



Sensibilidad bacteriana de cultivos de *Listeria* de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo, Perú

Bacterial sensibility of *Listeria* cultures from places of fish sale from Trujillo city, Peru, markets

Yulissa L. Moreno-Córdova¹, Pedro Mercado-Martínez²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo.

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno de amplia distribución, se transmite a humanos a través de diversos alimentos y muestra resistencia al tratamiento con antibacterianos. En la presente investigación se determinó la sensibilidad antibacteriana de 10 cultivos de *L. monocytogenes* y 15 cultivos de *Listeria* sp. frente a once antibióticos a elección, para lo cual se realizó antibiogramas de dichos cultivos. A estos cultivos se les reactivó en agar oxford para luego ser pasados a agar nutritivo, a continuación se realizó una suspensión bacteriana de cada cultivo con un patrón de turbidez McFarland 0,5; el equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL. Esta suspensión se estrió con hisopos estériles en placas con Agar Müller Hinton en diferentes direcciones, se colocaron los discos de sensibilidad, se incubó y a las 18 h se leyeron los resultados. Los antibacterianos empleados fueron: B-Lactámicos (Penicilina y Ampicilina), Macrólidos (Eritromicina), Sulfonamidas (Cotrimoxazol), Quinolonas (Ac. Nalidixico), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Aminoglicósidos (Gentamicina), Glicopéptidos (Vancomicina), Fenicoles (Cloranfenicol), Rifamicinas (Rifampicina) y Tetraciclinas (Tetraciclina). Finalmente se concluye que existe mayor frecuencia de sensibilidad frente a los antibacterianos usados en los cultivos de *Listeria* sp.

Palabras clave: Antibiograma, antibacterianos, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a widely distributed pathogen is transmitted to humans through various foods and shows resistance to antibacterial therapy. In the present investigation the antibacterial sensitivity of 10 cultures of *L. monocytogenes* and 15 *Listeria* sp cultures versus eleven choice antibiotics for which susceptibility of these crops was determined. These cultures were reactivated in oxford agar before being passed onto nutrient agar was then a bacterial suspension of each culture was performed with 0.5 McFarland turbidity standard, equivalents to 1.5×10^8 CFU/mL. This suspension was streaked with sterile swabs on Mueller Hinton Agar plates in different directions, sensitivity discs were placed, were incubated 18 h and the results were read. Antibacterial used were: B-lactam (penicillin and ampicillin), macrolides (erythromycin), sulfonamides (co-trimoxazole), quinolones (Ac. Nalidixic) Fluoroquinolones (Ciprofloxacin) Aminoglycosides (Gentamicin), glycopeptides (vancomycin), phenicols (Chloramphenicol), rifamycins (rifampin) and Tetracycline (Tetracycline). Finally it is concluded that there is a higher frequency of sensitivity to antibacterial used in the cultivation of *Listeria* sp.

Keywords: Susceptibility, antibacterial, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

Se han descrito alrededor de 250 agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales¹. Una de ellas es la Listeriosis, zoonosis que puede ser transmitida por contacto directo con animales infectados (exposición ocupacional), por ingestión de alimentos contaminados y de madre a hijo intrauterino o durante el parto². A pesar de presentarse con baja frecuencia, en la actualidad es una de las ETAs más letales conocidas, causando gran alarma a nivel mundial en productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias^{3,4}.

Estrechamente relacionado con los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, las bacterias del género *Listeria* se caracterizan por soportar altas concentraciones de sal, así como, multiplicarse en un rango de temperatura de 3 a 45°C y de pH entre 5,6 y 9,6⁵. De las seis especies registradas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*, de las cuales sólo las dos primeras son consideradas patógenas para humanos y animales y mayormente para animales, respectivamente^{6,7}.

L. monocytogenes, gracias a su capacidad de sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en diferentes medios, presenta amplia distribución en particular dentro de los alimentos, que pueden estar contaminados en cualquier eslabón de la cadena productiva y en el almacenamiento en frío, así como en el agua, que posibilita su llegada a huéspedes^{8,9}. Por ello, es frecuente la infección subclínica en humanos y diversas especies de animales, los cuales distribuyen al microbio a través de heces: vía fecal-oral¹⁰. Además, la infección humana puede ocurrir a través de alimentos como la leche fluida cruda y pasteurizada, quesos (en particular las variedades blandas), helado, verduras crudas, chorizos fermentados de carne cruda, carne cruda y cocida de ave de corral, carnes de todo tipo, y pescado crudo y ahumado⁷.

La presencia de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, como leche, carne, pescado y vegetales, refuerza la necesidad de que las industrias procesadoras de estos alimentos establezcan barreras que minimicen su ingreso a los lugares de proceso, en particular en aquellos puntos donde el alimento no es sometido a un tratamiento que permita la destrucción del patógeno; por ello, las industrias tienen, o deberían tener barreras sanitarias al ingreso de las salas de proceso, consistentes en un riguroso control del uniforme del personal, lavado de manos, uso de pediluvios y reducción del tránsito de personas que ingresan al lugar donde se procesan alimentos^{11,12,13}.

