

# **UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO**

**FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS**



**“Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda de tanques de frío en lecherías y tanques comunitarios provenientes de 9 sectores de la provincia de Cautín, IX Región”**

**Tesis de grado para optar al grado de Licenciado en Ciencias Veterinarias**

**Mauricio Alejandro Mayorga Schulz**

**Temuco**

**CHILE**

**2004**

**PROFESOR GUIA:**

**Oriana L. Betancourt G. Ms. Sc.**

**PROFESOR COLABORADOR:**

**Karen Villagrán A. T.M**

**PROFESORES INFORMANTES:**

**Horacio Gil M. M.V**

**Mauricio Silva J. M.V, Ms. Sc.**

*A mi madre... quien sin su constante apoyo, consejo y guía, los obstáculos habrían sido mucho mas difíciles de zanjar ...y gracias a quienes creyeron en mí y no me abandonaron. La perseverancia y dedicación forja el espíritu, modela la mente, y abre el entendimiento.*

*Porque...*

*"El trabajo perseverante, puede convertir una barra de hierro en una aguja para bordar".*

*Quian Que Lei Shu.*

## INDICE

Summary.	1
Resumen.	2
Antecedentes.	3
?? Situación en el mundo.	6
?? Situación de la Listeriosis en Chile.	8
?? Ecología.	9
?? Características morfológicas, bioquímicas y serológicas de la bacteria.	10
?? Aislamiento y cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> .	11
?? Hipótesis	14
Objetivos Generales y específicos.	14
Material y métodos.	16
Resultados.	19
Discusión.	22
Conclusiones.	27
Bibliografía.	28
Anexo.	32

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<b>18</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 3</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 4</b>	<b>34</b>

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Grafico 1</b>	<b>19</b>
------------------	-----------

## SUMMARY

Milk samples are collected from each dairy farm and additionally from collective bulk tank from 9 different places in the Cautin province, IX Region, Chile. The purpose is to determine the presence of *Listeria monocytogenes*, because of its wide spread distribution environment. In total two milk samples are taken from each of the 33 bulk tanks and therefore 66 samples altogether. At the same time, a questionnaire is filled out by the farmer to assess the hygiene conditions and the management practices of the sampling area. These samples are inoculated in an enrichment broth for 48 hr. at 37°C. and follow to spread on Oxford and Palcam agar are incubated at 35°C. The result was as follow; 5 samples in Oxford agar were suspected to be *L. monocytogenes*, while there was no growth in Palcam agar. The following tests were made gram positive/negative, catalasa, motility, hemolysis and biochemic tests such as sugar fermentation (ramnosa, xilosa and manitol). The latter tests confirmed the presence of *Listeria innocua* in 4 samples and *Listeria grayi* in 1 sample. The result of the questionnaire show adequate management practices. However the levels of CFU greater 3000 CFU average indicate poor cleaning and hygiene practices with the bulk tanks. The for the absence of *L. monocytogenes* is because of the season (spring, summer), *L. monocytogenes* is more prevalent in winter due to the dilution of the bacterium in bulk tank, and the competition of *L. innocua* over *L. monocytogenes*.

## RESUMEN

Se realizó un muestreo a lecherías y tanques comunitarios en 9 sectores diferentes de la provincia de Cautín, con el objeto determinar la presencia de *Listeria monocytogenes*, puesto que es una bacteria de amplia distribución en el medio ambiente. Para este efecto, se extrajeron 2 muestras de leche por estanque, 48 provenían de estanques individuales y 18 de estanques comunitarios, haciendo un total de 66 estanques. Paralelo a esto, se realizó un cuestionario para evaluar las condiciones de higiene y manejo del lugar. Estas muestras se inocularon en caldo de enriquecimiento por 48 hrs a 37°C. y posteriormente se sembraron en agar Oxford y Palcam y se incubaron a 35°C por 48 hrs. Se obtuvieron 5 muestras sospechosas en agar Oxford mientras que en agar Palcam no hubo crecimiento alguno. Se realizaron pruebas consistentes en Gram, catalasa, motilidad, hemólisis y pruebas bioquímicas como fermentación de azúcares (ramnosa, xilosa y manitol) arrojando como resultado *Listeria innocua* en 4 muestras y *Listeria grayi* en una de ellas. El cuestionario realizado indicó un nivel adecuado en higiene de la rutina de ordeño y desinfección del estanque, sin embargo los recuentos UFC mostraron niveles altos de UFC (entre 2000 y 3000) que muestra pobres prácticas de limpieza de los tanques. Se estima que la razón por la cual no se logró aislamientos de *L. monocytogenes* estuvo en la época de muestreo (primavera-verano), y a la dilución del inóculo en el estanque y a la competencia de *L. innocua* sobre *L. monocytogenes*.

## ANTECEDENTES

La leche es uno de los productos de mayor consumo humano y de la cual se extraen una gran variedad de subproductos también comestibles. Debido a esto, es esencial velar por la calidad sanitaria de ésta para proteger a la población, ya que se trata de un medio nutritivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos patógenos que pueden ser transmitidos al hombre (Marth y Steele, 1998).

La presencia de microorganismos en la leche ha sido materia de interés en salud pública desde los tempranos días de la industria láctea. Desde fines del siglo XIX hasta 1940, numerosos peligros en la salud fueron asociados a la ingesta de leche cruda y sus subproductos. Enfermedades como la fiebre tifoidea, tuberculosis, poliomielitis, eran frecuentemente fatales debido a que los tratamientos con antibióticos no estaban disponibles (Marth y Steele, 1998).

La alta incidencia de las enfermedades asociadas a la leche confirmó la necesidad de incrementar el uso de la pasteurización, un proceso que era usado sólo esporádicamente durante 1920 y 1930. Después de la II Guerra Mundial con la universalización de la pasteurización, y sumado a la modernización de las prácticas de producción de leche y técnicas de manejo (sanidad de las ubres, inspección del rebaño, cuidado del ambiente) disminuyeron la amenaza de estas enfermedades (Marth y Steele, 1998).

Dentro de las enfermedades transmitidas por este alimento figura también la listeriosis, zoonosis provocada por una bacteria del género *Listeria*, de la cual ya se tiene noticias desde 1911 en animales, detectándose en 1929 el primer caso en humanos (Food and Drug Administration (FDA), 1992). En 1926, Murray y col. la describieron como una enfermedad septicémica en el laboratorio al experimentar con conejos, la que se caracterizaba por la presencia de

monocitosis periférica. Por esta razón, el microorganismo fue llamado *Bacterium monocytogenes*, cambiándose posteriormente por *Listerella* y finalmente a *Listeria*. Esta bacteria permaneció como una curiosidad de laboratorio hasta el periodo de la II Guerra Mundial, cuando se le describió como una importante causa de sepsis neonatal y meningitis al Este de Alemania de Posguerra (Schlech, 2000).

Al principio se creía que afectaba a personas que trabajaban en contacto más estrecho con los animales (granjeros), pero cuando comenzaron a aparecer casos en zonas urbanas, las autoridades de Salud se dieron cuenta de que no era necesario el contacto con los animales para adquirir la enfermedad, la cual también es de carácter profesional, pues afectaba a los médicos veterinarios (FDA, 1992). Se ha aislado *Listeria monocytogenes* en un 77% de personas sanas que trabajan en laboratorios y en un 61.5 % de oficinistas, comprobando con ello el gran número de seres humanos que son portadores sanos (Gesche, 1989).

