

U N I V E R S I D A D D E C O N C E P C I O N

DIRECCION DE POSTGRADO PROGRAMA MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS
MENCIÓN HIGIENE Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



CARACTERIZACION DE LA PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN UNA LINEA DE PRODUCCION DE EMBUTIDOS CRUDOS MADURADOS DE UNA FABRICA EN LA REGION DE O'HIGGINS

PROYECTO TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS VETERINARIAS.

NELSON GUILLERMO ADRIAN FLORES

CHILLAN - CHILE

2010

CARACTERIZACION DE LA PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN UNA LINEA DE PRODUCCION DE EMBUTIDOS CRUDOS MADURADOS DE UNA FABRICA EN LA REGION DE O'HIGGINS

Profesor Guía

Paula Gädicke L'Huissier
Profesor Asistente
Médico Veterinario, M. Sc., Dr. MV.

Profesores Asesores

Juana Isabel López Martín.
Profesor Asociado
Médico Veterinario, M. Sc.

Alejandro Bravo Thoms
Médico Veterinario, M. Sc.

I. RESUMEN :

La listeriosis, enfermedad provocada por *Listeria monocytogenes* (Lm) y transmitida por alimentos, es relativamente poco común, pero grave, con tasa de letalidad alta (20-30%), comparada con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por esta vía, como la *Salmonella*. Su gravedad y el hecho de que esté muy frecuentemente asociada a alimentos de elaboración industrial, especialmente cuando se producen epidemias, la sitúan entre las enfermedades de transmisión alimentaria de mayor relevancia social y económica. La enfermedad afecta principalmente a segmentos específicos de la población, cuya vulnerabilidad es mayor.

Los alimentos LPC (listos para el consumo) son una categoría amplia y diversa de alimentos, elaborados y almacenados de modos diferentes y en condiciones diferentes, algunos de los cuales sustentan la proliferación de Lm, mientras que en otros, dicho microorganismo no prolifera en condiciones específicas de almacenamiento y vida útil, basado en su proceso de elaboración, pH y Aw (actividad de agua). Lm está presente en el ambiente de establecimientos procesadores y productos cárneos, incluso posterior a los procesos terminales de limpieza y desinfección de las líneas de producción por su capacidad de persistir en las líneas de procesamientos, formando biofilms, desafiando la eficiencia de los procesos de limpieza y desinfección utilizados en la industria cárnica.

Con el objetivo de caracterizar una línea de producción de una fábrica de cecinas maduradas, listas para el consumo, se evaluará la presencia y serotipo de Lm en tres puntos de muestreo a nivel de matriz alimentaria y cinco puntos en superficies de equipos en contacto con el producto en proceso.

La obtención de muestras desde las superficies, se realizará mediante esponjas húmedas del sistema Petrifilm 3M, y la obtención en materia prima y alimento terminado de acuerdo al Manual de Muestreo de Alimentos del Ministerio de Salud, Chile, Marzo 2008. La cuantificación y aislamiento de las colonias en cada matriz alimentaria se realizará según la metodología BAM-FDA y el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en superficies, se realizará utilizando el kit comercial Petrifilm 3M. Los aislados de Lm serán tipificados por PCR de acuerdo a los tres linajes descritos para esta técnica según Doumith, M. 2004. Estos resultados permitirán caracterizar las diferentes cepas de Lm, en relación a su ubicación en los 8 puntos de muestreo, dentro de la línea de producción de embutidos crudos madurados.

Se utilizará estadística descriptiva como frecuencias absolutas y relativas, estadígrafos de posición y dispersión para realizar un análisis exploratorio de la presencia o ausencia de Lm y su cuantificación en cada uno de los puntos de muestreo. Para cada muestra se identificará el punto de muestreo, pH, T^o y Aw, se analizará la frecuencia de la presencia o ausencia de Lm de acuerdo a estas variables mediante la prueba de Chi². La cuantificación de colonias según el punto de muestreo, pH T^o y Aw, se analizará mediante análisis de varianza o test de Kruskal-Wallis según corresponda a la distribución de los datos y la homoscedasticidad de las varianzas de los grupos. La fuerza de asociación de los factores analizados con las muestras positivas a Lm, se evaluará mediante Odds ratio, en forma uni y multivariada, utilizando el software Epi-info y Statistix.

II. FORMULACION DEL PROYECTO :

Características microbiológicas de *Listeria monocytogenes*:

Las listerias son bacilos de aproximadamente 0,4-0,5 mm. de diámetro y 0,5-2,0 mm. de longitud, con los extremos redondeados. Algunas veces pueden tener forma cocoide, apareciendo como células individuales o bien en cadenas cortas (Holt, J.G. *et al.* 1994)

Listeria monocytogenes (Lm) es una bacteria gram positiva, ubicua. Algunos estudios sugieren que entre el 1-10% de los seres humanos pueden ser portadores intestinales de Lm. Se ha encontrado en al menos 37 especies de mamíferos, 17 especies de aves y posiblemente en algunas especies de pescados y crustáceos. También puede ser aislado del suelo, del ensilaje, y de otras fuentes ambientales (CAC/CL-61, 2007). Se describe que Lm resiste condiciones ambientales diversas: pH bajo, altas concentraciones de sodio, es microaeróbica y psicotrófica, es decir, puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración. (Rocourt, J. y Cossart, P., 2001)

Presentación de la enfermedad:

La listeriosis es una enfermedad, que afecta principalmente a adultos mayores, lactantes, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas.

Lm y la enfermedad Listeriosis fueron identificadas por primera vez en animales de laboratorio en Cambridge en 1924 (Murray *et al.*, 1926). Más tarde se hizo evidente que la enfermedad Listeriosis también afectaba a los humanos y el aumento del número de casos en personas en muchos países durante el decenio de 1980, junto con la evidencia de transmisión por los alimentos, ha renovado el interés por esta enfermedad (McLauchlin, 1996). Este interés se ha traducido en grandes avances en la comprensión de la distribución de la bacteria, así como también desarrollar métodos muy avanzadas para la detección. Además, también ha habido grandes mejoras en la comprensión de la morbilidad general, la mortalidad y la epidemiología de la enfermedad, junto con la patogenicidad y los mecanismos de agresión utilizados por Lm. Sin embargo a pesar de estos avances, sigue habiendo problemas de salud pública relacionados con el control de esta bacteria, en particular con respecto a la contaminación de los alimentos.

El género *Listeria*, incluye seis especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. grayi*. La listeriosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Listeria* y Lm es la principal especie patógena en los animales y el hombre (McLauchlin y Jones, 1999). Dos casos de infecciones humanas causadas por *L. ivanovii* se han divulgado en el Reino Unido (Cummins *et al.*, 1994), y todos los otros aislamientos a partir de 3.000 casos de listeriosis en el Reino Unido entre 1965 y 2002 han sido identificadas como Lm. Un solo caso de listeriosis humana debido a *L. seeligeri* se informó en Suiza (Rocourt y Bille, 1987). *L. ivanovii* puede ser responsable de una proporción significativa de casos de listeriosis en animales domésticos en el Reino Unido, especialmente en el ganado ovino (Low y Donachie, 1997), y hay cierta evidencia de una infección muy rara causada por *L. innocua* en animales domésticos (Walker *et al.*, 1994). La especie *L. welshimeri*, y *L. grayi* no han sido descritas como causantes de enfermedad. Todos los miembros del género *Listeria* son ampliamente distribuido en la naturaleza y se han aislado del suelo, la vegetación, las aguas residuales, agua, alimentos para animales, carne fresca y congelada incluyendo aves de corral, y en las heces de animales sanos incluidos los seres humanos. Estos organismos pueden llegar a ser endémicos en los entornos de procesamiento de alimentos. (FAO/OMS, 2004).

Los efectos adversos para la salud de las infecciones humanas de *Lm* en el Reino Unido están bien documentados (McLauchlin *et al.*, 1986; McLauchlin, 1990; McLauchlin, 1996; y Smerdon *et al.*, 2001). Los datos del Reino Unido son similares a la de todo el mundo (Farber y Peterkin, 1991 y Bortolussi y Schlech, 1995) en que esta bacteria causa infección principalmente intrauterina, meningitis y septicemia. La listeriosis durante el embarazo se manifiesta como una infección severa y sistémica en el feto o recién nacidos, así como una enfermedad leve similar a la influenza en la mujer embarazada. La infección puede ocurrir en cualquier etapa del embarazo. Listeriosis en niños mayores de 1 mes es muy poco frecuente, excepto en aquellos con enfermedad de base. En los adultos y jóvenes, las presentaciones principales son las infecciones del sistema nervioso central y/o septicemia.

