

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE VETERINARIA



TRABAJO FIN DE MÁSTER
Máster en Iniciación a la Investigación en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos
Julio 2012

**Evaluación de sensibilidad y
resistencia a antibióticos de cepas
de *Listeria* spp. aisladas de
alimentos**

Autor: María Garcés Lambán

Tutores: Antonio Herrera Marteache y M^a Carmen Rota García

Departamento: Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Área: Nutrición y Bromatología



Agradecimientos

Al Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo 2007-2010 a través del Grupo Consolidado de Investigación “Análisis y evaluación de la Seguridad Alimentaria” (AO1).

A CARNISENUSA CSD 2007-00016 (Consolider Ingenio 2010, MICINN), a través del subproyecto titulado: “Incidencia y prevalencia de *L. monocytogenes* en las industrias cárnicas”

Agradezco el apoyo y la ayuda recibida por parte de mis tutores los profesores: Antonio Herrera y Carmina Rota; así como a Pilar Conchello, Javier Yangüela, Diego Góme, Ana Blasco y al apoyo técnico prestado por parte de Nieves Ortega.

Índice

Resumen.....	4
Introducción y revisión bibliográfica	
• Género <i>Listeria</i>	6
• Resistencia a antimicrobianos.....	11
• Metodología para la detección de sensibilidad o resistencia a antibióticos para cepas de <i>Listeria</i>	16
Objetivos.....	22
Material y métodos	
• Material, reactivos y equipos.....	23
• Medios de cultivo.....	24
• Cepas bacterianas.....	25
• Revivificación de cepas de <i>Listeria</i> spp.....	28
• Ajuste de la concentración microbiana por espectrofotometría.....	28
• Test de susceptibilidad antimicrobiana.....	31
Resultados y discusión	
• Ajuste de la Transmitancia.....	37
• Método de microdilución en caldo.....	39
▪ Susceptibilidad antimicrobiana general.....	41
▪ Comparación de la resistencia entre especies.....	43
▪ Adquisición de resistencia a lo largo del tiempo.....	45
▪ Multirresistencias.....	48
Conclusiones.....	50
Bibliografía.....	51
Anexos.....	56

1. Resumen

El uso creciente de antibióticos para la salud humana y animal, así como para la producción ganadera, ha ido acompañado del desarrollo de mecanismos de evasión por parte de microorganismos anteriormente sensibles. De este modo, desde los años 50 hasta la actualidad no han cesado de crecer las descripciones de microorganismos que han adquirido alguna forma de resistencia contra uno o más antibióticos. Inicialmente se monitorizó la evolución de las resistencias a antimicrobianos en los aislamientos originados en la clínica humana y posteriormente se dio gran importancia a la necesidad de la monitorización en los aislamientos de origen animal.

Se ha prestado escasa atención a la presencia de microorganismos resistentes en los alimentos destinados al consumo humano, especialmente en los de origen animal y que presumiblemente pueden ser portadores de resistencias. Muchos de los microorganismos ingeridos con los alimentos, como *L. monocytogenes* pueden ocasionar enfermedades si se dan las circunstancias apropiadas; concretamente éste patógeno con porcentaje de letalidad elevados en determinados grupos de riesgo.

De ahí la necesidad de evaluar los patrones de sensibilidad y resistencia a determinados antimicrobianos de uso habitual en el tratamiento de listeriosis, en cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos.

Para este estudio se han seleccionado 32 cepas de *Listeria* spp. aisladas de alimentos de origen animal (queso y longaniza), que incluyen: 18 cepas aisladas en el año 1994, 5 de ellas *L. monocytogenes* y 13 *L. innocua*, y 9 cepas del 2011, 5 *L. monocytogenes* y 4 *L. innocua*.

Se ha evaluado la susceptibilidad antimicrobiana de las 32 cepas de *Listeria* spp. a 9 antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, penicilina, riampicina, tetraciclina y vancomicina) mediante el método de microdilución en caldo, método cuantitativo que nos permite establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC); método laborioso y largo, pero permite obtener resultados con mayor exactitud y fiabilidad.

Los resultados de este trabajo indican que las cepas de *Listeria* spp. estudiadas han desarrollado resistencias a antimicrobianos a los cuales eran sensibles; además el transcurso del tiempo ha hecho que se incremente el porcentaje de cepas resistentes en un 10% y que hayan adquirido multirresistencia. Se ha observado diferencia de resistencia a los antibióticos ensayados entre las dos especies estudiadas, ya que la especie *L. innocua* manifestó mayor resistencia que *L. monocytogenes*; hecho nada desdeñable por la posibilidad de intercambio genético entre especies.

Estos resultados nos indican que *Listeria spp.* está adquiriendo resistencia a antimicrobianos usados para el tratamiento de la infección, lo que incrementa el riesgo de listeriosis asociada al consumo de alimentos.