La mayor parte de la información sobre la patogénesis de *L. monocytogenes* viene de estudios en ratones, estudios de biología celular usando cultivos de tejidos (FDA, 2001). En comparación a otros patógenos que causan enfermedades alimentarias, *Listeria* sólo es moderadamente virulenta, produciendo dos toxinas (hemolisina y citolisina), con la habilidad de lisar células sanguíneas y tejido (Pitt y col., 1999). Al ingresar *L. monocytogenes* por vía oral a través de alimentos contaminados, que es la principal vía de transmisión, penetra por el tejido intestinal y es expuesta a las células fagocíticas del sistema inmune, cuya función es destruir a los patógenos invasores. Una fracción de *L. monocytogenes* puede evadir los mecanismos defensores del sistema inmune, sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos hospedantes (macrófagos). Protegidos en su interior, o al salir de estas células hospedantes, *L.*

*monocytogenes* se moviliza vía circulación sanguínea o linfática hacia varios tejidos y, una vez invadidos estos tejidos, se multiplica en ellos. Entonces, usa los filamentos de actina del citoesqueleto para extenderse a las células adyacentes, sin riesgo de exposición a los componentes humorales del sistema inmune. La probabilidad de la invasión de los tejidos depende del número de microorganismos consumidos, susceptibilidad del hospedante, y virulencia de la cepa (FDA, 2001). La bacteria es diseminada a través de las fecas (Blood y Radostits, 1992), y también por la leche (Pitt y col., 1999).

La listeriosis presenta muchas manifestaciones y una distribución muy irregular entre las especies animales. En caso de presentación natural, la listeriosis visceral (septicemia), con meningitis o sin ella, se observa con más frecuencia en animales monogástricos y en rumiantes jóvenes, especialmente el feto y el neonato; la forma meningoencefálica es más frecuente en rumiantes adultos (Blood y Radostits, 1992).

Los síntomas de la listeriosis en personas sanas inmunocompetentes son confundidos con los síntomas de la gripe (dolor de cabeza, letargia, fatiga, mialgia). Es debido a esto que para los propósitos de tasación del riesgo a ella se hacen distinciones entre listeriosis no invasiva, con los síntomas suaves de una gripe (también referida como gastroenteritis listerial), y listeriosis invasiva. Esta última puede tener un largo periodo de incubación (sobre los tres meses) y un amplio rango de síntomas, los cuales incluyen bacteriemia, meningitis bacterial, infección del sistema nervioso central, encefalitis, endocarditis, meningoencefalitis, enfermedad neonatal, osteomielitis, peritonitis, infección pleural, neumonía, en el caso de mujeres embarazadas hay partos prematuros y abortos. En el caso de listeriosis no invasiva, los síntomas están más asociados con el sistema digestivo (diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos, calambres) (FDA, 2001).

Dentro de los grupos de mayor riesgo figuran niños recién nacidos (10 casos por 100.000 habitantes) y personas mayores de 60 años (1.4 casos por 100.000 habitantes), y de mayor predominancia en hombres (Schlech, 2000). Un tercer grupo corresponde a mujeres embarazadas, pacientes inmunodeprimidos, con cáncer, y pacientes con SIDA (FDA, 1992), así como las personas sometidas a transplantes de órganos y malignidades hematológicas, hemocromatosis, diabetes mellitus, cirrosis y falla renal con hemodiálisis o diálisis peritoneal (Schlech, 2000).

### ***Situación de la listeriosis en el mundo***

Aún cuando la listeriosis como enfermedad infecto-contagiosa era conocida desde hace varias décadas, nunca antes se había informado su presencia en alimentos o en materias primas de procesos de elaboración de éstos. Es de importancia no sólo en Salud Pública sino también a escala económica, pues el FDA (Food and Drug Administration), organismo controlador que supervigila los alimentos producidos en USA y los productos de importación, requisó en el año 1987 mercaderías que evidenciaban contaminación por un valor total de 66 millones de dólares, por lo que en junio de 1988 el FDA determinó que el análisis de *Listeria monocytogenes* fuese obligatorio para algunos productos, afectando el intercambio comercial con Chile al incluir un parámetro adicional de calidad con el que se tiene que cumplir en forma obligatoria (Arrieta, 1989).

Desde 1970, la listeriosis figuraba en la ex República Federal Alemana entre las enfermedades animales de declaración obligatoria (Merck, 1994). A fines de la década de los 80, *Listeria monocytogenes* emergió como un problema en carnes y otros productos procesados en los Estados Unidos. El USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) y la FDA, trabajaron en

plantas para mejorar sus procedimientos y establecer una tolerancia “cero” para el patógeno en productos listos para consumirse. Así, entre 1989 y 1993, la tasa de enfermedad de *Listeria monocytogenes* declinó en un 44%. Análisis preliminares de tasas desde 1993 no mostraron cambios en la tasa de enfermedad. Sin embargo, a fines de 1998 un aumento del número de casos de una especie subtipo de *Listeria monocytogenes* condicionó al CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades, en EE.UU) a investigar. Desde el 5 de febrero de ese año, el CDC reportó 16 muertes (5 de ellas abortos o partos prematuros) y 73 enfermos en 14 Estados asociados con el brote (FSIS, 2000).

Otros países que también tienen como política la tolerancia cero, son Canadá y Australia. Sin embargo, se cree que los niveles de tolerancia cero requeridos en leche y productos lácteos en Australia, Canadá y Estados Unidos son irreales e imposibles de llevar a cabo sin un futuro previsible hasta en la mayor severidad de un régimen. Por otro lado, se ha resumido un número de casos estudiados de los cuales sugirieron que la dosis infectiva lindaba entre  $2.7 \times 10^6$  a  $3.4 \times 10^9$  células de *L. monocytogenes* por gr. o ml de alimento. En Canadá y Europa, se propone un nivel aceptable de 100 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de alimento con el cual se ha podido demostrar que el microorganismo no crece. En Alemania la tolerancia cero ha sido injustificable y un nivel aceptable de *L. monocytogenes* entre  $10^2$  a  $10^4$  ufc/gr de alimento ha sido aprobado. En Estados Unidos, sin embargo, la salud pública y las agencias de regulación han implementado medidas de tolerancia cero a *L. monocytogenes* en alimentos listos para consumirse, y las mantendrán hasta que se acumulen suficientes antecedentes científicos que justifiquen o verifiquen los niveles propuestos (Pitt y col. , 1999).

### ***Situación de la listeriosis en Chile.***

*Listeria monocytogenes* es una bacteria poco conocida en el ámbito de la Salud pública de nuestro país, en lo que a control sanitario de alimentos de consumo nacional se refiere. Solamente a partir de 1983 se han comunicado trabajos en que se evidencia a los alimentos como vehículos de transmisión de este microorganismo que ha generado brotes epidémicos de cierta envergadura. En la VII Región se mostró una frecuencia preocupante de listeriosis neonatal (Arrieta, 1989). Entre los años 1984 y 1989 Sfeir y col. reportaron 6 casos de recién nacidos afectados por la Listeriosis, de los cuales 3 fallecieron. Otro estudio realizado por Zelada y col. (1990), detectaron entre 1982 y 1987 17 casos de infecciones por *Listeria monocytogenes* en la unidad de neonatología del hospital Félix Bulnes, describiéndose ésta como la segunda causa de infecciones bacterianas en esta unidad siendo superada sólo por *Streptococcus tipo B*. Beltrán (1991), reportó el caso de una mujer inmunocompetente de 34 años afectada de una meningoencefalitis bacteriana, detectada en el Centro de Pacientes Críticos, en la Clínica Las Condes de Santiago de Chile, presumible su infección fue por vía oral, lo que delataría una infección producto del consumo de alimentos contaminados, en este caso en particular quesos de elaboración casera. Otros dos casos son descritos por Aguilera y Mella (1997), quienes hacen mención de los factores de riesgo para contraer la enfermedad. Sin embargo, su vía de infección no está bien definida, la cual al parecer tiene su origen en infecciones nosocomiales.