La mayoría de los casos en adultos y jóvenes se producen durante la terapia de inmunosupresión, es decir, pacientes que reciben esteroides o citotóxicos por neoplasias malignas. Otros grupos de riesgo, incluyen a los pacientes con SIDA, diabéticos, personas con prótesis de válvulas cardíacas y los individuos con enfermedad hepática o alcoholismo. Aproximadamente un tercio de los pacientes con meningitis por listeriosis y alrededor del 10% con bacteriemia primaria son inmunocompetentes (Smerdon *et al.*, 2001). Presentaciones menos frecuentes en este grupo de pacientes incluyen meningoencefalitis y encefalitis, junto con las infecciones por focos de localizados como endocarditis, neumonía, peritonitis y abscesos profundos. Se presentan infecciones cutáneas y oculares por listeriosis (especialmente después del contacto con animales infectados o material de origen animal), y estas pueden preceder a una infección sistémica grave.

Listeriosis subclínicas ocurren y es probable que sean muy sub diagnosticadas. Además de la gripe como una enfermedad leve, manifestaciones oculares y la listeriosis cutánea, la gastroenteritis con fiebre se ha informado recientemente en los EE.UU., Italia y Escandinavia (Riedo *et al.*, 1994, Aureli *et al.*, 2000). Sin embargo, las enfermedades diarreicas no son una característica en todos los brotes (Linnan *et al.*, 1988) y pueden ser específicos para determinadas cepas de *Lm*.

La tasa de mortalidad de la listeriosis sistémica se ha estimado entre 20% y 40% (Farber y Peterkin, 1991), y los sobrevivientes, en particular aquellos en los que el organismo ha invadido el sistema nervioso central, pueden desarrollar secuelas importantes a largo plazo. En Inglaterra y Gales, se estimó una incidencia de 1,7 a 2,4 casos por millón de habitantes entre 1995 y 1999 (Smerdon *et al.*, 2001); esto se compara con 5,4 y 9,4 casos por millón de habitantes en Francia y los EE.UU., respectivamente (Goulet *et al.*, 2001).

Lm ha sido utilizada como un patógeno intracelular de bajo grado para estudiar la inmunidad celular (Kaufmann, 1993), y los más recientes avances en biología molecular han ayudado más en la comprensión de la listeriosis en el nivel celular (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Sin embargo, queda mucho por investigar de cómo se produce esta enfermedad, además de caracterizar las diferencias en los mecanismos de infección en órganos específicos y entre las diferentes cepas de *Lm*. Por otra parte, *Lm* es un microorganismo del suelo, que ha evolucionado en la capacidad de invadir y movilizarse dentro de las células eucariotas, probablemente en algunos organismos menores multicelulares del suelo (McLauchlin, 1997). Por lo tanto, esta bacteria no está adaptada al hombre, y es más bien una infección marginal y un patógeno oportunista, probablemente con múltiples rutas de infección y de presentación de la enfermedad, por lo que es poco probable que tenga una sola dosis infectante.

La ingestión de alimentos, por lo general muy contaminados, es la principal vía de infección (McLauchlin, 1996). La infección por los alimentos y su invasión, puede tener lugar en los sitios en la parte superior de la nasofaringe o el tracto digestivo. Hay pruebas que sugieren que en la encefalitis en ovejas por listerias, surge a través de heridas en la raíz dental y otros sitios de la mucosa oral, con una neuritis ascendente a lo largo de los nervios craneales (sobre todo el nervio trigémino) dando lugar a lesiones en la base del cerebro (Low y Donachie, 1997). Sin

embargo, no está claro si esta ruta se produce en el hombre, a pesar de la encefalitis muy similar a la de las ovejas que se producen en los seres humanos, en cuanto a lugar de la inflamación en el cerebro y la presentación histológica (Mylonakis *et al.*, 1998). El alimento contaminado pasa al estómago, donde el ambiente ácido puede eliminar a muchos de las Lm. Existe evidencia que apoya el papel del tratamiento antiácido en el aumento de la susceptibilidad de algunos grupos de pacientes (Fleming *et al.*, 1985) y en la infección de los animales de experimentación (Schlech *et al.*, 1993). La capacidad tampón de algunos tipos de alimentos también puede ser importante para facilitar la supervivencia del organismo, el cual puede invadir en diferentes sitios a lo largo del tracto gastrointestinal. Otras vías de infección pueden ocurrir, y en animales de experimentación, la septicemia se puede lograr con aerosoles contaminados a través de la vía respiratoria (Bracegirdle *et al.*, 1994). La evidencia que apoya la posibilidad de infección por vía respiratoria proviene de uno de los casos en un brote epidémico en Canadá en 1981 (Schlech *et al.*, 1983) en el que la septicemia y la neumonía por aspiración se desarrolló por consumir ensalada de repollo. Análisis de los animales inoculados por vía oral sugiere que el intestino delgado es el sitio principal de la invasión, aunque el sitio exacto anatómico y el modo de infección no se conocen bien (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). El mecanismo de la enfermedad diarreica, que presumiblemente se produce en esta etapa, no se conoce. Después de la inoculación oral de los animales, las bacterias se pueden observar, junto con una reacción inflamatoria, en las células fagocíticas en la lámina propia subyacente del ciego y del colon (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Tras esta fase, la invasión del útero o del sistema nervioso central (para los pacientes con periodos de incubación más cortos) se puede producir a través del sistema circulatorio. Sin embargo, a juzgar por el curso relativamente leve de bacteriemia por Lm en mujeres embarazadas (McLauchlin *et al.*, 1990), la mayoría de las personas pueden resolver con éxito esta invasión inicial. En animales infectados experimentalmente, el organismo se elimina de la sangre por las células fagocíticas en el hígado (células de Kupffer) y el bazo, aunque la invasión de otros tipos celulares (hepatocitos, por ejemplo) también pueden ocurrir. En las células fagocíticas no activadas, algunas bacterias sobrevivan y posteriormente se propaguen a otras células del huésped (por ejemplo, los hepatocitos). Las lesiones localizadas en el hígado y también en el bazo se puede resolver con éxito en la mayoría de las personas. Sin embargo, la naturaleza intracelular de Lm puede permitir la erradicación incompleta y la supervivencia de la bacteria en estos y otros sitios, seguido por la invasión sucesiva de otros órganos. Esto puede explicar los períodos de incubación relativamente largo (hasta 3 meses) que se muestra en algunos pacientes tras el consumo de alimentos contaminados (Linnan *et al.*, 1988).

La infección intrauterina del feto es como resultado de la diseminación hematogena de la madre. La formación de abscesos se lleva a cabo en la placenta, lo que puede propagarse a través de la vena umbilical o el líquido amniótico a los órganos internos del feto. La serie de episodios febriles observadas en la madre, puede ser consecuencia de una nueva invasión del torrente sanguíneo materno desde de la placenta. No es inusual que Lm pueda sobrevivir y crecer en el líquido amniótico y la aspiración de esto conduce a los cambios patológicos en las vías respiratorias del feto. La presencia de un elevado número de microorganismo en el líquido amniótico (Courcol *et al.*, 1982) da lugar a una contaminación generalizada del recién nacido y de la madre en el parto, así como el medio ambiente después del parto y puede dar lugar a nuevos casos debido a infección cruzada neonatal (McLauchlin *et al.*, 1986; Bortolussi y Schlech, 1995). Las múltiples vías de infección (así como por otras razones, puede ser un factor que contribuye a la falta de una única relación dosis-respuesta para la listeriosis humana. Otras vías de transmisión de la listeriosis en humanos ocurren incluyendo el contacto directo con el medio ambiente (O' Driscoll *et al.*, 1999), el contacto con animales infectados naturalmente (McLauchlin y Low, 1994), y a través de la infección cruzada entre los recién nacidos (McLauchlin *et al.*, 1986). Sin embargo, estas rutas son raras, y como se ha señalado

anteriormente, la mayoría de los casos se cree que son transmitidas por los alimentos.

Relaciones dosis-respuesta:

Las relaciones dosis-respuesta son mucho menos conocidos para la infección por Lm en humanos. Estas relaciones comprenden tres componentes principales, cada uno con grandes incertidumbres. Los tres componentes son el medio ambiente (la matriz alimentaria), el microorganismo patógeno virulencia) y el huésped de acogida (la susceptibilidad y el estado inmunológico). (McLauchlin *et al.*, 2004).

El ambiente:

Lm está presente en el ambiente de establecimientos procesadores y productos cárneos, incluso posterior a los procesos terminales de limpieza y desinfección de las líneas de producción, por su capacidad de persistir en las líneas de procesamientos formando biofilms, desafiando la eficiencia de los procesos de limpieza y desinfección utilizados en la industria cárnica. (Taboada *et al.*, 2007; Schöbitz *et al.*, 2009).

