



Artículo original

Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela

Luz Bettina Villalobos de Bastardo*, Rosa Elena Martínez Nazaret

Postgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre
Laboratorio de Microbiología

Recibido 16 de febrero de 2006; aceptado 25 de mayo de 2006

Resumen: Los aislados de *L. monocytogenes* así como de los de otras *Listeria* spp, han mostrado una susceptibilidad natural a un amplio rango de antibióticos activos contra bacterias Gram positivas. Ante la posible emergencia de cepas resistentes a antibióticos, se evaluó la actividad *in vitro* de antibióticos de elección, en cepas de *Listeria* spp aisladas de quesos blancos y atún fresco en la ciudad de Cumaná, desde febrero del 2003 a febrero del 2004. Las muestras fueron colectadas y procesadas según pautas de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos, para el aislamiento de las cepas. La confirmación definitiva se realizó con la galería API *Listeria* y por PCR. El perfil de susceptibilidad y la resistencia a agentes antimicrobianos, se realizó por el método de difusión en discos. Todas las listerias mostraron sensibilidad al sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina, cloranfenicol y vancomicina. 13,3 % mostraron resistencia a la penicilina G; 26,6 % a la ampicilina y 6,7 % a la eritromicina. El nivel de resistencia en *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*, se hizo presente para la eritromicina y ciprofloxacina, mostrando un porcentaje relativamente alto (20-40 %) comparada con *Listeria welshimeri* y *Listeria seeligeri*, las cuales arrojaron hasta un 50 % de resistencia a la penicilina G y ampicilina.

Palabras clave: *Listeria*, susceptibilidad, antimicrobianos, alimentos.

Antimicrobial susceptibility of *Listeria* spp. isolated of foods during the period 2003-2004. Cumaná, Venezuela

Abstract: Isolates of *L. monocytogenes* as well as *Listeria* spp, has showed natural susceptibility to a large range of antibiotics effective again gram positive bacteria. The possibility of emergency strains resistant to antibiotics was evaluated *in vitro* in bacteria strains isolated from white chesse and tuna fresh, in Cumaná from February 2003 to February 2003. Samples were collected and processed according to the instructions of the Food and Drugs Administration of the United States, for the isolation of strains. The definitive confirmation was achieved in a gallery API *Listeria* and for PCR. The profiles of susceptibility and resistance to antibiotics were carried out for the diffusion method in disks. All the listeria strains showed sensibility to the sulphamethoxazole-trimethoprim, gentamicin, chloramphenicol and vancomycin. 13,3% showed resistance to the penicillin G; 26,6% to the ampicillin and 6,7 % to the erythromycin. The resistance level in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*, became present for erythromycin and ciprofloxacin, showing a relatively high percentage (20-40%) compared with *Listeria welshimeri* and *Listeria seeligeri* which showed until 50% resistance to the penicillin G and ampicilin.

Keywords: *Listeria*,, susceptibility, antimicrobials, foods

* Correspondencia:
E-mail: lbvillalobos@yahoo.com

Introducción

Listeria spp es un microorganismo ubicuo que 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].

Dentro de las seis especies de *Listeria*, solamente *Listeria monocytogenes* resulta patógena para humanos causan-

do serias infecciones tales como: meningitis o septicemia en recién nacidos, pacientes inmunocomprometidos y mujeres embarazadas [2]. Aunque la enfermedad producida en humanos (*Listeriosis*) ocurre esporádicamente, es notable establecer que la transmisión de origen alimentario constituye la principal ruta de adquisición de esta enfermedad [3].

Hasta hace unos años, se consideraba que los aislados de *L. monocytogenes* así como las de otras *Listeria* spp, mostraban una susceptibilidad a un amplio rango de antibióticos activos contra bacterias Gram positivas. La combinación de la ampicilina con la gentamicina, era y sigue siendo recomendada como primera línea de terapia para el tratamiento de la listeriosis en humanos [4]. No obstante, ante el reporte de la primera cepa de *L. monocytogenes* resistente a antibióticos en Francia, 1988 [5], la posible emergencia de un patrón de resistencia dentro del género queda al descubierto. Desde entonces, la evolución de la resistencia en la bacteria ha sido considerablemente acelerada, quizás por efecto del uso indiscriminado de antibióticos que se observa hoy en día.

