

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

ESCUELA DE POSTGRADO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Listeria monocytogenes en repollo y lechuga como
vehículos de transmisión de listeriosis humana. Mercados
La Hermelinda, Central y Palermo de Trujillo, Perú. 2006
– 2007

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AUTOR : MsC. ENRIQUE AURELIO MARTIN ALVA

ASESOR: Dr. MILCIADES CHAVEZ CASTILLO

TRUJILLO – PERÚ

2007

DEDICATORIAS

A Dios, mi poder superior
como yo lo concibo
pues me dio la posibilidad
de continuar la búsqueda
de una ruta espiritual

A mis padres Alfredo y Elodia
pues con su inmenso amor
me dieron la posibilidad
de ser mi propio dueño

A Eloy y Jenny
por enseñarme a luchar
haciendo de sus vidas
un ejemplo de amor y comprensión

A mi esposa Martha y mi hijo Enrique
pues me dieron la paz
basada en la comprensión, amor y tolerancia
que me permite ser feliz día a día

AGRADECIMIENTOS

Eterno agradecimiento al **Dr. Milciades Chavez Castillo**, por su afecto, aliento y sabiduría en el desarrollo de la presente tesis.

Al **Ms. C Alfredo Martin Alva** , por haber impregnado en mi el rigor del científico como modelo de vida y al **Proyect New Hope International**, en las personas de **Ron Birtcher y su esposa Joane** , quienes abrieron las puertas de la ciencia para encontrar a dios ; y muy en especial a mi fraterno y leal amigo el **Lic. Néstor Silva Jaramillo** quienes con su inmenso amor y ayuda oportuna, permitieron el logro de esta meta académica

Al **Dr. Augusto Aldave Pajares** y a la **Dra. Helga Majo Marrufo** por su generosa comprensión y apoyo, permitiendo la culminación de esta ruta académica.

Al **Dr. Evaristo E. Mejia Aroca** y al **Rvdo. Marco Antonio Vela Carrión**, por su constante aliento académico y espiritual

PRESENTACION

Señores miembros del jurado:

En cumplimiento con las disposiciones vigentes, dispongo a vuestra consideración y criterio el presente informe de Tesis Doctoral titulado: *Listeria monocytogenes* en repollo y lechuga como vehículos de transmisión de listeriosis humana. Mercados La Hermelinda, Central y Palermo de la ciudad de Trujillo, Perú. 2006 – 2007, con la finalidad de Optar el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

Esperando que vuestro criterio sea de comprensión por los errores u omisiones que pudieran haberse cometido durante la elaboración de la presente, me someto a vuestro dictamen

Trujillo, Diciembre del 2007

ENRIQUE AURELIO MARTIN ALVA
Maestro en Ciencias
Mención Microbiología Clínica

MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR

Dra. Edita Araujo Castillo
PRESIDENTE

Dr. José Mostacero León
SECRETARIO

Dr. Milciades Chavez Castillo
MIEMBRO

INDICE

	Pág.
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
PRESENTACION	iii
MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR	iv
INDICE	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIAL Y METODOS	10
2.1. Material de Estudio	10
2.2. Métodos y Técnicas	10
2.2.1. Diseño de Investigación	10
2.2.2. Diseño de Muestreo	10
2.2.3. Tamaño de Muestra	10
2.2.4. Análisis Estadístico	11
2.2.5. Procedimiento	12
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSION	19
V. CONCLUSIONES	22
VI. PROPUESTAS	23
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24
VIII. ANEXOS	28

RESUMEN

Listeria monocytogenes es uno de los patógenos más importantes de origen alimentario; siendo los vegetales la vía más común en la transmisión de esta bacteria, desde el medio ambiente a los humanos. Las hortalizas como lechuga y repollo al ser contaminadas por una inadecuada manipulación actuarían como vehículos de transmisión de este patógeno, por lo que el propósito de la presente investigación fue determinar la frecuencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* en repollo y lechuga que se expende en los mercados Hermelinda, Central y Palermo de la ciudad de Trujillo. Para tal fin se aplicó un diseño de una sola casilla, con estudio observacional y transversal, y un diseño de muestreo estratificado, aleatorio y polietápico. Se calculó el tamaño de muestra ($n = 54$) mediante la fórmula de proporciones para población finita y varianza desconocida, procediéndose luego a un reparto proporcional de la muestra, entre los tres mercados estudiados. Todos los cultivos aislados fueron identificados mediante las pruebas establecidas en el Bergey's Manual of Determination Bacteriology y además por el Sistema Automatizado Micro Scan Walk Away y mediante Caracterización Molecular. Las diferencias de frecuencias se probó mediante el Test de Proporciones, con $\alpha = 0.05$. Los resultados confirman la presencia de la bacteria en estas verduras, y de las 54 muestras, 12 son positivas (22.22 %). En la presente investigación se concluye que: *Listeria monocytogenes* esta presente en repollo y lechuga procedentes de los mercados Hermelinda, Palermo y Central de la ciudad de Trujillo. La frecuencia relativa expresada en porcentaje para lechuga es la misma en los tres mercados (16.67 %) y la frecuencia relativa es mayor en el mercado Palermo (8.33%) que en el mercado la Hermelinda (5.56 %). La frecuencia de *Listeria monocytogenes* es mayor en lechuga que en repollo en los tres mercados estudiados. Estadísticamente, con un nivel de confianza del 95, se prueba que las frecuencias relativas de la presencia de *Listeria monocytogenes*, en los tres mercados es homogénea.

