



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



**Frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expendidas
en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo
Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.**

TESIS

**Para optar el título profesional de licenciado (a) en
Biología – Microbiología - Parasitología**

AUTOR (ES)

Bach. Stefanny Jiménez Salcedo
Bach. Roberto Edgar Alex Farroñán Sondor

ASESOR (A)

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo

Lambayeque – Perú

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA

**Frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expendidas
en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo
Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.**

TESIS

Para optar el título profesional de licenciado (a) en:
Biología – Microbiología - Parasitología

PRESENTADO POR:

Bach. Stefanny Jiménez Salcedo
Bach. Roberto Edgar Alex Farroñán Sondor

ASESORA:

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo

Lambayeque – Perú
2020



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



**Frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expendidas
en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo
Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.**

Aprobado por:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

Presidenta

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

Secretaria

Lic. Julio César Silva Estela

Vocal

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo

Asesora

Msc. Fransk Amarildo Carrasco Solano

Co-asesor

Lambayeque – Perú

2020

DEDICATORIA

A mis padres, César Pedro Jiménez Rivera y
Marlene Salcedo Díaz, quienes han sido el pilar
fundamental en mi formación profesional; por brindarme
su confianza, oportunidad y recursos.

A mis hermanas Jimena y Romina por
permanecer a mi lado y ser un apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica y creyeron en mí en todo momento.

A mi hermana Jimena por comprenderme y apoyarme en “las buenas y malas” como solo ella sabe hacerlo.

A mi hermana Romina por sus sugerencias y observaciones, siempre inteligentes y oportunas.

A mis padres, Teodolinda Sondor Ruiz, Roberto Farroñán Santisteban y con mucho cariño a mi mamá Bety Linares.

A nuestra asesora Graciela Albino Cornejo por facilitarnos el uso de los equipos y materiales del laboratorio y al personal de servicio técnico por su cooperación en el desarrollo de esta investigación.

Al profesor Fransk Carrasco Solano por su apoyo y orientación en el desarrollo de nuestra investigación.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 Antecedentes de la investigación.....	17
2.2 Base teórica.....	22
2.2.1 <i>Listeria</i> y su relación con Hortalizas.....	22
2.2.2 Rutas de entrada de bacterias al tejido vegetal.....	22
2.2.2.1 Pre-cosecha.....	23
2.2.3 <i>Listeria</i> en el tejido vegetal.....	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
3.1 Materiales.....	27
3.1.1 Zona de estudio.....	27
3.1.2 Población.....	27
3.1.3 Tamaño de muestra.....	27
3.2 Métodos.....	28
3.2.1 Diseño de investigación.....	28
3.2.2 Toma de muestra.....	28
3.2.3 Procesamiento de las muestras.....	30
A. Pre enriquecimiento.....	30
B. Enriquecimiento.....	32
C. Aislamiento.....	33
D. Selección de colonias sospechosas.....	36
E. Confirmación de <i>Listeria sp</i>	37
IV. RESULTADOS.....	38
V. DISCUSIÓN.....	44
VI. CONCLUSIONES.....	47
VII. RECOMENDACIONES.....	48

VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
IX.	ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia y ausencia de <i>Listeria sp.</i> en hortalizas de mayor consumo expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo2017-Mayo2018.....	38
Tabla 2. Aislamiento de <i>Listeria sp.</i> por tipo de mercado. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.....	38
Tabla 3. Frecuencia de <i>Listeria sp.</i> teniendo en cuenta el tipo hortaliza expendida en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las unidades muestrales	28
Figura 2. Toma de muestra.....	29
Figura 3. Pre enriquecimiento.....	31
Figura 4. Enriquecimiento.....	32
Figura 5. Aislamiento.....	34
Figura 6. Observación macroscópica de colonias. Control positivo ATCC® 19114 <i>Listeria monocytogenes</i> 4a en Agar Palcam.....	35
Figura 7. Observación macroscópica de colonias. Control positivo ATCC® 19114 <i>L. monocytogenes</i> 4a en Agar Oxford.....	35
Figura 8. Siembra de las colonias sospechosas empleando la técnica de estriado en Agar Tripticasa Soya con 0,6% de extracto de levadura para su aislamiento.....	36
Figura 9. Identificación de cepas sospechosas.....	37
Figura 10. Frecuencia de <i>Listeria sp.</i> en hortalizas.....	40
Figura 11. Selección de colonias sospechosas.....	41
Figura 12. Observación microscópica de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19114 4a control positivo (izquierda), cepa sospechosa confirmada para <i>Listeria sp.</i> (derecha).....	42
Figura 13. Prueba de Motilidad a 25° C. Control de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19114 4a positivo (izquierda), motilidad positiva proveniente de colonia sospechosa (derecha).....	42
Figura 14. Prueba de Voges-Proskauer. Control de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19114 4a positivo (izquierda), prueba negativa proveniente de colonia sospechosa (derecha).....	43
Figura 15. Prueba de reducción de Catalasa. Control de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC® 19114 4a positivo (izquierda), prueba positiva proveniente de colonia sospechosa (derecha).....	43
Figura 16. Mapa satelital del mercado “Modelo”, Chiclayo. Tomado de Google Maps Copyright 2017.....	53
Figura 17. Mapa satelital del mercado mayorista “Moshoqueque”, José Leonardo Ortiz. Tomado de Google Maps Copyright 2017.....	53
Figura 18. Mapa satelital del mercado mayorista “Los Pathos”, José Leonardo Ortiz. Tomado de Google Maps Copyright 2017.....	54

- Figura 19.** Mapa satelital mostrando la ubicación del mercado mayorista “Moshoqueque” y “Los Pathos”, distrito de José Leonardo Ortiz y del mercado “Modelo”, distrito de Chiclayo. Tomado de Google Maps Copyright 2017.....54
- Figura 20.** Formato de rotulado de la muestra.....55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ubicación geográfica de la zona de muestreo.....	53
Anexo 2. Rotulado de muestras.....	55
Anexo 3. Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i>	56
Anexo 4. Indicador químico externo para esterilización a calor seco en cinta adhesiva 3M.....	57
Anexo 5. Indicador químico 1250 3M Comply TM – Tiras para esterilización por vapor	58
Anexo 6. Medios de cultivo Difco ®.....	59
Anexo 7. Suplementos para Agar Palcam y Agar Oxford marca Difco ®.....	60
Anexo 8. Hoja de descripción VIP ® Gold <i>Listeria</i> – BIOCONTROL.....	61
Anexo 9. ATCC® 19114 <i>Listeria monocytogenes</i> 4a – KWIKSTIK.....	62

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018. Para este propósito se analizaron 90 unidades muestrales de hortalizas distribuidas en proporciones iguales de 30 unidades de tomate, 30 unidades de lechuga y 30 unidades de repollo, a la vez distribuidas entre los mercados anteriormente mencionados; las cuales fueron recolectadas según la Norma Técnica Peruana NTP ISO 2859-1:2008.

Las muestras de hortalizas se sembraron en medios de cultivo de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, selectivos y suplementados para el aislamiento de *Listeria sp.*, siguiendo con el protocolo descrito en ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* — Part 1: Detection method [Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria spp.* Parte 1: Método de detección].

Finalmente, los resultados demostraron que *Listeria sp.* estuvo presente en un 1.1%, equivalente a una unidad muestral de lechuga, procedente del mercado Moshoqueque ubicado en el distrito de José Leonardo Ortiz; determinando así que *Listeria sp.* se encuentra en baja frecuencia en hortalizas de mayor consumo expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.

Palabras clave: *Listeria sp.*, *L. monocytogenes*, hortalizas, tomate, lechuga, repollo

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the frequency of *Listeria sp.* in vegetables of greater consumption expended in the markets of the districts of José Leonardo Ortiz and Chiclayo. Lambayeque May 2017 - May 2018. For this purpose, we analyzed 90 sample units of vegetables distributed in equal proportions of 30 units of tomato, 30 units of lettuce and 30 units of cabbage, at the same time distributed among the aforementioned markets; which were collected according to the Peruvian Technical Standard NTP ISO 2859-1: 2008.

Vegetable samples were sown in pre-enrichment, enrichment, selective and supplemented culture media for the isolation of *Listeria sp.*, Following the protocol described in ISO 11290-1: 2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* - Part 1: Detection method [Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and counting of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp.* Part 1: Detection method].

Finally, the results showed that *Listeria sp.* It was present at 1.1%, equivalent to a sample unit of lettuce, from the Moshoqueque market located in the district of José Leonardo Ortiz; thus determining that *Listeria sp.* It is found in low frequency in higher consumption vegetables sold in the markets of the districts of José Leonardo Ortiz and Chiclayo. Lambayeque May 2017 - May 2018.

Keywords: *Listeria sp.*, *L. monocytogenes*, vegetables, tomato, lettuce, cabbage.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes y de mayor impacto sobre la salud de las personas en el mundo; en los países en vías de desarrollo es frecuente la incidencia de diversas enfermedades causadas por la ingesta de alimentos que no reúnen la calidad e inocuidad apropiadas (Calderón, Domínguez, Gutiérrez, Kooper, & Schneider, 2009).

La mayoría de estas enfermedades transmitidas por alimentos son de origen microbiano, tal es el caso de la listeriosis que es transmitida por el género *Listeria*, la cual se caracteriza por ser una bacteria ubicua y ampliamente distribuida en la naturaleza, teniendo como principales reservorios, el suelo, los forrajes, las aguas residuales, las aguas superficiales y el tubo digestivo de numerosas especies de mamíferos, pájaros, algunos peces y mariscos. Aunque esta bacteria puede transmitirse directamente desde los animales infectados a las personas, así como entre éstos, la principal ruta de transmisión de las listerias es la alimentaria, a través del consumo de alimentos, principalmente leche cruda, productos cárnicos y hortalizas, las cuales pueden contaminarse por el suelo, riego con aguas residuales o por el uso de estiércol como fertilizante. Asimismo, en ambientes de producción y procesamiento de alimentos donde llegan a formar biopelículas y persistir durante períodos prolongados de tiempo multiplicándose hasta niveles peligrosos durante su distribución y almacenamiento. (Agencia Española de seguridad alimentaria y nutrición, 2009; OMS, 2018 y Vila Brugalla, 2014)

En la naturaleza existen diversas especies de la bacteria del género *Listeria*, como lo son *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua* y *L. grayi*., de ellas, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* están asociadas a enfermedades humanas; siendo *L. monocytogenes* la especie que está emergiendo como una importante bacteria

patógena transmitida por los alimentos causante de listeriosis, aunque rara vez se contrae, la enfermedad puede ser grave para algunas personas, especialmente las embarazadas, lactantes, ancianos y los pacientes con sistemas inmunitarios debilitados, como los inmunodeprimidos por VIH/sida, leucemia, cáncer o trasplantes renales (Koneman & Allen, 2008 y OMS, 2018).

Desde el punto de vista microbiológico las hortalizas son alimentos comparativamente de menor riesgo que las carnes y los productos lácteos. Sin embargo, al ser consumidos sin ningún tipo de cocción, son potencialmente peligrosos en caso de que exista contaminación.

Se conoce que el género *Listeria sp.* ha sido aislada en diversas hortalizas, tales como tomate, zanahoria, lechuga, repollo, espinaca, pepino, judías, coliflor, brócoli, entre otras; en las cuales la contaminación es variable y se ve influenciada por el lugar de cultivo, la zona de recolección, los abonos, la temperatura, los procedimientos de lavado, el contacto con el suelo y las condiciones higiénicas durante su expendio (Carrasco, 2007; International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF, 2001 y López Orbegoso, Rivera Jacinto, & Rodríguez Ulloa, 2009).

En la actualidad debido a que el hombre en busca de una mayor capacidad de supervivencia y preocupado por controlar su peso corporal, está adoptando cambios en su dieta diaria, aumentando así el consumo de vegetales frescos y crudos, como son las hortalizas que se sirven en ensaladas, las cuales acompañan de forma infaltable a los diversos potajes que son consumidos masivamente por la población (Ferrato & Mondino, 2008).