Una revisión de los últimos años sobre los posibles cambios en el patrón de susceptibilidad a antibióticos en *Listeria* spp, han demostrado la habilidad de la bacteria de desarrollar resistencia a uno o más antibióticos [6,7,8]. Los estudios confirman que la susceptibilidad natural de *Listeria* spp 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, estreptomycin, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol y tetraciclina, ha sido detectada en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas [9,10].

A pesar de que la data refiere una incidencia de resistencia antimicrobiana relativamente baja en *Listeria* spp, 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 discutir [7].

El monitoreo continuo del curso y la naturaleza de la adquisición y diseminación de resistencia a antibióticos 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 listeriosis [5].

En Venezuela y en especial en la ciudad de Cumaná, el aislamiento de *L. monocytogenes* y *Listeria* spp en alimentos como ensaladas, carnes, quesos [11] y pescados [12], indican su distribución en la cadena alimentaria y su posible contacto directo e indirecto con los antibióticos que se utilizan comúnmente. Ante esta situación y la posible emergencia de cepas resistentes a antibióticos, se planteó la siguiente investigación con la finalidad de evaluar la actividad in vitro de antibióticos de elección, en cepas de *Listeria* spp y *monocytogenes* aisladas de alimentos en la ciudad de Cumaná, durante el período 2003-2004.

Materiales y Métodos

Obtención de las cepas bacterianas

Desde enero del 2003 hasta agosto del 2004, cepas de *Listeria* spp y *Listeria* fueron aisladas de sesenta (60) muestras de queso y treinta y tres (33) muestras de atún

fresco. Las muestras fueron colectadas de diferentes puntos de ventas de la ciudad de Cumaná y del Mercado Municipal.

El aislamiento de las cepas se realizó por siembra en medios selectivos Palcam (Merck) y Oxford (Oxoid), según las recomendaciones del Manual Analítico de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos [13]. Las pruebas de la catalasa, motilidad en paraguas a 28°C y reacciones de rojo de metilo y Voges Proskauer, se aplicaron para la identificación convencional. Todos los análisis se hicieron utilizando la cepa control (*L. monocytogenes* 446) certificada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos [14].

La confirmación definitiva se llevó a cabo por pruebas bioquímicas miniaturizadas en una galería API *Listeria* (BioMerieux-Zhuoz Pharma) y por PCR según pautas de Buber y col. [15]. Para dichos ensayos, se utilizaron las cepas certificadas (*L. monocytogenes* 446, *L. ivanovii* 450 y *L. innocua* 447) [14].

Ensayos de susceptibilidad antimicrobiana

El medio utilizado para este ensayo fue el agar Mueller Hinton (Merck) suplementado con 5 % de sangre de cordero.

El método de difusión en discos [16] se aplicó para determinar la susceptibilidad a antibióticos. Los antibióticos probados contenían: 10 Unidades de Penicilina G (P), 10 µg de Ampicilina (AM); 15 µg de Eritromicina (E), 25 µg de Sulfametoxazole-trimetoprim (SXT), 10 µg de gentamicina (CN); 30 µg de Cloranfenicol (C), 30 µg de Vancomicina (VA) y 5µg de Ciprofloxacina (CIP). Todos de Laboratorios Disco-BBL.

Las cepas aisladas e identificadas, fueron recuperadas en placas con agar tripticosa de soya (Merck) con 0,6 % de extracto de levadura (Merck), a 30 °C por 48 horas. Al cabo de ese período, 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.

Una vez ajustado la turbidez, se inocularon superficies secas de placas con agar Mueller Hinton (Merck) con sangre de cordero. Se colocaron los discos de antibióticos (4 por placa) y se incubaron por 48 horas a 30 °C. Después de la incubación, el diámetro (en milímetros) de la zona alrededor de cada disco, fue medido e interpretado de acuerdo a los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [17], para clasificar la sensibilidad del antibiótico en cada cepa, como susceptible, moderadamente susceptible, intermedio o resistente.

