

SEROTIPOS DE *Listeria monocytogenes* AISLADOS DE ALIMENTOS PRODUCIDOS EN LA PROVINCIA DE CAUTÍN, CHILE

Serotypes of *Listeria monocytogenes* Isolated on Food Produced in Cautin Province, Chile

Oriana Betancourt ^{1*}, Karen Villagrán ¹, Fredy Muñoz ¹, Eladio Gutiérrez ¹, Mauricio Mayorga ¹ y Patricia Melgarejo ¹

* Escuela de Medicina Veterinaria. ¹ Universidad Católica de Temuco. Manuel Montt 56. Temuco. Chile.
Teléfono: 205551. Fax: 205571. E-mail: obetanco@uct.cl

RESUMEN

En Chile se ha aislado *Listeria monocytogenes* en diversos alimentos. El objetivo de este estudio fue aportar información sobre la presencia de la bacteria en longanizas artesanales (embutidos madurados), leche cruda y hortalizas producidos en la Provincia de Cautín y determinar los serotipos. Las muestras correspondieron a longaniza común artesanal, leche cruda y hortalizas, colectadas durante 2003. Para el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* se usó la metodología aprobada por el Food and Drug Administration (FDA) con incubación en caldo selectivo preenriquecimiento para *Listeria* (35°C), y posterior siembra en medios selectivos Oxford y Palcam (35-37°C). Las colonias típicas fueron replicadas en caldo tripticasa de soja (TSB) y sometidas a pruebas bioquímicas de identificación. La serotipificación se realizó sobre 53 cepas, utilizando un set de antisuero comercial. *L. monocytogenes* se presentó en el 61,1% de las longanizas, en el 0,0% de las muestras de leche cruda y en el 16,6% de las de hortalizas. Estos resultados podrían indicar fallas en la higiene de la manipulación, en el lavado y sanitización de superficies de contacto con los alimentos. Se determinó la presencia del serotipo 4e en 3 cepas provenientes de longanizas fabricadas en la ciudad de Temuco, y 1 cepa de cada uno de los serotipos virulentos 1/2a, 1/2b y 4b, los dos primeros provenientes de longanizas y el último desde hortalizas. La presencia de estos serotipos 1/2a, 1/2b y 4b, plantean una clara amenaza de un eventual brote, particularmente en consumidores susceptibles. Estos resultados representan un importante desafío de prevención y control para las autoridades sanitarias chilenas.

Palabras clave: *L. monocytogenes*, longanizas, leche cruda, hortalizas.

ABSTRACT

It has been reported in Chile that *L. monocytogenes* is present in different kinds of foods. The aim of this study was to obtain information of the occurrence of the bacteria in sausages, raw milk and vegetables produced in Cautín Province, and to know the *L. monocytogenes* serotypes involved. For this purpose sausages, raw milk and several vegetables samples, were collected on 2003. For the isolation and identification of *L. monocytogenes*, the samples were grown in trypticase soy broth (TSB) inoculated into a pre-enrichment broth for *Listeria* (35°C followed by an inoculation on selective media Oxford and Palcam (35-37°C). Biochemical tests were performed to all the typical *Listeria* colonies according to the methodology recommended by Bacteriological Analytical Manual (FDA). Serotyping was carried out using commercial specific antisera on 53 bacterial strains. Results of the analysis indicated the presence of *L. monocytogenes* in 61.1% of sausages samples, 0.0% in raw milk samples and in 16.6% of vegetables samples. These results could indicate failure in the hygiene practices, like cleaning and sanitizing the surface in contact with the food. The presence of serotype 4e in 3 strains were found in some sausages. There was a strain of virulent serotype 1/2a, 1/2b and 4b, the first and second resulted isolated from sausages and the third one resulted from vegetables. The presence of serotypes 1/2a, 1/2b and 4b, is a threat of an eventual out-break, especially in persons quite susceptible, that is why, there is a huge risk for public health in customers from this region. These results represent for Chilean public's health authorities an enormous challenge for controlling and prevention procedures.

Key words: *L. monocytogenes*, sausages, raw milk, vegetables.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es una bacteria que está presente en diversos ambientes y alimentos, y en plantas de pro-

cesamiento de estos últimos [47]. La bacteria ha sido aislada de longanizas (embutidos de carne picada madurada) [28], leche cruda, y vegetales frescos entre otros, los que han estado implicados, tanto en casos esporádicos como en brotes de listeriosis [47], enfermedad invasiva severa de baja incidencia, pero con una letalidad por encima del 30% en los grupos de alto riesgo como ancianos, mujeres embarazadas, recién nacidos e inmunodeprimidos [48]. Los casos de listeriosis se producen principalmente en países industrializados, donde la producción masiva obliga a largos periodos de refrigeración de los alimentos, lo cual constituye un grave problema para empresas alimentarias debido a la dificultad que representa su control en las plantas de procesado [21].