Podemos ver que en la revisión de la literatura chilena de medicina humana de los últimos 22 años, figuran 6 publicaciones de infección por *Listeria monocytogenes*, 4 de las cuales corresponden a formas perinatales y solamente se encontraron 2 artículos sobre *Listeria monocytogenes* en adultos: un caso de meningoencefalitis sin trastornos de la inmunidad y otro que corresponde a una

romboencefalitis, que es un caso observado en Francia y publicado en la Revista Medica Chilena (Bravo y col., 1998).

En Chile, el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (1997), sólo ha contemplado el Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM) para leche cruda, que incluye coliformes en el caso de leche pasteurizada. La incidencia de listeria monocytogenes en los seres humanos es un problema poco conocido, por lo que resulta difícil estimar su magnitud. Sin embargo, se puede afirmar que la contaminación de alimentos con este microorganismo es una preocupación creciente tanto de las autoridades responsables de la salud humana y animal, como también de los exportadores nacionales de alimentos. Rubio y col.(1998) mencionaron que trabajos realizados en el país por Arrieta en 1989; y por Ferrer y col. en 1993, señalan que la bacteria ha sido aislada desde alimentos y agua en un 12 a 17% de las muestras analizadas, por otra parte, *Listeria monocytogenes* es monitoreada constantemente en alimentos destinados a exportación.

### **Ecología**

Diferentes investigadores han aislado *Listeria monocytogenes* del suelo (tierra de hojas), aguas servidas, abonos (estiércol), polvo, agua y silos (FDA, 1992). Se debe estar seguro de hacer el empaque del silo lo más apretado y estrecho posible para asegurar su adecuada fermentación, puesto que en aquellos realizados sin la debida compactación es más fácil la proliferación de esta bacteria (Sanaa y col. 1993).

El microorganismo se puede trasladar desde el tracto intestinal de los animales al tracto intestinal del hombre sin que cause enfermedad (FDA, 1992); de hecho ha sido encontrada en muchos animales domésticos y silvestres, incluyendo aves y peces. Los microorganismos pueden perdurar hasta tres

meses en las heces de las ovejas, y se ha comprobado que sobreviven 11 meses y medio en suelos húmedos, hasta 16 meses y medio en heces de bóvidos, 207 días sobre paja seca y más de dos años en suelos secos y heces (Blood y Radostits, 1992). Debido a que *Listeria monocytogenes* está ampliamente distribuida en el medio ambiente, es imposible prevenir que los animales tomen contacto con la bacteria. Sin embargo, granjeros, crianceros, procesadores de alimentos y manipuladores de alimentos pueden tomar todas las medidas para reducir la contaminación y conservarlos seguros de *L. monocytogenes* (FDA, 1992).

#### **Características morfológicas, bioquímicas y serológicas de la bacteria.**

El género *Listeria* consta de siete especies, las cuales son *L. monocytogenes*; *L. innocua*; *L. ivanovii*; *L. seeligeri*; *L. grayi*; *L. murralli*; *L. welshimeri* (Pitt y col., 1999), aunque el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática de Seelinger y Jones (1986), enumera 8 especies en el género *Listeria*: *L. monocytogenes*; *L. innocua*; *L. seeligeri*; *L. welshimeri*; *L. ivanovii*; *L. grayi*; *L. murralli*; y *L. denitrificans*. De estas, las especies *L. grayi* y *L. murralli* son consideradas aquí como subespecies de una especie simple, *L. grayi*. *L. denitrificans* está ahora en el genero *Jonesia* (Bacteriological Analytical Manual, 2001).

Dentro de estas siete especies, si bien tres de ellas pueden causar infección a los animales o al hombre (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) sólo *Listeria monocytogenes* es de importancia como patógeno de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Es un bacilo corto (0.5 µm de diámetro por 1 a 2 µm de largo), gram-positivo no esporulado, anaerobio facultativo, difterioide. Presenta motilidad, la cual es característicamente a tumbos al crecer a temperaturas de 20 a 25 °C (Pitt y col., 1999) . Puede crecer

en el laboratorio a un rango de temperatura que va entre 1°C y 45°C, creciendo óptimamente entre 3°C y 35°C pudiendo mejorar si se le mantiene bajo condiciones reducidas de oxígeno (Marth y Steele, 1998).

Bioquímicamente, todas las *Listerias* producen catalasa, fermentan glucosa a ácido sin gas, e hidrolizan esculina. *Listeria monocytogenes* típicas fermentan ramnosa, pero no xilosa, y son débilmente β-hemolíticos (Marth y Steele, 1998).

Dentro de la misma especie existen 13 serovariedades (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) (FDA, 2001), aunque se han descrito hasta 16 serovariedades, siendo más frecuentes las de tipo 1/2a, 1/2b y 4b aisladas de personas enfermas (Pitt y col., 1999).

Como característica particular, presenta una inusual resistencia a los ambientes extremos (resistiendo temperaturas de -0.4°C y 50°C) (Rubio y col, 1998), e incluso temperaturas de hasta -20°C durante dos años y es todavía viable después de congelación y descongelación reiteradas (Blood y Radostits, 1992). Puede crecer a pH de 4.3 hasta 10.0, también en presencia de cloruro de sodio al 10%, y sobrevivir en soluciones de salmuera refrigerada de cloruro de sodio al 25,5 % por 4 meses. Además, tiene la capacidad de poder resistir la pasteurización (microorganismo termodúrico) (Marth y Steele, 1998). En alimentos como camarones, se ha aislado luego de tratamientos térmicos de 100°C por 3 minutos cuando la contaminación fue importante. Además, como resiste la deshidratación, el polvo ambiental puede ser un vehículo importante en la contaminación de los productos en la línea de procesamiento industrial (Arrieta, 1989).

### ***Aislamiento y cultivo de Listeria monocytogenes.***

Se puede cultivar *Listeria* en caldos de crecimiento enriquecido tamponado, que contengan acriflavina, ácido nalidíxico y ciclohexamida como agentes restrictivos selectivos. Después de 24 a 48 horas de incubación a 30°C, el cultivo enriquecido es sembrado en dos diferentes placas de cultivo: uno es el medio Oxford (OXA) y el otro es el agar selectivo PALCAM para *Listeria*, el cual contiene polimixina B, acriflavina, y ceftacidima, o medio litio cloridefeniletanol-moxalactam (LPM), con o sin esculina, y citrato de amonio férrico. Después de 24 a 48 horas de incubación a 30-35°C, las colonias de *Listeria* en OXA, PALCAM y LPM son blancas con un halo negro, resultante de la hidrólisis de esculina, mientras las colonias que se desarrollaron en LPM sin esculina aparecen verde azulada bajo luz oblicua. El aislamiento presuntivo de *Listeria* está especificado y basado en una serie de pruebas bioquímicas que pueden tomar sobre 7 días en completarse (Marth y Steele, 1998).

La composición del Agar Oxford se basa en la formulación del Agar Columbia. Para impedir la flora acompañante indeseable, el medio de cultivo contiene cloruro de litio, acriflavina, sulfato de colistina, cefotetano, cicloheximida y fosfomicina como componentes inhibidores del crecimiento. *Listeria monocytogenes* disgrega la esculina presente en el medio de cultivo dando esculentina con formación de iones hierro (III), que producen compuestos complejos negros que luego tiñen de negro las colonias de *Listeria monocytogenes* (Merck, 1994).

