco o violáceo. La charnela esta provista de numerosos dientecillos similares, generalmente visibles a simple vista. La superficie interna es nacarada y de color violáceo. Entre ambas valvas se encuentra el cuerpo, el cual es blando y está cubierto por un tejido llamado manto, éste envuelve los órganos internos tales como: masa visceral, palpos labiales, pie, branquias y gónadas. Dado que los mitílidos son organismos sésiles, es decir, no son capaces de desplazarse de un lugar a otro en busca de alimento; deben filtrar su alimento, es decir, capturan su alimento a través de sus branquias y luego lo transportan a la boca para iniciar la digestión. El alimento que consumen se encuentra flotando en el agua y es muy pequeño (menor a 0,01 mm.), pudiendo ser microalgas y material particulado. Los mitílidos poseen un conjunto de filamentos negros-café denominados “biso”, a través del cual tiene la capacidad de mantenerse fijo a sustratos tales como: rocas, piedras, cuerdas, cascos de barcos e incluso en ciertos lugares de fango o arena. Un mitílido que se desprende del sustrato puede volver a fijarse a otro, debido a que tiene la capacidad de regenerar el biso (Plaza *et al.*, 2005).

Se distribuyen geográficamente en ambos hemisferios, tanto en aguas tropicales como templadas. Viven agrupados en bancos en áreas protegidas o expuestas, en el submareal o intermareal, principalmente en rocas adheridos al sustrato por el biso, también sobre fondo, generalmente de conchuela o gravilla, con profundidades por lo general no superiores a los 10 metros. En Chile, los choritos se encuentran en forma natural desde Iquique hasta el Estrecho de Magallanes, encontrándose principalmente en zonas de baja salinidad especialmente en sectores estuarinos-salobres, donde se mezcla el agua dulce con agua de mar (Plaza *et al.*, 2005).

Uno de los factores importantes para el crecimiento de los mitílidos es la temperatura, la cual influye directamente en la cantidad de alimento disponible en el agua y en la fisiología de éste. En condiciones normales, toleran temperaturas que fluctúan entre los 3°C a 20°C, pero se ha observado que aquellos bancos ubicados en la zona del intermareal pueden resistir condiciones extremas de temperatura de -10°C a 28°C. El chorito es un organismo que tolera amplios rangos de salinidad, desde 5 a 32 partes por mil (ppm), esto le permite habitar en las zonas de los archipiélagos, donde existen grandes fluctuaciones de salinidad que varían con la profundidad y las estaciones del año. En general, los choritos habitan en lugares protegidos de corrientes fuertes, por ello es importante conocer la velocidad y dirección de la corriente en el lugar donde se realizará el cultivo. Estos antecedentes permitirán saber en qué dirección colocar los sistemas de cultivos y estimar la dinámica de la oferta alimenticia (Plaza *et al.*, 2005).

El mejillón puede ser cultivado de tres maneras, las que varían desde, estacas de crecimiento, sistemas suspendido y en fondos marinos. En la actualidad, no existe una parametrización de factores ambientales claves en el desarrollo y crecimiento de esta especie. Es más, no existe un grado de correlación y comparación entre las anomalías ambientales y la producción de cada temporada (Guerrero, 2006; Plaza *et al.*, 2005). El método de cultivo utilizado en la región de Los Lagos, particularmente en la Isla de Chiloé, es el método de suspensión, debido a que es el que produce mejor rendimiento. Los tipos de cultivo más utilizados son: Balsas de cultivos y el *Long-Line* (Guerrero, 2006).

a) Balsas de cultivos

La balsa de cultivo corresponde a una estructura cuadrada o rectangular generalmente de madera, que se mantiene en la superficie gracias a la acción de flotadores y que se fija al fondo marino a través de un cabo que se une a un fondeo. Sobre esta estructura va dispuesto un emparrillado que consiste en varas de madera fijadas cada 40 a 50 cm., y de las cuales penden cuelgas o cuerdas de cultivos. En estas cuelgas de cultivo se encuentran fijadas las semillas del chorito. Este tipo de cultivo es más utilizado en España (Guerrero, 2006).

b) Long - Line

Este sistema es el que entrega mayor rendimiento debido a una mayor disposición de alimentos y menor cantidad de depredadores. Es actualmente, el sistema más utilizado en Chile, también es conocido como líneas largas y consiste en una línea madre, que es un cabo que puede ser de polipropileno de 12 a 16 mm. de diámetro, a la cual se le amarran boyas de flotación cada tres metros aproximadamente, las que generalmente son de poliestireno expandido. El anclaje de las líneas se logra mediante dos fondeos de concretos llamados muertos, instalados en los extremos de la línea madre. La longitud de la línea madre va desde los 100 a 200 metros, dependiendo principalmente de las condiciones del lugar y de las dimensiones de la concesión marítima que se posea. De esta línea madre penden cuelgas de cultivo de un largo de ocho metros, separadas entre 40 a 50 cm. para evitar el roce entre sí, debido a las corrientes y evitar pérdidas por desprendimiento. Estas cuelgas de cultivo se encuentran sumergidas de dos formas, cuelgas verticales y continuas o tipo "u". Actualmente se utilizan *Long-line* dobles continuas, que permite tener una mayor cantidad de cultivo, ahorrar espacio y costo de material, ya que este consiste en dos líneas madres separadas por un metro, las que comparten fondeos y flotadores. Separadas a 20 metros aproximadamente para que permita la circulación de las balsas cosechadoras (Guerrero, 2006).

3.5.2 PRODUCCIÓN Y COSECHA

a) La obtención de semilla

El primer paso dentro del cultivo del chorito es la obtención de semilla o "mejilla", lo que se logra poniendo colectores de semillas los que tienen 20 – 25 cm. de ancho y ocho metros de longitud y son ubicados en el mar en el mes de noviembre con la finalidad de captar las larvas que están en etapa de fijación. Los colectores permanecen en el agua entre cuatro a seis meses dependiendo de las condiciones ambientales, hasta que la larva llegue a un tamaño de 2,5 cm.

aproximadamente. Posteriormente los colectores son retirados y transportados hasta los centros de cultivos (Guerrero, 2006).

b) El encordado

Las semillas obtenidas de los colectores deben ser puestas en cuelgas de cultivo para lo cual se utiliza el encordado, que consiste en mantener los mitílicos apegados al colector por el tiempo necesario para que éstos se adhieran a éste a través del biso. Para mantener las semillas junto a la cuelga de cultivo se utiliza una malla de algodón con la cual se recubren las semillas que, posteriormente serán puestas en los centros de cultivo; esta malla desaparecerá completamente por descomposición natural al cabo de unas semanas en el agua (Guerrero, 2006).

c) El desdoble

Después de cuatro o seis meses en el mar, cuando el chorito alcanza los 4,5-5,5 cm., se procede al izado de las cuelgas de cultivo. Debido al considerable aumento de peso del chorito se hace necesario el desdoble de las cuelgas, esto es, la confección de nuevas cuelgas de densidad menor. Con este desdoble se facilita el crecimiento del chorito, además de evitar su desprendimiento de las cuelgas. Por cada "cuelga de cultivo" se obtienen entre dos o tres "cuelgas de desdoble" que vuelven al mar hasta su comercialización (Guerrero, 2006).

d) La cosecha y selección

Después de 15 a 18 meses, el chorito alcanza su talla comercial, es decir, entre 6 a 7 cm. y se procede a obtener el rendimiento necesario de mitílicos. El rendimiento, es la relación existente entre el peso total (con concha) del chorito y el peso de la carne (sin concha). Esto se calcula a través de un muestreo previo a la cosecha donde se pesa 1 Kg de chorito con concha, los que posteriormente son cocidos y desconchados, obteniendo así el peso en carne. El rendimiento obtenido va a ser un factor que determinará cómo será procesado finalmente el producto. Una vez obtenido el rendimiento comienza la cosecha, las cuelgas son retiradas del agua y subidas a una plataforma donde se procede a desprender el chorito, luego

se limpia con abundante agua de mar, se procede a su selección por tallas y finalmente son embolsados, listos ya para su traslado a los centros expedidores para su posterior comercialización. Esta operación se extiende prácticamente todo el año siendo más intensa en los meses de abril a junio y septiembre a noviembre. (Guerrero, 2006). En los últimos años la estacionalidad de las cosechas se ha comportado en forma errática, alargándose y acortándose los períodos, sin embargo en la actualidad es posible encontrar cosechas durante todo el año. Durante el 2003, éstas mostraron una concentración del 78% entre los meses de noviembre a junio, con *peak* de producción que varía entre los meses de marzo a mayo, según el año y sus condiciones ambientales, en el segundo semestre las cosechas son notablemente menores y muestran un segundo *peak* en noviembre (Plaza *et al.*, 2005).