La presencia de *L. monocytogenes* en alimentos puede tener diferente origen como: contaminación fecal, restos de suelo y ensilajes [13, 30, 34], higiene deficiente durante la manipulación, procesos sanitarios inadecuados, y contaminación cruzada con superficies de trabajo, maquinarias y equipos [47]. El problema se acentúa debido a la capacidad de la bacteria de desarrollarse a temperatura de refrigeración [45].

Según Cisternas y col. [7], la listeriosis ha sido poco conocida en Chile y su diagnóstico no es frecuente debido a la falta de acuciosidad en su investigación [39]. Se ha reportado 3,6% de muestras de diversos alimentos positivos a *L. monocytogenes* [9] y 38,3% de positividad en carne molida y 28,3% en longanizas en Chillán [2]. Estos hallazgos adquieren importancia si se considera que los embutidos en general son un importante componente de la dieta de los chilenos y su consumo es creciente en la población [49]. Cordano y Rocourt [9] reportaron entre 0,8 a 3,5% de presencia de *L. monocytogenes* en distintos lácteos y Schöbitz y col. [40], encontraron un 22% de positividad al estudiar la bacteria en leche cruda de plantas lecheras de la VIII a X Región.

L. monocytogenes tiene 13 serovariedades y los grupos antigénicos 1/2a, 1/2b y 4b son los predominantes en la mayoría de los casos de listeriosis identificados en humanos causada por ingesta de quesos, carne, helado y pescado [8, 17, 43]. En Chile, un estudio del Instituto de Salud Pública, demostró la presencia de numerosas serovariedades de *L. monocytogenes* en diversos alimentos. En lácteos y carnes se presentaron los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b; en carne de pescado y mariscos, el serotipo 1/2c; y el serotipo 3b fue encontrado exclusivamente en camarones [9].

Diversos casos de brotes de listeriosis por ingesta de alimentos contaminados se han producido en Chile en los últimos dos años. Noriega y col. [31] señalan que, el alto número de casos en mujeres embarazadas constituye una señal del aumento en la exposición a alimentos contaminados derivado de cambios en la alimentación o factores asociados a la preparación y conservación de los alimentos. Esto puede deberse a que el Reglamento Sanitario de los Alimentos [28], no señala la detección de *L. monocytogenes* dentro de los parámetros microbiológicos aplicados a alimentos de consumo interno.

El objetivo de esta investigación fue aportar antecedentes sobre la seroprevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos de alto riesgo (longanizas, leche cruda y hortalizas de consumo fresco) que se consumen en la provincia de Cautín (Chile), especialmente de serotipos asociados a listeriosis transmitida por alimentos informados en la literatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de longanizas provinieron del total de fabricantes de embutidos existentes en la ciudad de Temuco que contaban con Resolución Sanitaria. Las muestras de leche fueron obtenidas desde 33 estanques de frío, entre individuales y comunitarios de las comunas de Pitrufquén, Gorbea, Vilcún, Loncoche, Gral. López, Niágara y Huichahue. Hortalizas de la estación fueron recolectadas en distintas localidades de Temuco (Labranza, fundo el Carmen, sector norte del cerro Nielol, Feria de Temuco, y centro de la ciudad), que corresponden a aquellas que normalmente abastecen a distintos locales de ventas de hortalizas, incluidos supermercados, y en puntos de venta callejeros en el centro de esta ciudad.

Para estimar cada tamaño muestral se utilizó como prevalencia teórica la indicada por trabajos realizados en el país [9, 33, 34]. Las prevalencias consideradas para longanizas, leche cruda, y hortalizas fueron 3,6, 3,8 y 3,2%, respectivamente. De manera que se tomaron 72 muestras de longanizas artesanales (6 de cada fábrica), 66 de leche cruda (dos por estanque) y 48 de hortalizas (entre lechugas, zanahorias, acelgas, espinacas, achicorias, puerros, y apios). Todas las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas herméticas estériles (para Stomacher; Cliperplast; Chile) y mantenidas en un Cooler (Coleman Isotherm Extrem, Italia) a 4°C y enviadas al laboratorio de Microbiología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Temuco.

Para el aislamiento de *L. monocytogenes* en los diferentes alimentos se utilizó la metodología propuesta por la Food and Drug Administration [16] y Porto y Uboldi [34], con la modificación de temperatura sugerida por distintos autores [3, 9, 26]. Se realizó una incubación previa (Estufa Marca; WTB Binder IP20; Alemania) de 25 g de cada muestra en 225 mL de caldo selectivo de pre-enriquecimiento para *Listeria* (Merck) por 48 h a 35°C. Posteriormente, las muestras se sembraron en dos medios selectivos, agar Oxford (Merck) y agar Palcam (Merck), y se incubaron por 48 h a 35 – 37°C. Dos colonias típicas por placa Petri, de color gris azuladas con precipitado negro y verde grisáceo, y una depresión central con halo negro, fueron traspasadas a agar Tripticasa de soya (Merck) e incubadas por 24 h a 35°C. Las pruebas de identificación se realizaron mediante la coloración de Gram, catalasa, motilidad típica en caldo a 25°C (motilidad en forma de paraguas), fermentación de manitol, ramnosa y xilosa, hemólisis en agar sangre de cordero al 5%, y prueba de CAMP (frente a *S. aureus*) [41]. La efectividad de los medios de cultivos utilizados

fue comprobada mediante las características coloniales típicas desarrolladas por la cepa tipo *L. monocytogenes* ATCC 15313.