Resultados y Discusión

Un total de 15 cepas de *Listeria* spp (5 *monocytogenes*, 3 *innocua*, 2 *welshimeri*, 2 *seeligeri*, 2 *ivanovii*, 1 *grayi*) fueron aisladas de muestras de quesos y atún fresco (*Thunus* spp) durante el período 2003-2004. Cada una de las especies fueron confirmadas por PCR y los resultados

fueron previamente publicados por Martínez y Villalobos [11].

Los datos obtenidos en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana realizada a cada una de las cepas, revelaron que el 100 % fueron susceptibles al sulfametoxazole-trimetoprim (SXT), gen-

tamicina (CN) y vancomicina (VA). Del mismo modo se observó que un 93 % de las cepas identificadas, fueron susceptibles al cloranfenicol (C) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de *Listeria spp* susceptibles, moderadamente susceptibles y resistentes, a los antibióticos probados por la técnica de difusión en discos.

Antibióticos	% de cepas suscep.	% cepas mod. suscep.	% cepas resistentes
Penicilina G (P)	86,7	0	13,3
Ampicilina (AM)	73,4	0	26,6
Eritromicina (E)	80,0	13,3	6,7
Sulfamet-trimet. (SxT)	100	0	0
Gentamicina (CN)	100	0	0
Cloranfenicol (C)	93,3	6,7	0
Vancomicina (VA)	100	0	0
Ciprofloxacina (CIP)	86,7	13,3	0

El nivel de resistencia presente en las especies aisladas fue relativamente baja: 26,6 % de las cepas fueron resistentes a la ampicilina (AM), 13,3 % a la penicilina G (P) y 6,7 % a la eritromicina (E).

L. monocytogenes fue 100% susceptible a los antibióticos de elección para el tratamiento de la listeriosis: ampicilina (AM) y gentamicina (CN) (Tabla 2). Sin embargo, la

resistencia a uno de los antibióticos de elección, ampicilina (AM), fue común entre las especies no patógenas *L. welshimeri* y *L. seeligeri* y *L. ivanovii*. La resistencia a la eritromicina y a la ciprofloxacina, también fue observada en *L. monocytogenes* y *L. innocua*, mostrando un porcentaje relativamente alto (20-40 %).

Tabla 2. Patrón de susceptibilidad de las especies de *Listeria* aisladas de alimentos que se expendían en la ciudad de Cumaná, Venezuela.

Especie	Nº de cepas probadas	% de cepas susceptibles a:							
		P	A	E	SXT	CN	C	VA	CIP
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	100	100	60	100	100	80	100	80
<i>Listeria innocua</i>	3	100	100	66,6	100	100	100	100	66,6
<i>Listeria welshimeri</i>	2	50	50	100	100	100	100	100	100
<i>Listeria seeligeri</i>	2	50	50	100	100	100	100	100	100
<i>Listeria ivanovii</i>	2	100	0	100	100	100	100	100	100
<i>Listeria grayi</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100

De los alimentos seleccionados para el aislamiento e identificación de *Listeria spp*, el queso arrojó un mayor número de cepas resistentes a antibióticos. Este número, puede ser el reflejo de la presión selectiva ejercida por los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento en alimentos para animales [10].

La actividad inhibitoria y bactericida de la ampicilina y gentamicina observada en el estudio frente *L. monocytogenes* es una clara evidencia de que aún se mantiene el patrón de susceptibilidad a estos antibióticos de elección. Sin embargo, es importante señalar que este estudio al igual que otros, revela cambios importantes en el comportamiento que se consideraba usual para *Listeria spp* y *L. monocytogenes*. Estos cambios, aunque pequeños, se están dando

en cepas que están circulando en alimentos de primera necesidad para el venezolano.

Al ser la listeriosis una enfermedad relativamente rara en humanos, no hay estudios prospectivos y controlados que establezcan el mejor tratamiento antibiótico [18]. Se ha visto que *L. monocytogenes* puede ser refractaria a los mecanismos bactericidas de muchos antibióticos porque es intracelular y usa este mecanismo para multiplicarse y protegerse de los antibióticos que se encuentran en el fluido extracelular; sólo pocos agentes pueden penetrar, acumularse y alcanzar el citosol de las células que hospedan este microorganismo.

