



Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* sp. aislados de lugares de expendio de pollo y quesos en mercados de la ciudad de Trujillo (Perú)

Antibacterial sensitivity *Listeria* sp. cultures isolated from chicken and cheeses outlay in Trujillo (Peru) markets

J. Vega¹, P. Mercado ²

¹Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

La listeriosis es una enfermedad transmitida por los alimentos y de curso grave si no se establece el diagnóstico oportuno y el tratamiento temprano. El agente etiológico, *Listeria*, se encuentra ampliamente distribuida y puede sobrevivir prolongados periodos de tiempo en distintos medios. En la presente investigación se determinó la sensibilidad antibacteriana de siete cultivos de *L. monocytogenes*, 17 cultivos de *L. innocua* y 13 cultivos de *L. ivanovii* frente a once antibióticos: B-Lactámicos (Penicilina y Ampicilina), Eritromicina, Cotrimoxazol, Ac. Nalidixico, Ciprofloxacina, Gentamicina, Vancomicina, Cloranfenicol, Rifampicina y Tetraciclina; para ello, los cultivos se reactivaron en agar nutritivo, se suspendieron comparados con el patrón de turbidez McFarland 0,5 (equivalente a 10⁸ UFC/ml) y se estriaron en placas con Agar Mueller-Hinton en varias direcciones en donde se colocaron los discos de sensibilidad. La incubación se hizo por 48 hs. Se concluye que existe mayor frecuencia de sensibilidad frente a los antibacterianos usados en los cultivos de *Listeria monocytogenes* y *L. innocua*.

Palabras clave: Antibiograma, antibacterianos, Muller-Hinton, *Listeria*

ABSTRACT

Listeriosis is a foodborne disease and severe course if not set early diagnosis and early treatment. The etiologic agent, *Listeria*, is widely distributed and can survive long periods of time in different media. In this study we investigated the antibacterial sensitivity of seven crops of *L. monocytogenes* cultures L. 17 innocua and L. crops 13 ivanovii compared to eleven antibiotics: B - lactam (penicillin and ampicillin), erythromycin, cotrimoxazole, Ac. Nalidixic, ciprofloxacin, gentamicin, vancomycin, chloramphenicol, rifampicin and tetracycline, for this, the cultures were reactivated on nutrient agar, suspended compared to 0.5 McFarland turbidity standard (equivalent to 10⁸ CFU / ml) and streaked on plates with Mueller -Hinton Agar in several directions in which discs were placed sensitivity. Incubation was for 48 hours. It was concluded that there is a greater frequency of sensitivity to antibacterials used in crops *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*.

Key words: Susceptibility, antibacterial, Muller-Hinton, *Listeria monocytogenes*



INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes, microorganismo que causa la listeriosis, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza: suelos, aguas residuales, comida animal y vegetal, productos lácteos sin pasteurizar, desechos de mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos^{1,2}. Es un bacilo Gram positivo, que crece a temperaturas que varían entre 1 y 45°C, a pH de 4,4 a 9,6, en concentraciones altas de cloruro de sodio (15 %) y es capaz de formar biopelículas para protegerse de la acción de los antibacterianos^{3,4}.

El género *Listeria* actualmente comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. De ellas, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas para el hombre y animales y la enfermedad que ocasionan se conoce con el nombre de listeriosis y la primera se halla registrada como un patógeno oportunista, con tasas de mortalidad del 20-30%. Todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran patógenas, aunque su virulencia es variable⁵.

La experiencia en la industria de la carne de aves señala que se ha formado un nicho en la línea de producción. Los nichos son sitios dentro del ambiente de la producción en el cual se instala la bacteria y se multiplica (Biofilms). Así, estos sitios se transforman en reservorios desde donde se contaminan los alimentos. Durante las operaciones regulares de limpieza estos sitios pueden ser difíciles de encontrar y consecuentemente limpiar⁶. Aunque *L. monocytogenes* se ha considerado durante muchos años un patógeno de animales, su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos se hizo evidente a partir de 1980, cuando aparece con cada vez más frecuencia informes de brotes de listeriosis originados por consumo de alimentos contaminados, principalmente leche cruda o procesada^{7,8}.