Se utilizó un set de antisueros comerciales para *Listeria* (Denka Seiken Co. Ltda. Japón) que cuenta con 8 antisueros O (I/II, I, IV, V/VI, VI, VII, VIII y IX) y 4 antisueros H (A, AB, C y D). La determinación del antígeno O se llevó a cabo para 53 cepas usando el método de aglutinación en una placa de vidrio cuadrada, para lo cual se colocó una suspensión de bacterias inactivadas por cepa sobre la placa de vidrio, y se le adicionó una gota de cada antisuero hasta observar la aglutinación típica. La determinación del antígeno H, se llevó a cabo con las cepas que resultaron positivas a los factores antigénicos somáticos O, usando el método en tubo. Se colocó 1 mL de suspensión bacteriana dentro de los 4 tubos de cada cepa, y se adicionaron 2 mL de cada antisuero H en cada uno de los 4 tubos. Los tubos fueron sometidos a baño de maría (PolyScience 8305; EUA) a 50°C. Los serotipos fueron designados en base a las reacciones de aglutinación observadas, siguiendo la guía de resultados del fabricante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el 61% de las muestras de longanizas analizadas se detectó *L. monocytogenes* (TABLA I). La presencia de esta bacteria podría tener distinto origen, desde materias primas contaminadas durante el proceso de matanza y desposte, hasta prácticas higiénicas deficientes durante el proceso de manufactura [2, 24, 44].

Este resultado fue superior al informado por un estudio en carne molida (38,3%) y longanizas (28,3%) en Chillán [2], y en salchichas, patés (pasta untada de carne y grasa cocida) y jamones (3,6%) en la región Metropolitana [9]. Las longanizas muestreadas en Temuco corresponden a embutidos fabricados mayormente con carne de cerdo (*Sus scrofa domesticus*) y tocino, picados y mezclados con sal, especias y condimentos (embutido crudo madurado); se envasan en tripas naturales y se refrigeran (3 a -5°C) hasta su consumo. Rota y col. [36], señalan una mayor presencia de *L. monocytogenes* en carne de cerdo que de bovino (*Bos taurus-indicus*), y que los porcentajes aumentan conforme avanza el proceso de elaboración, siendo el más elevado en las carnes picadas. El tratamiento térmico de 71°C aplicado a los embutidos, es efectivo para eli-

minar este patógeno sólo si la carga inicial de listerias no supera un recuento de 10^3 ufc/g de carne cruda [6]. Este microorganismo es capaz de crecer a temperaturas entre 0 y 45°C, y aún cuando la contaminación inicial sea baja, puede multiplicarse a temperaturas de almacenamiento y llegar a niveles por sobre las 100 ufc/g de alimento [4, 47]. Debido a que estos productos corresponden a embutidos cárnicos que generalmente se consumen sin cocción suficiente, o que pueden contaminar superficies, utensilios y otros alimentos al refrigerarlos en forma inadecuada [35], representan un peligro para la salud de los consumidores pertenecientes a grupos de riesgo de la provincia de Cautín. A esto se suma que, los embutidos y carnes de cerdo y bovino corresponden al 10% de los alimentos identificados por el Servicio de Salud del Ambiente de la región Metropolitana como fuente de contagio en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos [35]. Esta alta proporción de aislamientos de la bacteria, podría deberse a un origen común en la carne de cerdo utilizadas en la elaboración de estos embutidos ya que es una la empresa que abastece mayoritariamente a estas fábricas en la provincia de Cautín.

Los resultados demuestran que esta bacteria también está presente en alimentos vegetales (TABLA I), los que generalmente se consumen en forma cruda. La positividad de *L. monocytogenes* (16,6%) fue superior a la informada por Monge y Arias [30], quienes aislaron la bacteria desde ensaladas frescas listas para el consumo (10%), y por Porto y Uboldi [34] (3,2%, en diversas hortalizas). Sin embargo, las concentraciones encontradas en el presente estudio estuvieron dentro del 15 al 70% [18], en vegetales sin lavar. Las muestras positivas a *L. monocytogenes* correspondieron a hortalizas provenientes de la Feria de Temuco y de puestos ambulantes del perímetro céntrico de esta ciudad. En los vegetales recolectados en los centros de cultivos de otras comunas cercanas, no se logró aislar la bacteria.