3.6 PLANTA PROCESADORA DE CHORITOS

El cultivo de choritos no presenta una interacción nociva con su medio ambiente, salvo la acumulación de heces producto del metabolismo del molusco. No obstante el medio ambiente presenta amenazas sanitarias hacia la actividad y el consumo de choritos. Para efectos del consumo interno y exportación de choritos existen protocolos para pesquisar de manera permanente la presencia de metales pesados, presencia de toxinas producto de floraciones algales y de vibrios. Las mayores exigencias y rigurosidad para estos monitoreos los pone la Unión Europea y la responsabilidad de aplicar estos protocolos es el Departamento de Sanidad Pesquera del Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). Para esto se ha estructurado y opera un programa de sanidad de moluscos bivalvos. En relación a las plantas procesadoras se ha establecido un programa de habilitación de plantas pesqueras, buques factoría y embarcaciones por el SERNAPESCA con la que a través de una pauta de inspección de infraestructura y manejo sanitario para plantas de exportación de productos pesqueros destinados al consumo humano, norma técnica HPB/PT1 del SERNAPESCA, se establece si se cumple con los requisitos de infraestructura y manejo sanitario de plantas pesqueras, buques factoría y embarcaciones detallados en la norma técnica HPB/NT1 de SERNAPESCA,

determinando una categoría final, según la aplicación de la totalidad de la pauta en la que para cada uno de los puntos incluidos, se ha incorporado una clasificación de deficiencias observadas (menores, mayores, serias y críticas), con la finalidad de realizar una evaluación objetiva de las mismas. Las deficiencias señaladas en las pautas de inspección son (**Tabla 2.**):

Tabla 2. Deficiencias especificadas en el manual de procedimientos sección 1 para la habilitación de plantas pesqueras y buques factoría.

Deficiencia	Definición
Menor	No está en concordancia con los requisitos de infraestructura del establecimiento o embarcación, manejo sanitario del proceso y/o inocuidad del producto exigidos y su impacto sobre el alimento afecta levemente la higiene general.
Mayor	No hay cumplimiento de los requisitos de infraestructura, manejo sanitario del proceso y/o inocuidad del producto determinan el deterioro del mismo sin llegar a ser crítico.
Seria	No hay cumplimiento de los requisitos de infraestructura, manejo sanitario del proceso y/o inocuidad del producto determinan la generación de un producto alterado.
Crítica	No hay cumplimiento de los requisitos de infraestructura, manejo sanitario del proceso y/o inocuidad del producto determina la obtención de un alimento que representa una amenaza para la salud pública.

Fuente: Manual de Procedimientos Sección 1: Habilitación de Plantas Pesqueras y Buques Factoría; Programa de Habilitación de Plantas Pesqueras, Buques Factoría y Embarcaciones. Departamento De Sanidad Pesquera, SERNAPESCA, Chile. 2010.

El funcionario de SERNAPESCA, al momento de realizar la visita inspectiva a la planta y confeccionar el informe, deberá sumar cada una de las deficiencias evidenciadas durante la visita, lo que permitirá clasificar a la planta pesquera en la categoría: A, B, C, D o No Certificable.

Planta Pesquera tipo A: Es aquella que al ser examinada bajo la norma HPB/PT1 de SERNAPESCA presenta seis deficiencias menores o menos, cinco deficiencias mayores o menos y no presenta deficiencias serias ni deficiencias críticas.

Planta Pesquera tipo B: Es aquella que al ser examinada bajo la norma HPB/PT1 de SERNAPESCA presenta siete deficiencias menores o más, tiene entre seis a diez deficiencias mayores, una deficiencia seria y ninguna deficiencia crítica.

Planta Pesquera tipo C: Es aquella que al ser examinada bajo la norma HPB/PT1 de SERNAPESCA presenta 11 deficiencias mayores o más, entre dos y cuatro deficiencias serias y ninguna deficiencia crítica.

Planta Pesquera tipo D: Es aquella que al ser examinada bajo la norma HPB/PT1 de SERNAPESCA presenta entre cinco a siete deficiencias serias y ninguna deficiencia crítica.

Se cataloga como No Certificable, cuando la planta posee ocho o más deficiencias serias y una o más deficiencias críticas. Al clasificarse como No certificable, no puede optar a la certificación sanitaria oficial otorgada por SERNAPESCA (Chile, SERNAPESCA, 2010).

Las plantas de proceso de choritos, para poder exportar, deben estar como mínimo clasificadas en categoría B, para un rango desde A a D (Chile, PROCHILE, 2006).

En Chile durante el año 2003, se registran 441 plantas procesadoras de mitílidos de las cuales 149 se ubican en la X Región dando empleo a más de 3.500 personas. En la X Región, muchas plantas trabajan más de una línea de elaboración. Siete son las principales líneas, como: Harina; Cocido; Fresco-enfriado; Congelado siendo ésta la elaboración de mayor importancia (88,5% del total de la producción industrial); Conserva; Ahumado y Aceite (Chile, PROCHILE, 2006; Plaza *et al.*, 2005). Estas plantas procesadoras se concentran principalmente en Puerto Montt, Castro y Calbuco, de ellas sólo cuatro pertenecen a la Categoría A, de las otras, la mayoría clasifica en la Categoría B (25) y las nueve restantes se dividen en

Categorías C y D. Como se mencionó anteriormente, un aspecto importante de considerar es que sólo el 10% de las plantas procesadoras está en una categoría A. Esto es relevante si se considera a futuro la posibilidad de exportar en fresco al mercado europeo-americano, ya que la industria no cuenta en la actualidad con plantas con la capacidad de cumplir con las especificaciones de la categoría necesaria para exportar, para abordar nuevos desafíos. (Plaza *et al.*, 2005). En toda la capacidad instalada de procesamiento de choritos se verá incrementada por un conjunto de inversiones que se están materializando, especialmente en Chiloé. Con esto se espera duplicar la capacidad instalada durante el año 2006 (230 mil toneladas) e incrementar el número de plantas en la categoría A (Chile, PROCHILE, 2006).

3.6.1 Procesamiento de la Materia Prima

A continuación se describen las etapas de procesamiento de los choritos para obtener el producto cocido congelado.

- **Recepción de Materia Prima:** El chorito proviene principalmente de centros de cultivos inscritos en el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos de SERNAPESCA, clasificados A o B, aprobadas o condicionalmente aprobadas (en status de abierta). Es transportado en camiones cerrados dentro de bolsas tipo red de una capacidad de 25 Kg aproximadamente, o en camiones abierto en bins o maxi bolsas cerradas de capacidad aproximada de 1000 Kg Una vez llegado a la planta de proceso las unidades son descargadas dentro de un área definida en la zona de Recepción, donde se mantienen hasta ser procesadas. En esta etapa se controla el peso del producto, se evalúa su frescura, rendimientos de producción y calibre, y otros parámetros de calidad definidos para el proceso (Chile, SEA, 2006).
- **Desgranado y Lavado:** El producto se deposita en tolvas de acopio y se conducen a través de cintas transportadoras a una máquina de desgranado y lavado (Chile, SEA, 2006).

- **Calibrado y Seleccionado:** Posteriormente, el chorito es calibrado automáticamente en tamaños (pequeño, mediano y grande) de acuerdo a los requerimientos de cada línea de proceso (carne, entero y media concha). En este punto se aprovecha de retirar fauna y flora acompañante, materias extrañas, choritos rotos y cualquier otro elemento extraño (Chile, SEA, 2006).
- **Acondicionado:** Los choritos son sumergidos en baño de agua a una temperatura entre 40 a 60°C por un tiempo de entre tres a siete minutos, con el propósito de lograr abrir levemente las valvas y así facilitar la extracción del pelo o biso en la etapa de desbisado (Chile, SEA, 2006).
- **Desbisado:** Los choritos son desprovistos en un gran porcentaje del pelo o biso por acción mecánica (Chile, SEA, 2006).
- **Cocción:** El producto se cocina al vapor en un equipo continuo que dispone de un programador de tiempo (velocidad de la cinta) y temperatura, lo que permite reaccionar rápidamente a determinadas características de la materia prima, de manera de obtener un producto bien cocido, garantizando de esta forma alcanzar temperaturas óptimas y seguras. Las condiciones de cocción poseen los siguientes parámetros (Chile, SEA, 2006):
 - Materia Prima proveniente de centro de cultivo tipo B
 - Tiempo igual o sobre 7,5 minutos.
 - Temperatura cocedor igual o sobre 100°C.
 - Materia Prima proveniente de centro de cultivo tipo A
 - Tiempo igual o sobre 4,5 minutos.
 - Temperatura cocedor igual o sobre 100°C.
- **Desconchado:** Al terminar la cocción, los choritos cocidos se desconchan automáticamente en un separador de concha-carne. Las conchas salen de

la planta a través de una cinta transportadora y la carne continúa a la siguiente etapa de proceso (Chile, SEA, 2006).