La matriz de los alimentos pueden afectar la susceptibilidad a la infección, incluida la capacidad del patógeno de sobrevivir a la acidez gástrica. La Listeriosis de origen alimentario, se ha asociado con una amplia gama de vegetales, carne, productos lácteos y mariscos, y por lo tanto es probable que exista una amplia gama de interacciones con las diferentes matrices alimentarias. Hay efectos que ayudan a disminuir la exposición del organismo al entorno ácido del estómago, tales como el tiempo de tránsito, la disminución de la secreción de ácido o neutralización del ácido; microambientes que proporcionan protección al organismo (por ejemplo, en alimentos altos en grasa o emulsionados) es probable que aumenten la susceptibilidad a la infección de una serie de patógenos intestinales (Buchanan *et al.*, 2000).

La evidencia de una serie de patógenos entéricos (sobre todo como respuesta a estrés ácido) sugiere que las respuestas al estrés pueden alterar el estado fisiológico de las bacterias y por ende, modificar significativamente sus posibilidades de sobrevivir a los sistemas de defensa. Por ejemplo, la exposición previa de *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*, así como Lm al estrés ácido moderado no sólo mejorar la supervivencia en el estómago y el tracto intestinal superior, si no que también pueden aumentar la expresión de determinantes de virulencia de algunas de estas bacterias que están involucrada en la invasión (Buchanan *et al.*, 2000). Por lo tanto, la composición de un alimento (grasa, agua, contenido de sal, etc) pueden tener un efecto en la modulación de la capacidad de los patógenos gastrointestinales, como Lm, para sobrevivir dentro del cuerpo y la virulencia expresa. No hay datos cuantitativos específicamente para Lm que estén disponibles actualmente (FDA, 2001), pero esto significa que la variación ambiental (junto con las diferencias en susceptibilidad del huésped) que es poco probable que exista una sola dosis infectante de Lm. Sin embargo, esta es un área importante de incertidumbre que requieren una mayor investigación.

El patógeno (virulencia):

Los datos sobre la susceptibilidad a la infección en los seres humanos a través de experimentos con alimentos y voluntarios no están disponible. Tales experimentos no serían éticos llevarlos a cabo, por lo tanto, las únicas fuentes de datos no son otras que las pruebas in vivo de infecciones experimentales con animales, en ensayos *in vitro* (modelos de cultivo de tejidos y la presencia y caracterización de genes asociados con virulencia), y de fuentes epidemiológicos (brote y los datos de vigilancia), (McLauchlin *et al.*, 2004).

Infecciones experimentales en animales:

A pesar que la susceptibilidad a la listeriosis puede aumentar por factores externos, es una característica de la enfermedad natural que la tasa de ataque en los seres humanos y animales es muy baja. Por lo tanto, los modelos experimentales que tratan de reflejar la infección natural puede funcionar mal, y un número relativamente grande de los animales puede ser necesario para que una pequeña proporción de ellos desarrollen los síntomas clínicos de la enfermedad. Modelos animales que se han utilizado por lo general, incluyen los animales no tratados previamente cuyo sistema inmunitario no está preparado para reaccionar frente a *Lm*. Por lo tanto, los efectos de la exposición previa (ya sea para aumentar o disminuir la susceptibilidad, los cuales tienen alguna base experimental), no se conocen. Los modelos experimentales que se han utilizado con mayor frecuencia (es decir, desafío por vía intravenosa o intraperitoneal de ratones) no reflejan la ruta natural de la enfermedad, ni a los humanos como huésped, ni ha una población con exposición previa a esta bacteria. Por lo tanto, éstos sólo pueden ser considerados como modelos con grandes limitaciones para la extrapolación a la infección humana por los alimentos. (McLauchlin *et al.*, 2004).

Una amplia gama de animales susceptibles a la infección experimental, como los conejos, ratones y, en menor medida, las ratas son de uso frecuente ya que estos animales mueren después de la inoculación de bacterias vivas por vía intravenosa o intraperitoneal. De las seis especies de *Listeria*, sólo cultivos de *Lm* y *L. ivanovii* son virulentas en todos los modelos que miden por DL_{50} , la cinética de crecimiento bacteriano en los tejidos del huésped, la supervivencia en el hígado y el bazo, o la muerte de los animales de experimentación. Todas las especies no hemolíticas de *Listeria* (*L. innocua*, *L. welshimeri*, y *L. grayi*) y *L. seeligeri*, débilmente hemolíticas, son virulentas en las pruebas de patogenicidad del ratón (Mainou-Fowler *et al.*, 1988).

En los ratones inoculados por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa u oral con *Lm*, mueren (dependiendo de la dosis y la vía de inoculación) después de 1 a 7 días. La DL_{50} para los ratones después de la inoculación intraperitoneal o intravenosa con rangos 10^2 a 10^7 bacterias (Brosch *et al.*, 1993). La vía oral en ratones, ratas y conejillos de indias ha sido descrito (Lammerding *et al.*, 1992). La infección se produjo con mayor consistencia en los animales gnotobióticos y un efecto de la disminución de la sensibilidad como resultado de la microflora natural del tracto gastrointestinal ha sido sugerido (Czuprynski y Balish, 1981). La inoculación de esófago de ratas juveniles con 10^6 UFC de *Lm* mostró un índice de infección del 50% en el hígado o el bazo (Schlech *et al.*, 1993). La infección de los ratones también se puede lograr a través de una vía de aerosol (Bracegirdle *et al.*, 1994). DL_{50} de 10^3 - 10^5 *Lm* fueron suficientes para matar a los animales después de aproximadamente 4 días.

Inoculación oral de monos *Cynomologous* con 10^5 , 10^7 , y 10^9 *Lm*, desarrollaron diarrea; sólo los que recibieron 10^9 bacterias desarrollaron fiebre, septicemia, pérdida de apetito, e irritabilidad ocasionales. Los monos alimentados con 10^5 y 10^7 bacterias eliminaron el organismo en las heces durante 2 y 21 días, respectivamente. Linfopenia y neutrofilia se observaron en los monos alimentados con 10^7 y 10^9 *Lm*. (Farber *et al.*, 1991)

Una prueba de queratoconjuntivitis experimentales (test de Anton) se puede realizar en cobayas o conejos ya sea mediante la inoculación de una suspensión de bacterias vivas sobre el ojo. Una conjuntivitis purulenta (y ocasionalmente una queratitis) se desarrolla dentro de 24-48 horas y generalmente se cura espontáneamente (Seeliger, 1961).

En embriones de pollo inoculados por vía intra-alantoideo, la DL_{50} es de alrededor de 10^2 organismos. Las lesiones se producen en la membrana corioalantoidea, el hígado y el corazón, y la bacteria puede ser fácilmente cultivado a partir de estos sitios (Terplan y Steinmeyer, 1989).

Modelos *in vitro* y la caracterización de genes de virulencia:

Lm, es capaz de infectar y crecer dentro de la célula en una amplia gama de tipos de células de mamíferos cultivadas *in vitro*, incluyendo los enterocitos, los macrófagos, hepatocitos, neuronas y fibroblastos. El uso de la invasión de las células de mamífero cultivadas *in vitro* ha dado lugar a una comprensión parcial de la base genética de la patogenicidad y virulencia de Lm. (Vázquez-Boland *et al.*, 2001)

Lm, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*, muestran estas propiedades de invasión y propagación, pero otras especies de *Listeria* no (Pine *et al.*, 1991).