Prado y col. [35], al analizar las notificaciones de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) en la región Metropolitana durante 1999 y 2000, concluyeron que el consumo de alimentos preparados en ferias y comercios ambulantes fue similar a aquellos obtenidos de supermercados o almacenes. Ellos señalan que, a mayor manipulación se incrementa el riesgo de contraer una enfermedad de este tipo cuando no se toman en cuenta las buenas prácticas de manufactura.

TABLA I

ESPECIES DE *LISTERIA* SPP AISLADAS DESDE ALIMENTOS PRODUCIDOS EN LA PROVINCIA DE CAUTÍN, CHILE, 2003/
***LISTERIA* SPP SPECIES ISOLATED FROM FOODS PRODUCED IN CAUTIN PROVINCE, CHILE, 2003.**

Tipo de alimento	Muestras de alimentos positivas a <i>Listeria</i> spp.			Total muestras
	<i>L. monocytogenes</i> (%)	<i>L. innocua</i> (%)	<i>L. grayi</i> (%)	
Longanizas	44 (61,1)	4 (5,6)	0 (0,0)	72
Leche cruda	0 (0,0)	4 (6,1)	1 (1,5)	66
Hortalizas	13 (16,6)	14 (29,2)	0 (0,0)	48
Total	57 (28,0)	22 (11,8)	1 (0,5)	186

Esto refuerza la importancia de los vegetales como agentes de contaminación cruzada en el hogar. Últimamente, la venta de hortalizas listas para consumir, preparadas en la calle en condiciones higiénicas inadecuadas, ha ido en aumento en Temuco, lo que contribuiría al riesgo de contagio de enfermedades transmitidas por este tipo de alimento. El aislamiento de un 16,6% de *L. monocytogenes* en las hortalizas, corrobora la importancia de realizar prácticas higiénicas estrictas durante la manipulación para evitar la contaminación de los productos alimenticios [46], especialmente cuando los alimentos se consumen con poca cocción, o son previamente refrigerados, o representan riesgo de contaminación para otros alimentos en las diferentes etapas de la manipulación [9, 35].

En relación al análisis de las muestras de leches cruda, no se obtuvo aislamiento de *L. monocytogenes*. Este resultado no concuerda con Schöbitz y col. [40], quienes encontraron un 22% de muestras positivas en leche cruda entre las Regiones VIII y X, con una mayor proporción en la IX Región. Es importante destacar que debido a que el 60,6% de las muestras fueron colectadas en otoño, se esperaba obtener aislamientos pues según Lovett y col. [22], esto es más probable durante esa época del año. El resultado puede deberse probablemente, al efecto de dilución de la leche y menos concentración de la bacteria en la muestra [38]. Al respecto, Hayes y col. [15] indican que, para detectar la bacteria en leche, ésta debe contener entre 10^5 y 10^7 organismos por mL.

Otras causas que pudieron influir en los resultados obtenidos, serían la presencia de sustancias inhibitoras naturales en la leche [14, 33] o que la fuerte contaminación de la muestra no permitió a la bacteria competir y, por lo tanto, no se multiplicó adecuadamente en la leche durante su almacenamiento en refrigeración [48]. Es importante señalar que el 21% de los productos había informado recuentos de aerobios mesófilos por encima de 2.000 ufc/mL, valor que indica las deficientes condiciones higiénicas en las que se produce la leche en la localidad estudiada. Luis-Juan y col. [23], reportaron idénticos hallazgos.

Por otro lado Cornu y col. [10], señalan que otras *Listerias* como *L. innocua* exhiben una variedad de actividades inhibitorias que favorecen su propio desarrollo, lo que puede contribuir a resultados falsos negativos para *L. monocytogenes*. *L. innocua* se presentó en el 6,1% de las muestras de leche cruda (TABLA I), y su presencia pudo haber inhibido el desarrollo

de *L. monocytogenes* dejándola por debajo del nivel de detección del método utilizado. En Chile, existe poca información sobre la incidencia de *L. monocytogenes* en los suministros de leche cruda, la cual es esencial en estudios de brotes asociados a lácteos [22].

En la serotipificación, se observó que sólo 6 cepas coincidieron con los antígenos somáticos y flagelares, correspondiendo 3 cepas al serotipo 4e y 1 cepa de serotipos 1/2a y 1/2 b (todas en longanizas), y una cepa 4b (en hortalizas) (TABLA II). López y col. [21], señalan que el estudio de los serotipos constituye un primer nivel de diferenciación de cepas de *L. monocytogenes* y que es una herramienta utilizada en todos los estudios epidemiológicos aún cuando existen cepas no serotipificables.