Factores como las prácticas de ordeño, las condiciones de infraestructura, la higiene en las salas y equipos de la granja pueden contribuir a la presencia de *Listeria* sp. , en la leche y en sus derivados; varios métodos de detección han demostrado que la contaminación del producto final proviene a menudo del ambiente, incluyendo suelo, paja y materia fecal, tanto en la leche como en los quesos⁸. Por lo tanto, la listeriosis debe ser considerada dentro del grupo de las infecciones alimentarias donde la *L. monocytogenes* es una de los agentes responsables y se ha presentado con tasas de mortalidad entre 20 y 30%, las más altas de todas ellas⁹.

Una característica importante de la listeriosis transmitida por alimentos es que el patógeno puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración hasta alcanzar cifras significativas si transcurre suficiente tiempo. Esta bacteria se refugia en áreas específicas donde se hallan residuos de alimentos y agua con temperaturas ideales y que usualmente son difíciles de limpiar y desinfectar; brindando una ubicación ideal para que *L. monocytogenes* sobreviva, se multiplique y potencialmente contamine los alimentos¹⁰. La frecuencia de brotes asociados al consumo de leche cruda o sus derivados ha puesto de manifiesto la importancia de evaluar las condiciones de ordeño, transporte y procesamiento de la leche¹¹.

La presentación clínica de la listeriosis incluye dos formas: listeriosis perinatal y listeriosis en el paciente adulto (99%), de preferencia en el inmunodeficiente. En ambas, las formas clínicas predominantes corresponden a infección local diseminada o infección local en el sistema nervioso central (SNC); sin embargo, a pesar que tiene alto porcentaje de mortalidad (20 a 30%) la dosis mínima requerida de *L. monocytogenes* para causar infección clínica en humanos no ha sido determinada, aunque el gran número detectado en los alimentos responsabilizados de casos esporádicos y epidémicos de listeriosis (10⁶) sugiere que es alta^{1,3,4,8}.

El patrón de sensibilidad a los antibacterianos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años: es sensible “in vitro” a una amplia gama de antibacterianos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicinas, cotrimoxazol y vancomicina, en cambio las fluorquinolonas y las cefalosporinas actuales presentan una pobre actividad, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima y todas las cepas son resistentes a fosfomicina³.

El monitoreo continuo del curso y la naturaleza de la adquisición y diseminación de resistencia a antibacterianos por *L. monocytogenes* y otros miembros del género, se ha convertido casi en una exigencia para todos los aislados procedentes de ambientes, infecciones clínicas y primordialmente los provenientes de alimentos, ya que constituyen los vehículos de transmisión primaria de la listeriosis². Las



explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos, como asunto de interés en Salud Pública, comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad⁷.

Teniendo en cuenta que se han registrado el aislamiento de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y de *L. ivanovii* a partir de lugares de expendio de pollo y quesos en los mercados de los distritos de Trujillo y La Esperanza (Perú)^{13,14,15,16,17}, se planteó la presente investigación que estuvo orientada a determinar la resistencia o sensibilidad de dichos microorganismos a antibacterianos y cuál de ellos tiene un mayor efecto, a fin de recomendar su aplicación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos

Siete cultivos de *L. monocytogenes*, 17 de *L. innocua* y 13 de *L. ivanovii* fueron aislados de los lugares de expendio de pollo y queso fresco manipulado y refrigerado en los mercados del distrito de Trujillo y La Esperanza (La Libertad, Perú) durante el 2012^{13,14,15,16,17} y mantenidos en el Laboratorio de Fisiología y Genética Microbiana de la Universidad Nacional de Trujillo.

Reactivación de los cultivos y obtención del inóculo.

Las cepas aisladas e identificadas fueron recuperadas en placas con agar Oxford a 30°C por 24 horas y luego traspasadas a frascos conteniendo agar nutritivo a 30 °C por 24-48 horas. Luego, de tres a cinco colonias fueron transferidas a solución fisiológica 0,85 %, para la obtención de una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez McFarland 0,5; el equivalente a 10⁸ UFC/ml.