El organismo entra tanto en células fagocíticas como no fagocíticas. Receptores del complemento CR3 junto con otros factores sin caracterizar, pueden estar implicados en la adhesión a los fagocitos. Una proteína de la superficie de la *Listeria*, una internalina (que es una reminiscencia de la proteína M del estreptococo del grupo A), se ha demostrado que puede intervenir en las etapas iniciales de la invasión de todos los tipos de células. Además, una proteína de la superficie celular (internalina B), es exigida para entrar en las células de hepatocitos como (HEPG-2) *in vitro*, pero no en las células como los enterocitos (Caco-2). El receptor de internalina A ha sido recientemente identificado como E-cadherina, que es una proteína de superficie de mamíferos involucrados con la unión de célula a célula, (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Otra proteína de superficie, la p60 (con actividad hidrolasa mureína) también pueden estar implicadas en la invasión de fibroblastos. Las células de mamíferos pueden ser los fagocitos especializados (como los macrófagos), que, naturalmente, encapsulan el material extracelular en un compartimento limitado por una membrana (la vacuola fagocítica), o los fagocitos no especializados (por ejemplo, una célula epitelial), que normalmente son incapaces de ejecutar este proceso. Lm tiene la capacidad de inducir un proceso de fagocitosis en una célula fagocítica no especializada (tales como los enterocitos, que es una célula epitelial en el revestimiento del tracto intestinal), que internalizan la bacteria en un compartimento de su membrana. En el fagocito, la mayoría de las células en la vacuola fagocítica, son destruidas. Sin embargo, las bacterias sobreviven en la vacuola limitada por una membrana del fagocito no especializado (que probablemente confiere cierta protección a la bacteria de las defensas del huésped en el medio extracelular), median en la disolución de la membrana de la vacuola por medio de un hemolisina tiol-activada (*Listeriolisina O*), y posiblemente también por la acción de una fosfolipasa C (fosfatidilinositol específico). Lm, a continuación, entra en el citoplasma de la célula huésped donde crece. (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). En el citoplasma, el organismo se rodea de actina polimerizada de la célula huésped, que es preferentemente polimerizado en el polo anterior de la bacteria. La capacidad de polimerizar actina intracelular confiere movilidad a la bacteria y puede ser mediada por la unión con la célula huésped y profilactin vasodilatador fosfoproteína estimulada (VASP), aunque el modo exacto de acción no se entiende. La estructura resultante, como la cola de cometa, puede empujar la célula bacteriana a una célula adyacente de los mamíferos, donde vuelve a ser encapsulado en una vacuola. En esta etapa, la vacuola es el doble de la membrana envolvente de las dos células del huésped. Una enzima fosfolipasa (una enzima de espectro amplio, lecitinasa, que hidroliza la fosfatidilcolina o lecitina) está implicada con la disolución de estas membranas (aunque la hemolisina y la fosfolipasa C también pueden contribuir en este proceso). El crecimiento intracelular y el movimiento en la célula recién invadida se repiten. Los genes involucrados en la invasión y el movimiento intracelular en células de mamíferos se encuentran en cualquiera de los operones adyacentes, o en lugares muy cerca en el cromosoma bacteriano. Un conjunto similar de genes están presentes en Lm, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*. La virulencia de Lm es por tanto una característica multifactorial y al menos nueve genes y sus productos son necesarios para la infección, la invasión, la supervivencia y la movilidad entre célula y célula (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Datos epidemiológicos:

La listeriosis es una de las enfermedades más importantes de transmisión por los alimentos. Las manifestaciones de la enfermedad en el hombre comprenden septicemia, meningitis (o meningoencefalitis) y encefalitis, habitualmente precedidas de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. En mujeres gestantes, las infecciones intrauterinas o cervicouterinas pueden provocar abortos espontáneos o nacidos muertos. También se ha asociado Lm con manifestaciones gastrointestinales acompañadas de fiebre. (Minsal, 2009).

El período de incubación entre la exposición (consumo de alimentos contaminados) y el inicio de la listeriosis varía entre 1 día y 3 meses (Linnan *et al.*, 1988), y esto, junto con la larga duración de la contaminación de un lote de fabricación única, supone que los brotes relacionados pueden ser muy muy separados temporal y geográficamente. Estos dos factores hacen que en determinados alimentos rara vez se identifique como asociadas con la enfermedad, aunque la mayoría de los casos se supone que son transmitidas por los alimentos. Los datos de casos infectados naturalmente indican que las dosis altas se asocian con la infección (McLauchlin, 1996). Sin embargo, ya que los alimentos sólo están disponibles por períodos cortos después de su consumo, es probable un sesgo en el examen de los alimentos que resulten en los períodos de incubación cortos. La evidencia circunstancial sugiere que existen diferencias en la virulencia y relativamente pocos "tipos" de Lm se han identificado en los grandes brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (McLauchlin, 1997). Sin embargo, incluso durante los brotes, la tasa de ataque (proporción de personas expuestas que desarrollan la infección) es baja. Es probable que la tasa de ataque de casos esporádicos de listeriosis (que constituyen la mayoría de los casos) es también muy bajo. La baja tasa de ataque de infección, se ilustra con los datos de un solo caso esporádico de listeriosis (asociado con un queso de pasta blanda) en Inglaterra durante los años 1988 (McLauchlin, 1990). Aquí, una meningitis desarrollada después de consumir 85 g de queso contaminado con $> 10^7$ /g de Lm. El fabricante del queso continuó la producción para los siguientes 11 meses y el 57% de los quesos elaborados fueron contaminados; las muestras resultaron contaminadas con 10-105 UFC / g de la misma cepa que se recuperó de LCR del paciente. Durante 1997 y 1998, 70 kg (150 paquetes) y 45 kg (100 paquetes) de queso se elaboraron cada semana, respectivamente. Al queso se le dio una vida útil 3-6-meses y el tiempo de duplicación de Lm en queso naturalmente infectados, se estima entre 1 y 2 días. El análisis de 533 casos de listeriosis durante el período en que el queso contaminado estaba a la venta, identificaron siete casos infectados por una cepa similar a la de contaminación del queso. No fue posible determinar si alguno de los siete casos habían consumido el queso, sin embargo, aunque todos habían estado expuestos a este producto, muchas personas consumieron este tipo de queso (junto con una alta dosis de Lm) no desarrollaron infección grave. (McLauchlin, 1990).

Situación en Chile:

En Chile se ha reportado que aunque la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la letalidad de la enfermedad sistémica/encefalítica puede ser muy alta, con valores cercanos al 30% en los recién nacidos, en los adultos (excluida la mujer embarazada) 35 % y puede variar desde 11% en menores de 40 años a 63% en los mayores de 60 años. El año 2008 y 2009 hubo dos importantes brotes en Chile, causadas por consumo de alimentos de origen animal como quesos y cecinas. Durante el 2009, se notificaron 45 casos de Lm en el país. El 62% de los casos, 28 se presentaron en la Región Metropolitana. El resto de las regiones que han reportado casos son: Valparaíso 16% (7), O'Higgins 7% (3), Maule 4% (2), Araucanía 4% (2), Los Lagos 4% (2) y la Región del Bío Bío 2% (1). De todos estos casos

notificados en el país, 10 presentaron cepas genéticamente relacionadas con el clon 001; de ellos 9 correspondieron a la Región Metropolitana y uno a la Región de O'Higgins. El último caso correspondiente a este clon se notificó en el mes de abril. Esta cepa fue relacionada con cecinas listas para el consumo. (Minsal, 2009).

Una importante característica de *Lm*, es que puede crecer en la escala de temperaturas de aproximadamente 1° a 45° C. y en el intervalo de pH desde 4,1 a 9,6. A pesar de crecer lentamente a temperaturas de refrigeración, entre 5° y 6° C, el largo tiempo de vida de los alimentos llamados listos para consumo (LPC), podría dar a este patógeno la oportunidad de alcanzar niveles peligrosamente altos. (Jay, 2002).

Los alimentos LPC, se definen como aquellos Alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo, sin necesidad de ser cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos. Se reconocen, entre otros, como alimentos LPC las cecinas embutidas (como las salchichas, mortadelas) y quesos, los que pueden contaminarse después que han sido sometidos a cocción o pasteurización y antes de que sean envasados. Una vez que *Lm* alcanza el alimento, usualmente tiene suficientes nutrientes, humedad, tiempo y temperaturas adecuadas para sobrevivir y posiblemente desarrollarse. (FAO/OMS, 2004). En la actualidad, las empresas orientan sus sistemas de aseguramiento de la calidad (BPM, HACCP) hacia determinados tipos de productos dentro de los LPC, ya que éstos presentan condiciones de pH, *A_w* (actividad de agua), salinidad, etc. que dificultan el crecimiento de varios patógenos, no así de *Lm*. (FAO/OMS, 2004). Sin embargo al realizar un estudio de pesquisa de *Lm*, es importante considerar el pH T° y *A_w*, ya que son reflejo de los sistemas de aseguramiento de calidad de la fábrica.

Problemas en Salud Pública, comparando *Lm* con otros patógenos:

Lm, aunque es menos frecuente en los seres humanos en comparación con *Campylobacter* y *Salmonelas*, muestra una alta tasa de mortalidad del 20%, especialmente entre grupos vulnerables como los ancianos. La listeriosis es también muy peligrosa para las mujeres embarazadas ya que puede causar infecciones fetales, abortos involuntarios y mortinatos (Rocourt y Cossart, 2001). Los alimentos más frecuentemente asociados con los brotes han sido identificados como alimentos listos para consumir, pescado ahumado y otros productos de la pesca, seguidos por los productos de carne y queso (Lianou y Sofos, 2007).

En humanos las infecciones por *Lm* son principalmente transmitidas por los alimentos y se presentan en incidentes esporádicos y brotes epidémicos (Farber y Peterkin, 1991). Los alimentos involucrados y documentados, han incluido el queso, vegetales, pescado y productos cárnicos (Rocourt y Bille, 1997). La incidencia de listeriosis humana en Noruega es la más baja y bastante estable. Entre 8 y 21 casos anuales, registrados, se ha informado en los últimos 10 años. Predominan los casos esporádicos, aunque un brote con trozos de carne precocida como fuente se ha informado (Lassen y Caugant, 1992). *Lm* crece a temperaturas de refrigeración y tiene la capacidad para formar una flora persistente en las plantas de la industria alimentaria con la posible contaminación de los productos finales, lo cual junto con una creciente demanda de alimentos listos para el consumo con vida útil más larga, plantea serios desafíos a la industria alimentaria y es de gran preocupación. En la industria de la carne, la *Lm* tanto, es considerado como el más complicado microorganismo a controlar durante el proceso (Even Heir *et al.*, 2004).