- **Enfriado:** Luego del desconchado, la carne de chorito pasa por un separador laminar, que es un baño de agua potable a temperatura ambiente y de renovación continua, que evita que se dañe el producto, lo enfría por inmersión hasta alcanzar una temperatura entre 16 y 20°C en menos de cinco minutos, y a la vez lo conduce en dirección del flujo del proceso. Además, simultáneamente esta máquina elimina los trozos de concha que puedan acompañar al producto, mediante decantación y cinta transportadora (Chile, SEA, 2006).
- **Selección:** Al salir del separador laminar, la carne de chorito pasa a una cinta de selección donde operarios en forma manual, retiran restos de concha, fauna y flora acompañante, choritos rotos, bisos y materias extrañas en general. De este modo, sólo la carne de chorito que cumplen con las especificaciones continúa a la siguiente etapa (Chile, SEA, 2006).
- **Congelado:** La carne de chorito se congela en un túnel continuo a una temperatura entre -35 y -40°C, en un tiempo siempre inferior a diez minutos (ultra congelados). A la salida del túnel de congelación, la carne de chorito congelada rápida e individualmente (I.Q.F). alcanza una temperatura igual o inferior a -18°C (Chile, SEA, 2006).
- **Glaceo:** Una vez congelado, el producto se glacea automáticamente mediante duchas de agua potable y con ausencia de aditivos, a una temperatura alrededor de 5°C (Chile, SEA, 2006).
- **Calibrado:** Posterior al glaceo, la carne de chorito se separa por tamaños automáticamente para poder realizar el envasado y empaque (Chile, SEA, 2006).
- **Envasado y Empaque:** Después del calibrado, se realiza el envasado de la carne de chorito en cajas recubiertas con una lámina de polietileno grado

alimentario en el caso del empacado a granel, o en bolsas como envase primario y cajas como envase secundario. En este punto se controla el peso de cada caja. Cada una se timbra indicando el calibre, el número de lote, el país de origen y el número de la planta (Chile, SEA, 2006).

En caso de utilizarse envases primarios y secundarios, los primeros llevarán indicado por lo menos el país de origen, el número de planta y el número de lote. Luego, las cajas son puestas en pallets para ser llevadas a una cámara de frío. El etiquetado de las cajas se realiza al momento del despacho, una vez que el producto ha sido destinado en planta, donde se especifica el nombre del producto en el que se especifica que está cocido, su número de la planta, su peso neto, el país de origen, el elaborador del producto, su fecha de elaboración y vencimientos, datos del importados y detallar que el producto debe mantenerse bajo congelación (-18°C) y descongelarse refrigerado. Dependiendo del mercado de destino llevará la frase “apto para consumo humano”, u otra información, de acuerdo a las exigencias del cliente. Las cajas pueden venir rotuladas con parte de la información (Chile, SEA, 2006).

Actualmente, más del 90% de los productos elaborados se destinan a mercados internacionales, siendo Europa el más importante, destacándose países como: Italia, Portugal, Francia, Dinamarca y España. Los productos congelados son la principal línea exportada, mientras que las conservas tienen como destino fundamental el mercado nacional (Chile, CORFO, 2003). Se ha evidenciado un aumento en la demanda mundial de los productos del mar congelados, una de las razones principales de la tendencia positiva registrada en los últimos años está ligada a las nuevas y sofisticadas tecnologías de congelamiento y conservación a bajas temperaturas que han permitido dar enormes pasos en el desarrollo y en la oferta de productos con un valor agregado más alto acompañado de una calidad cada vez más elevada. Otro aspecto importante ligado a la evolución de los productos del mar congelados es la tendencia saludable que en los últimos años ha portado al consumidor a la búsqueda de un estilo de vida más equilibrado donde la sana y correcta alimentación es crucial. Sobre todo los productos congelados

provenientes del mar interpretan mejor que otras categorías de alimentos esta dinámica sobre todo gracias a la conservación prolongada de la frescura, de lo genuino, de las vitaminas y todos los demás valores nutritivos (Chile, PROCHILE, 2009).

Conociendo estos fundamentos sobre la producción de choritos en el país, su relevancia en Chile además de la que posee fuera de sus fronteras, hace que exista una genuina preocupación de que se cumplan con los estándares sanitarios y prevenir situaciones complejas en los consumidores, quienes finalmente son los que juzgan la calidad e inocuidad de un producto. Resulta de vital importancia mantener controlada la presencia de una bacteria de peligro para la salud pública, durante el procesamiento de los mitílidos y es por ello que es relevante conocer la presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos.

4.OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Cuantificar *Listeria monocytogenes* en la materia prima, choritos vivos (*Mytilus chilensis*) y en su producto final choritos cocidos congelados para exportación, provenientes de una planta procesadora ubicada en Chiloé, X Región de Los Lagos, Chile.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Enumerar *Listeria* spp. en choritos vivos y en cocidos congelados.
- Identificar la presencia de *L. monocytogenes* en las muestras de choritos vivos y en cocidos congelados, que resultan positivas a *Listeria* spp.
- Comparar los recuentos de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en choritos vivos y cocidos congelados.
- Verificar si los choritos vivos y cocidos congelados cumplen con la normativa requerida por Chile y por la Unión Europea.

5.MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Este estudio se realizó con muestras obtenidas en una planta procesadora tipo B de choritos cocidos congelados, ubicada en la Isla Grande Chiloé, X Región de Chile. Se realizaron ocho muestreos entre los meses de Abril y Julio del año 2010, constituidos por cinco unidades de muestras de 1 Kg cada uno.

Las muestras correspondían a una misma partida de choritos, que fueron recolectadas por una empresa capacitada y acreditada para esto y se enviaron a Santiago en cajas isotérmicas con gel pack. Los choritos vivos eran obtenidos al azar desde el estanque de recepción de productos crudos, que llegan embalados en sacos desde las zonas de cultivo. A continuación, se recolectaron cinco unidades de choritos cocidos congelados en la etapa de procesamiento del producto, que corresponde a la clasificación de los congelados por tamaño, previa al envasado.

Las muestras recolectadas llegaron en un tiempo máximo de 24 horas al Laboratorio de Inocuidad de Alimentos (LIA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde fueron procesadas. La temperatura para mantención de choritos vivos osciló entre los 0° y 4° C, y los choritos cocidos congelados debían ser recibidos congelados. Una vez que eran recibidas las muestras en el Laboratorio, se procedía inmediatamente a registrar la temperatura de las muestras de los productos vivos y congelados. Las unidades muestreadas debían mantenerse a estas temperaturas para ser analizadas en el laboratorio, además de permanecer en bolsas plásticas limpias, secas, estériles e individuales, con su debido rotulado, indicando el tipo de muestra, el número de la muestra y la fecha de muestreo.

5.2 MÉTODO DE ANÁLISIS

El procesamiento de la muestra al igual que la determinación de resultados se realizó según la Norma Oficial Chilena NCh2657/2.Of2007 “Metodología de los alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* – Parte 2: Método de Enumeración” (Chile INN, 2007) (Ver **Anexo 2.**)

5.3 PLANES DE MUESTREOS Y CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS

Los criterios microbiológicos se han definido tomando como base la clasificación, los parámetros de control y planes de muestreo de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, su sigla en inglés), adaptados a la realidad de cada país, para asegurar la inocuidad de los alimentos para la salud de los consumidores. En ellos, se han estipulado niveles críticos que establecen la aceptación o rechazo de un determinado alimento.

De acuerdo con las categorías de riesgo establecidas en base a la peligrosidad del microorganismo implicado y la manipulación posterior del alimento en el que puede estar presente el agente, se ha definido la severidad del programa de muestreo, determinándose el número de unidades de muestra que serán examinadas (n), la cantidad máxima de unidades de muestra defectuosas (c) y el tipo de plan de muestreo. En el plan de muestreo de dos clases se divide la calidad del producto en dos grados: “aceptable” y “rechazable”, en cuanto a si la tasa microbiológica es inferior o superior a un nivel crítico establecido. En un plan de tres clases la calidad de un producto se divide en tres grados: “aceptable”, en donde los límites van desde cero a m, siendo m un valor del parámetro microbiológico bajo el cual el alimento no representa riesgo para la salud, “medianamente aceptable”, en el que los límites van desde m a M, siendo M un valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud, y “rechazable”, en donde los valores superiores a M. En el caso de un plan de muestreo de tres clases c se define como: el número máximo de unidades de muestra que puede

contener un número de microorganismos comprendidos entre m y M para que el alimento sea aceptable.

En el país, se estima la cantidad de *L. monocytogenes* aceptable en los alimentos según el criterio establecido en el Artículo 174 del Reglamento Sanitario de Alimentos para alimentos LPC que no favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes*; alimentos LPC que favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes*; y para alimentos LPC destinados para infantes menores de 12 meses de edad. En este estudio, se utilizó lo establecido para los alimentos LPC que no favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes* (**Tabla 3.**), ya que se trata de un alimento cocido y congelado.