2. Introducción y Revisión bibliográfica

2.1 G^o *Listeria*

Listeria debe su nombre a Joseph Lister (1827-1912), cirujano y microbiólogo inglés considerado como uno de los padres de la microbiología. Este microorganismo fue descubierto en conejos, en el año 1926, por Murray, Webb y Swann, microbiólogos de la Universidad de Cambridge, quienes bautizaron a este nuevo agente como *Bacterium monocytogenes*. Casi simultáneamente, James Pirie describió el mismo bacilo en un roedor con fiebre y monocitosis en Kenia y lo llamó *Listerella hepatolytica*. Más tarde, otros investigadores aislaron la misma bacteria y le dieron diferentes nombres. Esta confusión fue resuelta en 1957 por el alemán Heinz Seeliger, conocido taxónomo, quien en honor a Lister impuso el nombre *Listeria monocytogenes*, nomenclatura que se utiliza actualmente (Ledermann, 2008)

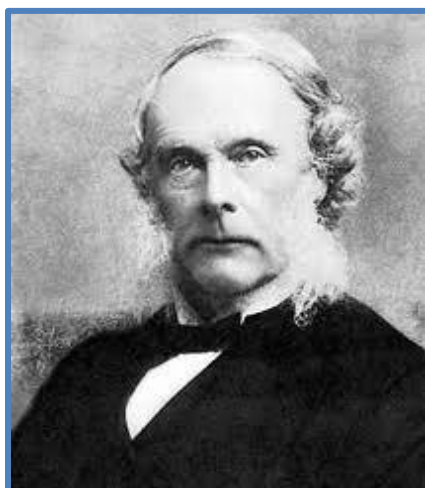


Figura 1. Joseph Lister (1827-1912)

El género *Listeria* comprende un grupo de bacterias Gram-positivas relacionadas con los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Como todas las bacterias Gram-positivas, *Listeria* posee una membrana citoplasmática y una pared celular gruesa y homogénea compuesta por peptidoglicano. Sin embargo, las bacterias Gram-negativas poseen una membrana citoplasmática y pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y a diferencia de las Gram-positivas, éstas poseen una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias (Figura 2). La ausencia de membrana externa hace que las bacterias Gram-positivas sean más sensibles a los antibióticos y a otros agentes antibacterianos, que las Gram-negativas. (Tortora *et al.*, 2007)

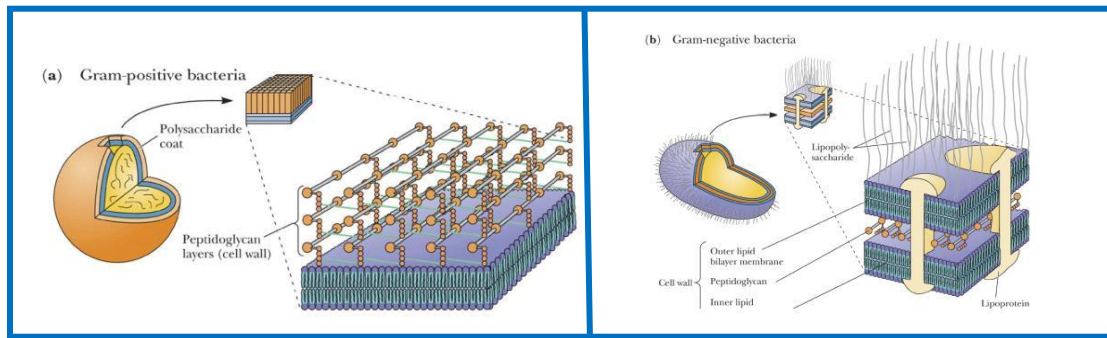


Figura 2. Estructura de la pared de bacterias Gram-positivas vs Gram-negativas

El género *Listeria* actualmente comprende ocho especies (NCBI):

- *L. monocytogenes*, comprende 13 serovariedades, siendo los serotipos más frecuentes 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b
- *L. innocua*
- *L. ivanovii*
- *L. seeligeri*
- *L. welshimeri*
- *L. grayi*
- *L. marthii*
- *L. rocourtiae*

Las especies *L. marthii* y *L. rocourtiae*, han sido identificadas recientemente. (Graves *et al*, 2010; Leclercq *et al*, 2010)

De todas estas especies, la única patógena para el hombre es *Listeria monocytogenes*, responsable de producir listeriosis, siendo ésta una enfermedad de transmisión alimentaria que se presenta produciendo tanto, casos esporádicos como brotes epidémicos. Fue a comienzos de la década de los 80, cuando esta especie se manifestó como un patógeno emergente transmitido por los alimentos (EFSA, 2011).

Entre las características más importantes de esta bacteria debemos destacar su resistencia a condiciones adversas, lo que favorece la supervivencia y crecimiento de estos patógenos en los alimentos (Tabla 1).

Tabla 1. Factores que favorecen la supervivencia y crecimiento de *L. monocytogenes* (AESAN, 2011)

Factor	Puede crecer			Puede sobrevivir pero no crecer
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura(°C)	-1,5 a +3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad agua (Aw)	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal (%)	< 0,5	0,7	12 a 16	≥20
Atmósfera	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado o atmósfera modificada			

El hábitat de *Listeria* spp., es muy diverso ya que se encuentra en intestino de animales y personas que actúan como portadores y, también, está ampliamente distribuida en ambientes naturales como suelo, agua, efluentes, pastos y ensilados dónde sobreviven durante períodos extensos de tiempo. También se encuentra en el suelo, paredes, techos y equipos de plantas de procesamiento de alimentos (Elika, 2006), lo que representa un importante problema a la industria alimentaria.

L. monocytogenes puede crecer como célula plantónica o como biofilm, adhiriéndose a las superficies y formando colonias protegidas por una capa formada por polisacáridos extracelulares denominada biofilm. De este modo, la bacteria es más resistente a los agentes químicos y físicos y puede sobrevivir por largos periodos con aportes mínimos de nutrientes. La localización de estas colonias protegidas por biofilm en áreas de difícil visibilidad y acceso para su limpieza hace que este patógeno pueda sobrevivir como foco continuo de contaminación de alimentos. (Elika, 2006)

Su carácter ubicuitario le confiere una importante oportunidad de llegar a los alimentos, que junto con su resistencia y multiplicación en condiciones extremas, destacando su carácter psicrotrofo, representa un importante problema sanitario.