Preparación de placas con medio de cultivo y siembra.

Se prepararon placas Petri con agar Müller-Hinton (12 a 15 mL por placa) a 45°C, aproximadamente, en las cuales se hizo la siembra por estrías en todas direcciones utilizando un hisopo.

Aplicación de discos de antibióticos¹².

Sobre la superficie de la placa ya sembrada con la suspensión bacteriana (inóculo) se colocó con ayuda de una pinza estéril los discos de antibióticos y se incubó a 37°C por 24 horas. Los antibacterianos probados fueron: B-Lactámicos (Penicilina y Ampicilina), Macrólidos (Eritromicina), Sulfonamidas (Sulfametoxazol trimetoprim), Quinolonas (Ac. Nalidixico), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Aminoglicósidos (Gentamicina), Glicopéptidos (Vancomicina), Fenicoles (Cloranfenicol), Rifamicinas (Rifampicina) y Tetraciclinas (Tetraciclina).

Medición del halo

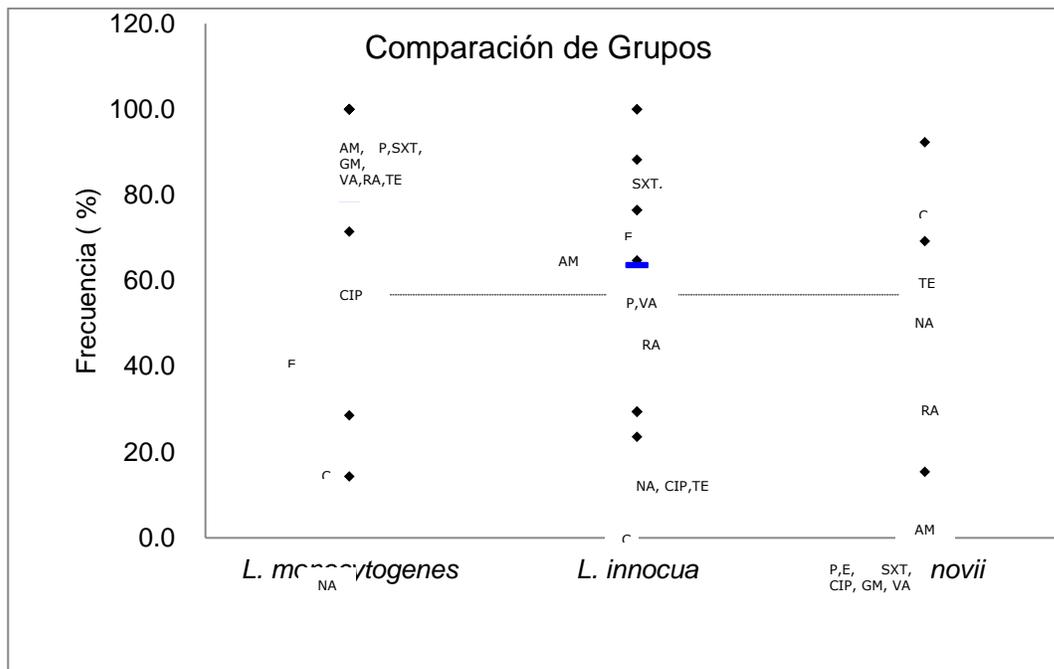
Pasado el tiempo de incubación se midió el diámetro (en milímetros) de la zona alrededor de cada disco, esto fue interpretado de acuerdo a los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), y se clasificó la sensibilidad de los antibacterianos en cada cepa, como susceptible, intermedio o resistente.

RESULTADOS

Se encontró una frecuencia del 100% de sensibilidad de cultivos de *Listeria Monocytogenes* sobre Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina. Del mismo modo, existe una frecuencia del 100% de sensibilidad de cultivos de *Listeria innocua* sobre Sulfametoxazole Trimetoprim y Gentamicina. Por último, existe mayor frecuencia de sensibilidad de cultivos de *Listeria ivanovii* sobre Cloranfenicol y Tetraciclina (Tabla 1). Asimismo, se evidenció que los antibacterianos que se encuentran por encima de la media aritmética son los mismos que se pueden usar ante infecciones, estos son: Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazol Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina, Tetraciclina, Eritromicina y Cloranfenicol (Fig. 1).