Entre las listeriosis asociadas a serovariedades, Lei y col. [20] mencionan que raramente se ha aislado el serotipo 4e en alimentos y casi nunca de pacientes, lo que indicaría que se trata de un serotipo no patógeno. Por otro lado, las cepas serotipo 4b causan sobre el 50% de casos de listeriosis en el mundo, y las cepas del grupo antigénico 1/2 (1/2a, 1/2b y 1/2c) predominan en aislamientos de alimentos. En cuanto a la distribución epidemiológica de los serotipos responsables de listeriosis humana y la estructura genética de las especies de *L. monocytogenes*, Merighetti y col. [27], sugieren que los serotipos 1/2a y 1/2c son genéticamente más heterogéneos y presentan diferentes niveles de patogenicidad, siendo menos virulentos para humanos. Es probable que el mayor porcentaje de aislamientos obtenido en las longanizas (61%) se deba a la contaminación de superficies de proceso y la posible formación de biopelículas en utensilios y superficies utilizadas en el proceso de fabricación de éstos embutidos, lo que a su vez pudo ocasionar la contaminación de este alimento con los serotipos encontrados. Borucki y col. [5], señalan que la formación de biopelículas está relacionada con una división filogenética, pero no con cada serotipo, y que existirían cepas persistentes mejores formadoras de biopelículas que otras no persistentes. Por lo tanto, en el caso del hallazgo del serotipo 4e en muestras de embutido, puede estar relacionado con que esta cepa sea más persistente y posean más capacidad para formar biopelículas y resistir a condiciones ecológicas de este alimento, al igual que los serotipos 1/2a y 1/2b.

Aguado y col. [1] establecen que, la similitud entre cepas de *L. monocytogenes* se debe a un origen común, lo que en este estudio explicaría la presencia del serotipo 4e en distintos

TABLA II

SEROTIPOS DE *L. MONOCYTOGENES* AISLADOS DESDE DISTINTOS ALIMENTOS EN LA PROVINCIA DE CAUTÍN, CHILE, 2003/ *L. MONOCYTOGENES* SEROTYPES ISOLATED FROM DIFFERENTS FOODS IN CAUTIN PROVINCE, CHILE, 2003.

Tipo Alimento	Muestras positivas <i>L. monocytogenes</i>	Serotipos de <i>L. monocytogenes</i>	Número total de muestras
Embutidos fermentados	44	1/2 a (1 cepa) 1/2 b (1 cepa) 4 e (3 cepas)	72
Leche cruda	0	-	66
Hortalizas	13	4 b (1 cepa)	48

aislamientos a partir de longanizas). Estos mismos autores señalan que, la manipulación postprocesamiento es un importante factor que contribuye a la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos, lo que podría explicar el origen del serotipo 1/2a que se encuentra presente en humanos, el cual pudo provenir de los manipuladores. La limpieza del equipo utilizado requiere especial atención cuando varios productos son elaborados en la misma máquina y es bien reconocido además que existe un alto riesgo de contaminación cruzada durante el procesamiento y empaque [25].

El serotipo 4b presente en las hortalizas analizadas, con gran afinidad y altamente patógeno para el hombre, pudo haber llegado a los vegetales por contaminación directa desde el suelo o a través de la manipulación, o por contaminación cruzada desde otros alimentos durante el manejo. Sin embargo, para corroborar el origen de la contaminación y el porqué de la presencia de los serotipos, sería necesario comparar el serotipo de muestras aisladas desde pacientes con listeriosis [42].

Los serotipos 1/2a, 1/2b, 4b y 4e de *L. monocytogenes* están presentes en alimentos de la provincia de Cautín, en hortalizas y longanizas artesanales (TABLA II). Es probable que en esta región, con alto consumo del tipo de alimentos analizados en el presente estudio y con una importante nivel de presencia de serotipos relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), pueda presentarse algún brote de origen alimentario, especialmente en individuos susceptibles. Las posibles rutas de contaminación se relacionarían con la carencia de higiene, tanto en la manufactura como en los procesos de fabricación de estos embutidos, y en la carencia de procedimientos de higiene en alimentos propiamente tal, que llevarían a la contaminación cruzada entre alimentos o la contaminación por manipulación directa en el caso de las hortalizas, a través del ser humano.

La β -hemólisis es un carácter taxonómico importante en la clasificación de *L. monocytogenes*. En el presente estudio, sólo la cepa aislada desde las longanizas de serotipo 1/2a tuvo una fuerte capacidad β - hemolítica, mientras que el resto de las cepas serotipo 4e, 1/2b y 4b, no produjeron hemólisis, al igual que varias de las cepas que no lograron ser serotipificadas. Se conoce que la expresión del gen *hlyA* provoca que la capacidad hemolítica sea altamente diversa entre diferentes cepas de la bacteria. Por lo tanto, es probable que no exista correlación importante entre la expresión del gen *hlyA* y el genotipo expresado por cada serovariedad, lo que puede deberse a alteraciones genéticas [37]. Esto explicaría la pérdida de la capacidad hemolítica de *L. monocytogenes* en estos serotipos (4e, 1/2b y 4b). Si la hemólisis se asocia a la virulencia, la presencia del serotipo 1/2a en las longanizas la constituyen en un alimento de mayor riesgo para los consumidores (TABLA II).