Existen otros tipos de caldos de enriquecimiento como el *caldo de enriquecimiento para Listeria (base)*, su composición (g/litro) consiste en Triptosa, D(+)-glucosa, cloruro sódico, tiamina dicloruro, tripaflavin, y como aditivo contiene tiocianato potásico, que sirve para la represión de la flora Gram (-) acompañante. Este caldo va acompañado con la preparación posterior de un

agar selectivo para *Listeria* que se compone de los mismos componentes anteriores, a los que se les adiciona ácido nalidíxico y Agar-agar (Merck, 1994). El *caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria FRASER (base)* tiene un elevado contenido en sustancias nutritivas y junto a su capacidad tampón se crean condiciones óptimas para el crecimiento de *Listeria*. El crecimiento de gérmenes acompañantes es inhibido en gran medida por el cloruro de litio, el ácido nalidíxico y el clorhidrato de acriflavina. Mediante la adición de esculina y citrato de amonio y hierro (III) se hace posible la identificación de la  $\beta$ -D-glucosidasa de las *Listerias*. Por la acción de la  $\beta$ -D-glucosidasa se escinde el glucósido esculina en esculetina y glucosa. La esculetina forma entonces con los iones hierro (III) un complejo verde oliva a negro. La composición del caldo es proteosa peptona, peptona de caseína, extracto de levadura, extracto de carne, cloruro sódico, hidrógenofosfato disódico, dihidrogenofosfato potásico, esculina, cloruro de litio (Merck, 1994).

El *Caldo base para enriquecimiento de Listeria s. Lovett* se basa en la formulación de Lovett y col. (1987) Ha sido adoptado oficialmente por la FDA para el análisis de alimentos y recomendado para el enriquecimiento selectivo de *Listeria* en muestras de leche, por sus buenos rendimientos, con un solo paso de enriquecimiento, en la recuperación de bacterias estresadas. La fórmula del caldo consiste en triptona, extracto de levadura, peptona de soja, cloruro sódico, dextrosa, fosfato dipotásico. La muestra (25 g. o mL) se mezcla con 225 mL de caldo de enriquecimiento completo y se incuba a 30°C durante 7 días, con subcultivos a las 24-48 horas y 7 días de la siguiente forma: 0.5 mL de cultivo de enriquecimiento se inoculan en alguno de los medios de cultivo sólidos para el aislamiento de *Listeria* (Oxford agar base, PALCAM agar base con sus respectivos suplementos restrictivos); 0.5 mL del cultivo de enriquecimiento se alcalinizan mezclándolos con 4.5 mL. de solución al 0.5% de KOH, y

posteriormente se inoculan sobre los medios sólidos para el aislamiento de *Listeria* (Scharlau, 2002).

El propósito de este trabajo será informar sobre la presencia de *L. monocytogenes* en leche cruda obtenida de lecherías y estanques comunitarios de 9 sectores de la provincia de Cautín. Al respecto, en la ciudad de Temuco y alrededores como zonas rurales, se unen una serie de factores que son muy particulares dentro de esta población: un gran número de población flotante, un alto porcentaje de pobreza en sectores rurales, así como desmejoradas prácticas de higiene ambiental y de manipulación de alimentos por poca información educativa respecto de ello. Se genera así un sector de riesgo dentro de la población, más aún si se considera que determinada bacteria debiera estar presente<sup>1</sup>, como es el caso de *L. monocytogenes*.

Si a lo expuesto por el gráfico sumamos el hecho que en la legislación chilena no existe una normativa en lo que se refiere a la bacteria *Listeria*, hay entonces un riesgo para el consumidor de este producto alimenticio por ser este alimento un producto masivo.

### **Hipótesis:**

Encontrar presencia de *L. monocytogenes* en lecherías y tanques comunitarios de la provincia de Cautín, IX Región, en al menos un 3,8% de positividad informada en la literatura.

### **Objetivos Generales:**

- ?? Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda provenientes de lecherías y tanques comunitarios de la Provincia de Cautín.

**Objetivos específicos:**

- ?? Estandarizar la técnica microbiológica utilizada para detectar la presencia de *L. monocytogenes* en leche cruda.
- ?? Determinar los factores que predisponen la presencia de *L. monocytogenes* en leche proveniente de lecherías y tanques comunitarios de la Provincia de Cautín.

---

<sup>1</sup> Comunicación personal. Dr. Horacio Gil. M.V. Servicio Salud Araucanía Sur, Temuco.

## MATERIAL Y METODOS

### 1) Localización geográfica de las lecherías y tanques comunitarios.

La localización de las lecherías y tanques de frío comunitarios está en Anexo 1. Para una mejor comprensión se ordenó por fecha de muestreo, y se antepuso un N° al nombre del predio que será el número para designar el estanque y nombre del predio o lugar muestreado.

### 2) Toma de muestra y transporte

Las muestras (2 por estanque), fueron tomadas en forma directa de los tanques de refrigeración, y depositadas en envases estériles y guardadas en un contenedor con hielo a 4°C para mantener las muestras hasta su llegada al laboratorio. El tiempo máximo de transporte de las muestras fue de 12 hrs.

Este muestreo se realizó por espacio de 8 meses entre Octubre del 2002 y Junio del 2003, cada tanque fue muestreado en sólo una ocasión. El número de muestras a obtener se calculó por medio de la siguiente fórmula para variables de carácter cualitativa, y de distribución normal.

$$N = \frac{p*(1-p)*Z^2}{e^2} \quad N = \frac{0.038*(1-0.038)*(1.96)^2}{(0.05)^2} = 56 \text{ muestras.}$$

donde “p” es la prevalencia, es la que se espera encontrar. (3,8 % según Pitt y col, 1999); “Z” es el al intervalo de confianza para este trabajo, el cual será de un 95%; y finalmente “e” corresponde al margen de error, el cual es de un 5%. Para efectos de este trabajo, se recolectaron 66 muestras, 10 más que el mínimo exigido.

### **3) Completación del cuestionario**

Al tomar la muestra se completó un cuestionario para conocer diversos aspectos tales como antecedentes prediales, productivos y de manejo, con el objeto de determinar posteriormente si existía alguna relación entre la presencia de *L. monocytogenes* y estas características. Se tomaron los siguientes datos:

a) Antecedentes prediales y de manejo: Nombre del predio y del propietario; dirección.

b) Identificación de la lechería: Se consultó por N° de vacas en lactancia, último recuento de UFC, N° de unidades de ordeño, antigüedad del estanque, cada cuánto tiempo se recolecta la leche, rutina de ordeño usada, origen del agua usada en la lechería, rutina de lavado de la maquina de ordeño, frecuencia de lavado del estanque de frío y T° del agua de lavado, manejo de purines, destino del agua de lavado de la máquina de ordeño ya usada, nivel de escolaridad de los trabajadores. Para los estanques comunitarios (CAL), los valores de UFC corresponden al promedio de los valores de cada productor.

### **4) Preparación de las muestras de leche para análisis microbiológico de *L. monocytogenes*.**

De cada muestra se tomaron 25 mL y se agregaron a 225 mL del caldo de enriquecimiento. Las muestras se mantuvieron en incubación por espacio de 48 hrs. a 37°C (Barbosa y col. 1994). A las 4 hr. de iniciada la incubación se le agregó un medio selectivo para favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes*. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a extraer con un asa de cultivo una pequeña muestra del caldo que se sembró por método de estría en agar Oxford y agar Palcam, y éstos fueron incubados a 35°C por 48 hr. (FDA 2001). Junto con esto, se sembró aparte una cepa tipo *Listeria monocytogenes* como control (cepa ATCC 15313).