Son muchos los alimentos que pueden vehicular este patógeno, de hecho ha sido aislado de una gran variedad de alimentos de origen vegetal (ensaladas y frutas), lácteo, marino o cárnico (Elika 2009):

- 1. Carne de rumiantes, otros animales de abasto y aves.** Aunque la prevalencia de *L. monocytogenes* en carnes difiere significativamente, algunos estudios han citado tasas de prevalencia de hasta el 92% de los productos analizados. Un número elevado de animales de abasto (11-52%) se consideran portadores sanos. En mataderos, la presencia de *L. monocytogenes* puede ser endémica, particularmente en efluentes y suelos.

2. Leche y derivados lácteos. Se ha descrito en leches y derivados lácteos y en plantas de procesamiento de dichos alimentos, así como en productos pasteurizados y en derivados frescos, probablemente, debido a una recontaminación tras su pasteurización. En el caso de quesos elaborados con leche pasteurizada o no pasteurizada, la ausencia de *L. monocytogenes* depende de parámetros intrínsecos (a_w , acidez, péptidos antimicrobianos, etc.) y extrínsecos (T^a , humedad, recontaminación, etc.), mientras su presencia es siempre problemática debido a su capacidad extraordinaria de supervivencia en condiciones hostiles.

3. Pescado fresco, congelado y ahumado: La presencia y supervivencia en pescado fresco y congelado es poco probable, mientras en el pescado ahumado es variable dependiendo del método de ahumado empleado (en frío o caliente), siendo este tipo de alimentos de alto riesgo.

4. Frutas y verduras: Se conoce que hasta el 10-20% de productos vegetales listos para su consumo pueden estar contaminados con *L. monocytogenes* incluyendo semillas germinadas (brotes), lechugas, rábanos, tomates, cebollas, pepinos, coliflores y setas cultivadas; de hecho, algunos brotes de listeriosis han sido debido al consumo de este tipo de productos.

5. Huevos y ovoderivados: La detección en este tipo de alimentos es poco frecuente.

6. Alimentos listos para consumo (RTE): Son alimentos de alto riesgo y han sido asociados a varios brotes de listeriosis. Tal es el caso de derivados cárnicos picados, ya que son alimentos con alta manipulación por lo que la posible contaminación con *L. monocytogenes* es muy elevada. En los derivados cárnicos fermentados, posiblemente, la presencia de *L. monocytogenes* es menor aunque su supervivencia es posible.

La prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en los alimentos preocupa tanto a profesionales de Salud Pública como a industriales y gobiernos, ya que se trata de un patógeno de origen alimentario que presenta una elevada tasa de mortalidad en poblaciones de riesgo.

Según indica el último informe de la EFSA, en el 2009 se confirmaron en la Unión Europea 1645 casos de listeriosis, mayor número de casos que los registrados años anteriores (2005-2008). La tasa de notificación fue mayor en la personas mayores de 65 años (58,5%) y el porcentaje de niños entre 0 y 4 años fue del 4,2%. La mayor parte

de los casos fueron de origen alimentario. En la siguiente figura 3 se puede observar la tendencia de los casos de listeriosis (EFSA, 2011)



Figura 3. Evolución de los casos notificados de listeriosis (2005-2009)

La listeriosis puede ser muy grave, en determinados grupos de riesgo, entre los que se encuentran: fetos, neonatos, niños, embarazadas y ancianos, y personas con el sistema inmune comprometido, pudiendo ocasionar secuelas que perduran toda la vida del paciente e incluso la muerte.

La transmisión de la enfermedad puede ser (Seza *et al*, 2007):

- Vertical (madre-hijo)
- Origen zoonótico (contacto con animales enfermos)
- Nosocomial (adquisición hospitalaria)
- Transmisión alimentaria, que representa el 99% de los casos

Esta enfermedad tiene dos formas diferentes de presentación:

- **Listeriosis no invasiva** o gastroenteritis febril, cuyos síntomas pueden ser leves (fiebre, dolores musculares y síntomas gastrointestinales).
- **Listeriosis invasiva**, responsable de producir aborto en mujeres gestantes, neumonías, granulomas diseminados en recién nacidos, meningitis, meningoencefalitis y septicemia). (Maxine Rosaler, 2004)

Los antibióticos de elección para el tratamiento de la listeriosis humana son: penicilina, ampicilina, o una asociación de ampicilina-gentamicina, penicilina-gentamicina (Charpentier y Courvalin, 1999). También se puede tratar con tetraciclina, eritromicina o cloranfenicol, solos o combinados (Holf, 1991). Dado que la resistencia a la penicilina y / o tetraciclina es común, otra terapia incluye el tratamiento con la

asociación de cloranfenicol y gentamicina (Lorber, 1997; Schlech, 2000), aunque en las personas alérgicas, o en la presencia de bacterias multirresistentes, el tratamiento está representado por cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol).

2.2 Resistencia a antibióticos/antimicrobianos

Múltiples estudios han demostrado la aparición de cepas multirresistentes en la naturaleza, lo que representa un riesgo potencial para la salud humana. El uso indiscriminado e irracional de antibióticos en Medicina humana y Veterinaria, así como para la producción ganadera, ha hecho que ciertos microorganismos estén adquiriendo algún tipo de resistencia frente a uno o más antibióticos, esto se ha convertido en uno de los principales problemas de Salud Pública (Balsalobre *et al.* 2004).