Palabras Claves: *Listeria monocytogenes*, Repollo y Lechuga, Transmisión.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is widely distributed in nature, and is one of the most important pathogens of feeding source. The most common transition of this bacteria from the environment to humans; including among others, raw vegetables, like lettuce and cabbage; presuming that the contamination of these is due to the miss-manipulation and control of the same; this is the reason for which it is expected that when such products arrive to the consumer, they have a high frequency of this bacteria; and, consequently, become a means of transportation of the pathogen, for which the following problem is stated: what is the frequency of isolation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and lettuce that are distributed in the markets “La Hermelinda”, “Central” and “Palermo” in Trujillo City as means of transportation of the human listeriosis?. Holding the hypothesis: “the frequency of isolation of this bacteria in such vegetables that are distributed in the markets of Trujillo, is higher than zero”. And the objectives: determine the presence of this bacteria in the vegetables that are the object of study; estimate the frequency of isolation on the evaluated vegetables; and determine the existence of differences on the frequency of isolation of the bacteria, between the cabbage and the lettuce among the markets that are object of study. For such purpose, a close investigation has been applied with observational and transversal study; and a design of stratified, aleatory and multi-staged sample design. The size of the sample ($n = 54$) was determined with the formula of proportions for finite population and unknown variance; and after that, proceeding with a proportional delivery of the sample among the three markets; being half of it cabbage and the other, lettuce. All the isolated crops were identified by the Automated System Micro Scan Walk Away and by the Molecular Characterization. The difference of frequencies was tested by the Test of Proportions, with $\alpha = 0.05$. The results confirm the presence of bacteria in these vegetables and from the 54 samples, 12 are positive (22.22%). The presence of bacteria in lettuce for each market is 16.67%; and statistics show that presence of the bacteria in the cabbage is the same in the three markets, but less than in lettuce. The presence of the bacteria implies that it is present in the rest of the markets of the city and possibly in other products as well. Besides its presence is highly probable in the salads prepared with other vegetables; for which it is suggested to implement a regular screening of this enteropathogen in our public health system.

Key words : *Listeria monocytogenes* , Cabbage and Lettuce, Transmission

I. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen diversas especies del género **Listeria**, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seelegeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*; *L. grayi* y *L. murrayi*. De ellas, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* están asociadas a enfermedades humanas; siendo *L. monocytogenes* la especie de mayor importancia clínica, por su alta frecuencia en los laboratorios clínicos (Koneman y col., 1997: 462 – 465 p, Seeliger y col., 2005: 1235-1245).

Listeria monocytogenes bacilo corto, gram positivo, intracelular, esta ampliamente distribuido en la naturaleza; se encuentra desde la flora bacteriana normal de hurones, chinchillas, rumiantes y humanos hasta en las aguas residuales, fertilizantes y vegetales en descomposición (Axelson y col., 1998: 134 p, Forbes y col 2002.,: 73 p, Espinoza y col., 2003:71-75 p)

Ha sido aislada de más de 50 especies de animales de sangre caliente (endotérmicos) y fría (ectotérmicos). También de la leche y derivados (pasteurizados y no pasteurizados); así como de diversas plantas, incluyendo verduras como repollo y coles (Espinoza y col., 2003:71-75 p).

Por otro lado, aún no se conoce si *L. Monocytogenes*, surge del suelo o se origina en los animales que excretan las bacterias en sus heces. A pesar de ello, en la actualidad

se considera que el hábitat primario de esta bacteria es el suelo y saprofito de los vegetales en descomposición, y de, contamina frecuentemente los alimentos durante su producción o procesamiento (Schwartz y col., 1989: 159 p, Swaminathan y col., 1995:341 -348 p).

La infección principalmente es una zoonosis, pero la mayoría de los casos provienen de áreas urbanas sin antecedentes de contacto con animales. Los datos epidemiológicos implican a los alimentos como el vehículo más común para la transmisión de la listeriosis humana siendo el tracto gastrointestinal la vía de acceso mas importante (Forbes y col 2002., 73 p, 8).Sin embargo, también se conoce que, el hígado es el primer órgano blanco donde se multiplica activamente antes que la infección sea controlada por la inmunidad medida por células (Amstrong ,1995: 87-89 p).

L. monocytogenes es un parásito intracelular facultativo, puede sobrevivir en macrófagos e invadir células no fagocíticas como las células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales. La capacidad del microorganismo para penetrar en el citoplasma de la célula, proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patogénico (Joklik ,1992: 59 p).

También se conoce que su unión a la célula huésped se produce por una proteína (integrina), luego es fagocitada por la célula huésped. En el fagolisosoma es sometida a un ambiente hostil con pH y ferritina bajos, activando una exotoxina (listeriolisina O)

que es capaz de lisar la membrana del fagolisosoma en 30 minutos y escapar al citoplasma (Forbes y col 2002.,: 73 p, Vasquez y col.,2001: 584-640).

La listeriolisina O, exotoxina hemolítica y citolítica, es un factor crítico de virulencia de *L. monocytogenes* . La toxina se une al colesterol e interrumpe las membranas y talvez es el factor que conduce a una interrupción de las membranas fagolisosómicas y a un crecimiento sin restricciones de *Listeria* dentro del citoplasma del fagocito (Forbes y col 2002.,: 73 p, Vasquez y col.,2001: 584-640).