La listeriosis tiene una tasa de mortalidad entre 20-30%, siendo más alta que la de casi todas las demás ETAs, porque en Estados Unidos anualmente se presentan 2500 casos¹⁴, en Europa la incidencia anual es de 0,1-11,3 casos por millón de habitantes¹⁵ y en el Perú, sólo en la región La Libertad, se han reportado 42 casos entre los años 2001-2008¹⁶. Dos formas clínicas se presentan en la listeriosis: la perinatal y la del paciente adulto, ambas como infección local diseminada o del sistema nervioso central (SNC)⁸. El diagnóstico oportuno y tratamiento temprano con antibacterianos como ampicilina y aminoglucósidos o clotrimazol son efectivos; sin embargo, la sintomatología generalmente no permite un diagnóstico temprano, ya que los primeros signos de un brote son generalmente el aborto y/o la muerte del individuo¹².

Los estudios confirman que la susceptibilidad natural de *Listeria* sp y *L. monocytogenes* a los aminoglucósidos, penicilinas, quinolonas, rifampicina, trimetropin asociado a una sulfonamida (cotrimoxazole), fosfomicina y ácido fusídico, aún se mantiene en el género; sin embargo, la incidencia de al menos una cepa resistente a la ampicilina, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol y tetraciclina, ha sido detectada en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas^{4,17,18}. Así, el patrón de sensibilidad a los antibacterianos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años. Generalmente, este microorganismo es sensible “in vitro” a una amplia gama de antibacterianos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicinas, cotrimoxazol y vancomicina. Las fluorquinolonas y las cefalosporinas actuales presentan una pobre actividad, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima; todas las cepas de *L. monocytogenes* son resistentes a fosfomicina⁸. A pesar de que la data refiere una incidencia de resistencia antimicrobiana relativamente baja en *Listeria* sp., es oportuno señalar que en los últimos diez años los cambios en la susceptibilidad casi uniforme del género, representa un tema de importancia y del cual aún falta mucho por discutir⁴.

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 listeriosis⁴. La emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos es un asunto de máximo interés en Salud Pública por lo que se deben dar cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos; además, el aislamiento de *Listeria* sp. en alimentos como el pescado, indican su distribución en la cadena alimentaria⁷.

Ante esta situación y la posible emergencia de cultivos resistentes a antibióticos, se planteó la siguiente investigación con la finalidad de evaluar la actividad de antibióticos de elección en 25 cultivos de *Listeria* provenientes de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo (Perú) y conocer, en base a análisis estadísticos, cual es el antibacteriano que tiene un mejor efecto sobre *Listeria*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos

Se dispuso de 10 cultivos de *Listeria monocytogenes* y 15 de *Listeria* sp., debidamente identificados, los cuales fueron aislados de los lugares de expendio de pescado obtenidos de los mercados del distrito de Trujillo, La Libertad, Perú.

Reactivación de los cultivos y obtención del inóculo.

Se hizo en placas conteniendo agar Oxford e incubándolos a 30°C por 24 horas. Luego se hizo una suspensión bacteriana semejante al patrón de turbidez McFarland 0,5; que es equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml.

Preparación de placas con medio de cultivo y siembra.

Se prepararon placas Petri con agar Müeller-Hinton (12-15 mL por placa), las que se dejaron secar por unos minutos en estufa para eliminar el exceso de humedad; luego se sembró la suspensión bacteriana, con ayuda de un hisopo estéril, sobre la superficie del medio de cultivo y en todas las direcciones.

Aplicación de discos de antibióticos para sensibilidad.

Sobre la superficie de la placa ya sembrada, con la suspensión bacteriana (inóculo), se colocó los discos de antibióticos, con ayuda de una pinza estéril, y se incubó a 37°C por 18 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)^{19,20}, y se clasificó la sensibilidad del antibacteriano en cada cepa, como susceptible, intermedio o resistente.

RESULTADOS

Se observó una frecuencia del 90% de sensibilidad del cultivo de *L. monocytogenes* ante Gentamicina pero 0% de sensibilidad ante Penicilina y Tetraciclina. Además se observa 100% de sensibilidad del cultivo de *Listeria* sp. ante Vancomicina y 0% ante Rifampicina y Tetraciclina, sin diferencia significativa entre los resultados para las dos especies de *Listeria* (Tabla 1). Se evidenció que los antibacterianos que tienen mejor acción para *L. monocytogenes* son: Ampicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina y Eritromicina; y para *Listeria* sp. son: Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina y Ciprofloxacina; por encontrarse por encima de la media aritmética (Fig. 1).