Tabla 3. Alimentos LPC que no favorece el desarrollo de *L. monocytogenes*.

Parámetro	Plan de muestreo			Límite por gramo		
	Categoría	Clase	n	c	m	M
Listeria monocytogenes (ufc/g)	10	2	5	0	100	-

Fuente: Artículo 174. Párrafo IV - De Otros Criterios Microbiológicos. Título IV- De los contaminantes. Reglamento sanitario de los alimentos. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2009.

En los alimentos LPC se considera que no favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes* cuando cumplen alguno de los siguientes parámetros:

1. pH menor o igual a 4,4;
2. actividad de agua (aw) menor o igual a 0,92;
3. combinación de pH y aw, con pH menor o igual de 5,0 y con aw, menor o igual a 0,94;

4. congelación, siempre que esta condición se mantenga durante todo el período, hasta antes de ser consumido;

5. vida útil en refrigeración por un lapso de menos de cinco días.

Los alimentos LPC que no cumplan con algunos de los parámetros anteriores se considera que favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes*.

Con respecto a los choritos vivos, materia prima en este estudio, no existe una normativa en Chile ni en la Unión Europea para los moluscos bivalvos vivos.

Debido a que el producto final es exportado a la Unión Europea, éste debe cumplir con los requisitos sanitarios que solicita la Unión Europea para los alimentos de exportación (**Tabla 4.**)

Tabla 4. Requisitos microbiológicos: criterios de seguridad alimentaria y de higiene de los procesos.

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras (1)		Límites	
		n	c	m	M
Alimentos congelados listos para el consumo que pueden favorecer el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> (2) (3)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g	
Alimentos vivos o ahumados listos para el consumo que pueden favorecer el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> (3)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	10 ufc/g	
Crustáceos y moluscos cocidos.	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 gramos	

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras (1)		Límites	
		N	c	m	M
Productos pelados y descabezados de crustáceos y moluscos cocidos (4)	<i>E. coli</i>	5	2	1 ufc/g	10 ufc/g
	Estafilococos coagulasa positivos	5	2	100 ufc/g	1000 ufc/g

Fuente: Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios.

(1) n= número de unidades que componen la muestra; c = número de unidades de muestreo con valores superiores al límite que pueden ser aceptadas o número de unidades de muestreo que dan valores superiores al límite que pueden ser aceptadas o número de unidades de muestreo que dan valores entre m y M.

(2) Se deberá garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

(3) Se considerarán dentro de esta categoría a aquellos alimentos que no cumplan con los criterios descritos a continuación:

- Productos que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes* cuando la recontaminación no sea posible tras ese tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final) y en moluscos bivalvos vivos.

- Productos con pH <4.4 o aw < 0.92 productos con pH <5,0 y aw <0.94 y los productos con una vida útil inferior a cinco días.

(4) Los resultados de las pruebas demuestran la calidad microbiológica del proceso analizado.

6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 40 unidades de muestras de choritos vivos y 40 unidades de muestras de choritos cocidos congelados, se encontraron valores inferiores a 10 ufc/g de *L. monocytogenes* (**Cuadro 1.**).

Cuadro 1. Resultados del recuento de *L. monocytogenes* en choritos vivos y cocidos congelados.

Muestreo	Tipo de Muestra	<i>L. monocytogenes</i> ufc/g
1er Muestreo (14 de Abril 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10
2do Muestreo (21 de Abril 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10
3ro Muestreo (06 de Mayo 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10
4to Muestreo (19 de Mayo 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10
5to Muestreo (02 de Junio 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10
6to Muestreo (16 de Junio 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10
7mo Muestreo (30 de Junio 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10
8vo Muestreo (07 de Julio 2010)	5 unidades de choritos vivos	< 10
	5 unidades de choritos cocidos congelados	< 10

Los niveles de *L. monocytogenes* obtenidos en el presente trabajo son aceptables para el consumo humano según los estándares nacionales y de la Unión Europea. De lo anteriormente expuesto se puede evidenciar la baja presencia de

L. monocytogenes en los choritos vivos y cocidos congelados examinados, lo que puede interpretarse como un bajo riesgo para la población, en especial en el producto final, ya que son obtenidos por los consumidores, descongelados y cocidos en sus domicilios, dándole poco tiempo a la bacteria para que pueda proliferar. Sin embargo, en el caso de que dichos productos no se sometieran a una correcta manipulación higiénica, a un correcto cocimiento o se destinan a un periodo de congelamiento o refrigeración insuficiente, el riesgo potencial aumenta.

Se ha determinado la incidencia de *Listeria* spp. en una infinidad de productos hidrobiológicos procedentes de muchos lugares geográficos (**Anexo 3**). Los resultados de muchos de estos estudios han sido ampliamente revisados. Las estrategias de muestreo, el número de muestras analizadas, y los métodos de detección son variados, por lo que si bien es útil tener en cuenta los resultados de estos estudios, los datos no siempre se pueden comparar directamente (Jinneman *et al.*, 2007). La incidencia observada de especies del género *Listeria* en moluscos bivalvos en mucho de estos estudios es diversa, independiente del tratamiento al que hayan sido sometidos para controlar el desarrollo microbiano. Ejemplos de estas investigaciones se reflejan en la diversidad de los resultados. Existen trabajos en los que los porcentajes de ejemplares positivos a *Listeria* spp. de mariscos analizados fueron cercanos al 25% y cerca de un 9% en el caso de *L. monocytogenes* (De Simon *et al.*, 1992; Parihar *et al.*, 2008). Por el contrario, otros estudios sugieren que las especies de *Listeria* están ausentes en los mariscos (Weagant *et al.*, 1988; Buchanan *et al.*, 1989; Fuchs y Surendran, 1989; Motes, 1991). Mientras que otros estudios han encontrado una frecuencia moderada de las especies pertenecientes al género *Listeria*, que oscila entre 1 a 3% (Colburn *et al.*, 1990; Masuda *et al.*, 1992; Decastelli *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en esta Memoria de Título, siguen la tendencia de trabajos realizados en este tipo de productos en el que no se ha encontrado la presencia de *L. monocytogenes*.

En una unidad de muestra de chorito cocido congelado se obtuvo una colonia de *Listeria* spp., que corresponde a una unidad de muestra obtenida del sexto muestreo analizado el 16 de Junio de 2010. Esta unidad de muestra (número

441) fue catalasa positiva, con una morfología microscópica acorde con lo descrito para la especie *Listeria*, y presentó una movilidad característica de *Listeria* spp. a 25°C. Al realizarle la prueba de confirmación de *L. monocytogenes* resultó ser no hemolítica, capacitada para fermentar ramnosa y xilosa, y no reaccionar con ninguna de las cepas de referencia de *S. aureus* y *R. equi* en la prueba de CAMP. Esto coincide con las reacciones esperadas para *L. welshimeri* como se puede ver en el **Anexo 4**.

Debido a que las especies del género *Listeria* son tan ubicuas, tienen muchas oportunidades para ingresar a la cadena de producción de alimentos y al ambiente donde son procesados. Por tanto, la coexistencia de las especies de este género en un mismo alimento no es poco común y puede ocurrir que exista más de una especie bajo las mismas condiciones, de hecho, estudios experimentales han demostrado que bajo variadas condiciones de estrés combinadas, todas las especies de *Listeria* comparten similares características de resistencia al estrés. Ya que todas las especies de este género son potenciales contaminantes de los alimentos, la detección de una en alimentos o elementos relacionados con su manufactura puede indicar la presencia de otras de su mismo género, como puede ser *L. monocytogenes*. Aunque *L. welshimeri* ha sido encontrada en el ambiente por estudios realizados en especies del género *Listeria* además de ser aislada de portadores humanos y animales, los estudios monitoreando su ecología aún son raros (Gilot y Content, 2002; Ivanek *et al.*, 2009).