El otro carácter taxonómico de peso, corresponde a la motilidad de la bacteria a 25°C [41]. El flagelo y la motilidad contribuyen a la virulencia de *L. monocytogenes* y la expresión de estos genes es termorregulada, con una alta represión a

37°C más que a 20°C. En efecto, la transcripción *in vitro* de los genes *flaA*, (que codifican la flagelina), y de los genes quimio-tácticos *cheY* y *cheA*, así como el ensamblaje de la flagelina a la superficie celular, se incrementan entre 20-25°C, y se reducen a 37°C [11], produciéndose por ello una supresión de la producción de flagelos de *L. monocytogenes* [19]. La temperatura de 50°C a que se realizó la serotipificación, pudo haber afectado la producción de flagelos. Sería coherente pensar que debido a esta supresión de motilidad flagelar por altas temperaturas, las 6 cepas en que sí se pudieron tipificar los serotipos 1/2a, 1/2b, 4b y 4e, serían más virulentas que las otras 15 cepas que no se serotipificaron por ausencia de antígeno flagelar. Por otro lado, durante la evolución, las serovariedades van perdiendo o adquiriendo genes, que le confieren la expresión de serogrupo específico asociado a antígenos serotipo específico [12]. Estos cambios estructurales del flagelo cambiarían también los epítomos del antígeno que se unen a los respectivos anticuerpos para *L. monocytogenes*, no siendo en consecuencia reconocidos por los anticuerpos comerciales utilizados en la serotipificación. Sin embargo, las reacciones de serotipo dependen también de la calidad del antisero, que a su vez dependen de las cepas de referencia estandarizadas utilizadas para producirlos, y de los métodos de preparación de antígenos elegidos [32].

De todo ello se desprende, que existe exposición de la población de la provincia de Cautín a este patógeno, si bien la casuística informada a la fecha es baja; de los 45 casos de listeriosis notificados durante el año 2009, sólo dos de ellos ocurrieron en la IX Región [29]. Esto podría explicarse porque no todos los brotes de ETAs en Chile concluyen con la identificación del agente causal. Por otro lado, según reportes del Servicio Nacional de Salud, de 260 brotes de ETAs en la región Metropolitana durante el 2000, el 67,7% no tuvo diagnóstico debido a que no fue posible obtener muestras de los alimentos involucrados ni de los pacientes afectados [35]. La infección por *L. monocytogenes* no es de notificación obligatoria en Chile. Sólo se vigila en preparados cárnicos listos para el consumo y en productos lácteos de exportación y el Instituto de Salud Pública (ISP) es el responsable de la confirmación de los casos [31]. La incidencia de listeriosis en Chile ha sido poco estudiada y no existen estadísticas correspondientes a ETAs atribuibles a *L. monocytogenes* [9]. Sin embargo, del 2006 al 2008, el total de aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos enviados al ISP fue de 4; 5 y 0 cepas por año, respectivamente [31]. Esto indica que es necesario estudiar la seropositividad en la población chilena para estimar su exposición al patógeno, así como implementar métodos y técnicas eficaces de identificación que permitan determinar rutas de contaminación en estudios de brotes en forma rápida y certera.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