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos de frecuencia en cuanto al ensayo de sensibilidad antibacteriana realizado a los diez cultivos de *Listeria monocytogenes*, tal como se muestra en la Tabla 01, se evidencia que esta bacteria es sensible en su valor más alto (90 %) al antibiótico gentamicina, por que dicha especie posee una sensibilidad natural a Gentamicina por ser un aminoglucósido, ya que inhibe la síntesis de proteínas a nivel ribosomal⁴.

Tabla 1. Frecuencia de cultivos sensibles de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. provenientes de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo (Perú) frente a los antibacterianos seleccionados.

Antibacteriano	Frecuencia (%) de cultivos sensibles de:	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> sp.
Ampicilina	80	87
Penicilina	0	7
Eritromicina	70	73
Sulfametoxazole Trimetoprim	80	73
Ácido Nalidíxico	30	13
Ciprofloxacina	30	87
Gentamicina	90	87
Vancomicina	80	100
Clorafenicol	30	27
Rifampicina	10	0
Tetraciclina	0	0

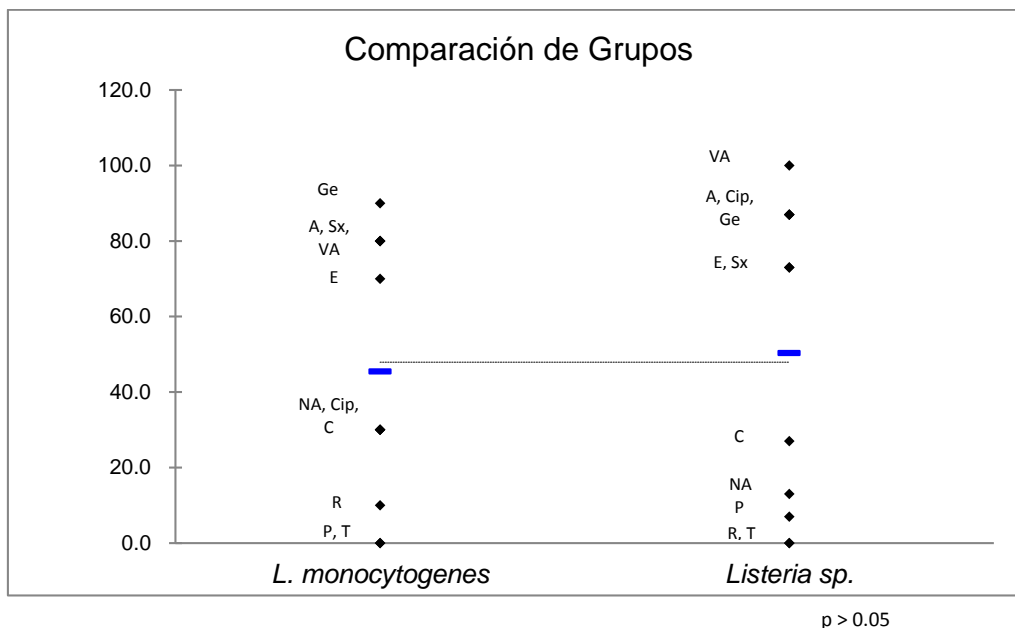


Fig. 1. Análisis de varianza (ANOVA) de la frecuencia de cultivos sensibles de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. Donde: A=Ampicilina; P= Penicilina; E=Eritromicina; SX= Sulfametoxazol Trimetoprim; NA=Acido Nalidíxico, CIP=Ciprofloxacina, G=Gentamicina; VA=Vancomicina; C=Cloranfenicol, R=Rifampicina; T=Tetraciclina.
— Representa la Media Aritmética

Asimismo, revela una sensibilidad del 80% a ampicilina y sulfametoxazole trimetoprim, esto sería porque ampicilina, siendo un betalactámico, actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular e induce un efecto bacteriolítico; y en el caso del sulfametoxazol y trimetoprim, se combina una sulfonamida, que tiene acción bacteriostática por ser antagonista del PABA (ácido para aminobenzoico) impidiendo así la síntesis de ácido fólico y consecuentemente la síntesis de timina y purina; con el trimetoprim que complementa ésta acción por ser un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa que actúa en la

síntesis de ácido fólico; actualmente, se considera que las mejores opciones son la penicilina o la ampicilina, solas o asociadas a gentamicina. Y la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia alternativa en esta circunstancia²¹.

La actividad inhibitoria y bactericida de la ampicilina y gentamicina observada en el estudio frente a *L. monocytogenes* es una clara evidencia de que aún se mantiene el patrón de susceptibilidad a estos antibióticos de elección; sin embargo, también se obtuvo un porcentaje de 80% de sensibilidad ante el antibiótico vancomicina, el que inhibe la síntesis de peptidoglucano y por lo tanto la síntesis de la pared celular⁴.