Pasadas las 48 hrs., si se observaban crecimiento de colonias sospechosas blancas con un halo negro, se sembraron en agar TSA y se les realizaba una tinción de Gram y catalasa. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas las cuales consistían en fermentación de azúcares que son: ramnosa, xilosa y manitol, junto con la realización de cultivos en agar sangre para evaluar la producción de  $\beta$ -hemólisis; y reacción de catalasa en peróxido de hidrógeno (Tabla 1).

**Tabla 1. Características bioquímicas diferenciales de especies de *Listeria*.**

<b>Especies</b>	<b><math>\beta</math>-hemólisis<sup>a</sup></b>	<b>Manitol</b>	<b>Ramnosa</b>	<b>Xilosa</b>	<b>Virulencia</b>
<b><i>L. monocytogenes</i></b>	+	-	+	-	+
<b><i>L. ivanovii</i></b>	+	-	-	+	+
<b><i>L. innocua</i></b>	-	-	V <sup>(b)</sup>	-	-
<b><i>L. welshimeri</i></b>	-	-	V <sup>(b)</sup>	+	-
<b><i>L. seeligeri</i></b>	+	-	-	+	-
<b><i>L. grayi</i><sup>(c)</sup></b>	-	+	V	-	-

FUENTE: Bacteriological Analytical Manual (BAM), Abril 2001.

<sup>a</sup> Usando sangre de cordero.

<sup>b</sup> V, variable.

<sup>c</sup> *L. grayi* incluye ahora la forma nitrato-reductora, ramnosa variable de especie *L. murrayi*.

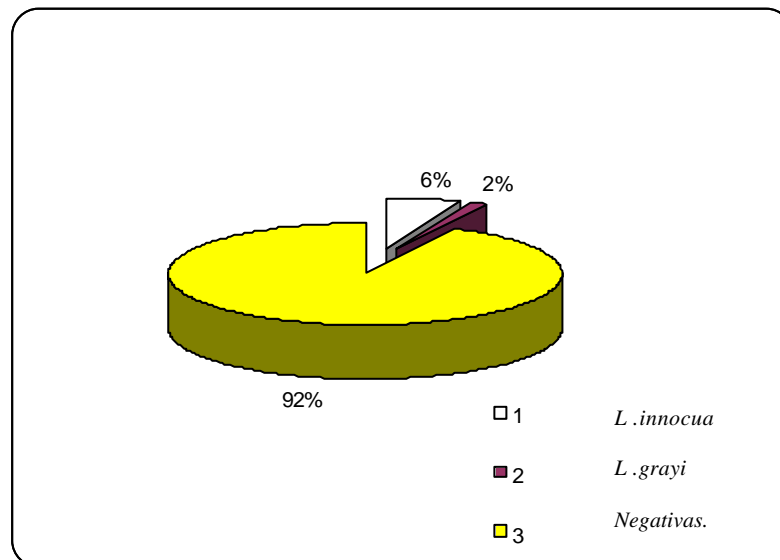
## RESULTADOS

Se analizó un total de 66 muestras provenientes de 33 estanques de las cuales 5 resultaron sospechosas de *L. monocytogenes* en agar OXFORD, donde se mostró el típico halo de ennegrecimiento del agar en la periferia de las colonias de color blanco, Gram (+) y catalasa (+); en agar PALCAM no hubo crecimiento. Se aplicaron pruebas bioquímicas para la identificación (Tabla 2):

**Tabla 2. Pruebas bioquímicas para identificación de *Listeria sp***

Especie (Nº del estanque donde se encontró)	$\beta$ -hemólisis	Manitol	Ramnosa	Xilosa	Catalasa
<i>Listeria innocua</i> (Nº 6)	-	-	+	-	+
<i>Listeria innocua</i> (Nº 7)	-	-	+	-	+
<i>Listeria grayi</i> (Nº 7)	-	+	+	-	+
<i>Listeria innocua</i> (Nº 31)	-	-	+	-	+
<i>Listeria innocua</i> (Nº 32)	-	-	+	-	+

**Gráfico 1. Porcentaje de muestras positivas a *Listeria sp*.**



Del total de las muestras; *Listeria innocua* correspondió a un 6.06%; y para *Listeria grayi* se registró un 1.51%, sin aislarse *Listeria monocytogenes*. Estas muestras provenían en su totalidad de los estanques (individuales) de lecherías que tenían entre 78 y 190 animales en lactancia, menos en el estanque N° 31, que tenía 43 animales. Para los estanques N° 6 y 7 las muestras se tomaron en primavera, mientras que para los estanques N° 31 y 32 se tomaron en otoño.

Para el caso de los estanques comunitarios, la mayor parte de los productores de leche transportaban su producto al tanque de frío inmediatamente de finalizada la ordeña, en tarros de aluminio. La distancia máxima que se recorría fue de entre 400 - 600 metros en algunos casos, pues la mayor parte se encontraba a distancias menores. La mayor parte de estos productores (aproximadamente 65%) realizaba la ordeña en forma manual por el reducido número de animales con que contaban, el resto lo hacía en forma mecanizada pero no contaban con estanques en su propiedad. La pregunta concerniente al N° de unidades de ordeña y manejo de purines no corresponde por ser solamente el tanque de frío y nada más (y por ser comunitario)

Las UFC para la gran mayoría de los tanques (individuales y comunitarios) tenían niveles altos, los cuales se hallaban entre las 2.000 y 3.500 UFC. (14 de los 33 estanques muestreados), habiendo muy pocos que presentaban un nivel bajo las 1.000 UFC (tal es el caso de los estanques N° 22, 27, 30 y 32.). Para el caso de los estanques N° 6, 7, 31 y 32 el recuento de UFC fue de 5.000, 4.000, 4.000 y 1.000 respectivamente. Los tanques con un número mayor a 10.000 UFC provenían mayormente de los estanques comunitarios.

Se observó que prácticamente la totalidad de los productores tenían un buen manejo en la rutina de ordeño, esto es el lavado de pezones antes de la ordeña y las manos del ordeñador, así como la aplicación de deeping al término de la

ordeña. Según la Tabla 3, se vé que prácticamente todos los productores individuales el aseo del estanque de frío se realizaba después del retiro de la leche por parte del camión recolector con caliente y detergente, se realizaba un enjuague, se le agregaba agua clorada y otro enjuague más con agua tibia, situación que se repite para los estanques comunitarios. El nivel educacional era mayormente Educación Media (69,6%), sólo algunos tenían cursos de capacitación a su haber. La limpieza de las máquinas de ordeño en el caso de productores propietarios era similar para todos pues la rutina de lavado incluía detergentes ácidos, y lavados con agua caliente y sumado a esto el estanque se incorporaba cloro en el lavado situación que también se repetía para los estanques comunitarios. En relación con el manejo de purines, la gran mayoría respondió que no lo hacía, a excepción de los propietarios de tanques N° 19, 29, 31, 32 y 33; que sí lo realizaban.

## DISCUSIÓN

En este estudio, los resultados obtenidos han arrojado la presencia de bacterias no patógenas del género *Listeria sp.*, pero no de *L. monocytogenes*. Sólo se halló en bajos porcentajes especies no patogénicas como son *L. innocua* y *L. grayi* (6% y 2%), porcentajes cercanos a los informados por Rodríguez y col. (1994) de 6.16% para *L. innocua*, y 0.77% para otras especies de *Listeria* (en donde se haya *L. grayi*). Como breve mención, esta última especie es raramente aislada (Rocourt y col. 1992). Esto se contrapone a los resultados obtenidos por Marín (1999), quien realizó un estudio en la VIII, IX Y X Regiones, obteniendo para la IX Región un 45 % de positividad a *L. monocytogenes*.

