



Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* proveniente de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo (Perú)

Antibacterial sensibility of *Listeria* cultures isolated places of fish-expenditure of markets from Trujillo city (Peru)

Pedro Mercado-Martínez¹, Yulissa L. Moreno-Córdova²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNT

RESUMEN

Se determinó la sensibilidad antibacteriana de 10 cultivos de *Listeria monocytogenes* y 15 cultivos de *Listeria* sp. frente a once antibióticos, 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 hs 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). Se encontró que los antibacterianos usados en los cultivos de *Listeria* sp. presentaron mayor frecuencia de sensibilidad.

Palabras claves: Antibiograma, antibacterianos, *Listeria*.

ABSTRACT

Antibacterial sensibility of 10 cultures of *Listeria monocytogenes* and 15 cultures of *Listeria* sp. opposite to eleven antibiotics were determined. Hence, these cultures they were reactivated in agar oxford then to be spent to agar nourishing, and antibiograms were made; later, there fulfilled a bacterial suspension of every culture with a boss of turbidity McFarland 0,5; the equivalent to 1.5×10^8 UFC/ml. This suspension was fluted by sterile hyssops in plates by Agar Müller Hinton in different directions, the discs of sensibility were placed, it incubated to 37°C and at 18 h the results were read. The antibacterial employees were: B-Lactámicos (Penicillin and Ampicilina), Macrólidos (Eritromicina), Sulfonamidas (Cotrimoxazol), Quinolonas (Ac. Nalidixico), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Aminoglicósidos (Gentamicina), Glicopéptidos (Vancomicina), Fenicoles (Cloranfenicol), Rifamicinas (Rifampicina) and Tetracyclines (Tetracycline). It was found that cultures of *Listeria* sp. presented the most sensibility frequency to antibacterial used.

Key words: Susceptibility, antibacterial, *Listeria*.

INTRODUCCIÓN

Como consecuencia de los cambios en el sistema de vida y en los hábitos alimentarios, las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados han surgido como una causa importante de morbimortalidad a nivel mundial: se han descrito alrededor de 250 agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales¹.

Considerada una zoonosis, la Listeriosis se adquiere mayormente por ingestión de alimentos contaminados o verticalmente de madre a hijo; sin embargo, a pesar de presentarse con una baja frecuencia es en la actualidad una de las ETAs más letales, causando gran alarma a nivel mundial entre productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias, debido a que *Listeria* 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^{2,3,4}.

En efecto, las bacterias del género *Listeria* se caracterizan por su gran resistencia a un medio adverso, soportando altas concentraciones de sal, multiplicarse en un rango de temperatura que va entre los 3 y 45°C y un rango de pH entre 5,6 y 9,6; son gram-positivas, estrechamente relacionado con los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Staphylococcus*⁵.

L. monocytogenes, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. grayi* conforman el género *Listeria*, pero sólo dos: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenas, la primera causa enfermedad severa en humanos y en animales, mientras que la segunda está más asociada a infecciones en animales⁶. La amplia distribución de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad de sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en diferentes medios; por consiguiente, los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva y en el almacenamiento en frío^{7,8,9}.

Dada la amplia distribución de *L. monocytogenes* en el medio ambiente, son múltiples las posibilidades de infección: a través del suelo, agua, plantas, animales, insectos, aire y alimentos (leche fluida cruda y pasteurizada, quesos, helado, verduras crudas, chorizos fermentados de carne cruda, carne cruda y cocida de ave de corral, carnes de todo tipo, y pescado crudo y ahumado) y hombre a hombre por la vía fecal-oral^{7,10}.

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; en pescado, por ejemplo, el proceso de ahumado en caliente (> a 68° C) tiene un efecto de pasteurización, sin embargo, el ahumado en frío (18-28° durante 18 h), incluso permitiría el desarrollo de *L. monocytogenes*, por lo tanto éste se considera entre los alimentos listos para el consumo de alto riesgo^{12,13}.

La listeriosis tiene una tasa de mortalidad entre 20-30%, siendo más alta que la de casi todas las demás ETAs: en Estados Unidos anualmente se presentan aproximadamente 2500 casos¹⁴. En Europa la incidencia anual está entre 0,1-11,3 casos por millón de habitantes¹⁵. En el Perú, sólo en la región La Libertad, se han reportado 42 casos entre los años 2001-2008¹⁶.

La dosis mínima requerida de *L. monocytogenes* para causar infección clínica en humanos no ha sido determinada, sin embargo el gran número de *L. monocytogenes* detectadas en los alimentos responsabilizados de casos esporádicos y epidémicos de Listeriosis (10⁶) sugiere que es alta⁸. Entonces, 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.

Hasta hace unos años se consideraba que *L. monocytogenes* mostraba susceptibilidad a un amplio rango de antibacterianos activos contra bacterias Gam positivas⁴; sin embargo, se han descrito: (i) fracasos clínicos contra la listeriosis en tratamientos con penicilina o ampicilina¹⁸, (ii) resistencias a macrólidos y a tetraciclinas codificadas por algunos plásmidos o cromosómicamente⁴ y (iii) resistencias a la gentamicina⁴. De la misma manera, el cloranfenicol es un compuesto de amplio espectro, bacteriostático que inhibe el crecimiento bacteriano al bloquear la transferencia de ácido

ribonucleico soluble a los ribosomas sin embargo se puede encontrar alguna cepa de *Listeria* sp. resistente¹⁷.