La presencia de biofilms ha sido bien documentado en la industria alimentaria (Carpentier y Cerf, 1993) y estos biofilms son una fuente potencial de contaminación bacteriana. *Lm* tiene el potencial de formar biofilms en materiales como el acero inoxidable (Norwood y Gilmour, 1999), de caucho o plástico (Beresford *et al.*, 2001), y estos materiales se encuentran con frecuencia

en la leche manejo de equipos, líneas de leche, o los depósitos de leche. La capacidad de Lm para formar biopelículas (Harvey *et al.*, 2007) puede contribuir a su persistencia en las plantas de procesamiento de alimentos (Thimothe *et al.*, 2004).

La evaluación de riesgos es el proceso científico de la determinación de la relación entre la exposición a un riesgo determinado con el conjunto definido de condiciones y la probabilidad de un efecto nocivo para la salud o la enfermedad (Jouve, 2000). Las evaluaciones de riesgos están bien desarrolladas para los peligros químicos, y con mucho esfuerzo se ha puesto en la aplicación de este tipo de análisis microbiológicos a los riesgos de seguridad alimentaria, especialmente para el consumo humano de alimentos (Rocourt *et al.*, 2001 y FDA, 2001). Las evaluaciones de riesgos microbiológicos se han subdividido en cuatro pasos, que comprenden, la identificación y caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo (Rocourt *et al.*, 2001).

Aunque un gran número de cepas de Lm ahora se pueden distinguir por medio de técnicas discriminatorias, ninguno de estos métodos se pueden utilizar para identificar los cultivos que no son patógenos o menos virulentos (McLauchlin *et al.*, 1986). Además, no hay pruebas que indiquen que la infección con ciertas cepas es más probable que cause enfermedad en el hombre de mayor gravedad o producir la muerte. Del mismo modo, las diferencias en la severidad de la enfermedad o las tasas de mortalidad no han sido registrados en los pacientes infectados durante los grandes brotes en comparación con los casos aparentemente esporádicos.

Algunos autores, como McLauchlin *et al* (1986), consideran que todas las cepas de Lm son patógenas, por los siguientes antecedentes:

- (1) Infecciones graves son el resultado de una amplia gama de cepas de Lm, y no hay evidencia clara de que la gravedad de la listeriosis humana es cepa específica.
- (2) Aunque un número de técnicas están disponibles para subtipo Lm, estos modelos no pueden predecir la capacidad de una cepa específica de causar enfermedades transmitidas por los alimentos. La evidencia epidemiológica ha demostrado que ciertos tipos de Lm son más frecuentemente asociados con la enfermedad de humanos esporádicos y se presentan con mayor frecuencia con grandes brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, por lo tanto es probable que haya diferencias entre las cepas para el potencial de causar esta enfermedad. Sin embargo, una amplia gama de cepas de Lm está involucrada con casos humanos esporádicos (esto es, probablemente, la forma predominante de la enfermedad) y no todos los grandes brotes han sido causados por un grupo restringido de tipos de Lm. Por lo tanto, una amplia gama de cepas tendría el potencial para causar una enfermedad grave.
- (3) la variación genética dentro de los genes de virulencia de la cepa salvaje de Lm es limitada, y esta variación no se ha vinculado a las diferencias en la patogenicidad. La mayoría de los ejemplares de Lm de tipo salvaje parece tanto a tener y expresar los genes de virulencia conocido *in vitro*. Una pequeña proporción de tipos silvestres no son patógenas cuando se probó el uso de modelos *in vitro* y en infecciones experimentales en animales, sin embargo, la base genética en este momento no se entiende, y la posibilidad de reversión a formas patógenas no pueden ser excluidos.
- (4) Experimentos en personas, para evaluar la capacidad de las cepas de Lm de causar la enfermedad al estar presente en los alimentos, no se han intentado. Los datos recogidos durante los incidentes de listeriosis transmitidas por los alimentos, junto con la alimentación en experimentos en monos, indican que la tasa de ataque de la enfermedad grave es muy bajo. Por lo tanto, si una población está expuesta a un vehículo de alimentos contaminados y no son casos reconocidos, esto no significa necesariamente que la cepa contaminante es incapaz de causar enfermedad.

(5) Criterios microbiológicos para los alimentos incluidos en la legislación, códigos de prácticas y directrices microbiológicos en el Reino Unido no han distinguido entre las diferentes cepas de Lm, y un enfoque similar se ha utilizado en otros países. La OMS Grupo de Trabajo oficioso sobre la listeriosis de origen alimentario, al considerar las acciones en la recuperación de Lm en alimentos, no distinguía entre las diferentes cepas de esta bacteria y recomendó: "retirar del mercado algunos alimentos que han demostrado ser causalmente asociado con casos de listeriosis humana y también recomienda: "considerar el retiro del mercado de alimentos procesados en envases intactos (por ejemplo la leche pasteurizada, productos lácteos y las carnes cocinadas en recipientes cerrados) que se encuentran contaminados con Lm.

Metodos diagnosticos pára Lm:

En el esfuerzo de la lucha contra Lm en los productos alimenticios, varios investigadores se centraron en el desarrollo de nuevos métodos, basados en la biología molecular, que podría detectar este patógeno más rápida y fiable en relación con el método microbiológico tradicional. En este contexto, un nuevo grupo de métodos, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectar los patógenos sin la necesidad de su cultivo. Hoy en día, con la segunda generación de métodos de PCR, están disponibles técnicas para una cuantificación de los microorganismos. Varios protocolos de PCR cuantitativa (qPCR) han sido publicados recientemente, destacando que este método puede ser ventajosamente usados para detectar y cuantificar Lm en los alimentos (O' Grady *et al.*, 2009).

La discriminación diagnóstica por técnicas de tipificación molecular, es importante en las investigaciones epidemiológicas y para detectar brotes y verificar las asociaciones epidemiológicas. Caracterizar la cepa también es esencial cuando se investigan las rutas de la contaminación y la localización de la bacteria en plantas procesadoras de alimentos. Métodos fenotípicos a menudo proporcionan un bajo poder de discriminación en las cepas (por ejemplo, la serotipificación), sufren de la variabilidad biológica (por ejemplo, fagotipificación) y no pueden ser aplicables a todas las cepas. Numerosos métodos moleculares como la electroforesis de enzimas multilocus (MEE), (Bibb *et al.*, 1990), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), (Martínez *et al.*, 2003), ribotipificación (Wiedmann *et al.*, 1996), fragmento amplificado polimorfismo en la longitud (AFLP), (Aarts *et al.*, 1999), la secuencia multilocus escribiendo (MLST), (Salcedo *et al.*, 2003) y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), (Louie *et al.*, 1996) se han utilizado en la tipificación y estudios epidemiológicos moleculares de Lm. PFGE se considera a menudo el método estándar de subtipificación de Lm (Graves y Swaminathan, 2001).

HIPOTESIS:

Listeria monocytogenes (Lm), está presente en las materias primas y superficies de una línea de producción de embutidos crudos maduros. La identificación bioquímica y molecular, permiten caracterizar su presencia y trazabilidad en la cadena de producción.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Caracterizar la presencia y lugares donde es posible encontrar Lm, *identificando además, su serotipo y genotipo*, en una línea de producción de embutidos crudos madurados.

Objetivos específicos:

- Detectar Lm en una línea de producción, a nivel de materia prima, producto terminado y superficies de contacto con la matriz alimentaria.
- Cuantificar la presencia de Lm en la línea de producción.
- Caracterizar las cepas de *Listeria monocytogenes* encontradas y aisladas, en relación a su serotipo y genotipo.
- Caracterizar los factores asociados (lugar de la muestra, T^o, pH, Aw), con las muestras positivas y el resultado analítico de Lm.