Considerando que en el departamento de Lambayeque no existe información documentada y ningún estudio anterior que evalúe la frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas se formuló la siguiente interrogante: ¿Cuál es la frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expandidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque?, teniendo en cuenta las condiciones no adecuadas del regadío de las hortalizas que luego son consumidos por la población, la capacidad de la bacteria de crecer en condiciones adversas, el tipo de reservorio predispuesto para su desarrollo, el ser considerada un vehículo de transmisión y la alta tasa de mortalidad a nivel mundial, la convierte en un importante problema de salud pública, por lo que se ejecutó la presente investigación cuyo objetivo fue determinar la Frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expandidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo - Lambayeque. Mayo 2017 - Mayo 2018.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Chuah, Ling, Mohd, Mustapha, & Rusul (2016), determinaron la prevalencia de especies de *Listeria* aisladas de hojas verdes. Se examinó un total de 405 tipos diferentes de muestras de verduras crudas obtenidas de mercados húmedos seleccionados en Selangor, Penang, Kedah y Perlis para la presencia de especies de *Listeria*. *Listeria spp.* se aisló en 84 de las 405 muestras (21,0%).

La mayor prevalencia de *Listeria spp.* se detectó en muestras de kangkong (34,6%), seguido de pegaga (28,0%), selom (28,0%) y lechuga (24,0%). Las especies más comunes aisladas fueron *L. monocytogenes* (50,0%); los aislados restantes de *Listeria* fueron *L. innocua* (32,1%), *L. seelingeri* (11,0%) y *L. grayi* (7,1%). Los hallazgos representados en este estudio muestran que el consumo de verduras crudas podría ser un riesgo potencial de listeriosis humana.

Hussain, Gooneratne, & Zhu (2016) ejecutaron un estudio en el que seleccionaron cuatro tiendas minoristas: (1) un mercado abierto (Mercado A); (2) un supermercado (Mercado B); (3) una tienda de comestibles asiática (mercado C); y (4) un mercado de expendio de fruta y verdura (Mercado D), de los cuales fueron recolectadas un total de 96 muestras, tales como: lechuga, repollo, pepino y zanahoria durante un período de 6 semanas. Luego de realizar el análisis microbiológico para detectar *Listeria spp.* en muestras de productos frescos mostró que la lechuga de las tiendas minoristas tenía el nivel más alto (4,2 log ufc / g) > pepino (3,2 log ufc / g) > col (2,5 log ufc / g) > zanahoria. La menor prevalencia de *Listeria spp.* se evidenció en las muestras de zanahoria (<1,05 log ufc / g) mientras que las muestras de lechuga presentaron la mayor prevalencia (> 4 log ufc / g).

Hussain & Zhu (2014), analizaron cuatro verduras frescas de consumo más común, tales como el repollo verde, repollo púrpura, lechuga y zanahoria, las que fueron recolectadas de dos mercados diferentes de frutas y hortalizas (informados como mercado 1 y mercado 2), localizados en la región de Canterbury en Nueva Zelanda durante un período de 5 semanas. Se concluyó que todas las muestras de repollo púrpura de ambos mercados fueron consistentemente positivas para *Listeria spp.* durante el período de muestreo de 5 semanas. *Listeria spp.* fueron detectados en el 60% y 100% de las muestras de repollo verde del mercado 1 y del mercado 2, respectivamente. Las muestras de lechuga recogidas de ambos mercados durante la semana 1 a la semana 3 fueron positivas para la presencia de *Listeria spp.*, mientras que las muestras de zanahoria tuvieron el porcentaje más bajo (20%) de muestras positivas, evidenciando así la capacidad de esta bacteria para colonizar dichas hortalizas.

(Abdullahi H. & Belmoh M., 2013), aislaron *Listeria monocytogenes* y otras especies luego de analizar un total de 336 muestras de alimentos listos para comer que se venden en la metrópoli de Kano, Nigeria; dentro de los alimentos muestreados se incluyeron 29 hamburguesas de carne, 30 yogures, 32 de leche fresca (nono) localmente fermentada, 34 de repollo, 45 de carne asada (tsire), 48 de lechuga, 55 de carne y 63 de carne asada (balangu). Las muestras se recolectaron a partir de diciembre del 2012 a marzo del 2013, luego de ser analizadas, de estas muestras 38 (11,3%) mostraron presencia de especies de *Listeria*. Además, se encontró que 06 aislamientos (1,8%) correspondían a *L. monocytogenes*; 31 (9,2%) fueron *L. ivanovii* y 01 (0,3%) *L. seeligeri*. De los 38 aislamientos, 7 (18%) fueron de balangu, 9 (24%) repollo, 14 (37%) lechuga, 5 (13%) carne y 3 (8%) 'tsire'. Se aisló *L. monocytogenes* a partir de 3 muestras de lechuga (50%), 2 muestras de balangu (33%) y 1 muestra de carne (17%).

Adelowo, Ajayeoba, Atanda, Bankole, & Obadina (2013), investigaron la incidencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (pepino, *Cucumis sativas*; repollo, *Brassica oleracea*; zanahoria, *Daucus carota*; tomate, *Solanum lycopersicum* y lechuga, *Lactuca sativa*) en seis estados en el suroeste de Nigeria (Lagos, Ondo, Oyo, Ogun, Osun y Ekiti). Un total de 555 muestras compuestas fueron recogidas de 30 mercados tradicionales durante los meses de julio, septiembre y noviembre del 2012 y enero del 2013. Solo 244 muestras fueron positivas. La distribución porcentual de *L. monocytogenes* aislados en las verduras listos para el consumo fue de 28,28% en repollo; 9,02% zanahoria; 23,36% en pepino; 19,67% en lechuga y 19,67 % en tomate. El estado de lagos tuvo mayor incidencia de contaminación de *L. monocytogenes* (55%) seguido por Ondo (48.89%), Oyo (48.75%), Ogun (44.09%), Osun (34.38%), y Ekiti (33.33%) respectivamente.

Esta investigación mostró la relevancia del estudio de esta bacteria, lo que podría suponer una amenaza de brote o casos esporádicos de listeriosis con altas tasas de morbilidad y mortalidad.

Chávez & Pérez (2011), evaluaron un total de 240 muestras de hortalizas (tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito) expendidas en los mercados “Palermo”, “La Unión” y “La Hermelinda” de la ciudad de Trujillo durante los años 2010 – 2011, quienes luego de analizar las muestras reportaron la presencia de *L. monocytogenes* en un 25.42% de las muestras, distribuyéndose por tipo de hortaliza de la siguiente manera: 10,4% en tomate; 31,3% en zanahoria; 23% en espinaca; 29,2% en lechuga y 33,33% en rabanito; mostrando así la mayor frecuencia de *L. monocytogenes* en las muestras de rabanito y la menor en las de tomate.

Carrascal (2011), evaluó 135 muestras de hortalizas frescas tales como espinaca, lechuga romana y lechuga batavia en los municipios de Madrid, Facatativa, Tocancipá, Cota y Chía, Bogotá; realizando tres muestreos en un periodo de seis meses, además cada tipo de hortaliza tuvo un tratamiento diferente durante su siembra, de tal modo que para la siembra de espinaca se hizo uso de compost y agua de riego por aspersión; en lechuga romana se empleó compost; y en lechuga batavia se utilizó fertilizantes químicos y durante el cultivo no se hizo riego. Luego de analizar las muestras reportó la presencia de *L. monocytogenes* en un 57.7% en espinaca y del 15.5 % en lechuga romana, evidenciando así una alta frecuencia en muestras de espinaca.

Alfieri, Gamboa, Morón, & Ramirez (2009), adquirieron muestras de dos tipos de vegetales frescos: tomates y cilantro de tres cadenas diferentes de supermercados de Valencia, Venezuela. La recolección se realizó adquiriendo 12 muestras al azar de cada grupo y de cada supermercado por semana, durante ocho semanas, para un total de 96 muestras por grupo, las cuales luego de ser analizadas, reportaron crecimiento de *L. monocytogenes* en un 25,0% y de *L. ivanovii* en un 16,7% en tomate; mientras que en las muestras de cilantro se encontró 36,5% de *L. monocytogenes*, 33,3% de *L. ivanovii* y 7,3% de *L. seeligeri*, estos resultados reafirman el alto porcentaje de *L. monocytogenes* en hortalizas frescas, tal es el caso del tomate que es consumido casi a diario por la población.

Martin (2007), analizó un total de 54 muestras recolectadas entre setiembre del 2006 - setiembre del 2007 procedentes de tres mercados de la ciudad de Trujillo, “Palermo”, “Central” y la “Hermelinda”. Se desprende que, del total de muestras, 36 (66.67 %) corresponden, al mercado la Hermelinda; siendo 18 muestras de lechuga y 18 de repollo respectivamente. Para el mercado de Palermo 12 muestras (el 22.22 %); de ellas 06 son de lechuga y 06 de repollo, por último, para el mercado Central 06 muestras (11.11%); 03 de lechuga, y 03 para repollo. Al finalizar su investigación, reportó 12 casos positivos a la presencia de *L. monocytogenes*, de los cuales 08 muestras corresponden al mercado 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.

Centurion & Takahara (2004), investigaron la incidencia de *L. monocytogenes* en un total de 100 muestras donde 50 corresponden a muestras de pollo y los 50 restantes a muestras de verduras las cuales fueron recolectadas durante los años 2003 – 2004 en diversos mercados y centros de abasto de Lima metropolitana. Luego de ser analizadas se logró aislar *L. monocytogenes* de una muestra de pollo y una muestra de verdura. De las 50 muestras de verduras, 7 correspondieron a espinacas, 13 a espárragos, 5 a lechugas, 11 a coles y 14 a apio. De las 13 muestras de espárragos, el 7.7% (1 muestra) presentó *L. monocytogenes*. Además, se detectó *L. innocua*, en espárragos (7.7%), lechuga (20%), coles (9.1%) y apio (7.1%).

2.2 Base teórica

2.2.1 *Listeria* y su relación con Hortalizas

Los brotes de enfermedades humanas debido a la transmisión de microorganismos patógenos a través de hortalizas, son generalmente consecuencia de la contaminación por aguas residuales, aguas con sustancias fecales, agua contaminada para el lavado o como consecuencia de una manipulación no higiénica.

Desde el punto de vista microbiológico las hortalizas son alimentos comparativamente de menor riesgo que las carnes y los productos lácteos. Sin embargo, al ser consumidos sin ningún tipo de cocción, son potencialmente peligrosos en caso de que exista contaminación.

Uno de los primeros brotes relacionados con hortalizas ocurrió en Canadá en 1981, considerado además el primer brote de *Listeria monocytogenes* que podría estar definitivamente vinculado a los alimentos y resultó en al menos 41 casos y 7 muertes confirmadas. Se encontró que el estiércol de ovejas infectadas con *L. monocytogenes* se había utilizado como fertilizante orgánico al cultivar las coles utilizadas para preparar la ensalada, lo que provocó una gran contaminación de las hojas (Dood, Nwaiwu, & Rees, 2016).

2.2.2 Rutas de entrada de bacterias al tejido vegetal

Existen dos explicaciones obvias de por qué las bacterias se encuentran dentro del tejido vegetal. En primer lugar, entran a través de aberturas naturales en la superficie de la planta (estomas, lenticelas, sitios de emergencia lateral de la raíz, etc.) y / o sitios de daño biológico o físico. En segundo lugar, se introducen en los tejidos internos junto con el agua.

Normalmente, el movimiento del agua es impulsado por la acción capilar de la cicatriz del tallo. Otras fuentes podrían ser las heridas o hematomas en la superficie de una hoja, la entrada a través de las raíces luego de la exposición a agua contaminada con patógenos.

Existe evidencia de que algunas bacterias pueden persistir en el ciclo de vida completo de la planta, desde la semilla hasta el brote. Se ha demostrado la evidencia de contaminación bacteriana a través de sistemas hidropónicos y esto puede conducir a la entrada en las plantas a través de raíces u hojas.

Por lo tanto, durante la producción, el agua se utiliza para remojar las semillas, regar las plantas y lavar los cultivos después de la cosecha, y todos estos procesos pueden considerarse fuentes potenciales de contaminación (Dood, Nwaiwu, & Rees, 2016).