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.

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 alimentos⁷. Asimismo, debe contarse con datos que permitan disponer con antimicrobianos efectivos para el tratamiento a fin de no incentivar su uso indiscriminado que conduce a la aparición de cultivos resistentes. Por ello, se planteó la siguiente investigación con la finalidad de evaluar la actividad de antibióticos de uso común en 25 cultivos de *Listeria* provenientes de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo (Perú); y así conocer, en base a análisis estadísticos, cual es el antibacteriano que tiene un mejor efecto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos

Se dispuso de 10 cultivos de *Listeria monocytogenes* y 15 cultivos de *Listeria* sp debidamente identificados los cuales fueron aislados de los lugares de expendio de pescado obtenidos de los mercados del distrito de Trujillo (Perú). Los cultivos aislados e identificados fueron reactivados sembrándolos 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.

Actividad antibacteriana

Se prepararon placas Petri con agar Müller 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.

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). 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, 100% de sensibilidad del cultivo de *Listeria* sp. ante Vancomicina y 0% ante Rifampicina y Tetraciclina y que no hay diferencia significativa entre los resultados para las dos especies de *Listeria* (Tabla 1).

Se evidencio que los antibacterianos que tienen mejor acción para *L. monosytogenes* fueron: Ampicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina y Eritromicina; y para *Listeria* sp.: 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.

Asimismo, revela una sensibilidad del 80% a ampicilina y sulfametoxazole trimetropin, 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 trimetropim, 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 trimetropin que complementa ésta acción por ser un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa que actúa en la síntesis de ácido fólico.

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 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

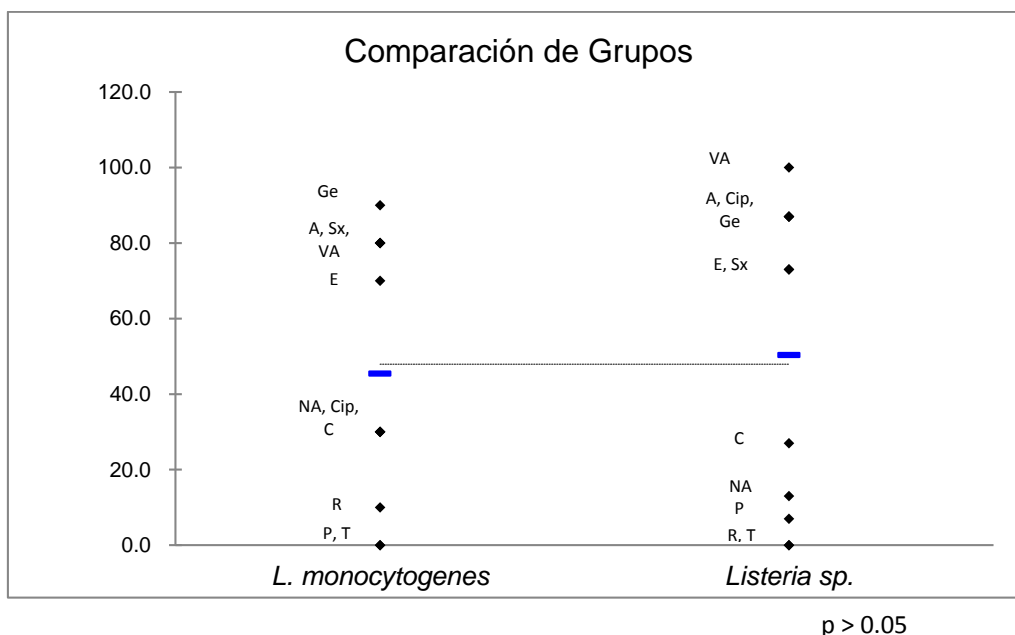


Fig. 1. Análisis de varianza (ANOVA) de la frecuencia de cultivos sensibles de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. Donde: A=Ampicilina; P= Penicilina; E=Eritromicina; SX= Sulfametoxazol Trimetoprim; NA=Acido Nalidíxico, CIP=Ciprofloxacina, G=Gentamicina; VA=Vancomicina; C=Cloranfenicol, R=Rifampicina;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

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 elección⁴.

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 celular. De otro lado, no se encontró ninguna cepa de *L. monocytogenes* sensible para tetraciclina y penicilina, pero sí de resistencia intermedia y resistencia.

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 si hubo resistencia intermedia y resistencia. (Ver Anexo 3). 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.

Se realizó el estudio de análisis de varianza (ANOVA) para la obtención de resultados estadísticos, donde, según la Gráfica 01 se exhiben los antibióticos que pueden utilizarse ante la posible infección con alguna de las especies de *Listeria* ensayadas en este trabajo de investigación. Es así 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. Cap. 2.10.14.
8. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Revista 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 Z R., Ciampi L. y NahuelquinY. *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. 5°ed. Barcelona. Elsevier Science. 2006.
15. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 5° 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. G. Malbrán C. 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. www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/listeria.pdf [Consulta: Septiembre, 2012]
19. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard- 2da ed. NCCLS document M31-A2. 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; Seventeenth Informational Supplement. CLSE document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
21. Zamora J., Chaves C. y 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).