No obstante, se ha referido y se pudo comprobar en este estudio, que el uso del sulfametoxazole-trimetoprim y de la vancomicina sola o combinada con un aminoglucósido,

pueden ser utilizadas como buenas opciones terapéuticas en casos de que el tratamiento tradicional no resulte [4,19].

En nuestro país aún no se ha reportado el primer brote por listeriosis, pero es importante señalar que la diseminación y emergencia de cepas resistentes de *Listeria* spp, se están presentando y pueden fácilmente ser adquiridos a través de productos listos para consumir, y propiciar infecciones de origen alimentario debido a cepas de *L. monocytogenes* que son resistentes a antibióticos.

Conclusiones

- *L. monocytogenes* fue 100% susceptible a los antibióticos de elección para el tratamiento de la listeriosis ampicilina (AM) y gentamicina (CN).
- La resistencia observada en la penicilina y ampicilina, fue común entre especies de *Listeria* no patógenas al humano.
- Los resultados evidencian la presencia de cepas con capacidad de resistencia a antibióticos, en alimentos comercializados en la ciudad de Cumaná.

Referencias

- [1] Oteo J, Alós J. *Listeria* y listeriosis. Informe del control de calidad SEIMC. 1999. Publicaciones del Servicio de Microbiología de Móstoles. Madrid. 4 pp.
- [2] Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti J. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 171 – 4.
- [3] Bell C, Kyriakide A. *Listeria*, una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. 1ª ed. España: Editorial Acribia;1998.
- [4] Charpentier E, Gerbaut G, Jacquet C, Rocourt J, Courvalin, P. Incidence antibiotic resistance in *Listeria* spp. J Infect Dis 1995;172:277-81.
- [5] Aureli P, Ferrini A, Mannoni V, Holzic S, Wedel-Weergaard C, Oliva B. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Italy to antibiotics. Int J Food Microbiol 2003; 83: 325 – 30.
- [6] Poros-gluchowska J, Markiewicz Z. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. Act Microbiol Pol 2003; 52:113 – 29.
- [7] Troxler R, Graevenitz A, Funke G, Wiedemann B, Stock I. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. Clin Microbiol Infect 2000;6:525 – 7.
- [8] Ostergaard C, Sorensen T, Knudsen J, Frimodt M. Evaluation of moxifloxacin, a new 8 –methoxyquinolone for treatment of meningitis caused by a penicillin-resistant pneumococcus in rabbit. Antimicrob Agents Chem 1998;42: 1706 – 12.
- [9] Marco F, Almela M, Noela J, Coel P, Gasser I, Ferrer M. In vitro activities of 33 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains isolated in Barcelona, Spain. Diag Microbiol Infect Dis 2000;38: 259-61.
- [10] Walsh D, Duffi G, Sheridan I, Blair, I, McDowell D. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. J App Microbiol 2001;90:517 – 22.
- [11] Martínez, R, Villalobos L. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en Atún fresco expandido en la ciudad de Cumaná, Venezuela. Rev Cient LUZ 2004; XIV (4):354-57.
- [12] Villalobos L. Identificación por métodos convencionales, PCR y susceptibilidad a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* procedentes de quesos frescos comercializados en Cumaná, Venezuela. Trabajo de Ascenso.UDO.2005. 115 pp.
- [13] Food and Drug Administration USA. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapters 10 and 11. 7ª ed. Washington, D.C. 1992. 23 pp.
- [14] Centro Venezolano De Colecciones De Microorganismos (CVCM). Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 2000. 296 pp.
- [15] Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner M. Detection and differentiation of *Listeria* spp by a single reaction based on multiplex PCR. Appl Environ Microbiol 1999; 65:4688-92.
- [16] Bauer A, Kirby J, Turck M. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Pathol 1966;45:493-6.
- [17] Ferraro M, Wikler M, Craig W, Dudley M, Eliopoulos G, Hecht D et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. 24 (1): 31-98.
- [18] Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. 2005; MVZ-Córdoba. 10:511-43.
- [19] Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob Agents Chem 1999; 43:2103-08.