En la cadena de producción de alimentos existen riesgos de infección por patógenos, por lo que se necesita un control microbiológico estricto para impedir que estos lleguen al consumidor.

2.2.2.1 Pre-cosecha

Se considera la fase más temprana de la cadena productiva e incluye siembra, cultivo, irrigación y tratamientos asociados con la producción de la planta madura.

La contaminación ocurre en la superficie del vegetal en la mayoría de los productos, sin embargo, existe evidencia de que los patógenos pueden ingresar por acción capilar en los espacios o hendiduras y/o en tejidos vegetales dañados durante la producción. La FDA (Food and Drug Administration) y USDA (United States Department of Agriculture) identifican numerosos factores de riesgo y áreas de control de contaminación microbiológica que deben implementarse en productos hortofrutícolas en etapa de pre-cosecha. Los documentos incluyen puntos como la calidad microbiológica del agua, uso de estiércol, manejo de animales y plagas; trazabilidad, limpieza,

sanitización y salud e higiene del trabajador. Las heces de animales domésticos, animales silvestres e insectos son una fuente potencial de contaminación animal.

Se ha documentado que el agua subterránea es menos probable de ser contaminada que las aguas superficiales, pues la calidad del agua superficial se afecta por los patrones de uso de la tierra en la cuenca. Estos patrones se pueden afectar por la presencia de heces de humanos y animales en el agua, tal como en el punto de origen (aguas residuales) y fuera del punto de origen, así como por la topografía y las fluctuaciones en las precipitaciones.

El tipo de irrigación utilizada también puede influir en la contaminación de hortalizas, ya que maximiza la exposición de la porción comestible del producto que pueden incrementar la probabilidad de contaminación. Las técnicas de goteo o sub-irrigación pueden minimizar la humectación de la porción comestible y, por lo tanto, disminuir la probabilidad de contaminación del producto.

Desafortunadamente, se hace amplio el uso de aguas residuales no tratadas para irrigación, especialmente en países en desarrollo, y el uso de estas aguas también puede incrementar el riesgo de contaminación de frutas y hortalizas. Además, las fuentes de contaminación indirecta podrían incluir las interacciones tróficas entre plantas y recolectores de plantas, como aves, mamíferos e insectos, ha adquirido interés como una fuente potencial de contaminación de frutas y hortalizas.

Los animales son un vehículo de contaminación y pueden acelerar la degradación de los productos agrícolas, reduciendo en gran medida a la calidad y la vida útil de los vegetales cuyo consumo es en fresco.

Los contaminantes también pueden introducirse en el suelo si la tierra se utilizó previamente para producción animal o vertederos industriales, o si se aplicaron biosólidos, lodos, estiércol como fertilizante o para disposición de residuos. El estiércol

es particularmente riesgoso, debido a que las heces de animales pueden contener patógenos que llegan a los vegetales cultivados en el campo. La cercanía del fertilizante al vegetal, contención inadecuada del abono y una composta incorrecta pueden incrementar el riesgo de contaminación del producto y además eliminar los beneficios del abono en términos de potenciación del crecimiento.

2.2.3 *Listeria* en el tejido vegetal

Existen numerosas fuentes de contaminación potencial, incluido el suelo, el agua de riego, el estiércol mal compostado y los animales en los alrededores. La adhesión es necesaria para que una bacteria colonice y potencialmente se internalice en las porciones comestibles de una planta, pero los mecanismos para que la adhesión se produzca no se han dilucidado bien para *Listeria monocytogenes*. Por ejemplo, Gorski et al. encontraron que los flagelos son necesarios para algunas, pero no todas las cepas, de *L. monocytogenes* para colonizar las plantas y que la aptitud de la colonización mejoró con la motilidad funcional de los flagelos.

Además, *L. monocytogenes* puede incorporarse en una biopelícula heterogénea formada por bacterias epífitas o formar su propia biopelícula en la superficie de una planta.

Una vez conectado, la persistencia en la planta depende parcialmente de la capacidad de la bacteria para sobrevivir a los factores estresantes ambientales (por ejemplo, la exposición a los rayos UV y las fluctuaciones de la temperatura), así como su capacidad para utilizar lixiviados de la planta como fuente de nutrientes. Las biopelículas y la colonización de micro sitios de plantas (por ejemplo, a lo largo de las venas o en espacios entre las células epidérmicas) proporcionan un entorno protector que puede

apoyar la proliferación microbiana. La internalización es otra forma más en que los patógenos transmitidos por los alimentos pueden obtener acceso a un ambiente protegido.

Por ejemplo, el tejido dañado, como un desgarro en la cutícula de la planta, podría proporcionar un sitio de entrada. Los sitios de entrada adicionales incluyen grietas en la cubierta de la semilla o lágrimas diminutas en el tejido de la raíz durante la germinación.

Las bacterias que están presentes cerca de las radículas germinantes están expuestas a exudados nutricionales de la planta en crecimiento, lo que puede estimular el crecimiento microbiano y aumentar el acceso a la planta (Deering, Oliver, & Shenoy, 2017).

Un estudio realizado por Deering, Oliver, & Shenoy, 2017, demostró la internalización de *Listeria monocytogenes* en semillas de lechuga romana cultivada en condiciones de invernadero, comprobando así que *Listeria* es capaz de vivir durante todas las etapas del crecimiento de la planta.

La bacteria puede ingresar en la planta a través de grietas en las capas envolventes de las semillas, por pequeños desgarros en el tejido de las raíces durante la germinación o a través de tejido vegetal dañado. Además de realizarlo rápidamente, apenas treinta minutos fueron suficientes, para dar lugar a la infección de las semillas expuestas a *L. monocytogenes*, de las que crecieron plantas contaminadas, capaces de albergar bacterias internalizadas.

Asimismo, la bacteria pudo perdurar en el vegetal hasta 60 días o hasta el momento de la cosecha, y encontrarse en todo el tejido de la planta. Los investigadores recalcaron que ésta puede ser una vía más de los patógenos asociados a alimentos para llegar a los consumidores, especialmente en alimentos listos para el consumo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Zona de estudio

El presente trabajo se realizó en los mercados mencionados a continuación: Mercado “Modelo” ubicado en la Calle Juan Cuglievan y la Avenida Arica, el Mercado Mayorista “Moshoqueque” ubicado en las Avenidas Dorado y Kennedy y por último el Mercado Mayorista “Los Pathos” ubicado en la Avenida Venezuela; pertenecientes a los distritos de Chiclayo y José Leonardo Ortiz respectivamente, en la Provincia de Chiclayo - Región Lambayeque, considerando únicamente los puestos donde se expenden hortalizas (Anexo 1).

3.1.2 Población

Estuvo constituida por todas las muestras de hortalizas frescas de *Lactuca sativa* L. (lechuga), *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (repollo), expendidos en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque. Mayo 2017 – Mayo 2018.

3.1.3 Tamaño de muestra

Se colectaron 90 unidades muestrales mediante el método de conveniencia según Alvitres (1997), donde se utilizaron los siguientes criterios de inclusión:

1. Hortalizas expendidas en el Mercado “Modelo”, Mercado Mayorista “Moshoqueque” y el Mercado Mayorista “Los Pathos” de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo respectivamente.
2. Verduras sin alteración de calidad orgánica.

Las 90 unidades muestrales de hortalizas fueron distribuidas a proporción de 30 muestras por mercado, a la vez repartidos en 10 unidades muestrales por cada tipo de hortaliza, ver Figura 1.

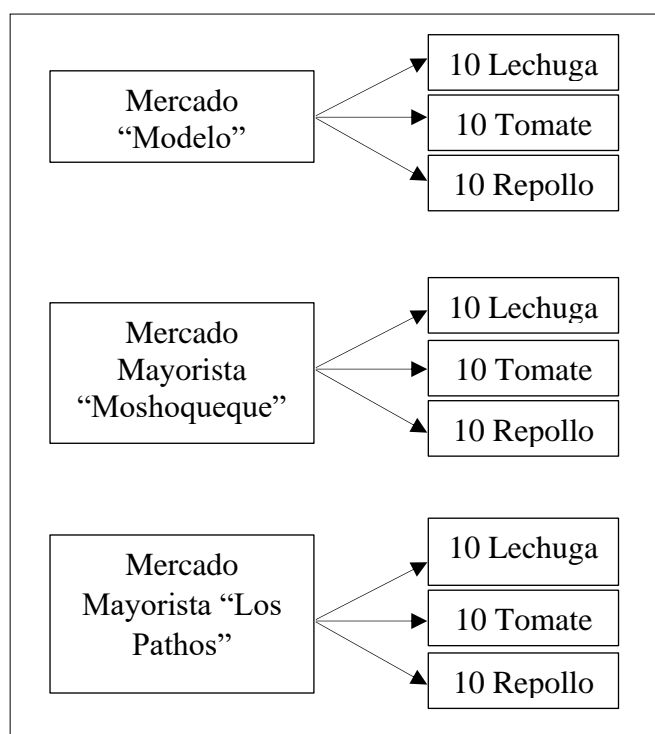


Figura 1. Distribución de las unidades muestrales

3.2 Métodos

3.2.1 Diseño de investigación: Diseño de una sola casilla

Se empleó ésta técnica, debido a que se usó un solo grupo con carácter “experimental”, en el cual las hortalizas tales como *Lactuca sativa* L. (lechuga), *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (repollo), constituyeron dicho grupo y donde se determinó la presencia o ausencia de *Listeria* sp.

3.2.2 Toma de muestra

Las muestras de *Lactuca sativa* L. (lechuga), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Brassica oleracea* L. var. *capitata* (repollo), fueron colectados de los mercados “Los Pathos” y “Moshoqueque” del distrito de José Leonardo Ortiz y el mercado “Modelo” del distrito de Chiclayo durante los meses de Marzo – Mayo del 2018.

El muestreo se realizó según la Norma Técnica Peruana NTP ISO 2859-1 2008 (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección Intelectual. INDECOPI, 2008), donde cada unidad muestral estuvo constituida por una planta entera

de lechuga, repollo y tomate las cuales fueron recolectadas asépticamente en bolsas de polietileno de primer uso (estériles), debidamente rotulados (Anexo 2) y transportados al Laboratorio de Microbiología de los Alimentos del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas - Lambayeque y procesadas dentro de las 12 horas siguientes.



Figura 2. Toma de muestra. **a.** Selección de hojas externas de repollo. **b.** Almacenamiento de muestra de repollo en bolsa de polietileno de primer uso. **c.** Sellado de la bolsa. **d.** Rotulado de muestras tomadas. **e y f.** Presentación de muestras selladas y rotuladas correctamente. **g y h.** Transporte de muestras en corcho con gel pack.

3.2.3 Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó aplicando la técnica descrita en ISO 11290-1:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria spp.* — Part 1: Detection method [Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria spp.* Parte 1: Método de detección] (Anexo 3).

A. Pre enriquecimiento

Se pesó asépticamente 25 g por cada muestra de lechuga y repollo, tomando las hojas externas; en el caso del tomate se consideró una unidad (los mismos que fueron obtenidos de las diversas áreas muestrales), las cuales se colocaron en una bolsa de polietileno estéril y fueron triturados empleando fuerza mecánica. Luego se agregó 225 ml de caldo semi concentrado Fraser (enriquecimiento primario), se homogeneizó durante dos minutos y luego se procedió a incubar a 30°C durante 25 h \pm 1h.





Figura 3. Pre enriquecimiento. **a.** Frascos de caldo Fraser semi concentrado. **b.** Pesado de 25 gr de muestra. **c y d.** Adición del suplemento de caldo Fraser. **e y f.** Vertido de 225 ml de caldo Fraser semi concentrado previamente suplementado. **g.** Muestras previamente homogenizadas lista para la incubación. **h.** Incubación de muestras a 30°C por 25h ± 1h.

B. Enriquecimiento:

Después de la incubación, se transfirió 0,1 ml de este medio de enriquecimiento primario a un tubo de dilución de 15x100 conteniendo 10ml de caldo Fraser concentrado (enriquecimiento secundario) y se incubó a 37°C durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$.

