

Presencia de microorganismos patógenos en hortalizas de consumo crudo en Costa Rica

Rafael Monge¹, y María Laura Arias²

RESUMEN. Se informa sobre la presencia de seis microorganismos patógenos en hortalizas que habitualmente se consumen crudos en Costa Rica. La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. se evidenciaron en el 5,2% (4/80) de las muestras de hojas de culantro, 8,7% (7/80) de las muestras de la raíz de ese vegetal y en el 2,5% (2/80) de las muestras de lechuga. En el 1,2% de las otras hortalizas estudiadas (zanahoria, pepino, rábano y tomate) se hallaron las formas de resistencia de ese coccidio. *Cryptosporidium* sp. no se encontró en repollo. Los quistes de *Giardia intestinalis* se encontraron en el 5,2% (4/80) y 2,5% (2/80) de las muestras de hojas y raíz de culantro, respectivamente. Las formas quísticas de *Entamoeba histolytica*, se observaron en el 6,2% (5/80) y 2,5% (2/80) de las muestras de hojas y raíz de culantro respectivamente. Asimismo, este protozoario se encontró en el 3,8% (3/80) y 2,5% (2/80) de las muestras de lechuga y rábano. En las otras hortalizas (zanahoria, pepino, repollo y tomate), estas amebas se evidenciaron en menos del 2% de las muestras. *Listeria monocytogenes* fue aislada en el 20% (10/50) de las muestras de ensalada de repollo. Virus de Hepatitis A y Rotavirus se evidenciaron en tres de los 10 grupos de lechuga analizados, sugiriendo esto, que al menos, tres muestras estaban contaminadas con tales partículas virales.

SUMMARY. Occurrence of some pathogenic microorganisms in fresh vegetables in Costa Rica. This study reports the occurrence of some pathogenic microorganisms in vegetables consumed on a daily basis by Costa Ricans. *Cryptosporidium* sp. oocysts were found in 5,2% (4/80) of cilantro leaves, in 8,7% (7/80) of cilantro roots and 2,5% of lettuce samples. A 1,2% (1/80) incidence was found in other vegetables samples (carrot, cucumber, radish and tomatoe). Oocysts of this parasite were absent in cabbage. *Giardia intestinalis* was only detected in 5,2% (4/80) of cilantro leaves and in 2,5% (2/80) of cilantro roots. *Entamoeba histolytica* cysts were found in 6,2% (5/80) of cilantro leaves, in 2,5% (2/80) cilantro roots, in 3,8% (3/80) lettuce and in 2,5% (2/80) radish samples. At least a 2% incidence of this amoeba was found in other vegetable samples (carrot, cucumber, cabbage and tomatoe). *Listeria monocytogenes* was isolated in 20% (10/50) of the samples of cabbage salad. Hepatitis A virus and Rotavirus were evidenced in three of the lettuce pools, suggesting that at least three of the samples were contaminated with these viruses.

INTRODUCCION

Costa Rica, durante los últimos años ha experimentado un cambio importante en el perfil epidemiológico, resaltando el incremento en las tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular y cáncer (1). Como estrategia para la prevención de estas enfermedades crónicas, se ha promovido el consumo de hortalizas, a fin de mejorar la ingestión de fibra y agentes antioxidantes como vitamina C y β-carotenos.

No obstante hortalizas como apio, lechuga, repollo y otras que habitualmente se consumen crudas, han sido identificadas en diversos brotes de diarrea y listeriosis como vehículos de *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp. *Listeria monocytogenes*, virus de Hepatitis A, Rotavirus, Norwalk y otros microorganismos patógenos (2-6).

Asimismo, en esos alimentos se ha evidenciado la presencia de huevecillos de *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichuria*, así como quistes de *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis* (8), confirmando el importante papel que las hortalizas desempeñan en la epidemiología de las parasitosis.

En Costa Rica, para 1995 la tasa de enfermedad diarreica fue de 20 por 1000 habitantes (9). Sin embargo, el número de casos asociados a microorganismos propagados por alimentos se descono-

ce, pues en el país no existe un programa de vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos.

Considerando lo anterior y dado que el tiempo de sobrevivencia de los microorganismos patógenos puede ser tan prolongado como para alcanzar en forma viable al consumidor (10), este estudio se propuso determinar la presencia de *Cryptosporidium*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Listeria monocytogenes*, Rotavirus y Virus de Hepatitis A en hortalizas que habitualmente se consumen crudas en Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS

Muestras: La determinación de *Cryptosporidium*, *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica* se realizó en 80 muestras de cada una de las hortalizas que más frecuentemente se consumen crudas en Costa Rica: repollo (*Brassica oleracea*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (*Lactuca sativa*), pepino (*Cucumis sativus*), zanahoria (*Daucus carota*), rábano (*Raphanus sativus*) y culantro (*Coleandrum sativum*). Las muestras fueron obtenidas durante un año, en ocho mercados abiertos (ferias del agricultor) del área metropolitana de San José. Posteriormente en esos mismos sitios se obtuvo 80 muestras de lechuga para la determinación de virus de hepatitis A y Rotavirus.