REFERENCIAS:

- Aarts, H.J., Hakemulder, L.E., Van Hoef, A.M. 1999. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *International Journal of Food Microbiology* 49, 95– 102.
- Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 342, 1236– 1241.
- Beresford, M. R., P. W. Andrew, and G. Shama. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *J. Appl. Microbiol.* 90:1000– 1005.
- Bibb, W.F., Gellin, B.G., Weaver, R. 1990. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2133– 2141.
- Bortolussi, R., Schlech, W.F. 1995. Listeriosis. In: Remington, J.S., Klein, J.O. (Eds.), *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 4th ed. Saunders, Philadelphia, pp. 1055– 1073.
- Bracegirdle, P., West, A.A., Lever, M.S., Fitzgoerge, R.B., Baskerville, A. 1994. A comparison of aerosol and intragastric routes of infection with *Listeria* spp. *Epidemiol. Infect.* 112, 69– 79.
- Brosch, R., Catimel, B., Milton, G., Buchrieser, C., Vindel, E., Rocourt, J. 1993. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (human food animal) in immunocompetent mice and its associated typing characteristics. *J. Food Prot.* 56, 296– 301.
- Buchanan, R.L., Lindqvist, R. 2000. Hazard identification and hazard characterization of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. Preliminary Report for FAO/WHO Expert Consultation, Rome. [on line]. Consultado 10 octubre 2009. http://www.who.int/fsf/mbriskassess/Scientific_documents/mra001.pdf
- CAC/CL-61. 2007. Codex Alimentarius Commission. Directrices sobre la aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos. (CAC/GL 61 – 2007. Pag. 1-30).
- Carpentier, B., and O. Cerf. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75:499–511.
- Courcol, R.J., Rousell-Delvallez, M., Puech, F., Delecour, M., Martin, G.R. 1982. Quantitative bacteriological analysis of amniotic fluid. *Biol. Neonate* 42, 166– 173.
- Cummins, A.J., Fielding, A.K., McLauchlin, J. 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J. Infect.* 28, 89– 91.
- Czuprynski, C.J., Balish, E. 1981. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* from gnotobiotic rats. *Infect. Immun.* 32, 323– 331

- Even Heir, Bjorn-Arne Lindstedt, Ole-Johan Rotterud, Traute Vardund, Georg Kapperud and Truls Nesbakken. 2004. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*. 96, 85-96
- FAO/OMS. 2004. Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en Alimentos listos para el consumo. Resumen Interpretativo. Publicación FAO/OMS. Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos N° 4. P. 1-25
- Farber, J.M., Daley, E., Coates, F., Beausoleil, N., Fournier, J. 1991. Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2606–2608.
- Farber, J.M., Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 752–811
- FDA. 2001. Federal Food Safety Information USA: Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health for Food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready to eat foods. [on line]. Consultado 10 octubre 2009. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>.
- Fleming, D.W., Cochi, S. L., Mac Donald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikatys, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. y Reingold, A. L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Eng. J. Med.* 312: 404-407.
- Goulet, V., de Valk, H., Pierre, O., Stainer, F., Rocourt, J., Valliant, V., Jacquet, C., Desenclos, J.C. 2001. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987 – 1997. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 983– 989.
- Graves, L.M., Swaminathan, B, 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 65, 55–62.
- Harvey, J., K. P. Keenan, and A. Gilmour. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.* 24:380–392.
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. y Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9ª edition. Regular, nonsporing gram-positive rods.. Ed. William & Wilkins. Group 19. P. 565-570
- Jay, J. 2002. *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Capítulo 25. Editorial Acribia, Zaragoza, España (P.457-480)
- Jouve, J.L., 2000. ILSI Europe session on microbial risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 141– 142.
- Kaufmann, S.H.E., 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 129– 163

- Lammerding, A.M., Glass, K.A., Gendron-Fitzpatrick, A., Doyle, M.P. 1992. Determination of virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3991–4000.
- Lassen, J., Caugant, D.A. 1992. Outbreak of listeriosis in Trondelag. MSIS-rapport. *Communicable Diseases Report Norway*, vol. 20. Norwegian Institute of Public Health, Oslo, p. 43.
- Lianou, A., Sofos, J.N. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection* 70, 2172–2198.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* 319, 823–828.
- Louie, M., Jayaratne, P., Luchsinger, I., Devenish, J., Yao, J., Schlech, W., Simor, A. 1996. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 15–19.
- Low, J.C., Donachie, W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.* 153, 9–29.
- Mainou-Fowler, T., MacGowan, A.P., Postlethwaite, R. 1988. Virulence of *Listeria* spp.: course of infection in resistant and susceptible mice. *J. Med. Microbiol.* 27, 131–140.
- Martinez, I., Rorvik, L.M., Brox, V., Lassen, J., Seppola, M., Gram, L., Fønnesbech-Vogel, B. 2003. Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *International Journal of Food Microbiology* 84, 285–297.
- McLauchlin, J., Audurier, A., Taylor, A.G. 1986. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967–1984. The use of serotyping and phage-typing. *J. Med. Microbiol.* 22, 367–377.
- McLauchlin, J. 1990. Human listeriosis in Britain, 1967–1985, a summary of 722 cases: 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol. Infect.* 104, 181–189.
- McLauchlin, J. 1996. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 7, 187–193.
- McLauchlin, J. 1997. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. *Rev. Med. Microbiol.* 8, 1–14.
- McLauchlin, J., Greenwood, M., Pini, P. 1990. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 255–262.

- McLauchlin, J., Jones, D. 1999. Erysipelothrix and Listeria. In: Borriello, S.P., Duerden, B.I. (Eds.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed. Systematic Bacteriology, vol. 2. Update 1. CDRom London, Arnold.
- McLauchlin, J., Low, C. 1994. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet. Rec.* 135, 615– 617.
- McLauchlin, J, Mitchell, R.T., Smerdon W.J., Jewell K.2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of Hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol*, 92, 15-33.
- MINSAL. 2009. Chile, Ministerio de Salud: Informe Brote Listeriosis Región Metropolitana Departamento de Epidemiología 5 de febrero 2009. [on line]Consultado el 11 noviembre 2009.
<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Listeriosis/Informe%20Listeria%20brote%202008.pdf>
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 407– 439.
- Mylonakis, E., Hohmann, E.L., Calderwood, S.B. 1998. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore)* 77, 313– 336.
- Norwood, D. E., and A. Gilmour. 1999. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J. Appl. Microbiol.* 86:576–582.
- O'Driscoll, J., Nnadi, C., McLauchlin, J. 1999. *Listeria monocytogenes* septic arthritis in an immunocompetent adult. *Clin. Microbiol. Infect.* 5, 234–235.
- O'Grady, J., Ruttledge, M., Sedano-Balbás, S., Smith, T.J., Barry, T., Maher, M. 2009. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiology* 26, 4–7.
- Pine, L., Kathariou, S., Quinn, F., George, V., Wenger, J.D., Weaver, R.E. 1991. Cytopathic effects in enterocyte-like Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *J. Clin. Microbiol.* 29, 990–996.
- Riedo, F.X., Pinner, R.W., Tosca, M.L., Cartter, M.L., Graves, L.M., Reeves, M.W., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Broome, C.V. 1994. A point source food-borne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *J. Infect. Dis.* 170, 693– 696.
- Rocourt, J., Bille, J. 1997. Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.* 50, 67– 73
- Rocourt, J. y Cossart, P. 2001, *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras*. Capítulo 18. Michael P. Doyle, Larry R. Beuchat, Thomas J. Montville (Ed.).

- Rocourt, J., Hogue, A., Toyofuku, H., Jacquet, C., Schlundt, J. 2001. *Listeria* and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *Am. J. Infect. Control* 29, 225–227.
- Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Hof, H., Espaze, E.P. 1987. Une nouvelle espèce du genre *Listeria*: *Listeria seeligeri*. *Pathol. Biol.* 35, 1075–1080.
- Salcedo, C., Arreaza, L., Alcalá, B., de la, F.L., Vazquez, J.A. 2003. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 757–762.
- Schlech, W.F., Chase, D.P., Badley, A. 1993. A model of foodborne *Listeria monocytogenes* infection in the Sprague–Dawley rat using gastric inoculation: development and effect of gastric acidity on infective dose. *Int. J. Food Microbiol.* 18, 15–24.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A. 1983. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308, 203–206.
- Schöbitz, R., Ciampi, L., Nahuelquin, Y. 2009. *Listeria monocytogenes*. *Un peligro latente para la industria alimentaria*. 2009. *Agro sur*. [online]. abr. 2009, vol.37, no.1, p.1-8. Consultado 6 Marzo 2010. http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-88022009000100001&lng=es&nrm=iso.
- Seeliger, H.P.R. 1961. *Listeriosis*. 2nd edn. VerlagKarger, Basilea, Suiza..
- Smerdon, W.J., Jones, R., McLauchlin, J., Reacher, M. 2001. Surveillance of listeriosis in England and Wales 1995–1999. *Commun. Dis. Public Health* 4, 188–193.
- Taboada, A., Sanchez E., Cava, R., Marin, F., Lopez A. 2007. Efectividad de desinfectantes de superficies de los equipos en instalaciones de envasado de productos listos para el consumo. (S7- P117). V Congreso Iberoamérica de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, Cartagena, Murcia, España 2007 (P. 882-892).
- Terplan, G., Steinmeyer, S. 1989. Investigations on the pathogenicity of *Listeria* spp. by experimental infection of the chick embryo. *Int. J. Food Microbiol.* 8, 277–280.
- Thimothe, J., K. K. Nightingale, K. Gall, V. N. Scott, and M. Wiedmann. 2004. Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *J. Food Prot.* 67:328–341.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14,584–640.
- Walker, J.K., Morgan, J.H., McLauchlin, J., Grant, K., Shallcross, J.A. 1994. *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Vet. Microbiol.* 42, 245–253.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E.M., McDowell, C.I., McDonough, P.L., Batt, C.A. 1996. Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1086–1090.