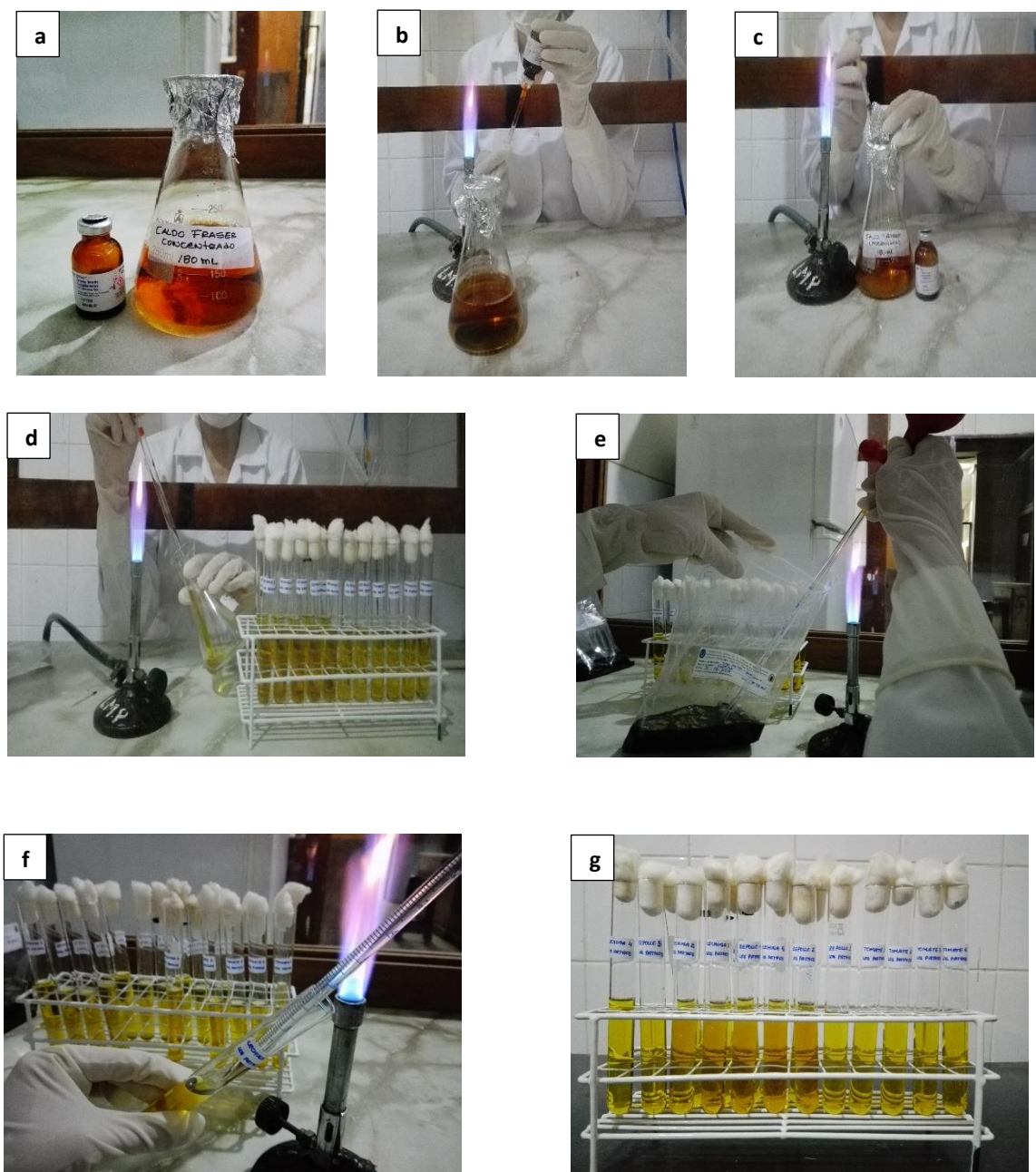


Figura 4. Enriquecimiento. **a, b y c.** Suplementado del caldo Fraser concentrado. **d.** Distribución de 10 ml de caldo por tubo. **e.** Extracción de 0.1 ml de alícuota de la muestra de enriquecimiento primario. **f.** Vertido y homogenización de alícuota al tubo de dilución conteniendo el caldo Fraser concentrado, previamente suplementado. **g.** Tubos inoculados listos para ser incubados a 37°C por $24\text{h} \pm 2\text{h}$.

C. Aislamiento:

Transcurridas las 24 horas de incubación del enriquecimiento primario, se tomó una asada del caldo de cada muestra y se sembró en doble placa y por estría en Agar Oxford y en Agar Palcam suplementado. Finalmente se incubó a 37°C de 24h- 48h.

De manera paralela a partir del enriquecimiento secundario, se tomó una asada de caldo por cada muestra y se sembró en doble placa y por estría en Agar Oxford y en Agar Palcam suplementado, luego se incubó a 37°C de 24h- 48h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron las características compatibles con *Listeria sp.*:

- **En Agar Palcam suplementado** las colonias de *Listeria sp.* aparecen pequeñas, redondas de coloración gris-verdosa rodeado con una precipitación o halo negro.
- **En Agar Oxford suplementado** la mayoría de las cepas de *L. monocytogenes* y otras *Listeria sp.* forman colonias redondas, color gris azulado de aproximadamente 1 mm de diámetro que está rodeado de un halo negro tras pasar 24 horas. Después de 48 horas, éstas colonias típicamente tienen un diámetro de 2 a 3 mm, permaneciendo negras con un halo negro, pero desarrollando un centro hundido.

La característica de ennegrecimiento es causada por la reacción positiva a la esculina exhibida por la *Listeria sp.*

En éstos medios todas las especies de *Listeria* crecen y presentan colonias del mismo aspecto. Por tanto, todos los aislados deben identificarse con los procedimientos bioquímicos.



Figura 5. Aislamiento. **a, b y c.** Presentación de Agar Oxford y Palcam, suplementado y servido de placas. **d.** Placas listas para sembrar luego de pasar control de 24hrs. **e.** Sembrado por estría del enriquecimiento primario y secundario. **f.** Placas de Agar Oxford y Palcam sembradas antes de incubar a 37°C de 24h- 48h. Oxford.

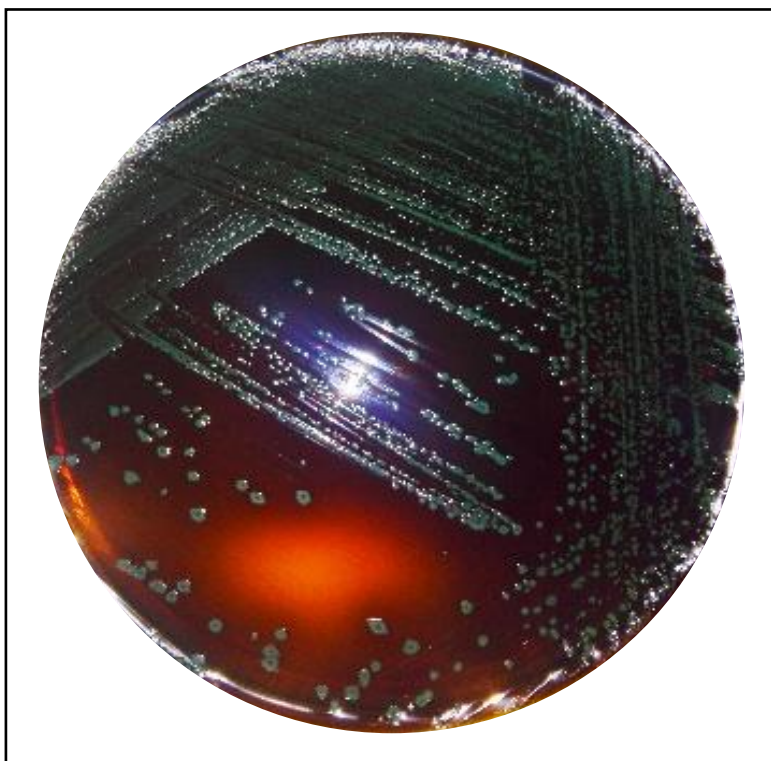


Figura 6. Observación macroscópica de colonias. Control positivo ATCC® 19114 *Listeria monocytogenes* 4a en Agar Palcam.

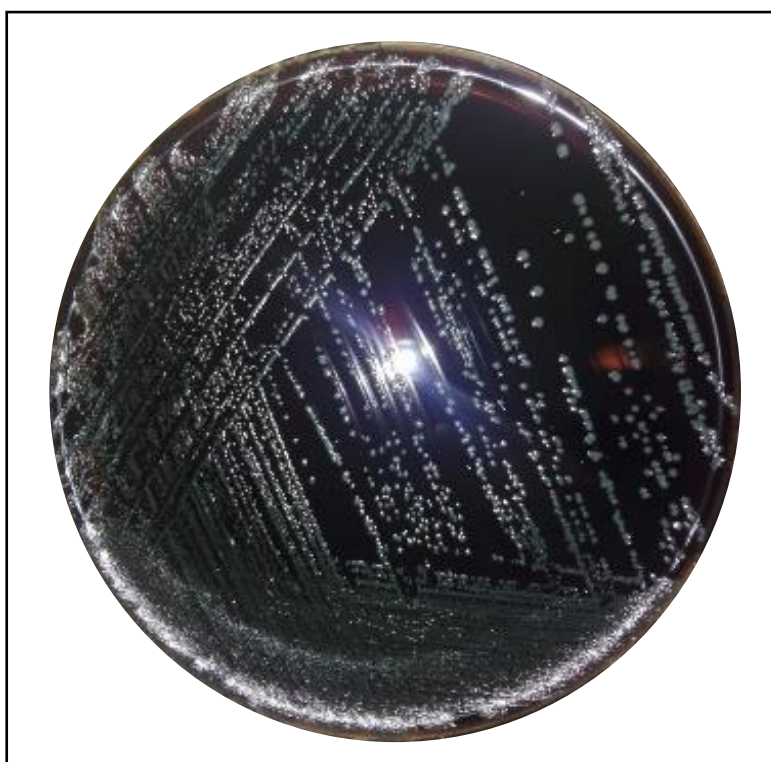


Figura 7. Observación macroscópica de colonias. Control positivo ATCC® 19114 *L. monocytogenes* 4a en Agar Oxford.

D. Selección de colonias sospechosas:

Se seleccionaron más de 5 colonias típicas aisladas compatibles con el género *Listeria*, las cuales se sembraron empleando la técnica de estriado en Agar Tripticasa Soya con 0,6% de extracto de levadura para aislamiento de las colonias.