**Tabla 1.** Frecuencia de la sensibilidad de los cultivos de *Listeria monocytogenes* (*L. mo*), *Listeria innocua* (*L. in*) y *Listeria ivanovii* (*L. iv*) aislados de mercados provenientes de la ciudad de Trujillo (Perú) frente a los antibacterianos seleccionados.

Antibacteriano	Frecuencia (%) de sensibilidad de:		
	<i>L. mo</i>	<i>L. in</i>	<i>L. iv</i>
Ampicilina	100	82	15
Penicilina	100	76	0
Eritromicina	57	88	0
Sulfametoxazole/Trimetoprim	100	100	0
Ácido Nalidixico	14	29	69
Ciprofloxacina	71	29	0
Gentamicina	100	100	0
Vancomicina	100	76	0
Clorafenicol	29	24	92
Rifampicina	100	65	46
Tetraciclina	100	29	77

**Fig. 1.** Análisis de varianza (ANOVA) de la frecuencia de sensibilidad de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Listeria ivanovii*. AM=Ampicilina; P= Penicilina; E=Eritromicina; SXT= Sulfametoxazol Trimetoprim; NA=Acido Nalidixico, CIP=Ciprofloxacina, GM=Gentamicina; VA=Vancomicina; C=Cloranfenicol, RA=Rifampicina; TE=Tetraciclina.

— Representa la Media Aritmética



DISCUSIÓN

El hecho que las siete cepas de *L. monocytogenes* haya mostrado ser sensible en un 100% a Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole–Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina, así como una sensibilidad de 71% Ciprofloxacina, significa que estos antibacterianos funcionan de manera efectiva contra el microorganismo, siendo posible la administración de estos medicamentos cuando ocurran infecciones. Por el contrario, la poca resistencia frente a la Eritromicina (57 %), al Cloranfenicol (29 %) y al Ácido Nalidíxico (14%) permite afirmar que no son antibacterianos recomendables. Concordante con estos hallazgos, MacGowan et al¹⁸, no encontraron ninguna cepa de *L. monocytogenes* resistente a Ampicilina y Gentamicina, lo cual podría deberse a que *L. monocytogenes* posee una sensibilidad natural a aminoglucósidos (Gentamicina), Penicilinas (Ampicilina, Penicilina), Quinolonas (Ac. Nalidíxico, Ciprofloxacina), Rifamicinas (Rifampicina), sin embargo, se cree que existe al menos una cepa resistente a uno o más de los antimicrobianos usados, tal como ha sido evidenciado en una investigación en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas en la cual se evidenció resistencia a Eritromicina (14 %) y a Cloranfenicol (57%)².

Igualmente, *L. innocua* presentó el mismo esquema de respuesta, es decir, sensible en un 100% para unos (Gentamicina y Sulfametoxazole–Trimetoprim), elevada para otros, Ampicilina (82%), Penicilina (76%), Eritromicina (88%), Vancomicina (76 %) y resistencia en menor grado: Ac. Nalidíxico y Cloranfenicol. Esto significa que los eventos son iguales a lo señalado para *L. monocytogenes* porque, incluso, en ambas especies se observó sensibilidad del 100% para: Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole–Trimetoprim y Vancomicina. Sin embargo, a pesar que *L. innocua* es una especie ha sido registrada como no patógena, es necesario realizar estos estudios de sensibilidad antibacteriana ante posibles brotes de listeriosis por esta especie.