III. HIPOTESIS DE TRABAJO:

Listeria monocytogenes (Lm) está presente en las materias primas y superficies de una línea de producción de embutidos crudos maduros. La identificación bioquímica y molecular permite caracterizar su presencia y trazabilidad en la cadena de producción.

Se pretende demostrar que *Lm* se encuentra en la materia prima que ingresa a la fábrica de embutidos crudos madurados y de allí contamina y siembra las superficies y equipos que toman contacto con ella en el proceso de elaboración, logrando permanecer en algunos de ellos, resistiendo los procesos de limpieza e higienización implementados por la empresa.

Su aislamiento e identificación bioquímica en primer lugar y luego su confirmación molecular, permitirá caracterizar los diferentes serotipos que participan y su ubicación en la cadena de producción. Su presencia nos indicará los puntos en que no se ha eliminado, posterior a los procedimientos de limpieza e higienización, orientando a mejorar los procesos para lograr su control y eliminación de la línea de producción.

IV. METODOLOGIA:

A.- OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS:

El estudio se realizará en una Fábrica de cecinas maduradas listas para el consumo, emplazada en la Región de O'Higgins, cuyos productos, embutidos madurados, tienen como destino el mercado nacional y la exportación. Esta empresa ha resultado positiva a Lm en pruebas de screening (presencia-ausencia) realizadas a productos terminados listos para el consumo.

A partir del flujo de producción de los embutidos madurados, se procederá a seleccionar 8 diferentes puntos de muestreo para un mismo lote, considerando 3 de las matrices alimentarias y 5 de superficies en contacto con el producto, considerados como lugares críticos en el manual HACCP de la empresa.

La obtención de muestras desde las superficies, se realizará mediante esponjas húmedas del sistema Petrifilm 3M, y la obtención en materia prima y alimento terminado de acuerdo al Manual de Muestreo de Alimentos del Ministerio de Salud, Chile, Marzo 2008.

1. Matrices alimentarias:

- Materia prima (carne de cerdo).
- Masa embutido fresco (carne de cerdo molida con aditivos).
- Embutido madurado listo para el consumo (Chorizo Riojano, obtenido al momento de la liberación comercial del producto para cada lote.).

2. Superficies en contacto con el producto durante su flujo de preparación:

- Film del envase de la carne.
- Bandeja de transporte.
- Moledora-mezcladora.
- Embutidora
- Mesa de trabajo del embutido.

B.-TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Se obtendrán 5 muestras en cada uno de los 8 puntos, con 6 repeticiones a intervalos de una semana, para obtener 30 muestras por cada uno de los ocho puntos, haciendo un total de 240 muestras.

La unidad de muestreo es el punto de muestreo. Se consideran 30 muestras en cada uno, para tener alta probabilidad de encontrar diferencias entre dos puntos que tengan contaminación diferente (muy baja positividad 0.5% y alta positividad 20%), con una confianza del 95% (error de tipo I) y poder de 80% (error de tipo II) (Win Episcopo 2.0).

C.- RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Se obtendrán 5 unidades de 250 gramos por cada muestra de matriz alimentaria, en bolsas estériles y transportadas refrigeradas a 4° - 6° C al laboratorio. Estas muestras serán procesadas según lo descrito en el Bacteriological Analytical Manual (BAM), (Anthony D. Hitchins, 2003a) de la Food and Drug Administration (FDA, US.), para su detección y cuantificación por recuento de tubos múltiples (NMP). Las unidades de cada muestra de embutido crudo madurado listo para el consumo, corresponderá a cada lote de producción respectivamente y se obtendrá posteriormente, a las 4 semanas de maduración en cámaras, momento de liberación comercial del producto por cada lote.

Para las muestras de superficie, se utilizará la recolección con el sistema de Petrifilm (3M). Las placas Petrifilm (3M), han sido diseñadas para análisis ambiental y constituyen una ayuda para el control de la eficiencia de las operaciones de limpieza y desinfección en las plantas. Estas placas contienen un medio de cultivo listo para usar con agentes selectivos, nutrientes, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador cromogénico que facilita la detección de colonias de *Listeria* (3MHealth Care Limited, 2005). La placa Petrifilm detecta la mayoría de las especies de *Listeria* presentes en el ambiente, tales como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Listeria welshimeri*. La presencia de microorganismos tipo *Listeria spp.*, tales como *Listeria innocua* aporta evidencia de que las condiciones ambientales son propicias para la ocurrencia de *Listeria monocytogenes* (3MHealth Care Limited, 2005).

Es conocido que las condiciones de limpieza o sanitización que se utilizan en las plantas de alimentos, pueden dañar los microorganismos. Es por ello, que se emplea agua de peptona tamponada (BPW) como caldo de reparación, en combinación con las placas Petrifilm a objeto de revivificar colonias dañadas o estresadas de *Listeria* sin alterar el recuento. Este proceso se considera una fase de reparación y no de enriquecimiento (3MHealth Care Limited, 2005). De acuerdo a la metodología indicada por 3M, la muestra se recogerá con esponja prehumedecida con 5 ml. de caldo, frotando 100 cm² de superficie a muestrear. La esponja en su bolsa, se transportará bajo refrigeración a laboratorio, donde después de una preincubación en estufa a 35 °C por 1 hora, para la reparación de las *Listeria* dañadas, se escurrirá y se sembrarán 3 ml. en placa Petrifilm bajo campana de flujo laminar. Se incubarán por 24 a 30 horas y se procederá a su cuantificación, considerando como *Listeria spp.* a aquellas colonias color rojo-violeta intenso. Como control positivo y negativo, se incubarán en cada muestreo, una placa petrifilm con siembra de cultivo de *Lm* puro y una placa original sin sembrar.

Las colonias consideradas como *Listeria*, se traspasarán a medio cromogénico, Agar *Listeria* Ottavani & Agosti (ALOA) (Anthony D. Hitchins, 2003b), Bacteriological Analytical Manual (BAM on line) M10a ALOA (Agar *Listeria* Ottavani & Agosti Medium) y se confirmarán con un kit para perfil bioquímico comercial, API *Listeria* (bioMerieux). La galería API, es un sistema estandarizado para la identificación de *Listeria* que utiliza ensayos bioquímicos miniaturizados, así como una base de datos específica. El sistema consta de 10 microtubos que contienen los sustratos deshidratados y permiten la realización de ensayos enzimáticos o de fermentación de azúcares.

D.- CONFIRMACIÓN Y SEROTIPIFICACION MOLECULAR DE LAS CEPAS AISLADAS.

La confirmación y caracterización molecular de las cepas de LM aisladas se realizará utilizando la reacción de polimerasa en cadena (PCR). Se utilizará PCR en tiempo real (qPCR) para la identificación de especie mediante el gen de la hemolisina *hly* mediante sondas Taqman y PCR de punto final para los distintos grupos de serotipos, utilizando la visualización de los amplificadores con Bromuro de Etidio o SYBR-Green, según los protocolos utilizados en los laboratorios de referencia (ISP Chile). Las cepas evaluadas serán aisladas desde agares selectivos (Medio cromogénico (ALOA) y seguirán el protocolo de extracción de ADN utilizando lisis celular por calentamiento. Este extracto será utilizado como templado para los dos objetivos.

Para la identificación de especie se utilizarán los partidores y protocolo de PCR con sondas TaqMan descrito por Nogva *et al* (2000). Este protocolo identifica el gen *hly* correspondiente a la listeriolysina O y amplifica un segmento de 112 pb. Los fluoróforos corresponden a FAM en el extremo 5' y TAMRA en el extremo 3'. La Tm es de 74.53 °C.

Para evaluar la similitud de las cepas de Lm aisladas se realizará también un enfoque molecular mediante PCR en tiempo final de cada uno de los aislados, según lo descrito por Doumith *et al*, 2004. Se evaluará la presencia de los siguientes genes *lmo0737*, *lmo1118*, *ORF 2819* *ORF2110* y como identificación de especie el gen *prs*. En este caso los resultados permitirán clasificar los serovares en los serotipos más conocidos (grupos 1 a 4): Grupo 1, serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; Grupo 2, serotipos 1/2c y 3c; Grupo 3, serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e; Grupo 4, serotipos 4b, 4d y 4e, respectivamente.