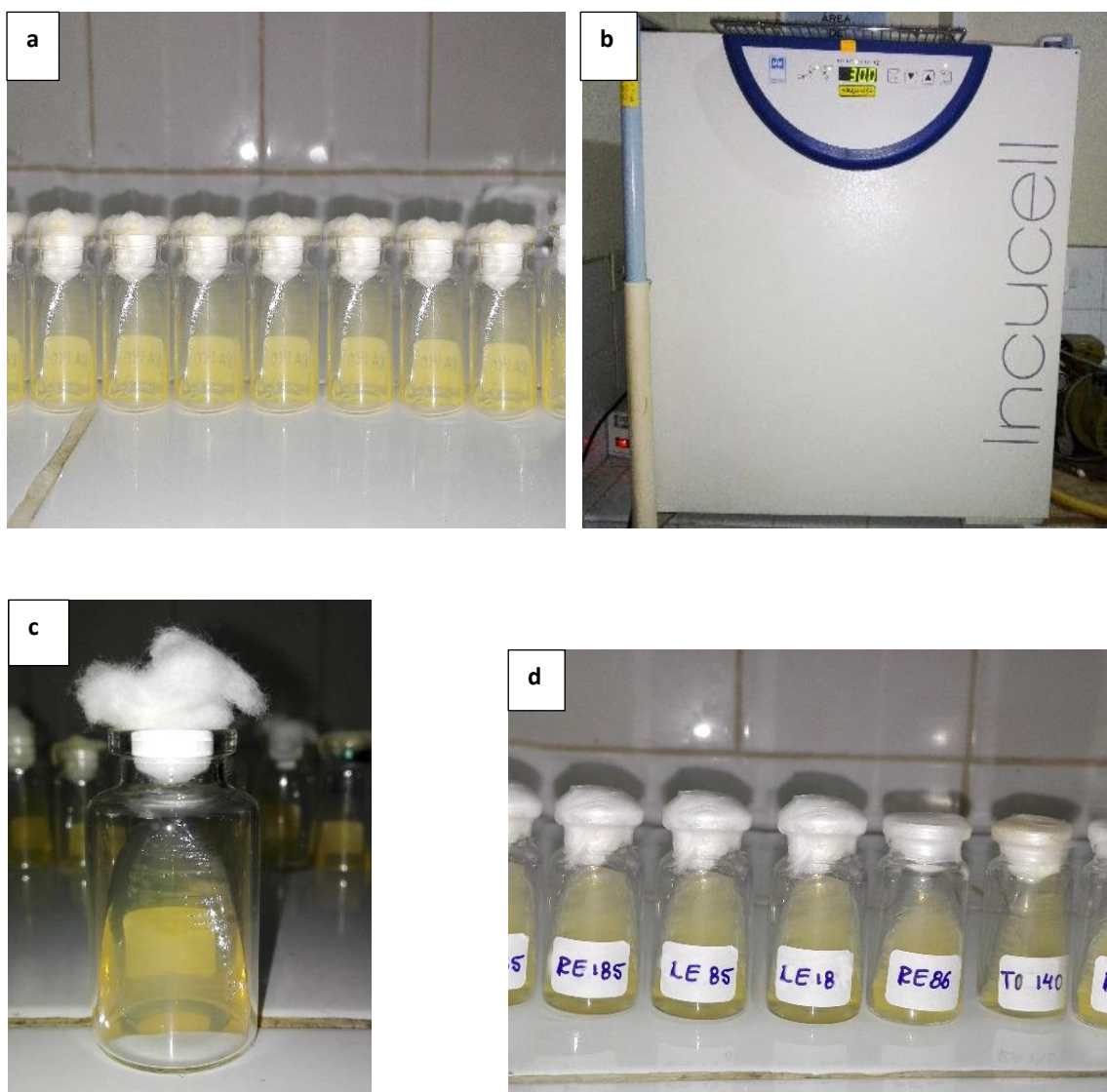


Figura 8. Siembra de las colonias sospechosas empleando la técnica de estriado en Agar Tripticasa Soya con 0,6% de extracto de levadura para su aislamiento. **a.** Viales servidos de Agar Tripticasa Soya con 0,6% de extracto de levadura **b.** Incubación a 37°C durante 48h. **c y d.** Viales luego de la incubación, obteniendo cultivos puros a los cuales se les realizó la confirmación de *Listeria sp.*

E. Confirmación de *Listeria sp.*

A las cepas sospechosas aisladas, se les realizó las pruebas de identificación para *Listeria sp.*, las que reaccionan de la siguiente forma: coloración Gram (bacilos Gram +), catalasa (+), VP (+), movilidad a 25 °C (+).

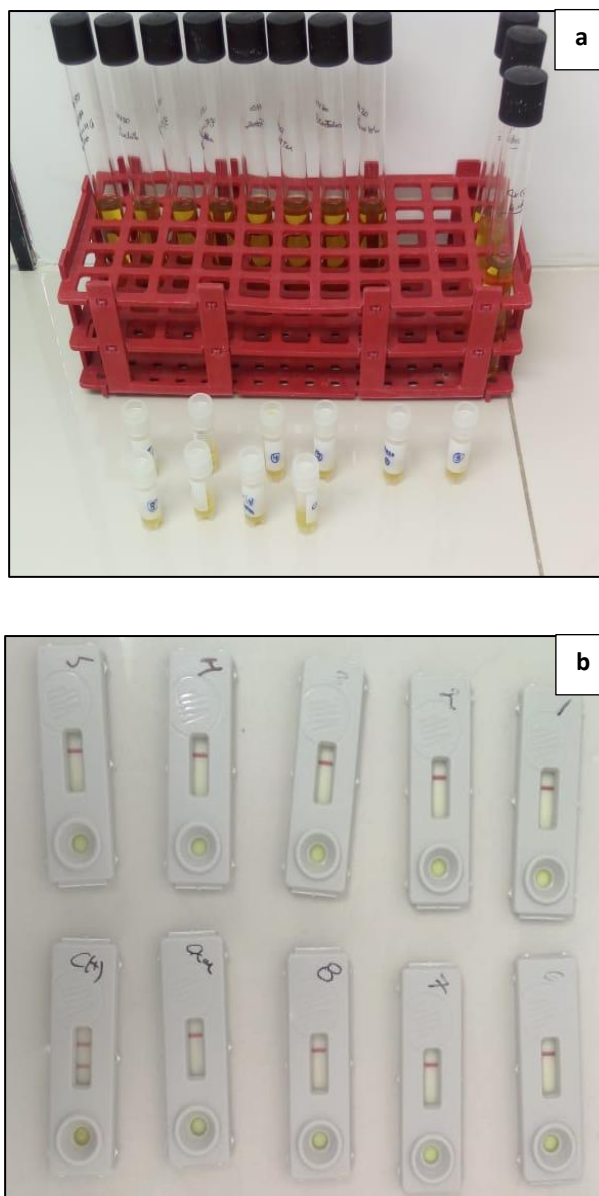


Figura 9. Identificación de cepas sospechosas. **a.** Cepas sospechosas cultivadas en caldo BHI. **b.** Cassetes para identificación de *Listeria sp.*

IV. RESULTADOS

El objetivo de esta investigación fue determinar la frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.

En el periodo de estudio Mayo del 2017 a Mayo del 2018, se analizaron 90 unidades muestrales de hortalizas distribuidas en proporciones iguales de 30 unidades de tomate, 30 unidades de lechuga y 30 unidades de repollo distribuidas en los mercados Modelo, Moshoqueque y Los Pathos de los distritos de Chiclayo y José Leonardo Ortiz respectivamente.

De las 90 unidades muestrales analizadas, se logró aislar *Listeria sp.* en una muestra de lechuga, equivalente a 1 unidad muestral (1.1%), procedente del mercado Moshoqueque ubicado en el distrito de José Leonardo Ortiz, tal como se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Presencia y ausencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo – Lambayeque. Mayo 2017 - Mayo 2018

N° de muestras	Resultados	Porcentaje
89	Ausencia en 25 gramos	98.9%
1	Presencia en 25 gramos	1.1%
90	Total de muestras	100%

Tabla 2. Aislamiento de *Listeria sp.* por tipo de mercado. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.

Mercado	Resultado	Porcentaje
Modelo	0	0.00
Moshoqueque	1	100%
Los Pathos	0	0.00

Respecto a la confirmación de *Listeria sp.*, ésta se realizó mediante pruebas bioquímicas, tales como la reacción a la prueba de Voges-Proskauer, detección de la presencia de la enzima catalasa y la prueba de motilidad a 25° C; evidenciando fermentación positiva, presencia de la enzima catalasa y finalmente un crecimiento positivo y característico del género en forma de sombrilla (Figuras 13; 14 y 15).

Además, se realizó la tinción Gram, donde se observaron bacilos cortos Gram positivos, con extremos redondeados en cadenas cortas y en empalizadas característicos de ésta bacteria (Figura 12).

La frecuencia de *Listeria sp.* en las muestras analizadas se observa en la Tabla 3, cuyos resultados determinaron que dicha bacteria posee baja frecuencia, lo cual fue evidenciado al estar presente únicamente en una unidad muestral obtenida a partir de lechuga (Figura 10).

Tabla 3. Frecuencia de *Listeria sp.* teniendo en cuenta el tipo de hortalizas expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018.

Tipo de hortalizas	Casos positivos		Casos negativos	
	N°	Porcentaje	N°	Porcentaje
Lechuga	1	1.1	29	32.2
Tomate	0	0.0	30	33.3
Repollo	0	0.0	30	33.3
Total	1	1.1	89	98.8