L. monocytogenes está presente en longanizas y hortalizas producidas en la Provincia de Cautín, así como los sero-

tipos informados en la literatura como causantes de listeriosis por consumo de alimentos contaminados con la bacteria. Esta evidencia confirma la necesidad de implementar en Chile un criterio microbiológico oficial para la vigilancia de esta bacteria, especialmente en los alimentos dirigidos a consumidores de riesgo.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Proyecto DIUCT 2002-3-03 de la Dirección de Investigación y Postgrado de la Universidad Católica de Temuco, el apoyo financiero para el estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGUADO, V.; VITAS, A.; GARCÍA-JALÓN, I. Random Amplified Polymorphic DNA typing applied to the study of cross-contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. **J. Food Prot.** 64 (5): 716-720. 2001.
- [2] AGUIRRE, R. Incidencia de condiciones higiénicas de expendio y algunos factores climáticos en la presencia de *Listeria monocytogenes* en carnes y derivados. Dpto. de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción, Chillán. 58pp. 1995.
- [3] BARBOSA, W.; CABEDO, L.; WEDERQUIST, H.; SOFOS, J.; SCHMIDT, G. Growth variation among species and strains of *Listeria* in culture broth. **J. Food Prot.** 57:765-775. 1994.
- [4] BORGES, M.; DE SIQUEIRA, R.; BITTENCOUR, A.; VANETTI, M.; GOMIDE, L. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Rev. Microbiol.** 30:362-364. 1999.
- [5] BORUCKI, M.; PEPPIN, J.; WHITE, D.; LOGE, F.; CALL, D. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 7336-7342. 2003.
- [6] BUNCIC, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. **Int. J. Food Microbiol.** 12:173-80. 1991.
- [7] CISTERNAS, A.; LAGOS, N.; GALSTUCH, J.; GONZÁLEZ, C.; GARCÍA, C.; DÍAZ, J. Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal. **Rev. Chil. Obstet. Ginecol.** 67:237-241. 2002.
- [8] CLARK, E.; WESLEY, I.; FIEDLER, F.; PROMADEJ, N.; KATHARIOU, S. Absence of serotype-specific surface antigen and altered teichoic acid glycosylation among epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes*. **J. Clin. Microbiol.** 38: 3856-3859. 2000.
- [9] CORDANO, A.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **Int. J. Food Microbiol.** 70: 175-178. 2001.
- [10] CORNU, M.; KALMOKOFF, M.; FLANDROIS, J. Modeling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. **Int. J. Food Microbiol.** 73: 261-274. 2002.
- [11] DONS, L.; ERIKSSON, E.; JIN, Y.; ROTTENBERG, M.; KRISTENSSON, K.; LARSEN, C.; BRESCIANI, J.; OLSEN, J. Role of flagellin and the two-component cheA/cheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. **Infect. Immun.** 72: 3237-3244. 2004.
- [12] DOUMITH, M.; CAZALET, C.; SIMOES, N.; FRANGEUL, L.; JACQUET, C.; KUNST, F.; MARTIN, P.; COSSART, P.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infect. Immun.** 72: 1072-1083. 2004.
- [13] FARBER, J.; WANG, S.; CAL, Y.; ZHANG, S. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. **J. Food Prot.** 61:192-195. 1998.
- [14] GAYA, P.; MEDINA, M.; NÚÑEZ, M. Effect of the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* Behaviour in Raw Milk at Refrigeration Temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.** 57:3355-3360. 1991.
- [15] HAYES, P.; FEELEY, J.; GRAVES, L.; AJELLO, G.; FLEMING, D. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 438-440. 1986.
- [16] HITCHINS, A. *Listeria monocytogenes*. In: **AOAC International Bacteriological Analytical Manual.** 8ª Ed. U.S.A. 13 pp. 1995.
- [17] IIDA, T.; KANZAKI, M.; NAKAMA, A.; KOKUBO, Y.; MARYAMA, T.; KANEUCHI, C. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. **J. Vet. Med. Sci.** 60: 1341-1343. 1998.
- [18] ILLANES, S.; ARAYA, P.; FERRER, S. Rombencefalitis: una forma de infección por *Listeria monocytogenes* en el sistema nervioso central. **Rev. Méd. Chile** 131: 921-928. 2003.
- [19] KATHARIAL, S. Repression of motility and flagellin production at 37°C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the non-pathogenic *L. innocua*. **Can. J. Microbiol.** 41: 572-577. 1995.
- [20] LEI, X.H.; PROMADEJ, N.; KATHARIOU, S. DNA fragments from regions involved in surface antigen expression specifically identify *Listeria monocytogenes* serovar 4 and a subset thereof: Cluster IIB (Serotypes 4b, 4d, and 4e). **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1077-1082. 1997.
- [21] LÓPEZ, V.; SUÁREZ, M.; CHICO-CALERO, I.; NAVAS, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J. *Listeria monocytogenes* en