Luego *Listeria* se disemina célula a célula sin ponerse en contacto con el medio extracelular, lo que explica la necesidad de una inmunidad mediada por células. Puesto que la bacteria nunca es extracelular los anticuerpos humorales del huésped no serían efectivos (Amstrong ,1995: 87-89 p, Joklik ,1992: 59 p, Vasquez y col., 2001: 584-640).

Igualmente el período de incubación de la listeriosis es en promedio de 3 a 4 semanas, con extremos de 3 a 90 días. El riesgo de listeriosis está marcadamente elevado en las mujeres embarazadas. Los tumores malignos, la administración de corticoides, y la infección por VIH en etapa SIDA son los cuadros inmunosupresores de base más frecuentes asociados con listeriosis de pacientes no embarazadas.

Por tanto en pacientes con listeriosis y tumor maligno de base, parece ser más frecuente varias formas de tumores hemáticos (leucemia, linfoma y mieloma múltiple) que los tumores sólidos. Otros cuadros subyacentes que predisponen a la listeriosis son las cardiopatías, la diabetes mellitas, la insuficiencia renal crónica, hepatopatías y el

transplante de órganos. Cabe destacar que el 15 % de los pacientes con listeriosis no presentan enfermedad de base demostrada. (Skogberg y col., 1992: 815-821p, Galiana, 1968:194-202 p, Slutsker y col., 2000: 83-86 p).

L. monocytogenes, produce enfermedades invasivas y no invasivas, como infecciones en el embarazo, granulomatosis antiséptica, sepsis de origen desconocido, meningoencefalitis, cerebritis e infecciones focales entre los primeros y entre las enfermedades no invasivas, destaca la gastroenteritis, que ocurre en huéspedes que consumen alimentos contaminados con *L. monocytogenes*.

La frecuencia en la que esta bacteria causa gastroenteritis es indeterminada así como la dosis infectante y las características del huésped por lo que se debe considerarse el cultivo para *L. monocytogenes* en los brotes de enfermedad caracterizada por fiebre, diarrea, cefalea, mialgias; si los cultivos de rutina han sido negativos, debe sospecharse que *L. monocytogenes* esté involucrada y se debe utilizar los medios de cultivo para su aislamiento. (Forbes y col 2002.,: 73 p, Slutsker y col.,2000 : 83-86 p, Durand , 1993:321-328 p).

Por otro lado se considera que de 1-5 % de los humanos son portadores intestinales asintomáticos de esta bacteria. Sin embargo la listeriosis humana y sobretodo en las mujeres embarazadas (en mayor porcentaje), recién nacidos, ancianos, pacientes con enfermedades neoplásicas y personas que tienen el sistema inmunitario deficiente (paciente con VIH, paciente con órganos transplantados, etc.) es muy frecuente (Bell y col., 1998: 207 p; Donnelly y col., 1992: 637 p, F.D.A, 2001, Watson, 1991: 178 p).

Listeria es un patógeno importante de origen alimentario, que resiste diversas condiciones ambientales: pH bajo, altas concentraciones de sal y, sobre todo, tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2 - 4 °C) y a tratamientos insatisfactorios de pasteurización, logrando constituirse en seria amenaza a la seguridad de la industria alimentaria (Axelson y col., 1998 : 134 p, Vasquez y col.,2001: 584-640, Bell y col., 1998 : 207 p, Farber y col.,1991:476-511 p).

Esta bacteria fue descrita por primera vez por Murray y cols (1) con el nombre de *Bacterium monocytogenes*, en casos de infección de conejos de laboratorio. Posteriormente se demostró que era el responsable de la meningoencefalitis en ovejas y ganado; por ser un patógeno intracelular facultativo clásico, junto con *Mycobacterium*, *Brucella*, *Legionella*, *Francisella*, *Salmonella* y otros (Koneman y col.,1997: 462 – 465 p)

A pesar de que en EEUU desde hace 40 años la infección de esta bacteria se considera dentro de la zoonosis, la asociación de *Listeria* con diversos síndromes clínicos en neonatos y adultos se ha informado con creciente frecuencia; sin establecerse con certeza el nexo epidemiológico entre los reservorios animales y la transmisión de los microorganismo *Listeria* a los humanos. En la actualidad parece claro que el alimento contaminado es la vía más importante de su transmisión del ambiente a los humanos.; a través de los vegetales crudos, productos lácteos y l carnes; aprovechando la disminución de acidez gástrica para instalarse (Koneman y col., 1997: 462 – 465 p).

A pesar de su ubicuidad, la incidencia anual de listeriosis es de 0.7 por 100.000, aunque la tasa anual de infección es 3 veces más alta en mayores de 70 años y 17 veces más alta en embarazadas; pero, a diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos tiene una alta tasa de mortalidad de alrededor del 23 % y es uno de los motivos que concita tanto interés (Cherubin y col., 1991: 1108 p , Schwartz y col.,1989: 74 p).

En Estados Unidos la listeriosis esporádica ocurre con baja frecuencia (1300 casos por año). Se han reconocido prolongadas epidemias frecuentemente caracterizadas por la alta tasa de mortalidad; como el caso del año 1988 al 1999, con más de 100 casos y 21 muertos en 22 estados ligado al consumo de embutidos (Schwartz y col.,1989: 74 p). En Canadá de 1980 y 1981 por el consumo de ensaladas de col abonadas con estiércol de oveja y entre 1983 ,1985 y 1995 en Massachussets, California y Francia se registraron casos ocasionados por el consumo de leches pasteurizadas, quesos estilo mexicano y quesos frescos elaborados con leche cruda (Axelson y col., 1998 : 134 p, Bell y col., 1998 : 207 p, Donnelly y col.,1992: 637 p, Galiana, 1968:194-202 p , Hitchins ,1995:1001-1008 ,Farber y col., 1991:476-511 p, Temple y col., 2000: 656-651p).