La ausencia de *L. monocytogenes* en las muestras podría explicarse por la época en que se realizaron los muestreos entre otros. En este trabajo, aproximadamente el 60,6% del total de muestras se tomaron en la temporada de primavera-verano y el restante 39,4% se realizó en otoño, en contraposición al trabajo realizado por Marín (1999) hecho en invierno. El ideal habría sido el muestrear también todo en invierno pero por problemas de logística no se pudo concretar. Lovett y col. (1987), señalan que existiría una variación estacional en la incidencia de *L. monocytogenes*, ya que ellos detectaron una menor positividad en la época de verano en 4 estados de U.S.A, lo que también afectaría a otras especies de *Listeria* que no son patogénicas (Sanaa y col.1993) y la concentración en leche cruda frecuentemente es menor a 1 bacteria por mL (Sanaa y col. 1993).

La presencia de *L. monocytogenes* también se ve afectada por los métodos empleados de aislamiento, tamaño y número de muestras (Rodríguez y col. 1994). El número de *L. monocytogenes* es usualmente bajo, especialmente en productos lácteos, y ensayos de su aislamiento en forma directa a agar sólido

usualmente fallan, en muchos casos por el bajo número de bacterias junto con el alto número de microflora competitiva presente hace más difícil su aislamiento (Vlaemynck y col. 1996) por ser ésta una bacteria que se inhibe frente a la competencia contra otros microorganismos. Se hace alcance a esto último pues en leche también puede haber presencia de bacterias del tipo *Enterococcus sp.* y *Streptococcus sp.* como parte de la flora normal (Marín, 1999). Por otro lado la leche también posee sustancias naturales antimicrobianas como la lactoperoxidasa, la cual posee efectos inhibitorios sobre *L. monocytogenes*. En leche fresca se reportó una ligera inhibición de *L. monocytogenes* a 25°C, y a 37°C se acentuó aún más (Pitt y col. 1999). Como breve mención a esto último, para algunos estanques la leche se había colocado recientemente lo que podría explicar al menos la ausencia de *L. monocytogenes*. Los efectos de la lactoperoxidasa fueron también informados por Gaya y col. (1991) pero a bajas temperaturas (4°C y 8°C) aún sigue teniendo una buena estabilidad y efectos bactericidas.

Otra razón de no haber aislado *L. monocytogenes* puede ser la temperatura de incubación de los caldos de cultivo. La etapa retardada es conocida como el tiempo que requiere el microorganismo para adaptar sus componentes celulares a un nuevo ambiente (Begot y col. 1997) que incluye a factores como la temperatura. Para el trabajo aquí realizado, los resultados no concuerdan con los obtenidos por Barbosa y col. (1994) en donde el crecimiento óptimo de *L. monocytogenes* fluctúa entre los 30°C y 37°C. En el trabajo hecho por Duh y col. en 1993, en caldo cerebro-corazón y a temperatura igual o inferior a 42°C, se observó un crecimiento más rápido de *Listeria innocua* que de *Listeria monocytogenes*, pero a temperatura de 7°C y sobre 42°C hubo mayor crecimiento retardado de *Listeria monocytogenes* que de *Listeria innocua*, por lo que se supone entonces que la técnica microbiológica no fue la más acertada.

Se esperaba que hubiera aislamiento de la en cuestión en los estanques comunitarios debido a las condiciones del manejo (transporte de la leche al estanque por cierta distancia a recorrer y al recuento de UFC).

Se ha confirmado la relación existente entre la presencia de *Listeria monocytogenes* y la inadecuada frecuencia de limpieza del área de ordeño y su respectiva maquinaria (Sanaa y col. 1993). A esto se suma que mientras más complejos son los equipos mecánicos hacen más factible la sobrevivencia de la bacteria por ser más difíciles de asear y desinfectar, como es el caso en las plantas que reciben leche (Charlton y col. 1990), y las máquinas de ordeño de las lecherías son mucho más fáciles de limpiar por mecanismos convencionales, por lo tanto se confirma lo dicho anteriormente.

En lecherías, el riesgo de contaminación de leche cruda por *L. monocytogenes* estaba significativamente asociado con el tamaño del rebaño, la calidad de la leche y el tipo de albergue que tienen los animales (Sanaa y col. 1993). La ausencia de *L. monocytogenes* pudo deberse quizás al reducido número de animales que cada propietario disponía, pues habían algunos que disponían de 6 y hasta 3 animales en el caso de los estanques comunitarios.

Hay que recordar que la leche puede ser contaminada con heces de animales sanos, lo que está relacionado con alimentación del ganado con ensilaje. De hecho, un ensilaje que no desarrolle un pH de acidez adecuado (alrededor de 4.0) puede permitir el crecimiento de *Listeria sp.* el cual puede alcanzar concentraciones infectivas (Sanaa y col. 1993), pero esta pregunta no fue incluida en el cuestionario. Si bien las muestras positivas a *L. innocua* provenían de predios con estanques individuales y con gran número de animales en el rebaño (esto último en los predios con los tanques N° 6, 7 y 32), su ausencia pudo deberse a la estacionalidad y temperatura de incubación de las muestras mencionadas anteriormente.

En lo referente a la presencia de *L. innocua*, esta bacteria ocupa los mismos nichos ecológicos que *L. monocytogenes* (incluyendo alimentos, vegetación y silos). Incluso no fue reconocida como especie distinta de *L. monocytogenes* hasta 1981 (Lan y col. 2000). Se ha aceptado ampliamente que en el aislamiento de *L. innocua* ésta tiene ventaja selectiva sobre *L. monocytogenes* durante los cultivos de enriquecimiento, el cual es atribuido a rápidas tasas de crecimiento. De hecho, se ha reportado una amplia inhibición entre *Listeria sp.*, ya que de 300 *Listeria sp.* aisladas, un 75% producen al menos un tipo de actividad inhibitoria como la producción de péptido antibióticos en la fase de crecimiento exponencial, o la producción de fagos como es el caso de *L. innocua* (Cornu y col., 2002), lo que podría explicar la ausencia de *L. monocytogenes* en este trabajo.

En el plano de la salud pública, si bien *L. innocua* no es patógena para humanos junto con *L. grayi* (Seelinger y Jones, 1986), el sobrecrecimiento de *L. innocua* puede enmascarar a *L. monocytogenes* durante el procedimiento de enriquecimiento, lo que puede provocar un alto riesgo de presencia de falsos negativos (Cornu y col. 2002). Hay estudios que dan cuenta de características de membrana similares a *L. monocytogenes* las cuales tienen carácter antigénico; esto se vio en cepas de *L. innocua* de serovariedad F8596, F7833 y F8735 esto por transferencia desde *L. monocytogenes* de serovariedad 4, particularmente 4b. Esto no representaría ningún problema mientras no haya transferencia de factores esenciales de virulencia tales como hemolisinas (listeriolisinas), y en esto no hay garantías de que a futuro no ocurra transferencias de genes que codifiquen esta característica por el método de transducción por ejemplo (Lan y col. 2000).