Aunque *Listeria* es una bacteria que adquiere resistencia a antibióticos muy lentamente, en los últimos años se ha demostrado que este patógeno ha desarrollado resistencias a antimicrobianos, entre ellos se incluyen algunos de los utilizados para el tratamiento de la listeriosis, tales como ampicilina o la asociación con un aminoglucósido (por ejemplo, gentamicina), y otros de segunda elección como cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina y rifampicina. (Moura *et al.* 2011).

Los microorganismos pueden presentar dos tipos de resistencia:

- **Natural**, cuando la bacteria no presenta sensibilidad al antibiótico de manera intrínseca.
- **Adquirida**, cuando una bacteria que antes era sensible, se vuelve resistente a un determinado antibiótico.

Las bacterias se vuelven resistentes gracias a su gran capacidad de adaptación, desarrollando mecanismos de resistencia que inhiben la acción de los medicamentos. Esta resistencia bacteriana constituye un grave problema para la salud pública, y obliga al desarrollo y utilización de nuevos agentes antibacterianos, más costosos y a veces más tóxicos que los empleados habitualmente (Otto *et al.* 2009).

Existen dos mecanismos, principalmente, por el que bacterias adquieren resistencia: bioquímicos y genéticos. (Otto *et al.*, 2009):

Mecanismos bioquímicos. Desde el punto de vista bioquímico, esta resistencia puede adquirirse mediante 3 formas diferentes:

1. **Inactivación del antibiótico.** Se realiza mediante la producción de enzimas que hidrolizan el antibiótico, por ejemplo la β -lactamasa que actúa sobre los β -lactámicos (penicilina, oxacilina, cefalosporinas) hidrolizando el enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporínico resultando un derivado ácido inactivo. Otra de las vías de inactivación es la modificación enzimática, este es el caso de

las enzimas modificadoras de aminoglucósidos codificadas en plásmidos. Por ejemplo, la modificación del cloranfenicol la realiza una enzima intracelular, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), existente tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Esta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S (Jawetz *et al.* 1997)

2. **Alteración del sitio blanco del antibiótico.** Se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc. Por ejemplo, el mecanismo de resistencia (ribosomal) a gentamicina, tobramicina y amikacina es poco frecuente y consiste en la mutación del péptido S12 de la subunidad 30S. (Otto *et al.* 2009).
3. **Las barreras de permeabilidad.** Incluye tres componentes básicos: la estructura de la membrana externa de la bacteria, las porinas, canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular, y las características fisicoquímicas del antimicrobiano (medicamentos hidrofílicos requieren presencia de porinas para su transporte al interior de la célula) (Otto *et al.* 2009).

Mecanismos genéticos. Este tipo de resistencia antimicrobiana puede ser adquirida mediante: mutación genética o por adquisición de nuevos genes de resistencia por intercambio de material genético.

1. **Mutación genética.**

En la mutación genética se produce un cambio en la secuencia de bases del ADN bacteriano. Este cambio en la secuencia de bases de un gen, en ocasiones, producirá un cambio en el producto codificado por ese gen. En el mundo microbiano ciertas mutaciones producen resistencia a antibióticos o alteraciones de patogenicidad. Las mutaciones en genes cromosómicos pueden conferir resistencia a las especies de *Listeria* (Alonso-Hernando, *et al.*, 2011). Existen diferentes tipos de mutaciones (Tortora *et al.*, 2007):

- **Sustitución de bases:** una de las mutaciones más comunes, en la que una única base en un punto de la secuencia de ADN es sustituida por una base diferente. Cuando el ADN se replica el resultado es la sustitución de un par de bases. Si una sustitución de bases sucede dentro de un gen que codifica una proteína, el mRNA transcrito a partir del gen llevará una base incorrecta en esa posición. Cuando el mRNA se traduce en una proteína la base incorrecta puede causar la inserción de un aminoácido incorrecto en la proteína.

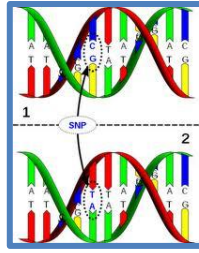


Figura 4. Sustitución de bases

- **Mutación de cambio de sentido:** cuando la sustitución de bases produce un cambio de aminoácidos en la proteína sintetizada.
- **Mutación terminadora:** mediante la creación de un codón de terminación (sin sentido) en la mitad de una molécula de mRNA algunas sustituciones de bases impiden efectivamente la síntesis de una proteína funcional completa; sólo se sintetiza un fragmento. Por eso una sustitución de bases que produce un codón de terminación se denomina mutación terminadora.
- Mutaciones de cambio del marco de lectura: un par de nucleótidos o algunos pares de nucleótidos presentan delección o se insertan en el ADN. Este tipo de mutación puede cambiar el marco de lectura de la traducción. Éstas casi siempre determinan un largo tramo de aminoácidos alterados y la producción de una proteína inactiva por el gen mutado.