Últimamente ligado al incremento de consumir vegetales frescos como parte de una dieta sana, se ha incrementado la transmisión de *Listeria monocytogenes* al hombre por el consumo de vegetales frescos donde está demostrada su capacidad de sobrevivir en vegetales crudos, por lo que se debe de promover cambios en la dieta. (Monge y col., 1991: 29-31 p)

Datos recientes reportan que casi mil personas infectadas por año y de las que la cuarta parte. En el Perú son escasos los trabajos publicados sobre *Listeria monocytogenes* en alimentos como repollo y lechuga, a excepción del realizado en quesos de fabricación artesanal por Espinoza y Cols (2003) en Ica. (Axelson y col., 1998: 134 p, Bille y col., 1999:346-356, Espinoza y col., 2003:71-75 p,)

Ahora se conoce que los alimentos como hortalizas frescas, leche y derivados, así como las carnes, son los vehículos de transmisión más comunes de *L. monocytogenes* del medio ambiente al ser humano; debido a que estos alimentos sufren una inadecuada manipulación y control en los procesos de cultivo, transporte, almacenamiento, distribución y expendio.

Sumado a esta problemática esta la gran variedad de potajes, que son consumidos masivamente por la población peruana y que tienen como ingredientes a las hortalizas crudas (lechuga y repollo) que son vehículos de *Listeria monocytogenes* y otros microbios .

Desafortunadamente países latinoamericanos como el Perú, tienen deficiente educación ambiental y sanitaria, limitada disponibilidad de agua; por lo que las lechugas y repollos, generalmente son regados con aguas servidas y abonados con estiércol; que son fuente permanente de una variedad de contaminantes físicos, químicos y biológicos como *L. monocytogenes*

Por lo expuesto, este trabajo esta orientado a determinar la frecuencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* en *Lactuca sativa* “lechuga” y *Brassica oleracea* var *capitata-alba* “repollo” que se expenden en los principales mercados de la localidad de Trujillo; para responder la interrogante:

¿Cuál es la frecuencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* en repollo y lechuga, que se expenden en los mercados La Hermelinda, Central y Palermo de la ciudad Trujillo, como vehículos de transmisión de listeriosis humana? y así cumplir con los siguientes objetivos:

- Determinar la presencia de *L. Monocytogenes*, en muestras de repollo y lechuga, mediante su aislamiento, identificación y caracterización.
- Estimar la frecuencia de *L. monocytogenes* en muestras de repollo y lechuga que se expenden en los mercados La Hermelinda, Central y Palermo de la ciudad Trujillo.
- Determinar si existen diferencias en la frecuencia de aislamiento de *L. Monocytogenes*, entre repollo y lechuga, así como entre los mercados en estudio.

Demostrada la presencia de *L. monocytogenes* en repollo y lechuga, se puede generalizar que las hortalizas actúan como vehículos de transmisión de la listeriosis humana ; de alta morbilidad y mortalidad , enfermedad que puede controlarse con educación ambiental y sanitaria de las personas encargadas de su producción, transporte y expendio de dichas hortalizas; lo que puede lograrse con el concurso de las

autoridades sanitarias, realizando campañas de concientización ambiental y sanitaria en todas las fases de la producción y comercialización, con el fin de disminuir la probabilidad de contaminación, y la consecuente morbi – mortalidad que acarrea, y proponiendo finalmente el tamisaje rutinario en el sistema de salud pública, propiciando diagnósticos de certeza, tratamientos eficaces y un control epidemiológico adecuado de la listeriosis en el Perú, así como también propiciar la implementación de planes de muestreo y criterios microbiológicos en hortalizas crudas, ya que en la actualidad no existe una Norma Técnica Peruana (NTP) siendo este microorganismo un patógeno de distribución universal (DIGESA, 2003 : R.M : 615).

II. MATERIAL Y METODOS

2.1. MATERIAL DE ESTUDIO:

Muestras de *Brassica oleracea* var *capitata-alba* “repollo “ y *Lactuca sativa* “lechuga “ obtenidas de los mercados , la Hermelinda, Central y Palermo de la ciudad de Trujillo.(Anexo 1 Figuras 1,2,3,4,5,6)

2.2. MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.2.1. Diseño de investigación: Diseño de una casilla, con estudio observacional y transversal.