- alimentos: son todos los aislamientos igual de virulentos? **Rev. Argent. Microbiol.** 38: 224-234. 2006.
- [22] LOVETT, J.; FRANCIS, D.; HUNT, J. *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence, and pathogenicity. **J. Food Prot.** 50:188-192. 1987.
- [23] LUIS-JUAN, A.; ALANIZ, R.; VÁZQUEZ, M.; ROSAS, B. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalupe, México. **J. Food Prot.** 58:1139-1141. 1995.
- [24] LUND, A.; ZOTTOLAS, E.; PUSCH, D. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. **J. Food Prot.** 54: 602-606. 1990.
- [25] LYYTIKÄINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V.J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. **J. Infect. Dis.** 181: 1838-1841. 2000.
- [26] MARINSEK, J.; GREBENC, S. *Listeria monocytogenes* in minced meat and thermally untreated meat products in Slovenia. **Slov. Vet. Res.** 39: 131-136. 2002.
- [27] MEREGHETTI, L.; ROCHE, S. M.; LANOTTE, P.; WATT, S.; VAN DER MEE-MARQUET, N.; VELGE, P.; QUENTIN, R. Virulence and cord blood mononuclear cells cytokine production induced by perinatal *Listeria monocytogenes* strains from different phylogenetic lineages. **Biol. Neonate.** 86: 66-72. 2004.
- [28] MINISTERIO DE SALUD. CHILE Reglamento Sanitario de los Alimentos. D.S. 977 Editorial Textos jurídicos Ltda., Santiago, Chile. 170 pp. 2007.
- [29] MINISTERIO DE SALUD. *Listeria monocytogenes* (LM), 2009. Departamento de Epidemiología Red Salud. Chile. En línea: <http://www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/72fd7726fb436118e04001011f010973.pdf>. 23/04/2010.
- [30] MONGE, R.; ARIAS-ECHANDI, M. Presence of *Listeria monocytogenes* in fresh salad vegetables. **Rev. Biom.** 10:29-31. 1999.
- [31] NORIEGA, L.; IBAÑEZ, S.; GONZALEZ, P.; YAMAMOTO, M.; ASTUDILLO, J.; GONZALEZ, M.; RIVEROS, R.; LIRA, F.; MARCOTTI, A.; PEREZ, J.; THOMPSON, L.; DAZA, F.; ESPINOSA, M.; PINOCHET, C.; VIAL, P. *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. **Rev. Chil. Infect.** 25: 342-349. 2008.
- [32] PALUMBO, J.; BORUCKI, M.; MANDRELL, R.; GORSKI, L. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. **J. Clin. Microbiol.** 41: 564-571. 2003.
- [33] PITT, W.; HARDEN, T.; HULL, R. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. **Aust. J. Dairy Tech.** 54: 49-65. 1999.
- [34] PORTO, E.; UBOLDI, M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. **Dairy Food Environ. Sanit.** 21: 282. 2001.
- [35] PRADO, V.; SOLARI, V.; ÁLVAREZ, I.; ARELLANO, C.; VIDAL, R.; CARREÑO, M.; MADANI, N.; FUENTES, D.; O' RYAN, M.; MUÑOZ, V. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999- 2000. **Rev. Méd. Chile.** 130: 495-501. 2002.
- [36] ROTA, C.; YAGÜELA, J.; BLANCO, D.; CARRAMIÑANA, J.; HERRERA, A. Presencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. en longanizas frescas y curadas. Utilización de distintas condiciones de tiempo y temperatura de incubación. **J. Vet. Med. B.** 44: 617-624. 1997.
- [37] RUDI, K.; NOGVA, H. K.; NATERSTAD, K.; DROMTORP, S.M.; BREDHOLT, A.; HOLCK, A. Subtyping *Listeria monocytogenes* through the combined analyses of genotype and expression of the *hlyA* virulence determinant. **J. Appl. Microbiol.** 94: 720-732. 2003.
- [38] SANAA, M.; POUTREL, B.; MENARD, J.; SERIEYS, F. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. **J. Dairy Sc.** 76: 2891-2898. 1993.
- [39] SCHLECH, W. Foodborne listeriosis. **Clin. Infect. Dis.** 31: 770-775. 2000.
- [40] SCHÖBITZ, R.; MARÍN, M.; HORZELLA, M.; CARRASCO, E. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. **Agro Sur.** 29: 114-119. 2001.
- [41] SEELIGER, H.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: Bergey's Manual of systematic Bacteriology. Vol II. Edts. Williams & Wilkins. Baltimore. U.S.A. Pp 1235-1245. 1986.
- [42] SHEARER, A.; STRAPP, C.; JOERGER, R. Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. **J. Food Prot.** 64: 788-795. 2001.
- [43] SIM, J.; HOOD, D.; FINNIE, L.; WILSON, M.; GRAHAM, C.; BRETT, C.; HUDSON, J. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. **Lett. Appl. Microbiol.** 35: 409-413. 2002.
- [44] SIRAGUSA, G.; DICKSON, J.; DANIELS, E. Isolation of *Listeria* spp from feces of feedlot cattle. **J. Food Prot.** 56:102-105. 1993.

- [45] SMITH, J.; FRATAMICO, P. Factors involved in the emergence and persistence of food-borne diseases. **J. Food Prot.** 58:696-708. 1995.
- [46] SORIANO, J.; RICO, H.; MOLTÓ, J.; MAÑES, J. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. **J. Food Prot.** 64:551-553. 2001.
- [47] THÉVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNZOZY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **J. Appl. Microbiol.** 101:7-17. 2006.
- [48] UNNERSTAD, H. *Listeria monocytogenes* – strain diversity demonstrated by genotyping. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Suecia Thesis of Grade. 36 pp. 2001.
- [49] VALENZUELA, B.; NIETO, S.; GOLUSDA, C.; MUÑOZ, P.; CORVARI, A. Composición de materias grasas y relación de ácidos grasos omega-6/omega-3 de cecinas de consumo habitual en la región Metropolitana de Chile: una reevaluación el año 2004. **Rev. Chil. Nutr.** 32:37-41. 2005.