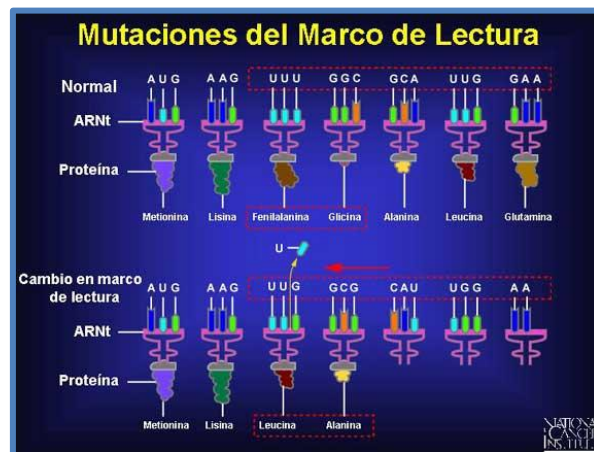


Figura 5. Mutaciones de Marco de Lectura

- Mutaciones espontáneas: las sustituciones de bases y las mutaciones de cambio del marco de lectura pueden aparecer de forma espontánea debido a errores ocasionales durante la replicación del ADN. Suceden en ausencia de agentes productores de mutaciones.

2. Adquisición de nuevos genes de resistencia por intercambio de material genético.

Es éste el principal mecanismo de adquisición de resistencia a antibióticos por parte de las bacterias transmitidas por los alimentos. Se sabe que las bacterias pueden transmitir sus genes de resistencia entre especies relacionadas y no relacionadas.

L. monocytogenes pueden volverse resistente por la adquisición de componentes genéticos móviles como plásmidos y transposones. Por ejemplo el *gen* VanA es uno de los genes responsables de la resistencia a la vancomicina. Este gen también puede ser transportado por un plásmido de gran tamaño (Poyart-Salmerón *et al*, 1990). Una de las fuentes más comunes de la adquisición de genes de resistencia de *Listeria* spp., es a partir de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* (Biavasco *et al*, 1996)

Las bacterias pueden adquirir resistencia a través de diferentes mecanismos de intercambio de material genético, como transducción, conjugación, transformación y transposición (Alonso-Hernando *et al*, 2011).

- **Transducción:** Transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago atemperado (genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano) durante su fase de ensamblaje, encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina transducción generalizada y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano pero se conserva el genoma viral se habla de transducción especializada. (Harley *et al*, 2004)

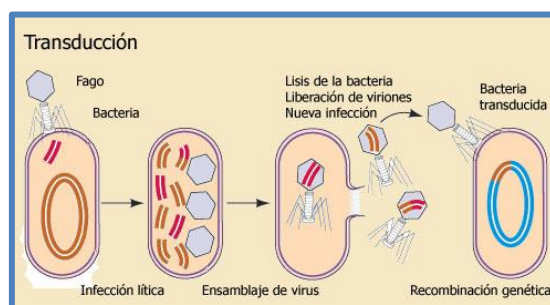


Figura 6. Transducción

- **Conjugación:** Transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de una hebra sexual; estos plásmidos usualmente contienen genes que le confieren resistencia a antibióticos, antisépticos y desinfectantes (Levy SB 2004).

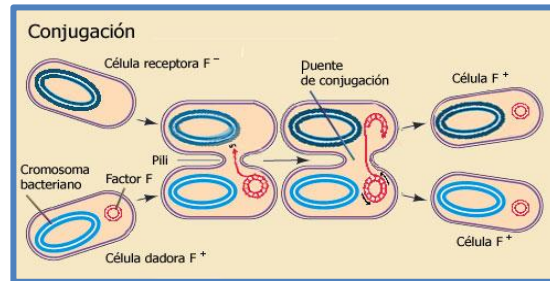


Figura 7. Conjugación

- **Transformación:** Transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma (Levy SB. 1998)

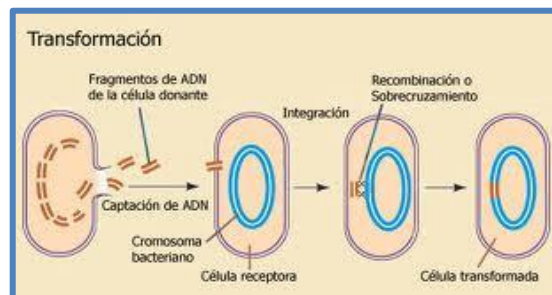


Figura 8. Transformación

- **Transposición:** Movimiento de una sección de ADN (transposon) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular (Prescott *et al*, 2004)

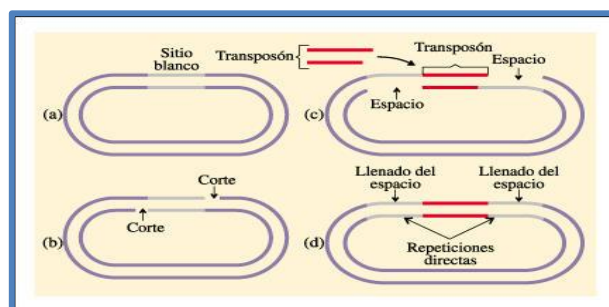


Figura 9. Transposición

Debido al uso desmesurado de antibióticos para la salud humana y animal, gran número de microorganismos, entre ellos el género *Listeria*, están desarrollando resistencias a diferentes antibióticos. El estudio de antibiorresistencias no debe limitarse sólo a la especie patógena (*L. monocytogenes*), ya que los genes de resistencia pueden transmitirse de unas especies a otras. Estudios como el de Hernández *et al* (2004) demuestran una adquisición de genes de resistencia de la especie *L. monocytogenes* a partir de la especie *L. innocua*.

2.3 Metodología para la detección de los patrones de sensibilidad o resistencia a antibióticos.

La problemática actual de las resistencias de los microorganismos a los antimicrobianos hace ineludible su determinación, incluso en aquellos casos en los que la sensibilidad se considera universal y no se han descrito, por el momento, mecanismos de resistencia (Aureli *et al*, 2003). Su detección se realiza mediante las pruebas de sensibilidad/resistencia o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica (Jorgensen, y Hindler, 2007).