2.2.2. Diseño de muestreo: Estratificado, aleatorio y polietápico

2.2.3. Tamaño de muestra.- El tamaño de muestra se estimó en dos etapas:

Número de puestos: El número total de puestos de los tres mercados, que fueron muestreados se determinó mediante la fórmula de proporciones para población finita y varianza desconocida; procediéndose luego a un reparto proporcional de la muestra, entre los tres mercados. Los valores de “p” y “q” se estimaron luego de un muestreo piloto:

$$n_p = t^2 pqN/E^2 (N-1) + t^2 pq$$

Donde:

$t = 1.96$ (siendo $\alpha = 0.05$); $N_1 = 103$ (mercado Hermelinda); $n_1 = 36$

$p = 0.2157$; $N_2 = 36$ (mercado Palermo); $n_2 = 12$

$q = 0.7843$; $N_3 = 17$ (mercado Central); $n_3 = 06$

$N = 156$; $E = 0.06$

$$n_p = (1.96)^2 (0.2157)(0.7843)(156)/(0.16)^2 (156-1) + (1.96)^2 (0.2157)(0.7843)$$

$n_p = 84$ puestos; pero al ajustar la muestra, mediante la fórmula:

$$n = (n_p) / [1 + (n_p/N)],$$

se tiene una “**n**”= **54 puestos**; que repartidos proporcionalmente en los tres mercados da: $n_1 = 36$ (Hermelinda); $n_2 = 12$ (Palermo); y, $n_3 = 06$ (Central). La selección de la muestra, en cada mercado, se hizo en forma aleatoria.

Número de Unidades Muestrales (para repollo y lechuga):

El número total de unidades muestrales fue igual al número de puestos, correspondiendo la mitad a lechuga y la otra mitad a repollo; procediéndose luego a un reparto proporcional de la muestra, entre los puestos de los tres mercados en estudio:

2.2.4. Análisis Estadístico

Los datos fueron vaciados en el programa (Software) de SPSS V 12, y luego procesados para construir tablas de frecuencias absolutas y relativas; expresadas en porcentaje. Con los valores de frecuencias, tanto para repollo y lechuga, por mercado y entre mercados, se probaron las diferencias significativas mediante el Test de

proporciones, a fin de determinar el tipo de verdura y el mercado en el que predomina *Listeria monocytogenes*.

El estadístico a usar es:

$$tc = (p_1 - p_2) / \{820.33 (1/n_1 + 1/n_2)\}^{1/2}$$

2.2.5. Procedimiento

Las muestras de repollo y lechuga se colectaron de los puestos que comercializan estos productos en los mercados la Hermelinda, Central y Palermo de la ciudad de Trujillo entre los meses de Setiembre del 2006 a Setiembre del 2007. (Anexo 1 Figuras 1,2,3,4,5,6)

El muestreo se realizó según la Norma Técnica Peruana NTP ISO 2859-1 (INDECOPI, 1999); cada unidad muestral estuvo constituida por una planta de lechuga y una planta de repollo, colectadas y etiquetadas en bolsas de polietileno de primer uso (estériles), para su posterior traslado al laboratorio.

El procesamiento de la muestra se realizó en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.N.T., de acuerdo con el manual de bacteriología analítica de la Food and Drug Administration (FDA, 2001: [en línea], Hitchins, 1995:1001-1008, FDA, 1992: [en línea]). Consistente en:

Pre enriquecimiento: Se pesaron asépticamente 25 gr de muestra cortada en pequeños trozos; porciones tomadas de diferentes áreas de la unidad muestral, luego se homogeneizaron con 225 mL de caldo de Enriquecimiento Base Listeria (LEB) (Merck

®), en un agitador Stomacher Seward ® durante un minuto; posteriormente, se incubó a 30 °C durante cuatro horas (Hitchins ,1995:1001-1008, (INDECOPI ,1999)..

Enriquecimiento: Después de la incubación, se adicionó 0,9 mL del suplemento selectivo para caldo LEB a cada uno de los caldos de enriquecimiento, continuándose con la incubación a 30 °C hasta completar las 24 - 48 horas (Hitchins ,1995:1001-1008,AFNOR ,2006: [En Línea]).

Aislamiento: A partir del caldo LEB incubado por 24 a 48 horas, se sembró en agar Oxford y Palcam (Merck) ® por estría y agotamiento, luego se incubó a 35 °C por 24 a 48 horas (Hitchins ,1995:1001-1008, AFNOR ,2006: [En Línea]).

Identificación: Se examinaron macroscópicamente las colonias que crecieron en los medios selectivos Oxford y Palcam, y que presentaban las características compatibles con *Listeria*; tales como, ser pequeñas, presentar borde entero, depresión central y degradar la esculina (Vasquez y col., 2001: 584-640, Donnelly y col., 1992: 637 p, Temple y col., 2000: 656-651p, Bille y col., 1999:346-356).

También se realizó un estudio microscópico de las mismas colonias, coloreadas con la técnica de Gram en la que se observaron cocobacilos Gram positivos.

Las colonias aisladas en los medios Oxford y Palcam se repicaron en agar tripticasa soya- extracto de levadura 0,6%(TSAYE) y, en caldo tripticasa soya-extracto de levadura 0,6% (TSBYE), para obtener cultivos puros a partir de los cuales se realizó la identificación bioquímica (Axelson y col., 1998 : 134 p , Farber y col.,1991:476-511 p

,Vasquez y col.,2001: 584-640, Donnelly y col.,1992: 637 p, Temple y col., 2000: 656-651p , Bille y col., 1999:346-356).

Identificación bioquímica: Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, motilidad, fermentación de la glucosa, ureasa, reducción de nitrato y rojo de metilo-Voges Proskauer. (Farber y col.,1991:476-511 p, Donnelly y col.,1992: 637 p, Hitchins ,1995:1001-1008, AFNOR ,2006: [En Línea]).

Pruebas para identificar *Listeria monocytogenes*: Se usaron: el agar cromogénico para *Listeria*, la prueba de CAMP (Christie-Atring-Munch-Peterson), asimilación de carbohidratos y el crecimiento en paraguas (Forbes y col 2002.,: 73 p, Hitchins ,1995:1001-1008, FDA, 1992: [en línea].). AFNOR ,2006: [En Línea]).