Aunque no se halló presencia de *L. monocytogenes* en leche cruda, no se puede descartar su presencia por ser ésta una bacteria ubicua. De hecho; el

número de muestras analizadas estuvo de acuerdo con la prevalencia informada (de un 3,8 %). Sin embargo, en Chile este es un problema no aclarado y que evidentemente requiere de estudios más amplios y con técnicas de aislamiento más sensibles como las moleculares, pues sumado a esto se han descrito recientemente cepas de *L. monocytogenes* que son no hemolíticas y distinguir entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* en base a la actividad hemolítica es un riesgo (Perrin y col. 2003). *L. innocua* es una bacteria no patógena (de hecho sólo se ha registrado un único caso fatal debido a una bacteriemia en un paciente de tercera edad lo cual fue sorprendente pues es el primer caso documentado), pero podría adquirir factores de virulencia a futuro.

## CONCLUSIONES

- ?? *L. monocytogenes* no se encuentra en los porcentajes citados en la literatura.
- ?? No se aisló *L. monocytogenes* probablemente a debido a la competencia ejercida por *L. innocua*, y a la dilución de las bacterias en la leche.
- ?? No se puede descartar la presencia de *L. monocytogenes* debido a las altas UFC informadas por los productores.
- ?? Es necesario afinar con mayor precisión la metodología para el eficiente aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de muestras de leche de estanques de frío.
- ?? El problema de esta bacteria no es bien conocido en Chile y que merece una mayor atención.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) **Aguilera, J., Mella, S. 1997.** Casos Clínicos: Meningitis por *Listeria monocytogenes*: Importancia de los Factores de Riesgo. Rev. Med. Inter. Concepción Chile. Vol. 1 N° 3.
- 2) **Arrieta, A. 1989.** *Listeria monocytogenes*, contaminante de alimentos de importancia emergente. Revista Alimentos 14(3): 85-88
- 3) **Barbosa, W., Cabedo, L., Wederquist, H.J., Sofos, J.N., Schmidt, G.R. 1994.** Growth Variation Among Species and Strains of *Listeria* in Culture broth. Journal of Food Protection 57 (9):765-775.
- 4) **Begot, C., Lebert, I., Lebert, A. 1997.** Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiology, 14:403-412.
- 5) **Beltrán, C., Gil, D., Castillo, A., Valdes, S., 1991.** Meningoencefalitis bacterémica por *Listeria monocytogenes* en un adulto inmunocompetente. Rev. Méd. Chile 1991; 119: 436-439.
- 6) **Blood, D.C.; Radostits, O.M..** Medicina Veterinaria. Séptima Edición, volumen I , Nueva Editorial Interamericana, S.A. 1992.
- 7) **Bravo M., Ferrer S., Trujillo S., 1998.** Romboencefalitis por *Listeria monocytogenes*. Caso clínico. Rev Med Chile 126: 828-832.
- 8) **Cornu, M.; Kalmokoff, M.; Flandrois, Jean-Pierre. 2002.** Modeling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. International Journal of Food Microbiology, 73: 261-274

- 9) **Charlton, B.R.; Kinde, H.; Jensen, L.H. 1990.** Environmental Survey for *Listeria* Species in California Milk Processing Plants. *Journal of Food Protection* 53 (3): 198-201.
- 10) **Duh, Y.; Schaffner, D.W. 1993.** Modeling the Effect of Temperature on the Growth Rate and Lag Time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 56 (3): 205-210.
- 11) **Food and Drugs Administration (FDA), Center of Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN) 2001 Bacteriological Analytical Manual (BAM) on line.** <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
- 12) **FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition USDA/Food Safety and Inspection Service Centers for Disease Control and Prevention, 2001. Draft assessment of relative risk to public Health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready to eat foods.** <http://www.foodsafety.gob/~dms/imsrisk.html>
- 13) **Food Safety and Inspection Service (FSIS) . United States Department of Agriculture, Washington D.C. 2000 FSIS Strategies for Addressing *Listeria monocytogenes*.** <http://www.fsis.usda.gov>
- 14) **Gaya, P.; Medina, M.; Núñez, M. 1991.** Effect of the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* Behaviour in Raw Milk at Refrigeration Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (11):3355-3360.
- 15) **Gesche, E. 1989.** *Listeria monocytogenes* como causal de enfermedad transmitida por alimentos. *Fleischwirtsch. Español* (2): 41-448)
- 16) **Johnson J.; Doyle M.; Cassens R., 1990.** *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in Meat and Meat Product A Review. *Journal of Food Protection* 35 (1): 81-91.

- 17) **Lan, Z.; Fiedler, F.; Kathariou, S. 2000.** A Sheep in Wolf's Clothing: *Listeria innocua* Strains with Teichoic acid-Associated Surface Antigens and Genes Characteristics of *Listeria monocytogenes* Serogroup 4. Journal of Bacteriology, 182 (11):6161-6138.
- 18) **Lovett J.; Francis D.W.; Hunt J.M., 1987.** *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence, and Pathogenicity. Journal of Food Protection 50 (3):188-192
- 19) **Manual de Medios de Cultivo Merck, 1994.**
- 20) **Marín C.; Marcelo J. 1999.** Detección de *Listeria monocytogenes* en leche cruda. Tesis para optar al título de Tecnología Médica. 63 pp.
- 21) **Marth, E.; Steele J. 1998.** Applied Dairy Microbiology. Editorial Marcel Dekker.
- 22) **Nuevo Reglamento Sanitario de los Alimentos, Ediciones Publiley 1997.**
- 23) **Perrin, M.; Bemer, M.; Delamare, C., 2003.** Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. Journal of Clinical Microbiology, 41 (11):5308-5309.
- 24) **Pitt, W.; Harden, T.; Hull, R. 1999.** *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. The Australian Journal of Dairy Technology 54: 49-65.
- 25) **Regents Scharlau. 2002.**  
<http://www.scharlau.com/medios/english/default.htm>
- 26) **Rodríguez, J.L.; Gaya, P.; Medina, M.; Núñez, M. 1994.** Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in Ewes' Raw Milk. Journal of Food Protection 57 (7): 571-575
- 27) **Rocourt, J.; Boerlin, P.; Grimont, F.; Jacquet, C.; Pifferetti, Jean-Claude 1992.** Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a Single

- Species, *Listeria grayi*, with a Revised Description of *Listeria grayi*.  
International Journal of Systematic Bacteriology 42 (1):171-174
- 28) **Rubio T.; Sánchez M L.; Espinoza J. 1998.** Radiosensibilidad de *Listeria monocytogenes* en cultivos puros y langostinos congelados contaminados Nucleotécnica (32): 59-64.
- 29) **Sanaa, M.; Poutrel, B.; Menard, J. L.; Serieys, F. 1993.** Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy Farms. Journal of Dairy Science 76 (10): 2891-2898.
- 30) **Seelinger, H.P.R., and D. Jones. 1986.** Listeria, pp. 1235-1245. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volumen 2, 9ª Edition. P.H.A. Sneath, NS Mair, M.E Sharpe, and J.G. Holt (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore.
- 31) **Schlech III, Walter F.,2000.** Foodborne Listeriosis. Clinical infections Diseases, (31): 770-775.
- 32) **Sfeir J, Bloomfield J, Aspillaga C, Ferreiro M. 1990.** Early onset neonatal septicemia caused by *Listeria monocytogenes*. Revista Chilena de Pediatría. 1990 Nov-Dec;61(6):330-3.
- 33) **U.S Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service.**
- 34) U.S Health and Human Services/Food and Drug Administration(FDA), 1992. Preventing Foodborne Listeriosis.  
<http://www.vf.cfsan.fda.gov/~mow/FSISLIST.html>.
- 35) **Vlaemynck, G.M.; Moermans, R. 1996.** Comparison of EB and Fraser Enrichment Broths for the Detection of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in Raw-Milk Dairy Products and Environmental Samples. Journal of Food Protection 59 (11): 1172-1175