Uno de los trabajos realizado para establecer la virulencia de *L. welshimeri*, informó que altas dosis de *L. welshimeri* ($> 1 \cdot 10^8$ ufc/ ml) inoculada a ratones, que es por lo menos 100.000 veces más alta que la DL50 de *L. monocytogenes* en ratones ($1 \cdot 10^3$ ufc/ml), no logró matarlos (Kluge y Hof, 1986). En un estudio realizado el año 2006 por Hain *et al.*, se comparó la secuencia genómica entre *L. welshimeri*, *L. innocua* y *L. monocytogenes* para establecer los factores comunes en el material genético y si era posible que aunque *L. welshimeri* y *L. innocua* no manifestaran ser patógenas, pudieran tener en su genoma los componentes para serlo. En dicho trabajo se identificaron los determinantes de virulencia más

importantes en la patogénesis de *Listeria*, éstos están localizados en un locus cromosómico entre los genes *prs* y *ldh* designado como el grupo de genes de virulencia, con la sigla en inglés “vgc” o también llamado isla de patogenicidad de *Listeria* 1, “LIPI-1”, que tiene la responsabilidad de la mantención del ciclo de vida intracelular de la bacteria. En la investigación se pudo reconocer que los determinantes de virulencia vgc están presentes en *L. monocytogenes*, pero no fueron identificados en *L. welshimeri* y en *L. innocua*, lo que sugiere que especies del género *Listeria* probablemente evolucionaron a partir de la pérdida de la región “vgc” conduciendo a la generación de especies no patógenas a partir de una cepa progenitora que ya albergaba estos genes y en su evolución se fueron perdiendo en las especies que no manifiestan ser patógenas. Adicionalmente a la investigación antes citada, según los datos obtenidos por Den Bakker *et al.*, el año 2010, se indica que el género *Listeria* representa un grupo de especies que han evolucionado de un ancestro con un grupo de genes de virulencia. Con el tiempo estas especies se han diversificado en patógenos altamente clonales (por ejemplo, *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*), los actualmente conocidos como no patógenos (*L. welshimeri*), y subtipos que incluyen cepas con y sin el grupo de genes de virulencia, pero se les considera como no patógenas (*L. innocua* y *L. seeligeri*). La pérdida de genes, la transferencia lateral de genes, la recombinación, así como la selección, claramente han contribuido a la evolución del género *Listeria* en especies estrechamente relacionadas y que se han adaptado a diferentes nichos (Hain *et al.*, 2006; Den Bakker *et al.*, 2010).

Como ya se ha mencionado, dentro del género de *Listeria* spp. se consideran como patógenas a *L. monocytogenes* y a *L. ivanovii* difiriendo en los hospederos a los que infectan, siendo *L. monocytogenes* patógena para humanos y animales, y a *L. ivanovii* capacitada exclusivamente para infectar a rumiantes. Un trabajo publicado a inicios del año 2010 describe la existencia de un caso de listeriosis en un humano provocado por *L. ivanovii* subespecie *ivanovii*. Este tipo de casos en humanos plantean interrogantes sobre la supuesta especificidad de *L. ivanovii* para los rumiantes, además de reflejar que puede que existan las condiciones para que especies del género *Listeria* a las que no se les ha atribuido

las características para poder afectar a seres humanos, pueden eventualmente hacerlo o ya lo están haciendo y se ha subestimado su potencial peligro para la salud pública. A pesar de los pocos casos documentados de infecciones por otras especies del género *Listeria* en seres humanos, éstos podrían ser resultado de una baja patogenicidad para los humanos, además de que, con toda esta información expuesta, es posible que aún no se hayan descubierto los mecanismos con los que estas especies reconocidas actualmente como apatógenas para humanos estén provocando casos de listeriosis que no están siendo notificados o identificados correctamente debido a la falta de investigación al respecto (Hain *et al.*, 2006; Den Bakker *et al.*, 2010; Guillet *et al.*, 2010).

La presencia de una especie de *Listeria* en el alimento cocido congelado puede indicar primero que, ésta haya procedido de una contaminación posterior a la cocción del producto, esto avalado por datos que actualmente se manejan al respecto, en donde la contaminación cruzada se ha considerado como la principal fuente de *Listeria* en pescados y mariscos cocidos o procesados. Esto ha sido demostrado por la recuperación de bacterias no lesionadas de *L. monocytogenes* en la superficie de muchos productos hidrobiológicos LPC que recibieron un tratamiento térmico (Jinneman *et al.*, 2007). En un segundo plano, el hallazgo de una especie del género *Listeria* en el producto final está indicando que se establece una ecología en el alimento propicia para la sobrevivencia de listerias en este ambiente, por lo que serían recomendables más estudios en choritos cocidos congelados en el que se pueda determinar la sobrevivencia de *Listeria* spp. en éstos.

Las exigencias del mercado importador de productos provenientes del mar, en relación a la ausencia o niveles bajos de *L. monocytogenes* y la inminente presencia de este agente patógeno en el ambiente marino, plantea un enorme desafío a la industria pesquera chilena en la prevención de contaminación con esta ubicuitaria bacteria. Para continuar compitiendo en el mercado externo, será necesario no declinar en las medidas de control tendientes a evitar la contaminación y, más que ello, impedir la proliferación de *L. monocytogenes* en sus productos.

CONCLUSIONES

En todas las unidades de muestras de choritos vivos y choritos cocidos congelados analizados hubo niveles menores a 10 ufc/g de *L. monocytogenes*.

Los niveles encontrados de *L. monocytogenes* en los choritos vivos y cocidos congelados analizados cumplen con la normativa nacional para este tipo de producto.

Los niveles encontrados de *L. monocytogenes* en los choritos vivos y cocidos congelados analizados cumplen con los criterios microbiológicos que establece la Unión Europea para este tipo de producto.

Se obtuvo una colonia de *Listeria* spp. en 1/5 unidades de muestra de chorito cocido congelado, obtenida del sexto muestreo. Según los resultados obtenidos de las pruebas de identificación de especies del género *Listeria*, la colonia corresponde a *L. welshimeri*, considerada una listeria apatógena.

Existe un riesgo potencial de presencia de *L. monocytogenes* en estas unidades de muestras, ya que *L. welshimeri* y *L. monocytogenes* pueden sobrevivir bajo las mismas condiciones.

BIBLIOGRAFÍA

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. 1998. *Listeria*. Una Aproximación Práctica al Microorganismo y su Control en los Alimentos. 1° Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 173 p.

BREMER, P J.; FLETCHER, G.; OSBORNE, C. 2003. *Listeria monocytogenes* in seafood. New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited A Crown Research Institute. Christchurch, Nueva Zelanda. 13 p.

BUCHANAN, R.; STAHL, H.; BENCIVENGO, M. y DEL CORRAL, F. 1989. Comparison of Lithium Chloridephenylethanol-moxalactam and modified Voges Johnson Agars for Detection of *Listeria* spp. in Retail Level Meat, Poultry and Seafood. Applied and Environmental Microbiology. Vol 55: 599 – 603.

CHILE, CORFO (CORPORACIÓN DE FOMENTO DE LA PRODUCCIÓN). 2003. Mejillón Chileno Ficha Choritos Sector Acuicola. [en línea] <http://www.corfo.cl/rps_corfo_v57/OpenSite/Corfo/Centro%20de%20Documentaci%C3%B3n/Estudios/Estudios_doc/FichaChoritos_Sector_Acuicola01.pdf> [consulta: 25 abril 2010]

CHILE, INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN). 2007. Norma Oficial Chilena NCh2657/2.Of2007. Metodología de los alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* – Parte 2: Método de Enumeración. 28 p.

CHILE, MINSAL (Ministerio de Salud). 2008. Listeriosis: con medidas simples la población puede prevenirla. [en línea] <http://www.redsalud.gov.cl/noticias/noticias.php?id_n=281 > [consulta: 12 diciembre 2010]

CHILE, MINSAL (Ministerio de Salud). División de Políticas Públicas Saludables y Promoción. Departamento de Alimentos y Nutrición. 2009a. Consulta Pública Propuesta de criterios microbiológicos para *Listeria monocytogenes* para el Reglamento Sanitario de los Alimentos. 12 Marzo 2009 -12 Mayo 2009. [en línea] <<http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/64ebfe8e38e5264de04001011e013fb3.pdf> > [consulta: 15 abril 2010]

CHILE, MINSAL (Ministerio de Salud). 2009b. Informe Listeriosis 25 de Agosto 2009. [en línea] <<http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/71fd37eae7d943a4e04001011f014853.pdf>> [consultado: 15 abril 2010]

CHILE, MINSAL (Ministerio de Salud). Departamento de Epidemiología. 2011. Informe *Listeria*, Chile 2010. [en línea] <http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Listeriosis/listeria%20informe%20%20_2010_.pdf> [consulta: 20 febrero 2011]

CHILE, PROCHILE (Dirección de Promoción de Exportaciones). 2006. Identificación y Estudio de Cluster Exportadores Regionales, Región de Los Lagos. [en línea] <http://www.prochile.cl/documentos/pdf/cluster/cluster_lagos_informe.pdf> [consulta: 25 abril 2010]

CHILE, PROCHILE (Dirección de Promoción de Exportaciones). 2009. Estudio de Mercado Choritos - Italia [en línea] <http://www.chilealimentos.com/medios/Servicios/noticiero/EstudioMercadoCoyuntura2010/productos_marinos/milan_choritos_2009_prochile.pdf> [consulta: 25 abril 2010]

CHILE, SEA (Servicio de Evaluación Ambiental). 2006. Declaración de Impacto Ambiental Planta Procesadora de Choritos y Salmón Ahumado, Salmones Aucar Ltda., Quemchi, X Región. [en línea] <http://www.e-seia.cl/archivos/DIA_Salmones_Aucar_Ltda1._V.F._.pdf> [consulta: 30 diciembre 2010]

CHILE, SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca). 2009. Anuario Estadísticas 2009. Chile, Desembarque total por especie y mes 2008. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=startdown&id=4112> [consulta: 09 abril 2011]

COLBURN, K. G.; KAYSNER, C.; ABEYTA, C. y WEKELL, M. 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. Applied and Environmental Microbiology. 56: 2007 - 2011.