Además, todos los cultivos aislados, fueron identificados mediante el Sistema automatizado Micro Scam Walk Away y mediante Caracterización Molecular (patrones electroforéticos de proteínas totales).

III. RESULTADOS

En el presente trabajo se llegó a determinar la presencia de *L. Monocytogenes*, en muestras de repollo y lechuga, mediante su aislamiento, identificación y caracterización en los tres mercados evaluados.

CUADRO 1: Valores del número de puestos por mercado (frecuencia y porcentaje), tamaño de muestra y casos positivos para *L. monocitognes* en lechuga y repollo y totales, entre setiembre del 2006 a setiembre del 2007

Población, muestra y casos positivos		Hermelinda		Palermo		Central		Total	
		f _i	%	f _i	%	f _i	%	f _i	%
Número de puestos (N)		103	66.00	36	23.00	17	11.00	156	100.00
Tamaño de muestra (n)		36	66.67	12	22.22	06	11.11	54	100.00
Casos positivos	Lechuga (n/2=muestra)	06	66.67	02	22.22	01	11.11	09	100.00
	Repollo (n/2=muestra)	02	66.67	01	33.33	00	00.00	03	100.00
	Total de casos	08	66.67	03	25.00	01	08.33	12	100.00

Del análisis del Cuadro 1, se desprende que del total de las 54 muestras, 36 (66.67 %) corresponden, proporcionalmente, al mercado la Hermelinda; siendo 18 muestras de lechuga y 18 de repollo respectivamente. Para mercado de Palermo 12 muestras (el 22.22 %); de ellas 06 son de lechuga y 06 de repollo y para el mercado Central 06 muestras (11.11%); 03 de lechuga, y 03 para repollo.

Ahora bien de los 12 casos positivos (100 %); 08 corresponden a la Hermelinda (06 de lechuga y 02 de repollo); 03 del mercado Palermo; (02 son de lechuga y 01 de repollo); y sólo 01 caso para el mercado Central, corresponde a lechuga.

CUADRO 02: Valores de las frecuencias absolutas y relativas (%) de los casos positivos, negativos y total de ellos, para lechuga y repollo en los tres mercados de Trujillo, de setiembre 2006 a setiembre 2007

CASOS	f_i	Hermelinda		Palermo		Central		TOTAL	
		Lechuga	Repollo	Lechuga	Repollo	Lechuga	Repollo	f_i	%
Casos positivos	f_i	06	02	02	01	01	00	12	22.22
	%	16.67	05.56	16.67	08.33	16.67	00.00		
Casos negativos	f_i	12	16	04	05	02	03	42	77.78
	%	33.33	44.44	33.33	41.67	33.33	50.00		
Total de casos	f_i	18	18	06	06	03	03	54	100.00
	%	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00		
Muestra	n	36		12		06			
	%	100		100		100			

En el Cuadro 02 presenta que del 100 % de casos, el 22.22 % (12 casos) son positivos; y el 77.78 % (42 casos) son negativos. La presencia de *L. Monocytogenes*, en lechuga en los tres mercados presenta la misma proporción (16.67 %). En cambio para repollo, muestra mayor porcentaje de contaminación en el mercado de Palermo (8.33%), seguido de la Hermelinda (5.56 %) y la bacteria esta ausente en las muestras de repollo del mercado Central.

La prueba definitiva, para confirmar o rechazar esta aparente diferencia, se presenta en el Cuadro 03, con los resultados de la aplicación del Test de Proporciones y la prueba de hipótesis correspondiente; para los casos negativos de repollo. Aplicándose en ellos y no en los casos positivos, porque en estos últimos, la ausencia (aparente) de la bacteria en las muestras de repollo en el mercado Central ($f_i = 0.00$), no permite la aplicación del Test.

Por otro lado, en los tres mercados, predomina la contaminación en las muestras de lechuga sobre las muestras de repollo.

3. Prueba de Homogeneidad para Proporciones (Test de Proporciones)

CUADRO 03: Valores de “t” calculado, probabilidad de diferencias significativas y valor crítico ($\alpha = 5.00\%$) para los casos negativos de repollo en los tres mercados, de setiembre 2006 a setiembre 2007

CASOS	Mercados	Hermelinda		Palermo		Central	
		t	Prob. %	t	Prob %	t	Prob. %
Casos negativos de repollo	Hermelinda	---	---	0.1095	8.72	0.1769	14.04
	Central			0.2293	18.14	---	---
Probabilidad de error máxima aceptable (valor crítico): $\alpha = 5.00\%$							

De la observación de este Cuadro, los valores de “t” calculado y probabilidad de diferencias significativas, luego de la aplicación del Test de Proporciones, al compararse con el valor crítico ($\alpha = 5.00\%$), para los casos negativos de repollo en los tres mercados, se demuestra que no existen diferencias significativas, estadísticamente, a un nivel de confianza del 95 %. Es decir, estadísticamente, el porcentaje de los casos

negativos de las muestras de repollo en los tres mercados son iguales; y, por extensión, se puede afirmar lo mismo para los casos positivos.

IV. DISCUSIÓN

Como se sabe, la bacteria *L. Monocytogenes* es una de los patógenos más importantes de origen alimentario, porque resiste diversas condiciones ambientales, como pH bajo, altas concentraciones de sal y, sobre todo, tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2 - 4 °C) y tratamientos insatisfactorios de pasteurización, logrando que se constituya en una seria amenaza a la seguridad de la industria alimentaria (Forbes y col 2002.,: 73 p, 1 Vasquez y col.,2001: 584-640, Bell y col., 1998 : 207 p; (,Farber y col.,1991:476-511 p).