# **ANEXO**

**Tabla 1. Nombres de los predios y N° de los estanques, fecha de muestreo, localización geográfica, sector y tipo de estanque analizados.**

Nombre	Fecha de muestreo	Sector	Tipo de estanque
1.- Arquenco	Octubre 2002	Gral. López-Vilcún	Individual
2.- Calatayud	Octubre	Quillem	Individual
3.- Sn. Bernabé	Octubre	Quillem	Individual
4.- Manzún (Vieja)	Noviembre 2002	Gral. López- Vilcún	Individual
5.- Manzún (Nueva)	Noviembre	Gral. López-Vilcún	Individual
6.-Sta. Teresa (Galpón)	Noviembre	Caivico-Huichahue	Individual
7.-Sta.Teresa (Araneda)	Noviembre	Caivico-Huichahue	Individual
8.- Sta. Selma	Enero 2003	Villarrica-Loncoche	Individual
9.- Catrico	Enero	Catrico-Villarrica	Individual
10.-CAL Mune El Raulí	Enero	Mune Alto-Pitrufoquén	Individual
11.-CAL Mune (R.B)	Enero	Mune Alto-Pitrufoquén	Individual
12.-CAL Mune (C.C)	Enero	Mune Alto-Pitrufoquén	Individual
13.-CAL Mune	Enero	Mune Alto-Pitrufoquén	Comunitario
14.-CAL Quitratúe	Marzo 2003	Quitratúe- Gorbea	Comunitario
15.-CAL Quitratúe	Marzo	Quitratúe-Gorbea	Comunitario
16.-CAL Quitratúe	Marzo	Quitratúe-Gorbea	Comunitario
17.-CAL Quitratúe	Marzo	Quitratúe-Gorbea	Comunitario
18.-CAL Quitratúe	Marzo	Quitratúe-Gorbea	Individual
19.-CAL Quitratúe (C.M)	Marzo	Quitratúe-Gorbea	Individual
20.-CAL Quitratúe (J.K)	Marzo	Quitratúe-Gorbea	Individual
21.-La Hijuela	Abril 2003	Gral. López-Vilcún	Individual
22.-El Carmen	Mayo 2003	Mune Alto-Pitrufoquén	Individual
23.-CAL Mune (E.G)	Mayo	Mune Alto-Pitrufoquén	Individual
24.-CAL Mune	Mayo	Mune Alto-Pitrufoquén	Comunitario
25.-CAL Mune	Mayo	Mune Alto-Pitrufoquén	Comunitario
26.-CAL Mune	Mayo	Mune Alto-Pitrufoquén	Comunitario
27.-CAL Mune Sta.Rosa	Mayo	Mune Alto-Pitrufoquén	Individual
28.-CAL Mune	Mayo	Mune Alto-Pitrufoquén	Comunitario
29.-El Alamo	Mayo	Faja 10.000	Individual
30.-La Sombra	Mayo	Faja 20.000,Km. 6	Individual
31.-Miramar	Mayo	Niágara- Km.13	Individual
32.-Sta. Gloria	Junio 2003	Faja 8.000-Las Hortensias	Individual
33.-El Renoval	Junio	Km. 13,camino a Niágara	Individual

**CAL = Centro de Acopio Lechero**

**Tabla 4. Aspectos y resultados obtenidos del cuestionario.**

N° del estanque y nombre del predio	N° de vacas en lactancia	N° de unidades de ordeño	UFC	Antigüedad del estanque	Tipo de estanque	Recolección de leche	Origen del agua	Lavado del estanque	Destino del agua de lavado	Manejo de purines	Escolaridad de los trabajadores
1.-Arquenco	183	8	3.500	No sabe	Individual	Día por medio	Pozo	C/2 días	Canal	No	E. Media, cursos aparte
2.-Calatayud	360	20	2.000	10 años	Individual	Diariamente	Pozo	Al retirar leche	A potreros por canal	No	E. Media
3.-Sn. Bernabé	60	8	3.000	No sabe	Individual	Cada 2 días	Canal	Al retirar leche	Canal a potreros	No	E. Básica
4.-Manzún (Vieja)	160	10	3.000	8 años	Individual	Diariamente	Pozo	Diariamente	Canal	No	E. Media
5.-Manzún (Nueva)	180	10	2.500	No sabe	Individual	Diariamente	Pozo	Diariamente	Canal	No	E. Media
6.-Sta. Teresa (Galpón)	101	10	5.000	+ de 4 años	Individual	Cada 2 días	Pozo	Al retirar leche	Desagüe, canal	No	E. Media, cursos varios
7.-Sta. Teresa (Araneda)	78	8	4.000	No sabe	Individual	Diariamente	Pozo	Al retirar leche	Canal	No	E. Básica
8.-Sta Selma	210	8	3.500	No sabe	Individual	Diariamente	Pozo	Al retirar leche	Desagüe o potrero	No	E. Básica, cursos
9.-Caticro	182	10	2.000	10 años	Individual	Diariamente	Pozo	Al retirar leche	Canales cercanos	No	E. Media (2° medio)
10.-CAL Mune El Raulí	50	3	2.000	3 años	Individual	Diariamente	Pozo	Al retirar leche	desagüe	No	E. Básica
11.-CAL Mune (R.B)	25	2	9.487	No sabe	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	canal	No	E. Media
12.-CAL Mune (C.C)	20	2	11.500	3 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	desagüe	No	E. Media (1° medio)
13.-CAL Mune	49	No corresp.	4.833	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
14.-CAL Quitratúe	14	No corresp.	137600	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
15.-CAL Quitratúe	14	No corresp.	26.000	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
16.-CAL Quitratúe	29	No corresp.	20.650	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Básica
17.-CAL Quitratúe	No sabe	No corresp.	25.860	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
18.-CAL Quitratúe	No sabe	3	46.121	No sabe	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No	E. Media
19.-CAL Quitratúe (C.M)	10	2	7.000	15 años	Individual	Día por medio	Vertiente	Al retirar leche	Pozo	Sí	E. Media
20.- CAL Quitratúe (J.K)	30	2	3.000	No sabe	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No	E. Media
21.-La Hijuela	150	8	2.500	No sabe	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No	E. Básica, cursos aparte
22.-El Carmen	11	5	112	2 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Desagüe	No	E. Básica
23.-CAL Mune (E.G)	30	2	2.780	3 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No	E. Media
24.- CAL Mune	17	No corresp	3.000	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
25.- CAL Mune	41	No corresp	5.500	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
26.- CAL Mune	52	No corresp	3.000	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
27.- CAL Mune (L.F)	25	2	200	1 año	individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No	E. Media (1° medio)
28.- CAL Mune	No sabe	No corresp	8.000	3 años	Comunitario	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	No corresp.	E. Media
29.- El Alamo	18	4	104.000	2 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Pozo purinero	Sí	E. Básica
30.- La Sombra	11	3	350	1 1/2 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Pozo absorbente	No	E. Media
31.- Miramar	43	4	4.000	15 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Pozo purinero	Sí	E. Media
32.- Sta. Gloria	190	2	1.000	15 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal de desagüe	Sí	E. Básica (6°)
33.- El Renoval	28	3	20.000	10 años	Individual	Día por medio	Pozo	Al retirar leche	Canal	Sí	Educación media

**Nota:** Los valores de UFC para los estanques comunitarios es un valor promedio.