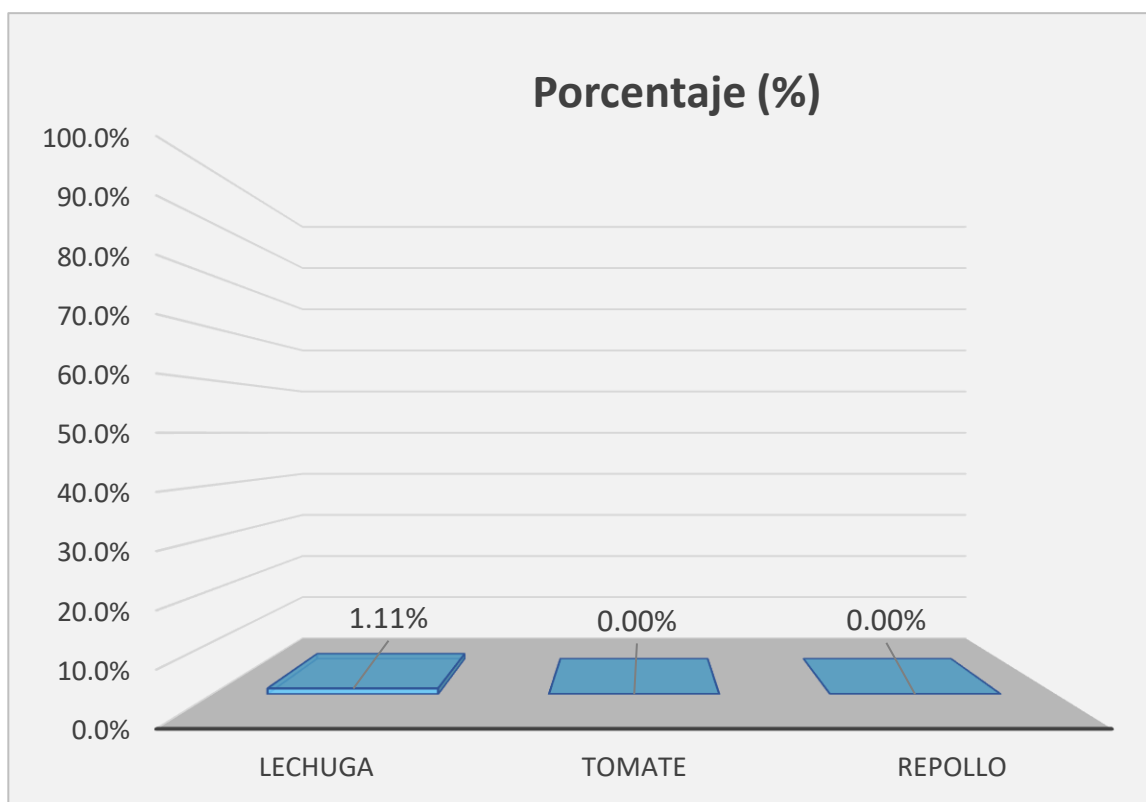


Figura 10. Frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas

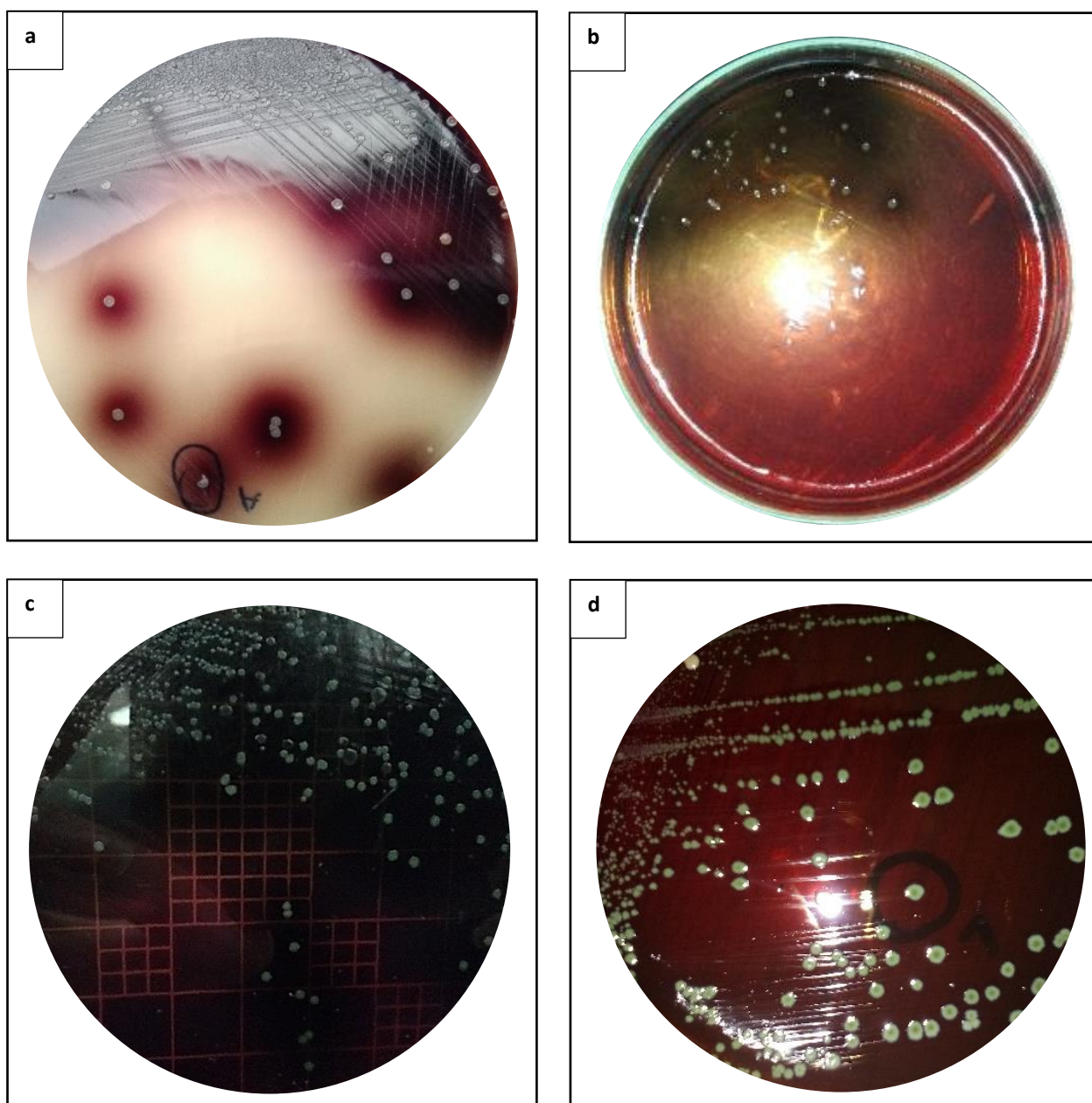


Figura 11. Colonias sospechosas. **a, b, c y d.** Colonias sospechosas, compatibles con el género *Listeria*.

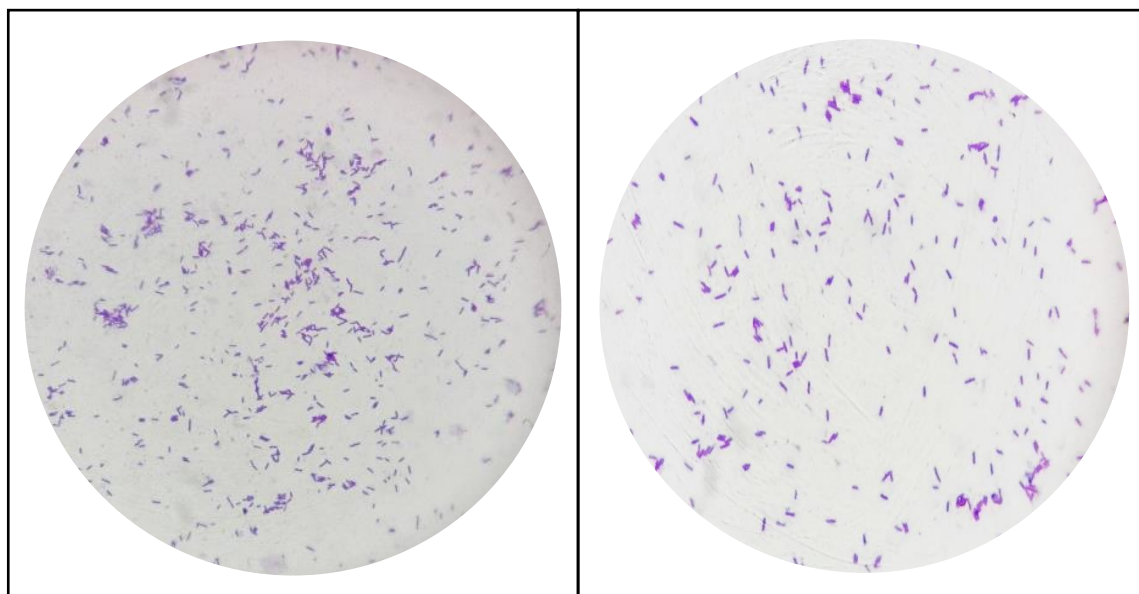


Figura 12. Observación microscópica del control positivo *Listeria monocytogenes* ATCC® 19114 4a (izquierda), cepa sospechosa confirmada para *Listeria sp.* (derecha).

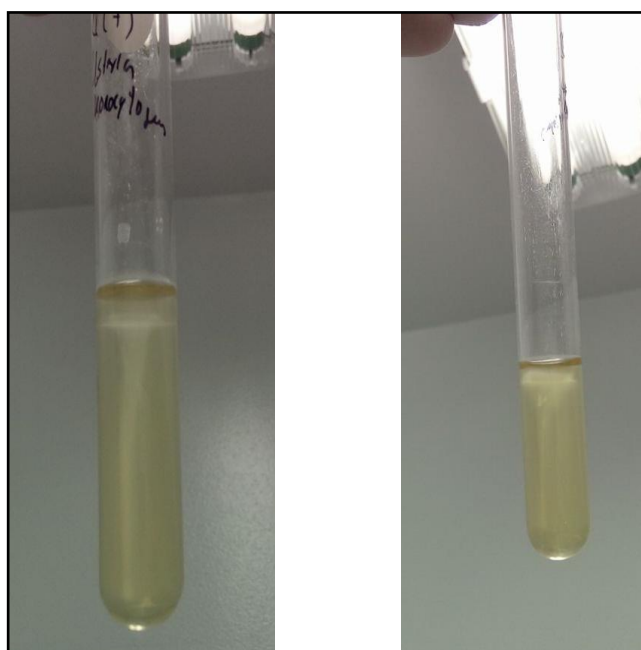


Figura 13. Prueba de motilidad a 25° C. Control de *Listeria monocytogenes* positivo (izquierda), motilidad positiva proveniente de colonia sospechosa (derecha)



Figura 14. Prueba de Voges-Proskauer. Control de *Listeria monocytogenes* positivo (izquierda), prueba positiva proveniente de colonia sospechosa (derecha)



Figura 15. Prueba de reducción de Catalasa. Control de *Listeria monocytogenes* positivo (izquierda), prueba positiva proveniente de colonia sospechosa (derecha)

V. DISCUSIÓN

Listeria sp. es una bacteria que posee gran habilidad para sobrevivir y crecer bajo condiciones adversas más que otras bacterias patógenas no esporuladoras transmitidas por alimentos; razón por la cual puede transmitirse por consumo de una amplia variedad de alimentos, particularmente en aquellos listos para el consumo, siendo las hortalizas los principales vehículos de transmisión

La presente investigación determinó la frecuencia de *Listeria sp.* en hortalizas de mayor consumo expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo 2017 - Mayo 2018 siendo de utilidad para posteriores investigaciones dado que no se encontraron datos relacionadas en la Región Lambayeque; así mismo a nivel nacional la importancia prestada a su estudio en hortalizas es muy baja, esto puede deberse a que la enfermedad es poco frecuente en la población general, sin embargo, debido a sus características de ubicuidad y gran adaptación a las condiciones del medio debería ser mejor investigada.

En la presente investigación se obtuvo una frecuencia de aislamiento de *Listeria sp.* del 1.1%, porcentaje menor a lo encontrado por Centurion & Takahara (2004) quienes reportaron la presencia de dicha bacteria en un 20.00% en muestras de lechuga y 9.1% de repollo. Asimismo, la investigación realizada por Martin (2007), reportó la presencia de *L. monocytogenes* en un 22.22% a partir de las mismas muestras; datos que difieren en gran porcentaje con lo logrado en la investigación; del mismo modo al reportado por Pérez y Chávez (2011) quienes determinaron una alta frecuencia de *L. monocytogenes*, reportando un 29,17% de positividad provenientes de muestras de lechugas y 10.42% de muestras de tomate, ésta diferencia se puede explicar básicamente teniendo en cuenta los

factores influyentes como las propiedades del sustrato, las condiciones de riego y manipulación por parte del agricultor, además, de las condiciones brindadas por los expendedores de los diferentes centros de abastos quienes por su afán de conservar y vender su producto a buen precio y en menor tiempo, realizan un procedimiento de desinfección con alguna sustancia clorada, como por ejemplo dióxido de cloro o algún otro desinfectante autorizado; y si se habla del efecto de la limpieza de hortalizas sobre *Listeria sp.*, se puede decir que la contaminación microbiana en éstas se localiza fundamentalmente en su superficie, ya que son las zonas de la corteza o las hojas más externas las que se encuentran más expuestas, de tal manera que se podría plantear que cuando las listerias se encuentran en bajas concentraciones, pueden ser eliminadas de las hortalizas con un adecuado proceso de limpieza, disminuyendo así la posibilidad de recuperación de la misma al momento de ser analizadas.

En otro estudio realizado por Chuah, Ling, Mohd, Mustapha, & Rusul (2016), se comprobó una alta frecuencia de *Listeria sp.*, a partir lechugas analizadas (24,0%), hallazgos que son afines a los reportados por Adelowo, Ajayeoba, Atanda, Bankole, & Obadina (2013), quienes luego de analizar muestras, entre ellas pepino, repollo, zanahoria, tomate y lechuga, lograron aislar *L. monocytogenes* en un 28,28% (repollo y lechuga), y 19.67% (tomate). De la misma forma, un estudio realizado por Abdullahi H. & Belmoh M. (2013), precisó el aislamiento de *L. monocytogenes* y otras especies luego de analizar muestras de repollo y de lechuga (11,3%), porcentajes que son notoriamente mayores a los obtenidos al finalizar ésta investigación, en este caso es posible un predominio de diferencia en los métodos de laboratorio desarrollados por cada autor durante las diferentes etapas del procedimiento, como en el enriquecimiento, aislamiento e identificación del mencionado microorganismo, esto complementado con técnicas más sofisticadas y sensibles; así mismo en la metodología empleada para la recolección de las

muestras, el número de muestras analizadas, las condiciones para la toma de muestra y antecedentes de brotes de listeriosis por país de origen. De tal modo que, en éste estudio se aplicaron Normas Técnicas Peruanas para la toma de muestra, igualmente, se utilizaron medios de cultivo de enriquecimiento como Caldo Fraser, Agar Oxford y Palcam como segundos medios.

El porcentaje de frecuencia de *Listeria sp.* en la presente investigación es menor a los obtenidos por Carrascal (2011) y Alfieri, Gamboa, Morón & Ramirez (2009) en más de un 50% de diferencia, porcentajes que superan en gran medida a lo obtenido; justificación que es semejante a lo ya explicado en párrafos anteriores.

La alta demanda de vegetales debido a su rápida cocción, su valor nutritivo, bajo valor calórico, hacen que estos productos formen parte de la dieta diaria de la población; si bien es conocido que los procesos de cocción en los vegetales antes de su consumo reducen el riesgo de contaminación, el problema se presenta cuando no se realiza dicho proceso o si éste es insuficiente (Centurion & Takahara, 2004).