El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Por el momento no existe un método universal que reproduzca las condiciones en las que se encuentra un microorganismo produciendo una infección y, por tanto, la situación ideal en las que deben desarrollarse las pruebas de sensibilidad (García *et al*, 2000).

Los métodos para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana pueden clasificarse en dos tipos: métodos cualitativos y cuantitativos.

- Los **métodos cualitativos** o métodos de difusión en disco, son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. Este es uno de los métodos más utilizados en la rutina diaria por la mayor rapidez, pero son varios los estudios que han demostrado que es inadecuado y poco reproducible (Gómez *et al*, 2009).
- Los **métodos cuantitativos** son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (CBM). Se define MIC como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes) y como CBM la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de

inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada. La determinación de la MIC puede realizarse por los métodos de micro o macro dilución en caldo, dilución en agar o por el test comercial *E-test*.

Para que los resultados de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos sean reproducibles y comparables, los métodos deberán estar estandarizados. Existen diferentes centros europeos de referencia en los estudios de sensibilidad microbiana, como son el Grupo Sueco de Referencia en Antimicrobianos (SRGA), el Sistema DIN de los Países Bajos, la Sociedad Británica de Antimicrobianos, la Sociedad Francesa de Microbiología (SFM) y el Comité Americano de Estandarización de Laboratorios Clínicos (CLSI) (Malbrán, 2001). Las recomendaciones más utilizadas para los métodos de susceptibilidad antimicrobiana son las establecidas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Métodos de Dilución en caldo (cuantitativos)

Muchos factores influyen en las interacciones *in vitro* e *in vivo* entre microorganismos y las sustancias antimicrobianas, incluyendo el medio de cultivo utilizado, la concentración del antibiótico y la cantidad de bacterias frente a las que actúa el antibiótico.

El **medio de cultivo** utilizado para realizar las Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos debe permitir el crecimiento apropiado del microorganismo en estudio. Para la mayor parte de los microorganismos se recomienda utilizar el medio Mueller-Hinton (MH), sea en agar o en caldo. Estos medios muestran buena reproducibilidad entre los diferentes lotes comerciales, son baratos y contienen bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas. (García *et al* 2000)

A pesar de estas cualidades, algunos parámetros del medio se deben controlar en cada lote de uso, como son:

- **La cantidad de cationes divalentes.** La variación de los cationes divalentes principalmente de Ca^{++} y Mg^{++} , afecta a los resultados de antibióticos como tetraciclinas, aminoglucósidos, etc., por lo que se recomienda la utilización del medio Mueller-Hinton con la concentración de cationes ajustada (cation-adjusted Mueller-Hinton, CAMH), para asegurar resultados aceptables. Si las concentraciones de cationes son más bajas que las recomendadas, se observará una actividad incrementada de los aminoglicósidos y la tetraciclina. Por el contrario, con concentraciones de cationes más altas que las indicadas la actividad de los aminoglicósidos y la tetraciclina disminuirá.

- **pH del medio de cultivo** que debe ser ajustado a 7.2 – 7.4 (7.3 ± 0.1) a 25°C antes de autoclavar y debe ser verificado tras la preparación final. Un pH del medio de cultivo inferior al indicado puede conducir a una actividad disminuida de los aminoglicósidos, eritromicina y clindamicina, mientras que un pH superior a 7.4 tiene el efecto contrario.
- **Efecto de la timina o timidina:** los medios que contienen un exceso de timina o timidina pueden revertir los efectos inhibitorios de las sulfonamidas y trimetoprim, produciendo alteraciones en las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano en la placa.

Existen dos modalidades de los métodos de dilución, en las que se utilizan tubos (macrométodo) o placas de microtitulación (micrométodo) (García *et al*, 2000):

En el **método de macrodilución** se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo.

En el **método de microdilución** cada una de los pocillos de la placa de microtitulación con pocillos de fondo en "U" representa uno de los tubos del método de macrodilución.

La mayoría de placas disponibles tienen 96 pocillos (12x8). El volumen final de cada pocillo es habitualmente de 100 µl, por lo que antes de la inoculación de la placa, cada pocillo debe contener 100 µl de caldo con antimicrobiano (volumen de inóculo menor de 10 µl) o 50 µl (si se van a usar también 50 µl para inocular la placa). En este último caso debe tenerse en cuenta, a la hora de calcular la concentración inicial más alta, que tras añadir el inóculo la concentración de antimicrobiano se diluirá a la mitad. Dependiendo, pues, del volumen de inóculo final, las placas se rellenan utilizando una pipeta multicanal con 100 ó 200µl de la solución más alta de antimicrobiano en la columna 1. Posteriormente se añade un volumen de 50 o 100 µl de caldo sin antimicrobiano en los pocillos de las columnas 1 a la 10 y se realiza la dilución en la

forma habitual empleando la pipeta multicanal, dejando los pocillos de la última columna como controles (positivos - no antimicrobiano- y negativos - no inóculo-).

Para la preparación del inóculo se debe partir de un cultivo fresco para la preparación de una suspensión en solución salina estéril o en caldo Mueller-Hinton a una turbidez equivalente a la del estándar 0.5 de la escala McFarland.

La CLSI recomienda que se debe partir de una concentración de 1×10^8 ufc/ml, para que la concentración final en cada pocillo de la placa de microtitulación sea de 5×10^5 ufc/ml (García *et al*, 2000), aunque se aceptan concentraciones entre 3 y 7×10^5 ufc/ml.