La reacción se realizará utilizando el termociclador Roche 480 revelando con SYBR Green ó con el termociclador MJR Research 100 visualizando los amplificadores con tinción de Bromuro de Etidio. La secuencia de partidores que se utilizarán en estos PCR es la siguiente:

Tabla de partidores utilizados en la técnica PCR tiempo final:

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Tm (°C)	Tamaño ampliación (pares de bases)
Método SYBR green			
Lm hlySYBRGreen	GGGAAATCTGTCTCAGGTGATTGT	65,25	106
Lm hlySYBRGreen	CGATGATTTGAACTTCATCTTTTGC	66,32	
Método Sonda Taqman			
LMhlyF	TGCAAGTCCTAAGACGCCA	64,56	113
LMhlyR	CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA	63,79	
LMhlyProbe	FAM-CGATTTTCATCCGCGTGTTCCTTTTCG-TAMRA	74,53	

Tabla con partidores de serotipificación.

Nombre	Secuencia	Serotipos específicos	Tamaño producto (pares de bases)
Imo0737F	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	1/2a, 1/2c, 3a, 3c	691
Imo0737R	ACGATTTCTGCTTGCCATTTC		
Imo1118F	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	1/2c, 3c	906
Imo1118R	CGGCTTGTTCCGCATACTTA		
ORF2819F	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT	1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e	471
ORF2819R	CATCACTAAAGCCTCCCATTG		
ORF2110F	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	4b, 4d y 4e	597
ORF2110R	CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
prsF	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	Todas las especies de Listeria	370
prsR	CAAAGAAACCTTGGATTGCGG		

La serotipificación molecular de las cepas aisladas, permitirá observar la trazabilidad de la posible contaminación de la línea de proceso con Lm. Los resultados obtenidos se analizarán en relación a su ubicación en los 8 puntos de muestreo, dentro de la línea de producción del embutido crudo madurado.

E.-INFORMACIÓN ADICIONAL DE CADA MUESTRA:

Para cada muestra de matriz alimentaria o superficie, se registrará el pH, T^o y Aw según corresponda. Esto en cada uno de los puntos de muestreo y en cada repetición.

F.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se conformará una base de datos que considerará la identificación del punto de muestreo, la semana en que se obtuvo la muestra (1 a 5), el tipo de muestra (tipo de matriz o tipo de superficie), pH, T^o y Aw según corresponda al tipo de muestra, la presencia o ausencia de Lm en la muestra y el número de colonias presentes en ella.

Se utilizará estadística descriptiva, como frecuencias y estadígrafos de posición y dispersión, para realizar un análisis exploratorio de la presencia o ausencia de Lm y su cuantificación en cada uno de los puntos de muestreo.

Se analizará la frecuencia de la presencia o ausencia de Lm, de acuerdo al punto de muestreo, pH, T^o y Aw mediante la prueba de Chi².

La cuantificación de colonias de Lm según el punto de muestreo, pH, T^o y Aw, se analizará mediante análisis de varianza o test de Kruskal-Wallis, según corresponda a la distribución de los datos y la homoscedasticidad de las varianzas de los grupos.

La fuerza de asociación de los factores analizados con las muestras positivas a Lm, se determinarán mediante Odds ratio, en forma uni y multivariada, utilizando el software Epi-info y Statistix.

REFERENCIAS:

- 3MHealth Care Limited. 2005. Guía Petrifilm Listeria, Placa para el Control Ambiental de Listeria. 3M Departamento de Microbiología, 3M España S.A, Madrid. [on Line]. Consultado el 16 octubre 2009.
<http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=66666UuZjcFSLXTtMxMy5xfcE VuQEcuZgVs6EVs6E666666-->
- Anthony D. Hitchins. 2003a. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* Bacteriological Analytical Manual (BAM); Food and Drug Administration (FDA, US.).Chapter 10. [on line]. Consultado 24 marzo 2010.
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>.
- Anthony D. Hitchins. 2003b. Bacteriological Analytical Manual (BAM); Food and Drug Administration (FDA, US.).Chapter 10. M10aALOA (Agar Listeria Ottavani & Agosti) Medium. [on line] Consultado 24 marzo 2010.
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm062997.htm>
- Doumith, M. 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR, Journal of Clinical Microbiology 42(8) 3819-3822.
- MINSAL. 2008. Chile, Ministerio de Salud. Manual de Muestreo de Alimentos del Ministerio de Salud, Chile, Marzo 2008.
- Nogva, H. K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck, and D. Lillehaug. 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. Appl. Environ. Microbiol. 66:4266–4271.

V. PLAN DE TRABAJO :

Trimestre 1:

Actividad 1: Visitar en detalle la planta, obtener su layout y conocer a fondo los equipos, los procesos y tiempos. Análisis de situación.

Actividad 2: Establecer los puntos de muestreos (8).

Actividad 3: Realizar los muestreos, (5 muestras por punto, con una frecuencia semanal, por 6 semanas).

Actividad 4: Laboratorio: Siembra, identificación bioquímica, PCR.

Actividad 5: Listeria confirmada por PCR, identificación genética.

Trimestre 2:

Actividad 6: Interpretación y análisis de resultados. Trabajo estadístico.

Actividad 7: Elaboración de informe final.

Actividad 8: Presentación de resultados. Publicación.

Actividad	Responsable	TRIMESTRE					
		1			2		
Actividad 1: Visitar en detalle la planta, obtener su layout y conocer a fondo los equipos, los procesos y tiempos. Análisis de situación.	Nelson Adrian	X					
Actividad 2: Establecer los puntos de muestreos.	Nelson Adrian, Alejandro Bravo Paula Gädicke	X					
Actividad 3: Realizar los muestreos	Nelson Adrian		X	X			
Actividad 4: Laboratorio: Siembra, identificación bioquímica, PCR a positivas.	Nelson Adrian		X	X			
Actividad 5: Listeria confirmada por PCR, según serotipo, a identificación genética.	Nelson Adrian			X	X		
Actividad 6: Interpretación y analisis de resultados. Trabajo estadístico.	Nelson Adrian, Alejandro Bravo Juanita López Paula Gädicke					X	
Actividad 7: Elaboración de informe final.	Nelson Adrian, Alejandro Bravo Juanita López Paula Gädicke					X	X
Actividad 8: Presentación de resultados. Publicación.	Nelson Adrian, Alejandro Bravo Juanita López Paula Gädicke						X

VI. RECURSOS DISPONIBLES :

El financiamiento del presente proyecto, se realizará con fondos propios de la Secretaria Regional Ministerial de Salud O'Higgins, cubriendo las necesidades de transporte, toma de muestras, procesamiento preliminar de las muestras en Laboratorio Regional y recurso humano de apoyo.

El Instituto de Salud Pública (ISP), aportará todos los insumos de muestreo y análisis, sus Laboratorios para análisis de las muestras, recuento, aislamiento de *Listeria monocytogenes*, confirmación por PCR e identificación genética por campo pulsado de las cepas identificadas, como también, el recurso humano correspondiente.

El costo deducible del estudio asciende a la suma de \$ 6.000.000, considerando el valor global de los análisis, toma y transporte de muestras.

VII. Señale otros aspectos que Ud considere relevantes para la evaluación del proyecto.

La extensión de esta sección es de una página.

La vigilancia de patógenos presentes en los alimentos, se inicia con la caracterización del patógeno en su cadena productiva. En el caso de *Listeria monocytogenes*, dada su característica de ubicua, su caracterización en la materia prima y ambiente de producción es fundamental para su control. Este estudio, servirá de modelo para el resto de las plantas productoras, especialmente en las matrices alimentarias que no favorecen la proliferación bacteriana de *Listeria*, ya que los estudios mundiales de Evaluación de Riesgo de FAO-OMS, permiten que estas matrices contengan hasta 100 microorganismos por gramo sin causar riesgo a la salud, situación acogida en Chile por el Ministerio de Salud y recientemente incorporada al Reglamento Sanitario de los Alimentos (Decreto N° 97, Ministerio de Salud Chile, 1996; modificado por el Decreto N° 93/2009, Publicado en el Diario Oficial el 11 Diciembre 2009 y vigente desde esa misma fecha).

Artículo 174.- En los alimentos Listos Para el Consumo (LPC) se considera que no favorecen el desarrollo de *Listeria monocytogenes* cuando cumplen alguno de los siguientes parámetros:

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

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

Criterios microbiológicos para *Listeria monocytogenes*

1. Alimentos LPC que no favorecen el desarrollo

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

2. Alimentos LPC que favorecen el desarrollo

Parámetro	Plan de muestreo		Límite por gramo			
	Categoría	Clases	n	c	m	M
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	10	2	5	0	0	---

3. Alimentos LPC destinados a infantes menores de 12 meses de edad

Parámetro	Plan de muestreo		Límite por gramo			
	Categoría	Clases	n	c	m	M
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	11	2	10	0	0	---

REFERENCIAS:

MINSAL. 2010. Chile, Ministerio de Salud. Reglamento Sanitario de los Alimentos, Decreto N° 977/1996, y sus modificaciones vigentes a junio del 2010. P. 84-85