La literatura referente a *L. Monocytogenes*, señala que, en la actualidad parece claro que el alimento contaminado es la vía más importante en la transmisión de esta bacteria desde el medio ambiente a los humanos.; estando implicados los vegetales crudos, los productos lácteos y las carnes (Koneman y col .,1997: 97 – 98 p). Tal afirmación, se confirma a través del presente trabajo, al haberse logrado demostrar su presencia en muestras de repollo y lechuga, mediante su aislamiento, identificación y caracterización.

La presencia de la bacteria se da en los tres mercados principales de la localidad y en las dos especies muestreadas (lechuga y repollo), lo que implicaría, presumiblemente, que también está presente en los demás mercados de la localidad; y, posiblemente, también en otros productos.

La aparente ausencia de la bacteria en repollo del mercado Central, sólo se debería a una cuestión de muestreo (no incluye a toda la población), pues si éste se repite, es altamente probable (95 % de confianza), que se detecte su presencia en muestras de repollo, obtenidas del mercado Central.

La confirmación de la presencia de *L. monocytogenes* en lechuga y repollo, en los tres mercados de la localidad, significa que ella estará presente, en porcentaje altamente probable, en las ensaladas preparadas con estos vegetales; representando un riesgo potencial para la salud pública, dado que su dosis infectante no ha sido claramente definida y está demostrada su capacidad de sobrevivir en vegetales crudos (Monge y col., 1991:29-31).

La confirmación de la presencia de esta bacteria en las dos especies de vegetales evaluadas y en los tres mercados; obliga a continuar el trabajo, tratando de confirmar su presencia en otros tipos de alimentos y en otros mercados de la localidad; así como, estimar la frecuencia de personas afectadas por esta bacteria; y, sugerir la implementación del tamisaje rutinario de este enteropatógeno en nuestros sistemas de salud pública.

Respecto a la frecuencia de la presencia de esta bacteria, en los tres mercados y en las dos especies de vegetales evaluadas (lechuga y repollo), el porcentaje de casos positivos es de 22.22 %, como se puede observar en el Cuadro 02; sin embargo, tales valores no pueden ser contrastados, por no existir trabajos semejantes en otros lugares,

ni en años anteriores sobre dentro del mismo lugar, donde se ha desarrollado la presente investigación.

Así mismo, se demuestra que el mayor porcentaje de casos positivos se presenta en lechuga (16.67 %) y con igual frecuencia en los tres mercados evaluados; desconociéndose las causas por las cuales; esta bacteria es más frecuente en lechuga que en el repollo.

Así mismo, estadísticamente, a un nivel de confianza del 95 %, se demuestra que las frecuencias relativas de la presencia de esta bacteria en repollo, para los tres mercados, son homogéneas (Cuadro 03); es decir, que el porcentaje de los casos negativos de las muestras de repollo en los tres mercados son iguales; y, por extensión, se puede afirmar lo mismo para los casos positivos. No habiendo, igualmente, trabajos con valores que permitan contrastar con los resultados aquí obtenidos.

De todo ello, sólo se puede afirmar que se considera que de 1-5 % de los humanos son portadores intestinales asintomáticos de esta bacteria. Sin embargo, este microorganismo es causante de listeriosis en muchos humanos; siendo los grupos con más alto riesgo las mujeres embarazadas (en mayor porcentaje), recién nacidos, ancianos, pacientes con enfermedades neoplásicas y personas que tienen el sistema inmunitario deficiente (pacientes con VIH, pacientes con órganos transplantados, etc.) (Bell y col., 1998 : 207 p , Donnelly y col.,1992: 637 p , Hitchins ,1995:1001-1008, Watson , 1994: 103-106 p).

V. CONCLUSIONES

En el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

2. *Listeria monocytogenes* esta presente en repollo y lechuga procedentes de los mercados Hermelinda, Palermo y Central de la ciudad de Trujillo.
3. La frecuencia relativa expresada en porcentaje para lechuga es la misma en los tres mercados (16.67 %) y la frecuencia relativa es mayor en el mercado Palermo (8.33%) que en el mercado la Hermelinda (5.56 %).
4. La frecuencia de *Listeria monocytogenes* es mayor en lechuga que en repollo en los tres mercados estudiados.
5. Estadísticamente, con un nivel de confianza del 95, se prueba que las frecuencias relativas de la presencia de *Listeria monocytogenes*, en los tres mercados es homogénea.

VI. PROPUESTAS

- Que las autoridades de salud establezcan controles microbiológicos de las hortalizas como lechuga y repollo, que se expendan en los mercados, desde el cultivo, riego, transporte, almacenamiento y expendio.
- Que el personal médico, frente a cuadros diarreicos, soliciten al Laboratorio la búsqueda de *Listeria monocytogenes*, además de los patógenos entéricos clásicos.
- Que los laboratorios clínicos públicos y privados, estén implementados con medios selectivos y técnicas de cultivo, que permitan el aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association Francaises de Normalisation. Detection of *Listeria monocytogenes* - Routine method. [En Línea]. Francia. AFNOR . [Fecha de acceso 27 de Septiembre del 2006], disponible en: <http://www.Afnor.fr>.