DECASTELLI, L.; ERCOLINI, C.; FISICHELLA, S. y BIANCHI, C. 1993. Incidenza di *Listeria* spp.in mitili (*Mytilus galloprovincialis*) di allevamento. *Microbiologie Aliments Nutrition*. 11: 51 - 56.

DEN BAKKER, H.; BUNDRANT, B.; FORTES, E.; ORSI, R. y WIEDMANN, M. 2010. A Population Genetics-Based and Phylogenetic Approach to Understanding the Evolution of Virulence in the Genus *Listeria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76 (18): 6085-6100

DE SIMON, M.; TARRAGO, C. y FERRER, M. 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *International Journal of Food Microbiology*. 16: 153 -156.

DOMINGUEZ, M. 2010. Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria. *Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXXI: Aspectos higiénicos de los alimentos microbiológicamente seguros*. [en línea] <<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1112/1129>> [consulta: 05 octubre 2010]

ESPAÑA, Ministerio de la Presidencia. 1998. Reglamento sobre Notificación de Sustancias Nuevas y Clasificación, Envasado y Etiquetado de Sustancias Peligrosas Real Decreto 363/95. B.O.E: nº 160 de 6 de julio de 1998. Anexo B, parte B punto B, Definiciones generales de los términos utilizados en los métodos de ensayo del presente anexo. [en línea] <<http://www.boe.es/boe/dias/1998/07/06/pdfs/A22374-22487.pdf>> [consulta: 01 mayo 2011]

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: Resumen Interpretativo. Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos, No. 4. WHO, Roma, Italia. 54 p.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura. 2005. National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Chile. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets. Text by Norambuena, R. & González, L. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. [en línea] <http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_chile/es> [consulta: 25 abril 2010]

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate. Directorate, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada: 55(3): 476 – 511.

FUCHS, R. y SURENDRAN, P.1989. Incidence of *Listeria* in Tropical Fish and Fishery Products. Letters in Applied. Microbiology. 9: 49 – 51.

GARCÍA, M.; CHAVES, F.; SANZ, F.; RODRIGUEZ, J. 2006. Epidemiología Molecular de las Infecciones por *Listeria monocytogenes* en un área de Madrid durante un período de 3 años (2001 – 2003). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. ISSN: 0213-005X. 24(4): 86 – 89

GILOT, P.; CONTENT, J. 2002. Specific Identification of *Listeria welshimeri* and *Listeria monocytogenes* by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein. Journal of Clinical Microbiology 40(2): 698–703.

GRAVES, L.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S. 2007. Subtyping *Listeria monocytogenes*. **In:** Ryser, E.; Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3º Edición. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EEUU. p. 283 - 304

GUERRERO, M. 2006. Evaluación Técnica y Económica del Proceso de Cosecha de Choritos en Plataforma Flotante. Tesis para obtener el Título de Ingeniero en Ejecución Mecánica. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Escuela de Ingeniería Mecánica. 80 p.

GUILLET, C.; JOIN-LAMBERT, O.; LE MONNIER, A.; LECLERCQ, A.; MECHAÏ, F.; MAMZER-BRUNEE, M-F.; BIELECKA, M.; SCORTTI, M.; DISSON, O.; BERCHE, P.; VAZQUEZ-BOLAND, J.; LORTHOLARY, O y LECUIT, M. 2010. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. Emerging Infectious Diseases. 16 (1): 136 - 138.

HAIN, T.; STEINWEG, C.; KUENNE, C.T.; BILLION, A.; GHAI, R.; CHATTERJEE, S.S.; DOMANN, E.; KARST, U.; GOESMANN, A.; BEKEL, T.; BARTELS, D.; KAISER, O.; MEYER, F.; PUHLER, A.; WEISSHAAR, B.; WEHLAND, J.; LIANG, C.; DANDEKAR, T.; LAMPIDIS, R.; KREFT, J.; GOEBEL, W. y CHAKRABORTY, T. 2006. Whole-Genome Sequence of *Listeria welshimeri* Reveals Common Steps in Genome Reduction with *Listeria innocua* as Compared to *Listeria monocytogenes*. Journal of Bacteriology. 188 (21): 7405–7415.

- IVANEK, R.; GRÖHN, Y.; WELLS, M. T.; LEMBO, A. J. JR.; SAUDERS, B. D. y WIEDMANN, M.** 2009. Modeling of Spatially Referenced Environmental and Meteorological Factors Influencing the Probability of *Listeria* Species Isolation from Natural Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(18): 5893–5909.
- JINNEMAN, K.; WEKELL, M. EKLUND, M.** 2007. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Fish and Seafood. **In:** Ryser, E.; Marth, E. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3° Edición. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EEUU. pp. 617 – 654.
- KLUGE, R. y HOF, H.** 1986. Virulence of *Listeria welshimeri*. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene*. 262: 403–411.
- LADO, B.; YOUSEF, A.** 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In: Ryser, E.; Marth, E. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3° Edición. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EEUU. pp. 157 – 214
- MASUDA, T.; IWAYA, M.; MIURA, H.; KOKUBO, Y. y MARUMAYA, T.** 1992. Occurrence of *Listeria* species in fresh seafoods. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 33: 599 - 602.
- MERZ, A.; HIGGS, H.** 2003. *Listeria* Motility: Biophysics Pushes Things Forward. *Current Biology*. Elsevier Science Ltd. ISSN: 0960-9822. 13 (8): R302 – R304.
- MIETTINEN, H.** 2006. *Listeria monocytogenes* in Fish Farming and Processing. Disertación Académica. Helsinki, Finlandia. Universidad de Helsinki. Facultad de Medicina Veterinaria. Departamento de Higiene Ambiental y el Alimentos. 70 p.
- MOTES, M.** 1991. Incidence of *Listeria* spp. in shrimps, oysters and estuarine waters. *Journal of Food Protection*. 54: 170 - 173.
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M.** 2002. *MICROBIOLOGÍA Médica* 4° Edición. Madrid, España. Editorial Elsevier, 810 p.
- NORTON, D.; BRADEN, C.** 2007. Foodborne Listeriosis. **In:** Ryser, E.; Marth, E. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3° Edición. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EEUU. pp. 305 – 356

PAINTER, J.; SLUTSKER, L. 2007. Listeriosis in Humans. **In:** Ryser, E.; Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3° Edición. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EEUU. pp. 85 – 110

PARIHAR, V. S. 2004. Zoonotic Aspects of *Listeria monocytogenes* with Special Reference to Bacteriology. Report N° 45. Masters of Science Programme in Veterinary Medicine for International Students. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) ISSN 1403-2201. Uppsala, Suecia. 46 p.

PARIHAR, V.S; BARBUDDHE, S.B.; DANIELSSON-THAM, M.L. y THAM, W. 2008. Isolation and Characterization of *Listeria* species from Tropical Seafoods. Food Control 19 (6): 566-569.

PLAZA, H.; ORTÚZAR, Y.; GONZALEZ, M; AROS, J. 2005. Estado de Situación y Perspectivas de la Industria del Chorito. Fishing Partners Ltda. 1° Edición. Puerto Montt, Chile. 67p.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. 2007. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. **In:** Ryser, E.; Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3° Edición. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EEUU. pp. 1 -20

SAUDERS, B; WIEDMANN, M. 2007. Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. **In:** Ryser, E.; Marth, E. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. 3° Edición. Editorial CRC Press Taylor & Francis Group. Florida, EEUU. pp. 21 – 53

SCHÖBITZ, R; CIAMPI, L; NAHUELQUIN, Y. 2009. *Listeria monocytogenes* peligro latente para la industria alimentaria. AGRO SUR. 37(1): 1- 8.

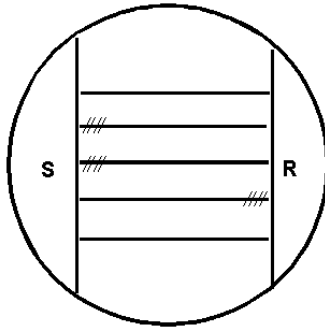
TECHNOPRESS S.A, Directorio de la Acuicultura y Pesca de Chile. 2007. Cultivo de Mitílidos, la Nueva Joyita de la Acuicultura. [en línea] < <http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=17450> > [consulta: 17 julio 2010]

WALKER, R. 2004. Chapter 33: *Listeria* **In** Hirsch, D.; Maclachlan, J.; Walker, R. Veterinary Microbiology. 2° Edición. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 536 p.

WEAGANT, S.; SADO, P.; COLBURN, K.; TORKELSON, J.; STANLEY, F.; KRANE, M.; SHIELDS, S. y THAYER, C. 1988. The Incidence of *Listeria* Species in Frozen Seafood Products. Journal of Food Protection. 51(8): 655 - 657.