Es importante tener en cuenta que las hortalizas son un producto alimenticio sin restricción para su consumo, de ahí la importancia de determinar la presencia de *Listeria sp.* en dichos productos, por tanto, los datos reportados en este estudio son entonces un primer acercamiento para avanzar en el conocimiento de la frecuencia de ésta bacteria en hortalizas expandidas en la región.

VI. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos se concluye que:

- Al término de la investigación se aisló el género *Listeria sp.* a partir de una muestra de lechuga.
- De las hortalizas (tomate, lechuga y repollo), expendidas en los mercados Modelo, Moshoqueque y Los Pathos de los distritos de Chiclayo y José Leonardo Ortiz respectivamente, se reportó baja frecuencia de *Listeria sp.* correspondiente al 1.1% de un total de 90 muestras, lo que no representa un riesgo para la salud de los consumidores.

VII. RECOMENDACIONES

- Utilizar otro tipo de hortalizas de mayor consumo tales como rabanito, espinaca y zanahoria.
- Aumentar el número de unidades muestrales para obtener una mayor cantidad de datos.
- Analizar el agua empleada para el riego de las hortalizas.
- Analizar el agua empleada para el lavado de las hortalizas durante su expendio en los mercados.
- Realizar hisopados de superficies vivas a los encargados del expendio de hortalizas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullahi H., K., & Belmoh M., A. (2013). Isolation of *Listeria monocytogenes* recovered from some ready-to-eat foods sold in Kano, north-western Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 8-12. doi:10.4314/bajopas.v7i2.2
- Adelowo, O. O., Ajayeoba, T. A., Atanda, O. O., Bankole, M. O., & Obadina, A. O. (2013). The incidence and distribution of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vegetables in South-Western Nigeria. *Food Science & Nutrition*, 1-8.
- Agencia Española de seguridad alimentaria y nutrición. (2009). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo asociado a la presencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco o congelado. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 27-40.
- Alfieri Graterol, A. Y., Gamboa, O., Morón de Salim, A., & Ramirez Mérida, L. G. (2009). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicum esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos entre supermercados de Valencia. Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(3), 318-324.
- Alvitres Castillo, V. (1997). *Método Científico: Planificación de la investigación*. Chiclayo: Ciencia.
- Calderón, G., Domínguez, W., Gutiérrez, G., Kooper, G., & Schneider, S. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socio económico*. Roma: FAO.
- Carrascal, A. K. (2011). Contaminación de hortalizas con *Listeria monocytogenes* - estudio de Bogotá. *Revista Alimentos Hoy*, 21(25), 38-39.
- Carrasco, E. (2007). Análisis del Riesgo Microbiológico: *Listeria monocytogenes* en ensaladas de IV gama. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Centurion, M., & Takahara, M. (2004). Determinación de incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidas en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Chuah, L.-O., Ling Tan, P., Mohd Esah, E., Mustapha Goni, A., & Rusul, G. (2016). Prevalence of *Listeria* species in raw leafy vegetables obtained from wet markets. *Food Technology Division*, 163.

- Deering, A. J., Oliver, H. F., & Shenoy, A. G. (2017). *Listeria monocytogenes* internalizes in romaine lettuce grown in greenhouse conditions. *Journal of Food Protection*, 573-581.
- Dood, C., Nwaiwu, O., & Rees, C. (2016). Risk of Listeria: A guide for Food Manufactures. Inglaterra.
- Ferrato, J., & Mondino, M. (2008). *Producción, consumo y Comercialización de Hortalizas en el Mundo*. Buenos Aires: Universidad Nacional del Rosario.
- Hussain, M. A., & Zhu, Q. (2014). Prevalence of Listeria species in Fresh Salad Vegetables and Ready-to-eat Foods Containing Fresh Produce Marketed in Canterbury, New Zealand. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences Open Journal*, 1(1), 5-9.
- Hussain, M. A., Gooneratne, R., & Zhu, Q. (2016). Detection of Listeria Species in Fresh Produce Samples from Different Retail Shops in Caterbury, New Zealand. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences Open Journal*, 2(3), 96-102. doi:10.17140/AFTNSOJ-2-135
- Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección Intelectual. INDECOPI. (2008). NORMA TÉCNICA PERUANA NTP-ISO 2859-1 2008. *Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte 1: Esquemas de muestreo calificados por límite de calidad aceptable (LCA) para inspección lote por lote*. Lima, Perú.
- International Commision on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF. (2001). *Microorganismos de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico* (6 ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- López Orbegoso, J., Rivera Jacinto, M., & Rodríguez Ulloa, C. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Perú Med Exp Salud Pública*, 45-48.
- Martin Alva, E. A. (2007). *Listeria monocytogenes* en repollo y lechuga como vehículo de transmisión de listeriosis humana. Mercados la Hermelinda, Central y Palermo de Trujillo - Perú 2006-2007. Trujillo, Perú.
- OMS. (Febrero de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/>

- Ortiz Jareño, M. (2016). Diversidad genética y persistencia ambiental de *Listeria monocytogenes* en dos plantas de proceso de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario. Madrid, España.
- Pérez Rodríguez, E. G. & Chávez Castillo, M., (2011). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expendidos en mercados de Trujillo. *Ciencia y Tecnología*.
- Vila Brugalla, M. (2014). *Listeria monocytogenes* en comidas preparadas. *eurocarne*, 69-79.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Ubicación geográfica de la zona de muestreo



Figura 16. Mapa satelital del mercado “Modelo”, Chiclayo. Tomado de Google Maps Copyright 2017.



Figura 17. Mapa satelital del mercado mayorista “Moshoqueque”, José Leonardo Ortiz. Tomado de Google Maps Copyright 2017.

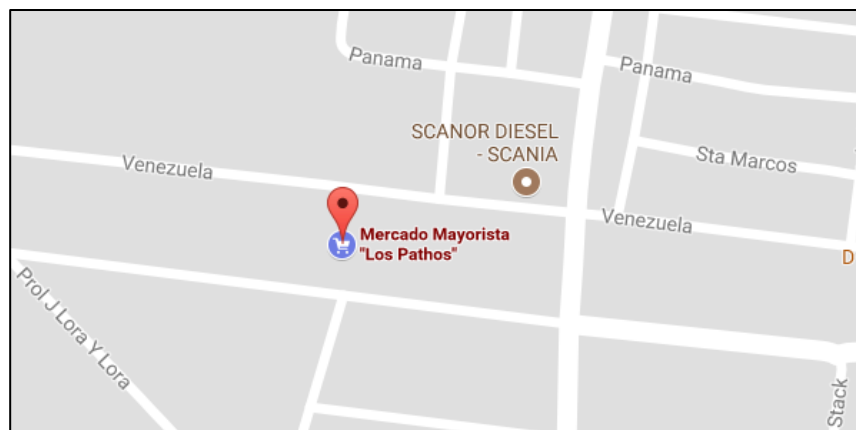


Figura 18. Mapa satelital del mercado mayorista “Los Pathos”, José Leonardo Ortiz. Tomado de Google Maps Copyright 2017.

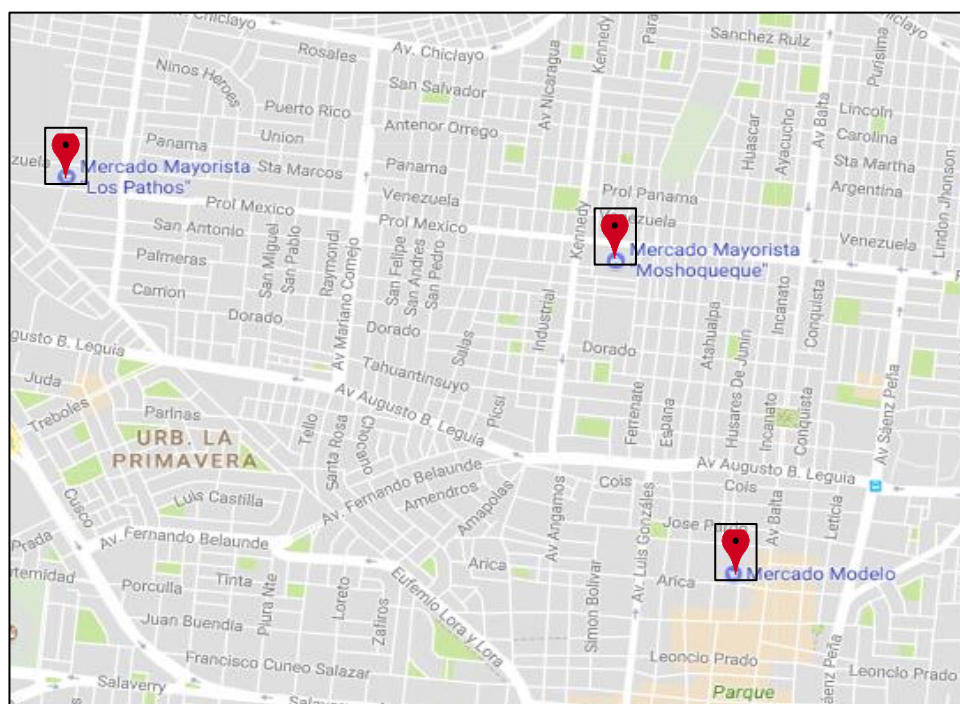


Figura 19. Mapa satelital mostrando la ubicación del mercado mayorista “Moshoqueque” y “Los Pathos”, distrito de José Leonardo Ortiz y del mercado “Modelo”, distrito de Chiclayo. Tomado de Google Maps Copyright 2017.

Anexo 2. Rotulado de muestras



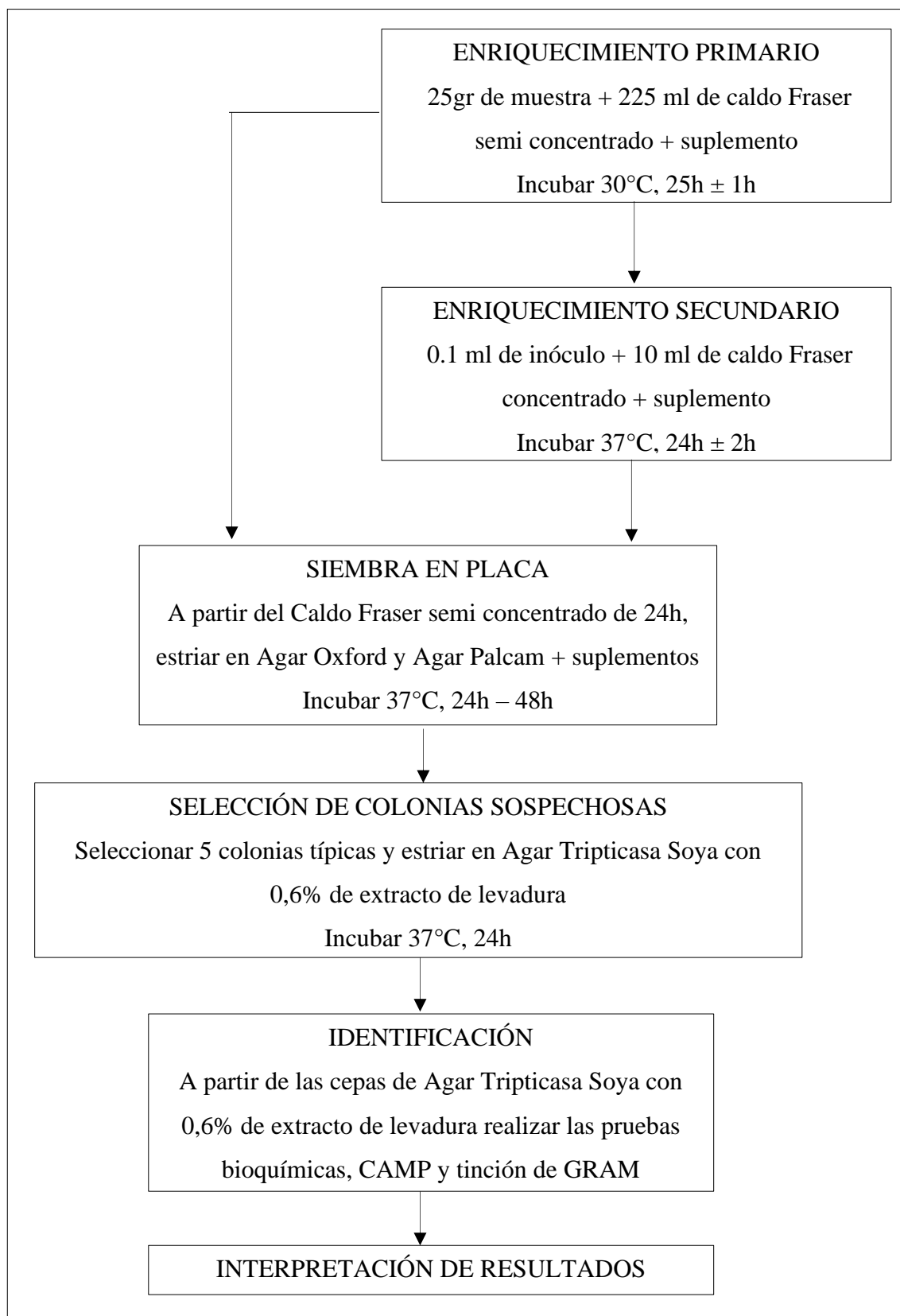
	<p>“Frecuencia de <i>Listeria sp.</i> en hortalizas de mayor consumo expendidas en los mercados de los distritos de José Leonardo Ortiz y Chiclayo. Lambayeque Mayo 2017- Mayo 2018”.</p>	
<p>Nombre del mercado: _____ Puesto N° _____</p>		
<p>Tipo de hortaliza: _____</p>		
<p>Fecha: ____/____/____ Hora: _____</p>		
<p>Nombre del responsable del muestreo:</p> <p>_____</p>		

Figura 20. Formato de rotulado de la muestra.