Para *Listeria* sp., se evidenció que el 100 % de los cultivos (15) fueron sensibles a vancomicina y se encontró una sensibilidad elevada (83%) para ampicilina, ciprofloxacina y gentamicina. La ciprofloxacina, como parte de las fluoroquinolonas, es un antibiótico de amplio espectro e inhibe la enzima topoisomerasa IV y provoca lisis celular. En el caso de gentamicina, ésta inhibe la síntesis proteica por alterar la interacción codón-anticodón dando una mala lectura del código genético e inhibir los procesos de iniciación y elongación de la síntesis proteica; siendo así un bacteriostático.

Cabe señalar que según los datos obtenidos, no hubo registro de sensibilidad para rifampicina y tetraciclina, pero sí hubo resistencia intermedia y resistencia. La literatura revela que existe una incidencia de al menos una cultivo resistente a ampicilina, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol y tetraciclina, detectada en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas⁴. Coincidiendo con los resultados obtenidos en la presente investigación.

El análisis de varianza (ANOVA) indica que para *L. monocytogenes* se puede utilizar Ampicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina y Eritromicina, por encontrarse por encima de la línea que representa la media aritmética; en el caso de *Listeria* sp., los antibacterianos factibles de usar son Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina y Ciprofloxacina. Además, resultó q no hay diferencia significativa entre los resultados de ambas especies trabajadas de *Listeria*; por lo que se pueden utilizar los mismos antibióticos para ambas especies. Antibióticos que se encuentren sobre la media aritmética, ya que éstos serían más eficaces.

Por lo tanto, el presente trabajo evidencia que *Listeria* es un microorganismo sensible a una amplia gama de antibióticos, como lo describen Oteo y Alós; antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina y vancomicina. Describiéndose además resistencias a macrólidos y a tetraciclinas en algunos aislamientos; que suelen estar codificadas por plásmidos, aunque también hay casos de resistencia a tetraciclinas codificada por el cromosoma; puntualizado así por dichos autores.

CONCLUSIONES

- No hay diferencia significativa entre *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. con respecto a los antibacterianos evaluados.
- Se pueden usar los antibióticos Ampicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Eritromicina y Ciprofloxacina para *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcayaga S, Hott B. *Listeria* y Listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. Rev Chile Salud Pública, 2008; 12(3): 188-195.
2. Rossi L, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: una revisión de las vías que llevan a su aparición. Chile Infect, 2008; 25(5): 328-335.
3. Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. *Listeria monocytogenes* un peligro para la industria alimentaria. Agro sur Chile, 2009; 37(1): 1-8.
4. Villalobos L, Martínez R. Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela. Rev Soc Venezolana Microbiol, 2006; 26:31-34.
5. Gesche E, Ferrer J. Detección de *Listeria monocytogenes* en agua de mar y pescado provenientes de Áreas de Recolección de Productos Marinos. Alimentos, 1995; 20(34): 21-25.
6. Torres KJ, Sierra SC, Poutou RA, Vera H, Carrascal AK, Mercado M. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. Rev. UDCA Act Divulg Cient, 2004; 7(1): 25-57.
7. Manual de la OIE sobre animales terrestres. *Listeria monocytogenes*. 2004. capítulo 2.10.14.

8. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Rev MVZ Córdoba. Colombia, 2005; 10(1):511-543
9. 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. 2011
10. Gesche, E. *Listeria monocytogenes* como causal de enfermedad transmitida por alimentos. Fleischwirtsch, español, 1989. (2): 41-44.
11. Gamboa A, Mejía D, Moreno P, Buitrago S, Pérez K, et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria* especies isolated from swine processing facilities in Colombia. J Swine Health Prod, 2013; 21(1): 10-21.
12. Schöbit ZR, Ciampi L, Nahuelquín Y. *Listeria monocytogenes* un peligro para la industria alimentaria. Agro sur Chile, 2009; 37 (1): 1-8
13. FAO. Codex Alimentarius, Directrices Sobre la Aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos. 2007.
14. Murray P, Rosenthal K, Kabayashi G, Pfaller M. Microbiología Médica. 5ª ed. Barcelona: Elsevier Science. 2006.
15. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2004.
16. Ministerio de Salud del Perú. Información estadística sobre listeriosis-años 2001 al 2008. La Libertad: Gerencia Regional de Salud La Libertad – Oficina de Informática. Telecomunicaciones y Estadística; 2009.
17. Malbrán GC. 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.
18. Oteo J, Alós J. Servicio de Microbiología. Control de Calidad SEIMC. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid. [Consulta en línea]. <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/listeria.pdf> [Consulta: Septiembre del 2012]
19. 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.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventh Informational Supplement. CLSI 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.
21. Zamora J, Chaves C, Arias M. Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. Rev Alan Venezuela, 2006; 56 (2).