Esta concentración bacteriana puede ser ajustada por espectrofotometría mediante la medida de la Absorbancia o Transmitancia.

Los medios de cultivo inoculados deben ser incubados dependiendo de los microorganismos a 35°C durante 18/24 horas, para todas aquellas bacterias de crecimiento rápido o a 35°C durante 24/48 horas, para las de crecimiento lento.

Otro punto importante a tener en cuenta, es la utilización de cepas de referencias en cada ensayo, con el fin de asegurar la calidad de éste y controlar la precisión y la exactitud del método. La selección de las cepas de referencia dependerá del tipo de ensayo que se vaya a realizar. Las cepas de referencia aconsejadas por el CLSI en métodos de dilución en caldo son:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: Control para antimicrobianos usados frente a bacterias grampositivas.
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: Control para antimicrobianos usados frente a bacterias gram-positivas, y para el control de trimetoprim/sulfametoxazol.
- *Escherichia coli* ATCC 25922: Control de antimicrobianos usados frente a bacterias gram-negativas.
- *Escherichia coli* ATCC 35218: Control para las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: Control de antimicrobianos usados frente a bacterias gram-negativas y particularmente con aminoglucósidos.

Selección de antibióticos para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*

En la selección de los antibióticos debe tenerse en cuenta, para incluir en el estudio, aquellos antibióticos de uso habitual en el tratamiento de las infecciones producidas por la bacteria/s objeto de estudio.

También debe seleccionarse al menos un antibiótico perteneciente a cada uno de los siguientes grupos continuación (Skoog *et al*. 2003):

- **β-Lactámicos:** poseen un anillo central de cuatro átomos denominado anillo β-lactámico. Su principal modo de acción es la inhibición de la síntesis de pared celular. Constituyen una amplia lista de antibióticos: Penicilinas, Cefalosporinas y todos aquellos que en su estructura tengan un anillo β-lactámico es su estructura molecular.
- **Glicopéptidos:** Los glicopéptidos poseen una compleja estructura química y actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular en un sitio diferente al de los β-Lactámicos. La actividad de este grupo está dirigida a las bacterias Gram - positivas.
- **Aminoglucósidos:** Los aminoglucósidos o aminósidos son un grupo de antibióticos bactericidas. Actúan a nivel de ribosomas en la subunidad 30S bacteriana, y por ende, a nivel de síntesis de proteínas inhibiéndola, creando porosidades en la membrana externa de la pared celular bacteriana. Tienen actividad especialmente frente a bacterias Gram-negativas y aeróbicas y actúan sinérgicamente frente a organismos Gram-positivos.
- **Macrólidos:** Los macrólidos son antibióticos estructuralmente relacionados que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona, que inhiben la síntesis proteica a nivel ribosomal.
- **Rifamicinas:** A este grupo pertenece la Rifampicina que se une a la subunidad beta de la DNA-polimerasa RNA-dependiente, impidiendo que esta enzima se una al DNA, bloqueando la transcripción del RNA.
- **Tetraciclinas:** La Tetraciclina es producida por una bacteria del género *Streptomyces*. Su mecanismo de acción se debe a la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal, de ciertas bacterias Gram-positivas y negativas. Actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30 S del ribosoma y no permitir la unión del ácido ribonucleico de Transferencia (tRNA) a este, ni el transporte de aminoácidos hasta la subunidad 50 S.

Las resistencias bacterianas a este grupo son de aparición lenta, aunque mucho más rápida si se utiliza por vía tópica. El mecanismo bacteriano implicado puede ser mediante plásmido, lo que explica la reticencia al uso de Tetracilinas en el ámbito hospitalario, para evitar la aparición de resistencias simultáneas a varios antibióticos.

- **Quinolonas:** Este grupo de compuestos incluye un número de agentes antimicrobianos íntimamente relacionados que funcionan primariamente inhibiendo la actividad de la DNA-girasa, interfiriendo en la replicación de

ADN de muchas bacterias Gram-positivas y negativas. Tienen una acción bactericida rápida.

- **Lincosamidas: Clindamicina.** A este grupo pertenece la Clindamicina tiene efecto bacteriostático. Interfiere con la síntesis de las proteínas, de forma similar a la eritromicina y cloranfenicol, uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano.

Lectura de los resultados

Tras la incubación de las placas de microtitulación se determina la capacidad de crecimiento de la bacteria en presencia del antimicrobiano mediante la valoración de la turbidez del medio por espectrofotometría.

La lectura espectrofotométrica permite establecer la MIC para cada antibiótico ensayado, que se definen como la máxima dilución del antimicrobiano en la que no hay crecimiento bacteriano (García *et al*, 2000).

Los criterios para la interpretación de las MIC o punto de corte (breakpoint) establecidos por la CLSI para *Listeria*, sólo están fijados para tres antimicrobianos: ampicilina, penicila G y trimetropin-sulfametaxole.

Algunos autores recomiendan utilizar como referencia la MIC establecida para otra bacteria Gram positiva, como es *Staphylococcus aureus*. Estos criterios han sido utilizados en estudios como los de Toxter *et al* (2000); Conter *et al*, (2008); He *et al* (2010). Estos valores de MIC permiten clasificar las cepas como sensibles, resistentes o intermedias a difrentes antibióticos.