La presencia de *Listeria monocytogenes* se estudió en 50 muestras de repollo picado preempacado y expandido en supermercados de la capital costarricense. El muestreo se efectuó durante cuatro meses consecutivos.

1 Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud

2 Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

Análisis microbiológico:

a. Identificación de protozoarios: Las muestras se procesaron por la técnica de lavado (11), con un volumen de solución salina (NaCl 0,85%) equivalente al doble del peso de cada hortaliza. El líquido de lavado se centrifugó a 500 G por 30 min y se observó el sedimento en lugol para evidenciar las formas quísticas de *Entamoeba histolytica*. Así mismo, una porción del sedimento se utilizó para la identificación, mediante inmunofluorescencia, de *Giardia intestinalis*. Para esto se usó un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína (Biovar, Lote # 901). El diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. se efectuó aplicando la tinción de Koster modificada (12) a una alícuota del sedimento.

b. Determinación de partículas virales: Se formaron dieciséis grupos compuestos por cinco unidades de lechuga cada uno y se procesaron por la técnica de lavado. El líquido se centrifugó a 2000 G por 20 minutos y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100000 G por una hora. El sedimento obtenido fue resuspendido en agua destilada hasta obtener un volumen final cercano a los 250 0l.

Para evidenciar la presencia de rotavirus cada sedimento fue analizado por pruebas inmunoabsorbentes de enzimas conjugadas (ELISA) (13) y para la determinación de virus de Hepatitis A se utilizó radio inmunoensayo (RIA) (14) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (15).

c. Aislamiento de *Listeria monocytogenes*: Luego de

homogeneizar la muestra, 25 gramos de esta se agregaron a 225 ml del caldo de enriquecimiento UVM (University of Vermont Modified Medium) modificado y se incubó a 30 °C por 24 ± 2 horas. Transcurrido este tiempo, 0,1 ml del caldo UVM se transfirió a 10 ml de caldo Fraser y se incubó a 37 °C por 26 ± 2 horas. Posteriormente, de los tubos que mostraran oxidación de la esculina, se tomó una asada y se sembró por rayado en placas de agar Oxford. Estas se incubaron por 24-48 horas a 37 °C, después de lo cual fueron evaluadas para la determinación de las colonias típicas de *Listeria*.

El aislamiento de *Listeria monocytogenes*, se confirmó por luz de Henry, morfología, tinción de Gram, movilidad, propiedades β hemolíticas, CAMP-*Staphylococcus aureus* y utilización de Xilosa y Rhamnosa.

RESULTADOS

El porcentaje de positividad de las hortalizas según tipo de microorganismo evidenciado se presenta en la Tabla 1. Las formas quísticas de *Entamoeba histolytica*, fueron evidenciadas en el 6,2% (5/8) y 5,2% (4/80) de las muestras de hojas y raíz de culantro respectivamente. Así mismo, este protozoario se encontró en el 3,8% (3/80) y 2,4% (2/80) de las muestras de lechuga y rábano. En las otras hortalizas (zanahoria, pepino, repollo y tomate), estas amebas se evidenciaron en menos del 2% (2/80) de las muestras.

TABLA 1
Porcentaje de positividad de las hortalizas según microorganismos evidenciado

Microorganismo	Culantro hojas	Culantro raíz	Lechuga	Tomate	Pepino	Rábano	Repollo entero ^a	Repollo picado ^b	Zanahoria
<i>Cryptosporidium</i> ^a	5,2	8,7	2,3	1,2	1,2	1,2	0	NI	1,2
<i>G. intestinalis</i> ^a	2,5	5,2	0	0	0	0	0	NI	0
<i>E. histolytica</i> ^a	6,2	5,2	3,8	0	0	2,4	1,3	NI	0
<i>L. monocytogenes</i> ^b	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	20	NI
Hepatitis A ^c	NI	NI	2	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Rotavirus ^c	NI	NI	2	NI	NI	NI	NI	NI	NI

^a n= 80, ^b n=50, ^c n=80

NI = No investigado

Los quistes de *G. intestinalis* se observaron en el 2,5% (2/80) y 5,2% (4/80) de las muestras de hojas y raíz de culantro, respectivamente y los ooquistes de *Cryptosporidium* sp en el 5,2% (4/80) y 8,7% (7/80) de las muestras de hojas y raíz de ese mismo vegetal. En menos del 3% (2/80) de las otras hortalizas estudiadas se hallaron las formas de resistencia de ese coccidio. *Cryptosporidium* sp no se encontró en repollo.