Por su parte, *L. ivanovii*, como era de esperar, mostró un comportamiento diferente frente a los antimicrobianos porque, por ejemplo, apareció con una frecuencia elevada de sensibilidad para Cloranfenicol, Ácido Nalidíxico y Tetraciclina, aspecto que puede ocurrir, pues se está observando variación en las tres especies estudiadas, hecho que justifica el trabajo por separado, amparado por las pruebas estadísticas como se ha hecho aquí, para proponer específicamente qué antimicrobiano utilizar en eventuales casos de infección: para *L. monocytogenes* se puede utilizar Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina ya que se encuentran por encima de la media; en el caso de *L. innocua*, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina, Penicilina, Vancomicina y muy cerca de la media, Rifampicina y para *L. ivanovii*, Cloranfenicol, Tetraciclina y Ácido Nalidíxico. Lamentablemente, no se han hallado trabajos anteriores que permitan hacer las comparaciones con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Como se ha mencionado, el patrón de sensibilidad a los antibióticos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años, habiéndose establecido que es sensible a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina y vancomicina¹⁹, aspecto que ha sido evidenciado en el presente trabajo, pero existe una variación en el grado de sensibilidad de una especie a otra, fenómeno que podría deberse a la variación del grado de virulencia inherente, como ha sido señalado por entidades encargadas de estandarizar los procedimientos que conducen a la determinación de la sensibilidad o resistencia de bacterias a los antimicrobianos^{20,21}.

CONCLUSIÓN

- *Listeria monocytogenes* es 100% sensible a Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina; *Listeria innocua* a Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina, Penicilina y Vancomicina y *Listeria ivanovii* a Cloranfenicol, Tetraciclina y Ácido Nalidíxico.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. *Listeria monocytogenes* un peligro para la industria alimentaria. *Agro sur* 2009; 37 (1): 1-8
2. Villalobos L, Martínez R, Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela. *Rev Soc Venez Microbiol* 2006; 26:31-34
3. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Rev MVZ Córdoba* 2005; 10(1):511-543
4. Muñoz A, Vargas M, Otero L, et al. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica* 2011; 31:428-39
5. Elika, Fundación Vasca para la seguridad agroalimentaria, *Listeria monocytogenes*. Granja Modelo Arkaute 2006. 1- 13
6. Comisión del Codex Alimentarios. Observaciones sobre el proyecto de directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo. EE. UU. 2006: 82-96
7. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. *Listeria monocytogenes* capítulo 2.10.14: 1222-1233
8. Gallegos J, Arrieta G, Máttar S, Poutou R, Trespalacios A, Carrascal A. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Rev MVZ Córdoba* 2007; 12(2) : 996-1012
9. Rodríguez E, Cabrera L, Colina G. *Listeria monocytogenes* en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 2009; 71 – 79
10. Chávez R. Evaluación del control de *Listeria monocytogenes* usando métodos físicos y químicos en condiciones de laboratorio y sobre superficies contaminadas en relación al tiempo. Trujillo, Perú. [Tesis para optar por el grado de Biólogo - Microbiólogo]. 2011
11. Albarracín Y, Poutou P, Carrascal A. *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra *Revista MVZ Córdoba*. 2008; 13(2): 1326-1332
12. Malbrán G. Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología. Servicio Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina. 2001
13. Flores J. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de Trujillo, Departamento La Libertad-Perú en los meses de Mayo- Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
14. Toribio D. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de La Esperanza, Departamento La Libertad-Perú en los meses de Mayo- Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
15. Floriano P. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de quesos elaborados artesanalmente de procedencia del distrito de Otuzco, departamento de La Libertad - Perú en los meses de Mayo- Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012
16. Pita J. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidas de quesos elaborados artesanalmente de procedencia del distrito de Bambamarca, departamento de Cajamarca - Perú en los meses de Mayo – Noviembre del 2011. Tesis de Biólogo Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
17. Sánchez L. Identificación bioquímica y caracterización molecular de cultivos de *Listeria* sp. obtenidas de lugares de expendio de pollo y quesos en Trujillo. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. UNT. Trujillo, Perú. 2012.
18. Macgowan A, Reeves D, Mclaulhlin J. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lancet* 1990; 336: 513-514.
19. Oteo J, Alós J. Servicio de Microbiología. Control de Calidad SEIMC. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid. <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/listeria.pdf> .2012.
20. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M31-A2 [ISBN 1- 56238-461-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSE document M100-S17 [ISBN 1- 56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.