Axelsson F, Sonrén M. *Listeria*. Technical Handbook. Sweden: Diffchamb AB; 1998.

Amstrong D: *Listeria monocytogenes*. In Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE (eds) *Enfermedades Infecciosas Principios y Practicas*, ed 4. New York, Churchill Livingstone, 1995

Bell C, Kyriakides A. *Listeria*. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. España. Acribia; 1998.

Bille J, Rocourt J, Swamithran B. *Listeria*, *Erhysipelotrix*, and *Kurthia*. In Murray P, Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH, (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 7 th. ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 1999. p. 346-56.

Center for Food Safety and Applied Nutrition. Preventing food borne listeriosis. [en línea]. Estados Unidos. Food and Drug Administration; 1992. [fecha de acceso 15 de Abril del 2003], URL disponible en: <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/%20FSISLIST.html>.

Cherubin CE, Appleman MD, Heseltine PNR, et al. Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis. *Rev Infect. Dis.* 1991;13:1108-14

Donnelly CW, Brackett R, Doores S, Lee W, Lovett J. Listeria. In: Vanderzant C, Splittstooser DF, (eds). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3 rd ed. Washington DC: American Public Health Association. 1992. p. 637-63.

Durand. Acute bacterial meningitis in adults: a review of 493 episodes. N Engl J

Med 1993; 328:21.

Espinoza et al . Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003. *Rev. Perú. med. exp. salud pública*, abr./jun. 2004, vol.21, no.2, p.71-75. ISSN 1726-4634.

Farber JM, Peterkin PI. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. *Microbiol Review* 1991; 55(3): 476-511.

Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual on line Reagents Index. [en línea]. Estados Unidos. FDA; 2001. [fecha de acceso 15 de Abril de 2003], URL disponible en: <http://http://%20vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-ri.html>.

Forbes A, Sahm F, Weissfeld A. and et al. *Diagnostic Microbiology*. Eleventh edition. 2002. And Inprimer Elsevier Science.

Galiana J. Neurolisteriosis. Primer caso pediátrico nacional. *Arch PediatrUruguay* 1968, 39: 194-202

Hitchins AD. Listeria monocytogenes. In Food and Drug Administration (eds). *Bacteriological Analytical Manual*. 8 th ed. Arlington: AOAC International, 1995; pp. 10.01-11.08.

Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de Protección Intelectual. Norma Técnica Peruana NTP-ISO 2859-1. Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte I: Planes de muestreo clasificados por nivel de calidad aceptable (NCA) para inspección lote por lote. Lima: INDECOPI; 1999[STANDARDIZEDENDPARAG]

Joklik et al. *Listeria y Erysipelothrix*. In: Joklik, Willett, Amos, Wilfert eds. Zinsser Microbiology, ed 20^a. Appleton-Century-Crofts. 1992

Koneman , E. et al. 1997 . Diagnostico Microbiologico. 3° ed. Edit. Panamericana .Mexico.

Monge , R. et al : Presence of *Listeria monocytogenes* in fresh saled vegetables. Reb Biomed 1991, 10 : 29-31

Resolución Ministerial N° 615 - 2003 - S.A/DM del 28 de Junio del 2003. Criterios microbiológicos de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos y bebidas de consumo humano. (DIGESA)

Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, et al. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. N Engl J Med. 1985;312:404

Seeliger HPR, Jones D: Genus *Listeria* Pire 1940, 383AL. In Sneath Ph, Mair NS, Sharpe ME, et al (eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol2(8th ed.), pp 1235-1245. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986.

Schwartz B, Hexter D, Broome CV, et al: Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. J Infect Dis. 1989. 159:680

- Schwartz B, Hexter D, Broome CV, et al: Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J Infect Dis.* 1989. 159:680
- Skogberg K, Syrjanen J, Jahkola M, et al: Clinical presentation and outcome of listeriosis in patient with and without immunosuppressive therapy. *Clin Infect Dis* 1992;14:815-821.
- Slutsker L, Evans Mary C, Schuchat A. Listeriosis. In: Scheld WM, Craig WA and Hughes JM, editors. *Emerging Infections 4*. Washington, DC ASM Press; 2000. p.83-106.
- Swaminathan B, Rocout J, Bille J: *Listeria*. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds): *Manual of Clinical Microbiology* (6th ed.), pp 341-348. Washington DC, ASM Press, 1995.
- Temple ME, Nahata MC. Treatment of listeriosis. *Ann Pharmacother* 2000; 34(5): 656-61.
- Vasquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Gobel W, et al. *Listeria*, pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(3): 584-640.
- Watson D. Revisión sobre ciencia y tecnología de los alimentos. Volumen 1: Higiene y Seguridad Alimentaria. Zaragoza: Acribiá; 1994.

VIII. ANEXOS

Anexo 1



Figura 1. Recolección de muestras de *Lactuca sativa* “lechuga” en el mercado La Hermelinda.



Figura 2. Recolección de muestras de *Brassica oleracea* var *capitata-alba* “repollo” en el mercado La Hermelinda.



Figura 3. Recolección de muestras de *Lactuca sativa* “lechuga” en el mercado Central



Figura 4. Recolección de muestras de *Brassica oleracea* var *capitata-alba* “repollo” en el mercado Central.



Figura 5. Recolección de muestras de *Lactuca sativa* “lechuga” en el mercado Palermo



Figura 6. Recolección de muestras de *Brassica oleracea* var *capitata-alba* “repollo” en el mercado Palermo.