ANEXOS

ANEXO 1.

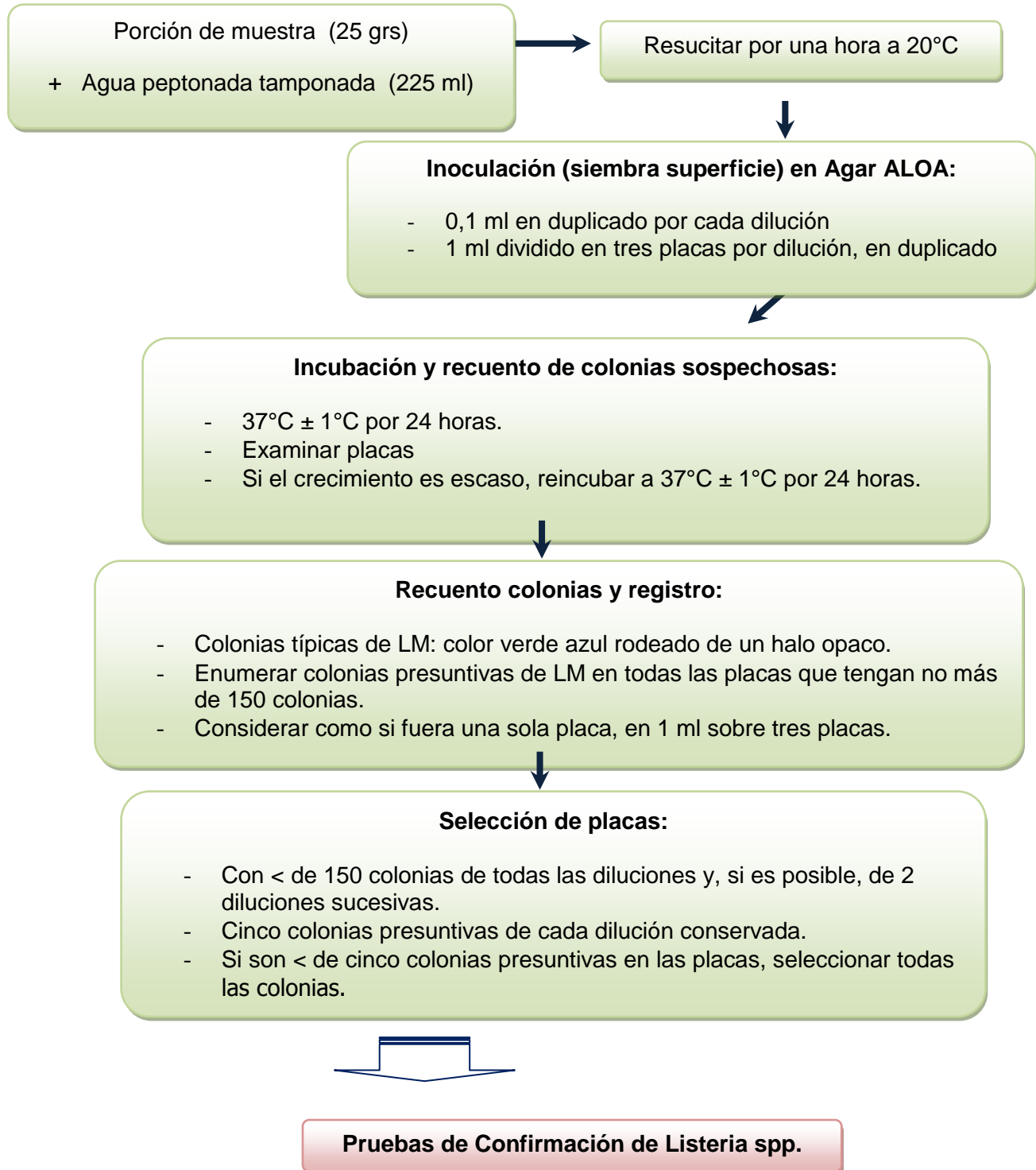


Las líneas horizontales representan inoculaciones de cinco cepas de prueba. Las líneas verticales representan inoculaciones de *Staphylococcus aureus* (S) y *Rhodococcus equi* (R). Líneas rayadas indican (sólo esquemáticamente) la localización de regiones de hemólisis.

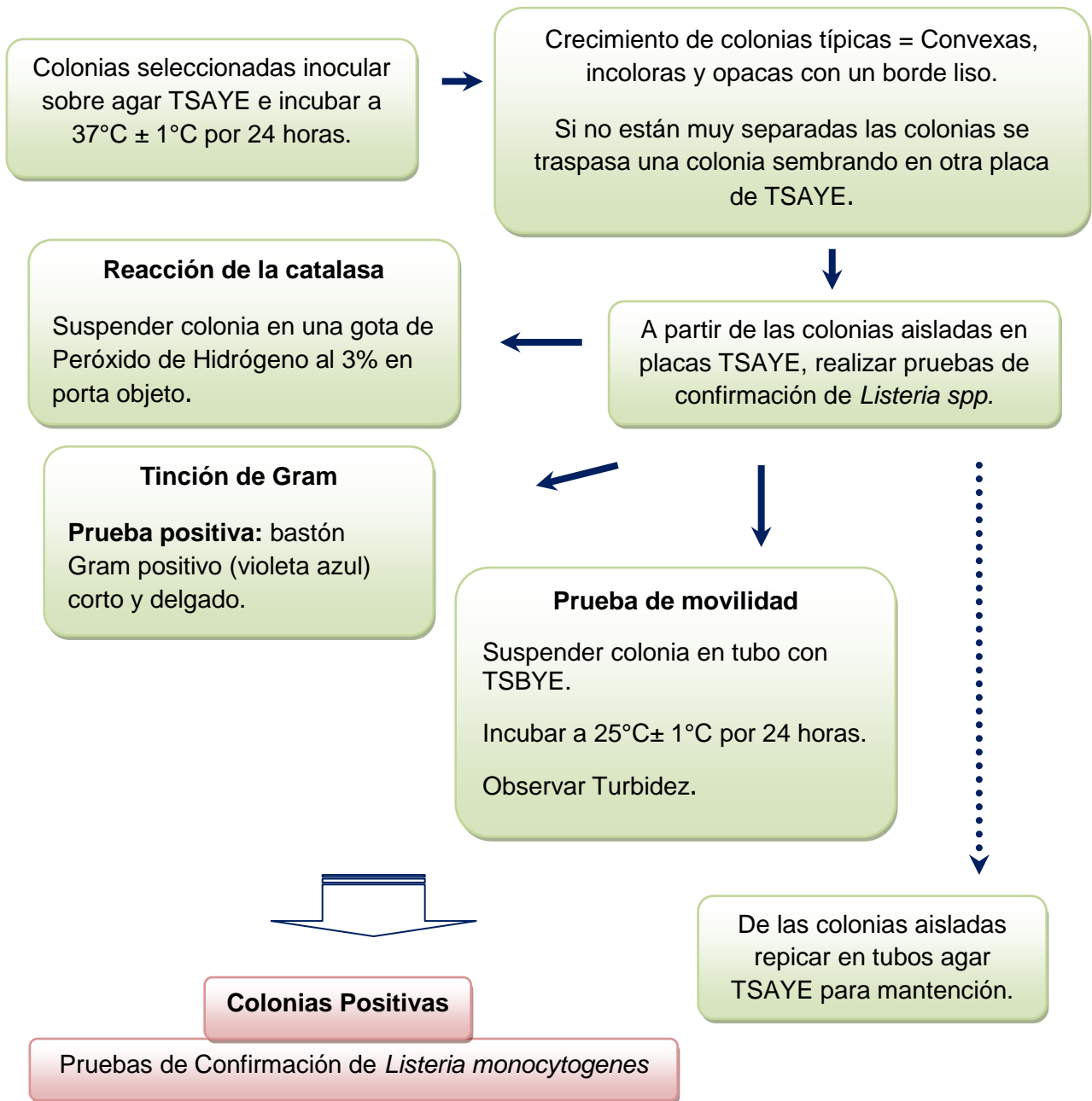
Fuente: USA, FDA, Food and Drugs Administration, 2003. Bacteriological Analytical Manual Chapter 10 Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.

FIGURA N. 2: Diseño de inoculación para la prueba de CAMP para *L. monocytogenes* en una placa de agar sangre de carnero.

ANEXO 2. Diagrama de Procedimiento de Recuento de *L. monocytogenes* (LM) según Norma Oficial Chilena N° 2657 Parte 2. 2007



Pruebas de Confirmación de *Listeria* spp.



Pruebas de Confirmación de *Listeria monocytogenes*

Prueba Hemólisis

Marcar cuadrados en placa de agar sangre de cordero.

Inocular cada colonia aislada en placa TSAYE, en espacios diferentes en el agar.

Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas



Control positivo: LM



LM: β hemólisis delgada y clara

Prueba de Utilización de Carbohidratos

Colonias de cultivo de TSBYE

Inocular en caldo de ramnosa y en caldo de xilosa

Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco días.



LM: Ramnosa positivo

Prueba CAMP

Sembrar *S. aureus* y *R. equi* en paralelo y diametralmente opuesto en agar sangre de cordero.

Sembrar en ángulo recto a las líneas sembradas las cepas en estudio en la misma placa.

Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas



Cultivos Control

- LM
- *Listeria innocua*
- *Listeria ivanovii*



LM: β hemólisis angosta en intersección con *S.aureus*.

ANEXO 3. Incidencia de *Listeria* spp. en Mariscos y Pescados Frescos, Congelados y Procesados.

Productos (País)	Número de muestras	(% de Muestras Positivas)	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Cangrejos	24		29,2
Cangrejos cocidos (EEUU)	2	50	0
Cangrejos LPC (China)	7		14
Cangrejos cocidos o LPC (EEUU)	138	22,5	
Cangrejos (Egipto)	5	40	0
Cangrejos azul cocidos (EEUU)	126	10,3	7,9
Cangrejos cocidos (múltiples países)	154		0
Camarón/Langostino			
Camarones frescos (múltiples países)	7		28,6
Camarones frescos y congelados (EEUU)	4	25	0
Camarones frescos (Japón)	70	8,6	1,4
Camarones frescos (Trinidad)	41	5	
Camarones LPC y congelados (Francia)	17	23,5	11,8
Camarones cocidos y procesados (múltiples países)	8		25
Camarones LPC (múltiples países)	49		8,2
Camarones frescos y procesados (India)	19	10,5	0
Camarones (Canadá)	20		20
Camarones en salmuera LPC (Noruega)	16		18
Camarones cocidos y frescos (Islandia)	11	9	9
Langostinos LPC (Japón)	38	15,8	2,6
Camarones (Egipto)	5	40	20

Productos (País)	Número de muestras	(% de Muestras Positivas)	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Langostinos/Camarones/Cardidos cocidos (Reino Unido)	40		0
Langostinos cocidos (múltiples países)	287		1,5
Langostinos procesados (múltiples países)	4		0
Langostinos (Brazil)	178	50	18
Langostinos LPC (China, Ecuador, México)			6,7
Langosta			
Cola de Langostas congeladas (múltiples países)	2		50
Langostas cocidas (Canadá)	70		0
Mejillones			
Mejillones ahumados (Nueva Zelanda)	14		35,7
Mejillones frescos (múltiples países)	40	22,5	7,5
Ostras			
Ostras congeladas (múltiples países)	1	0	0
Ostras procesadas (EEUU)	2	0	0
Ostras frescas (Japón)	84	0	0
Ostras frescas (Egipto)	2	0	0
Almejas			
Almejas frescas (India)	1	0	0
Almejas frescas (EEUU)	1	0	0
Almejas cocidas (múltiples países)	59		0
Ostiones			
Ostiones congelados (múltiples países)	2	50	0

Productos (País)	Número de muestras	(% de Muestras Positivas)	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Ostiones frescos (USA)	1	0	0
Ostiones (Canadá)	1		0
Otros mariscos e invertebrados			
Mariscos cocidos (Islandia)	11	0	0
Mariscos frescos (no ostras) (Japón)	147	11,6	1,4
Mariscos ⁴	25	44	25
<i>Donax</i> spp. (coquina frescos) (Egipto)	6	16,7	16,7
<i>Ruditapes</i> spp. (almejas frescas) (Egipto)	4	50	25
Cangrejos de río cocidos (múltiples países)	6		0
Pescados			
Pescados frescos (EEUU)	4	50	50
Bagres frescos (EEUU)	1	100	0
Pescados frescos (Trinidad)	61	14,8	2
Pescado picado fresco (Noruega)	8		12
Pescados frescos (Japón)	382	12,6	2,4
Pescados frescos (India)	51	3,9	0
Pescados frescos (Egipto)	39	25,6	12,8
Pescados congelados (Egipto)	17	17,6	5,9
Pescados frescos (India)	4	25	
Pescados congelados (India)	10	20	
Pescados LPC (Nueva Zelanda)	25	52	32
Pescados picados LPC y crudos (Japón)	37	43,2	8,1

⁴ Incluye las 14 unidades de muestras de mejillones ahumados ordenados por categoría de mejillones.

Productos (País)	Número de muestras	(% de Muestras Positivas)	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Truchas frescas (Islandia)	2	0	0
Abadejos secados (Islandia)	5	0	0
Pescados congelados (múltiples países)	4		25
Ceviche de pescados (Perú)	32	75	9
Pescados preservados sin tratamiento térmico (Dinamarca)	335		10,8
Pescados preservados sin tratamiento térmico (Dinamarca)	282		22,3
Pescados LPC (Dinamarca)	232		14,2
Pescados escabechados (Suiza)	89		25,8
Gravlax de Salmones (Islandia)	22	63,6	22,7
Salmones ahumados fríos (Suiza)	100		24
Salmones ahumados fríos (Suiza)	64		6,3
Salmones ahumados fríos (Suiza)	324		13,6
Salmones ahumados fríos (Suiza)	434		11,3
Pescados ahumados fríos (Noruega)	33		9
Salmones ahumados (Islandia)	31	29	3,2
Salmones ahumados fríos (Canadá)	32		31,2
Salmones ahumados fríos (Italia)	37	0 - 80	0
Salmones ahumados fríos (Nueva Zelanda)	12		75
Salmones ahumados fríos (EEUU)	61		78,7

Productos (País)	Número de muestras	(% de Muestras Positivas)	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Pescados ahumados (Nueva Zelanda)	12		66,7
Pescados ahumados, salados y fríos (Finlandia)	110		20
Pescados ahumados	380		7,1
Salmones ahumados fríos (Dinamarca)	340		20,9
Salmones ahumados fríos (Dinamarca)	190		33,7
Salmones ahumados (Japón)	92		5,4
Salmones y Truchas arcoiris gravlax o ahumados	51		39
Salmones y Truchas arcoiris gravlax o ahumados	32		9,4
Salmones y Truchas arcoiris gravlax o ahumados	29		10,3
Salmones y Truchas arcoiris gravlax o ahumados	103		16,5
Salmones y Truchas arcoiris gravlax o ahumados	94		17
Salmones y Truchas arcoiris gravlax o ahumados	35		22,9
Pescados ahumados (Canadá)	71	11,3	
Pescados ahumados (Canadá)		20,4	4,4
Pescados ahumados calientes (Suiza)	496		8,9
Pescados ahumados calientes (Suiza)	691		8,4
Pescados ahumados y/o salados (Egipto)	11	18,2	5,6
Pescados importados (Canadá)	3		33,3

Productos (País)	Número de muestras	(% de Muestras Positivas)	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
Otros Pescados y Mariscos			
Mariscos ahumados importados (Canadá)	64		1,6
Mariscos ahumados (Canadá)	130		0
Anguilas importadas (Canadá)	14		0
Calamares, langostinos (múltiples países)	2	100	0
Mariscos frescos y congelados (Taiwan)	57		10,5
Mariscos frescos y procesados (Islandia)	26	3,9	3,9
Mariscos (India)	200	8	0
Mariscos frescos (EEUU)	59	49,2	
Mariscos procesados (EEUU)	14	0	
Mariscos (otros) (Islandia)	5	20	20
Mariscos crudos LPC (Japón)	28	7,1	10,7
Mariscos LPC (Nueva Zelanda)	50	48	26
Mariscos cocidos (Japón)	5	0	0
Mariscos (Japón)	6	0	0
Mariscos LPC (Japón)	213		3,3
Ensalada de mariscos procesados (EEUU)	2	0	0
Ensalada de mariscos crudos (Islandia)	37	32	16
Pasta con mariscos y pescados molidos (Islandia)	7		28,6
Surimi (EEUU)	1	0	0
Surimi (Canadá)	46		2
Kamaboko importado (surimi) (Canadá)	335		0
Paté de mariscos (Canadá importado)	20		0
Ensalada de mariscos (Canadá)	4		0
Mariscos procesados (Canadá)	11		0

Fuente: Jinneman *et al.*, 2007. Tabla 15.7 Incidence of *Listeria* spp. in Fresh, Frozen, and Processed Seafood, Chapter 15: Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in Fish and Seafood in *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, página 628.

ANEXO 4.: Reacciones para la Identificación de *Listeria* spp.

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba de CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi Grayi</i>	-	-	-	-	-

V: Reacción variable; **(+):** Reacción débil; **+**: > 90% de reacciones positivas; **-**: Sin reacción.

Fuente: Norma Oficial Chilena NCh2657/2.Of2007 “Metodología de los alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* – Parte 2: Método de Enumeración” (Chile INN, 2007).