La presencia de rotavirus y virus de Hepatitis A se demostró en tres de los grupos de lechuga, sugiriendo esto que al menos un 2% (3/80) de las muestras estaban contaminadas con esas partículas virales.

Listeria monocytogenes se aisló del 20% (10/50) de las muestras repollo picado preempacado.

DISCUSION

Varios investigadores han concluido que el uso de materia fecal como fertilizante, así como la utilización de aguas residuales para la irrigación constituyen las principales fuentes de contaminación de hortalizas (10,16).

En Costa Rica, un alto porcentaje de las aguas utilizadas para irrigación, no satisface la recomendación sanitaria dictada por la FAO/OMS (17), que establece como aceptable un nivel máximo de 10³ coliformes fecales/ 100 ml (2). Esta situación podría ser la causa más importante de contaminación en los productos hortícolas evaluados, pues el uso de materia fecal como fertilizante no es una práctica común en el país.

Aun cuando el origen de los microorganismos patógenos hallados, es sumamente difícil de definir, la presencia de estos pone en evidencia el peligro potencial que las hortalizas representan para la salud pública, pues se ha demostrado que las formas quísticas de *Cryptosporidium* sp, provenientes de animales domésticos como perros, gatos, ganado bovino y caprino y de animales silvestres como castores, ratones y ratas almizcleras, pueden causar diarreas importantes en humanos, principalmente en aquellos inmunosupresos (18-20). Una situación similar ocurre con las formas quísticas de *E. histolytica* provenientes de gatos y perros (21) y con los quistes de *G. intestinalis* derivados de perros, castores y ganado vacuno y caprino (22,23).

La presencia de *Listeria monocytogenes* podría explicarse en torno a su amplia distribución en la naturaleza (24) o bien a su presencia en las aguas de irrigación, pues esta bacteria ha sido aislada de las heces de diferentes animales domésticos y silvestres (25). No obstante, independientemente de su origen, cada cepa de *L. monocytogenes* es considerada capaz de causar, meningoencefalitis, sepsis, granulomatosis infantiséptica e infecciones durante el embarazo (26).

Considerando que los patógenos mencionados han sido aislados de diversos mamíferos, se podría asumir que la contaminación hallada obedece a la presencia de materia fecal animal en las aguas de irrigación; sin embargo la presencia de rotavirus y virus de Hepatitis A en lechuga, sugiere una importante asociación con excretas humanas, ya que solamente los primates son reservorios de estas partículas virales (26).

Ante nuestros resultados y dada la alta resistencia de *L. monocytogenes*, así como de las formas quísticas de *G. intestinales*, *E. histolytica* y *Cryptosporidium* sp al cloro (26-29), agente químico usualmente utilizado en la desinfección de vegetales, es necesario considerar la omisión de hortalizas de consumo crudo en los planes de alimentación de pacientes con cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida u otras patologías o tratamientos farmacológicos que conlleven a una depresión del sistema inmunológico.

Por otro lado, es necesario promover en mujeres embarazadas el consumo de vegetales hervidos, al menos hasta que esté claramente definida la dosis infectante y la ruta de infección de *L. monocytogenes*, pues el tratamiento térmico elimina al microorganismo (26), sin afectar radicalmente el valor nutritivo del alimento, debido a que la aplicación de calor aumenta la biodisponibilidad del β caroteno, así como el contenido de fibra dietética (30,31). Esta recomendación también es válida para la eliminación de las formas quísticas de *G. intestinales*, *E. histolytica* y *Cryptosporidium* sp (26).

Además, es necesario fomentar la adecuada manipulación de las hortalizas, para evitar la contaminación cruzada con las superficies y utensilios de trabajo, así con alimentos que se consumen crudos o cocidos.