Anexo 3. Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.*



Anexo 4. Indicador químico externo para esterilización a calor seco en cinta adhesiva 3M



Instrucciones de uso:

- Desenrolle una sección de la cinta indicadora a calor seco 1226 Comply de aproximadamente 20-30 cm de largo. Envuelva cada paquete según sea requerido.
- Coloque un extremo de la cinta indicadora en el paquete y aplique presión con los dedos a lo largo de esta para asegurar la unión.
- No estire la cinta a través del paquete puesto que puede causar su rotura.
- Después de la esterilización deje que los paquetes se enfrien según procedimientos establecidos antes de romper el sello de la cinta.
- La cinta está diseñada para adherirse a una variedad de materiales, incluyendo tejidos, metal y papel.

Interpretación de resultados:

- Las líneas de indicador químico de la cinta 1226 Comply virarán de un color verde claro a un color marrón claro luego de que hayan sido expuestas a condiciones de esterilización a calor seco y que se haya superado, según las normas internacionales, los 155°C de temperatura.
- Un cambio de color incompleto puede indicar un proceso inadecuado de esterilización.

Almacenamiento:

- Conservar en lugar seco (50% H.R.) con una temperatura entre (15-30°C) y proteger de la luz.

Tiempo de vida:

- La cinta 1226 Comply está cubierta por una garantía general de 24 meses por cualquier defecto de fábrica.
- La cinta tiene una vida de 24 meses desde su fecha de fabricación cuando esta almacenada según las condiciones anteriormente indicadas.

Precaución:

- No utilice esta cinta para otro tipo de esterilización que no sea a calor seco.

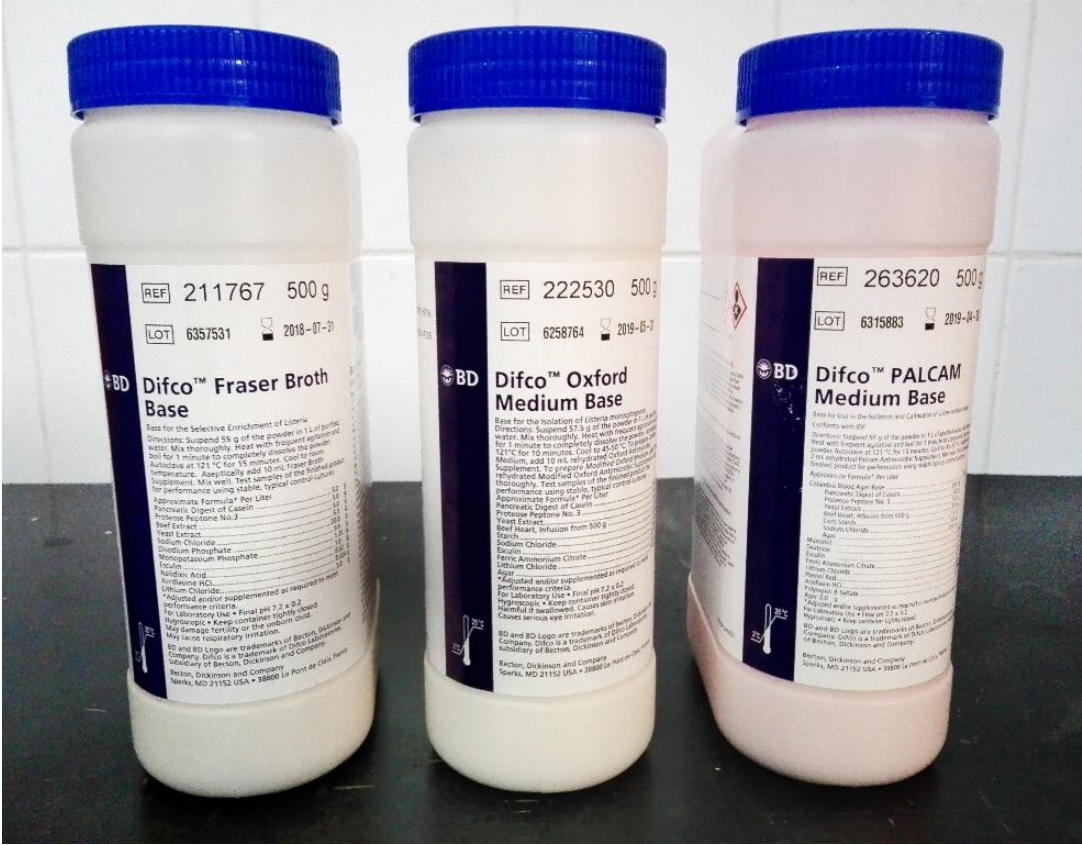
7 750373 149822 >

Lote	Vencimiento	Fabricado por Sicad SPA Via Caduti Liberazione 57 21040 Uboldo (VA) Italia
213	12-2019	

Anexo 5. Indicador químico 1250 3M Comply™ – Tiras para esterilización por vapor




Anexo 6. Medios de cultivo Difco ®



Anexo 7. Suplementos para Agar Palcam, Agar Oxford y Caldo Fraser marca Difco ®

Anexo 8. Hoja de descripción VIP® Gold *Listeria* - BIOCONTROL



VIP® Gold for *Listeria*

AOAC Official Method 997.03
AOAC Performance Tested Method (60801)

BIOCONTROL

Results. Right now.

GENERAL DESCRIPTION

VIP® Gold for *Listeria* is a single-step visual immunoassay for the detection of *Listeria* in food and environmental samples. Each device contains a proprietary reagent system, which forms a visually apparent antigen-antibody-chromogen complex if *Listeria* is present. The test is intended for use by laboratory personnel with appropriate microbiology training.

Part No: 60037-40 (40 tests)

KIT COMPONENTS

Each VIP Gold for *Listeria* kit contains the following:
VIP Gold for *Listeria* test devices

EQUIPMENT / MATERIALS REQUIRED

Other necessary materials not provided include:

- Media per Appendix A
- Autoclave
- Vortex mixer
- Analytical balance, tolerance ± 0.2 g
- Stomacher / Masticator machine
- Stomacher-type bags with filter or equivalent
- Incubator capable of maintaining 29 - 31 °C
- Water bath capable of maintaining 95 - 105 °C or equivalent (e.g. autoclave with flowing steam, dry heater)
- Micropipette(s) capable of delivering 0.1 mL and 1.0 mL

SAMPLE PREPARATION

A. Test Portion Preparation & Enrichment

Two Step Enrichment Protocol (AOAC OMA 997.03)
for meat, poultry, seafood, vegetables, dairy products, eggs, pasta, animal meal, nuts and environmental samples.

- (a) **Food samples** Add 25 g test portion to 225 mL of modified Fraser Broth with lithium chloride (mFB+LiCl) (Appendix A). Stomach / masticate for 2 min and incubate 28 h (26 - 30 h) at 30 °C (29 - 31 °C).
- (b) **Environmental samples** Add 60 mL of mFB+LiCl to sample bag containing environmental sponge sample. Ensure that the sponge is oriented horizontally in the sample bag. If using a swab, add environmental swab sample to 10 mL of mFB+LiCl. Mix well and incubate 28 h (26-30 h) at 30 °C (29 - 31 °C).
- (c) Transfer 1 mL incubated mFB+LiCl to 9 mL Buffered *Listeria* Enrichment Broth (BLEB) (Appendix A). Mix thoroughly with vortex mixer. Incubate 24 h (22 - 26 h) at 30 °C (29 - 31 °C).

Single Step Enrichment Protocol (AOAC PTM 060801)
for meat, poultry, seafood, vegetables, dairy products, and environmental samples.

- (a) **Food samples** Add 25 g test portion to 225 mL of Demi-Fraser Broth (DFB) (Appendix A). Stomach / masticate for 2 minutes and incubate 48 h (46 - 54 h) at 30 °C (29 - 31 °C).
- (b) **Environmental samples** Add 100 mL of DFB to sample bag containing environmental sponge sample. Ensure that the sponge is oriented horizontally in the sample bag. If using a swab, add environmental swab sample to 10 mL of DFB. Mix well and incubate 48 h (46 - 54 h) at 30 °C (29 - 31 °C).

Note: Retain original BLEB or DFB tubes under refrigeration (2 - 8 °C). Use for confirmation of presumptive positive results.

B. Sample Inactivation

- (a) Vortex mix incubated sample. Transfer 1.0 mL incubated BLEB or DFB to a clean test tube.
- (b) Inactivate microorganisms at 100 °C (95 - 105 °C) for 5 min in a water bath, autoclave or dry heater.
- (c) Cool tubes to 25 - 37 °C before testing. Tubes that have been inactivated can be stored for up to 4 days at 2 - 8 °C prior to testing.

TEST PROCEDURE

- (a) Open the sealed foil pouch containing the VIP Gold devices and remove the sheet of test devices. Break away the necessary number of devices, one device for each test portion.
- (b) VIP Gold units may not be reused. Reseal unused VIP Gold units in pouch containing desiccant. Store at room temperature (15 - 30 °C).
- (c) Enriched broths should be equilibrated to 25 - 37 °C prior to running the test.
- (d) Vortex mix contents. Transfer 0.1 mL of inactivated BLEB or DFB to sample addition well. Avoid transferring particulate matter to the device.
- (e) Incubate device at room temperature (15 - 30 °C) for 10 min.


RESULTS

Note: Examine test unit at 10 min. Beyond this time faint lines may develop because of non-specific color development and should be disregarded.

- (a) Examine VIP Gold unit for the presence of distinct detection lines in both test sample and test verification zone. Lines should be dark when contrasted with white background and should extend across the zone. Intensity of test sample and test verification lines may differ.

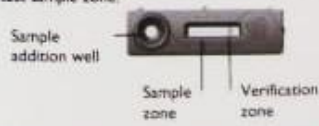
Absence of a test verification line indicates an invalid test result. Contact BioControl Technical Services at (800) 245-0113.

- (b) Test sample is considered **positive** when lines are present in the test sample zone and in the test verification zone.



Sample addition well Sample zone Verification zone

- (c) Test sample is considered **negative** when a line is present in the test verification zone and no line is seen in the test sample zone.



Sample addition well Sample zone Verification zone

- (d) Positive and negative control cultures should be run to familiarize the analyst with the results interpretation.

Page 1

Anexo 9. ATCC® 19114 *Listeria monocytogenes* 4a - KwikSTIK