REFERENCIAS

- Ministerio de Salud. Mortalidad por enfermedades del aparato circulatorio y cánceres. Departamento de estadística. Ministerio de Salud, Costa Rica, p.15. 1995.
- Shuval H. Recommendation for the control of cholera in Chile through wastewater and water sanitation. Mission Report June 7-15, World Bank. Nueva York 45 p. 1991.
- Geldreich E. & Bordner R. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market: a review. J Milk Food Tech 34:184-195. 1971.
- Farber J.M & Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. Microbiol Rev. 3:476-511, 1991.
- Greffin M., Surouviec J. & Mc Closkey D. Foodborne norwalk virus. Am J Epidemiol 115:178-184. 1992.
- Roseblum L., Mirkin I., Allen D., Safford S. & Hadler S. A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. Am J Publ Health 80:1075-1080. 1990.
- World Health Organization. Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture. Technical Report Series 778. Ginebra, Ed. WHO, p.74. 1989.
- Marzochi M. Estudio de factores involucrados na disseminação dos eneroparasitas. II Estudio do contaminação de verduras e dolo de hortas na cidade de Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brasil. Rev. Inst. Trop. S. Paulo. 19:148-155. 1977.
- Ministerio de Salud. Memoria 1995. San José, Costa Rica, 1996.
- Shuval H., Adien A., Fattal B., Rawitz E. & Yekutiail P. Wastewater irrigation in developing countries. World Bank Technical Paper Number 51, Washington, Ed WB p.322. 1986.
- Vanderzant C. & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, Ed APHA p.140-155. 1992.
- Kageruka P., Brand J., Taelman H. & Jonas C. Modified Koster stainign method for the diagnosis of cryptosporidiosis. Am Soc Belge Med Tro. 64:171-175. 1984.
- Johnson G.D., Holborrow J. & Dorling J. Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. In: Weir DM DE. Handbook of experimental immunology. Vol 1. Immunochemistry. Blackwell Scientific Publications, 14.1-14.40. 1978.
- Hunter W. Radioimmunoassay. In: Weir DM DE. Handbook of experimental immunology. Vol 1. Immunochemistry. Blackwell Scientific Publication 15.1-14.30. 1978.
- Persing D., Smith T., Tenver F. & White T. Eds. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. American Society for Microbiology, Washington p.641. 1993.
- Castro M.L. & Florez A. Evaluación de riesgos para la salud por el uso de las aguas residuales en agricultura: aspectos microbiológicos. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria (CEPIS), p.32. Lima 1990.
- Fernández M. Calidad sanitaria de aguas utilizadas en irrigación de hortalizas de la provincia de Cartago, Costa Rica. Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), San José, Costa Rica, p.60. 1993.
- Fayer R. & Ungar L. *Cryptosporidium* sp and cryptosporidiosis. Microbiol Rev 25:967-975, 1986.
- Trissi D. Immunology of *Entamoeba histolytica* in human and animal hosts. Rev Inf Dis 4:1154-1184. 1982.
- Casemore D. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. Epidemiol Infect 104:1-28. 1990.
- Casemore D. The epidemiology of human cryptosporidiosis and the water route of infection. Wat Sci Tech 24:157-164. 1991.
- Pacha R., Oark G., Williams E., Coartes A., Scherffelmairs J. & Debusschere P. Small rodents and other mammals associated with mountains meadows as resevoirs of *Giardia* ssp. and *Campylobacter* spp. Appl Environ Microbiol 53:1574-1579. 1987.
- Erlandsen S., Sherlock S., Januschka M., Schupp D.G., Schaefer F.W., Jakubowski W. & Bemrick W.J. Crossspecies transmission of *Giardia* spp: inoculation of beavers and muskrats with cyst of human, beaver, mouse and muskrats origin. Appl Environ Microbiol 54:2777-2785. 1988.
- Weis J. & Seeliger K.P.R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. J Appl Bacteriol 50:1-9. 1975.
- Beuchal L.R. Berrang H.E. & Brackett R.E. Presence and public health implications of *Listeria monocytogenes* on vegetables. En: Foodborne listeriosis. AL Miller; Smith J.L. & Somkuti G.A. (Ed.) New York, Elviesier Science., p175-181. 1990.
- Cliver D.O. (Ed). Foodborne diseases. New York. Academy Press p. 395. 1990.
- Jarro E., Bingham A. & Mayer E. *Giardia* cyst destruction: effectiveness of six small quantity water desinfection methods. Am J Tro Hyg 29:8-11. 1980.
- Jarro E., Bingham A. & Mayer E. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. Appl. Env. Microb. 41:483-487. 1981.
- Campbell I., Tzipori S. & Hulchinson G. The effect of desinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. Vet. Rec. 111:414-415. 1982.
- Olson J. Recomendaciones de vitamina A. Memorias I Simposio de Micronutrientes. San José, Costa Rica, p.51. 1995.
- Asp N.G., Schweizer T.F., Southgate D.A.T. & Theandrs O. Dietary fiber analysis. En: Dietary fiber-A component of food: Nutritional function in health and disease. Schweizer T.F. & Edwards C.A. (Ed.). London, Springer Verlag. p176-184. 1992.

Recibido: 29-01-1996

Aceptado: 09-07-1996.