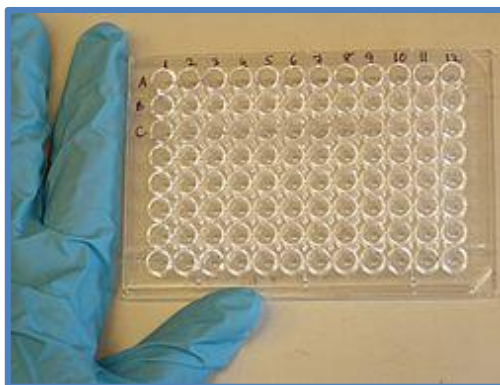


Figura 10. Placa de microtitulación

3. Objetivos

Los objetivos que nos planteamos en este trabajo han sido los siguientes:

1. Evaluación del patrón de susceptibilidad/resistencia antimicrobiana de cepas de *Listeria spp.* de origen alimentario.
2. Estudio comparativo de la susceptibilidad antimicrobiana entre las especies del Gº *Listeria*: *L. innocua* y *L. monocytogenes*.
3. Evolución del patrón de sensibilidad/resistencia de las cepas anteriores a lo largo del tiempo.
4. Estudio y evolución del patrón de multirresistencia de dichas cepas.

4. Material y métodos

Para evaluar el patrón de sensibilidad o resistencia a diferentes antibióticos de cepas del G^o *Listeria*, se utilizó la técnica de microdilución en placa, método recomendado por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

4.1 Material, reactivos y equipos

A continuación se enumeran los equipos, material y reactivos que se han utilizado a lo largo del desarrollo experimental de este trabajo.

Material

- Micropipetas (50µl y 1000µl)
- Micropipeta multicanal (50µl)
- Material plástico: puntas, placas de Petri, placas de microtitulación (96 pocillos)
- Crioviales de congelación (Nirco S.L)
- Tubos Spectronic

Reactivos.

- HCl 0,1M (Panreac)
- Tampón fosfato Ph 6 0,1M (Panreac)
- Etanol 95% (Panreac)
- Dimetilsulfóxido (Panreac)
- Penicilina (SIGMA-ALDRICH)
- Ampicilina (SIGMA-ALDRICH)
- Ciprofloxacina (SIGMA-ALDRICH)
- Clindamicina (SIGMA-ALDRICH)
- Eritromicina (SIGMA-ALDRICH)
- Gentamicina (SIGMA-ALDRICH)
- Rifampicina (SIGMA-ALDRICH)
- Tetraciclina (SIGMA-ALDRICH)
- Vancomicina (SIGMA-ALDRICH)

Equipos

- Balanza granatario monoplato Kern 440-45N
- Rotatubos. IKA (03.169125).
- Estufa de cultivo 30 °C de J.P.Selecta (2000237).
- Estufa de cultivo 37 °C de Memmert (D06062).
- Lector ELISA (Multiskan Ex (*Thermo labsystem*))
- Spectronic 20 (PACISA)
- Autoclave (P. Selecta)
- Cabina de flujo laminar (Telstar SA)

4.2 Medios de cultivos

Los medios de cultivo utilizados en el estudio, así como su modo de preparación se detallan a continuación:

- **Caldo BHI (caldo infusión cerebro corazón, MERCK)**

Método de preparación:

- Suspender 37g del medio en un litro de agua purificada.
- Agitar suavemente hasta conseguir que se haya diluido por completo.
- Dispensar en tubos de vidrio, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

- **Agar BHIA (agar infusión cerebro corazón, OXOID) :**

Método de preparación:

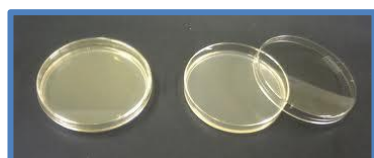


Figura 11. Placas medio BHIA

- Suspender 52 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
- Agitar para conseguir una disolución parcial.
- Calentar agitando frecuentemente y hasta llegar a ebullición.
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
- Verter sobre las placas de Petri y dejar solidificar.

- **Caldo Mueller-Hinton (MERCK):**

Método de preparación:

- Suspender 21g del medio en un litro de agua purificada.
- Agitar para conseguir una dilución parcial.
- Calentar agitando hasta llevarlo a ebullición.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Atemperar en la estufa de mantenimiento de agares hasta su uso.

- **Agar PCA (Recuento en placa agar, MERCK)**

Método de preparación:



Figura 12. Placa Agar PCA

- Suspender 23,5g del medio en un litro de agua purificada
- Agitar suavemente hasta conseguir que se haya diluido por completo.
- Dispensar en tubos de vidrio, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

4.3 Cepas bacterianas

4.3.1 Cepas de referencia

La cepa de referencia utilizada en nuestro trabajo ha sido *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Esta cepa fue conservada en congelación en viales de criocongelación a -80 °C. Cada vial compuesto por bolitas de vidrio poroso y de líquido criogénico, facilita la adherencia de los microorganismos y asegura la supervivencia del máximo número de bacterias posibles durante su conservación a temperatura de congelación.

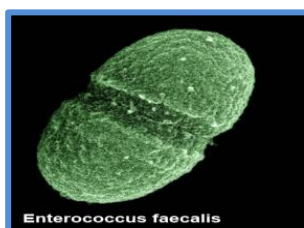


Figura 13. *Enterococcus faecalis*

4.3.2 Cepas a estudiar

Las cepas ensayadas para el estudio de sensibilidad y resistencia han sido cepas de *Listeria* pertenecientes a las especies *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Estas cepas fueron aisladas en estudios previos a partir de productos cárnicos (longaniza fresca, semicurada y curada) y productos lácteos (queso fresco y madurado)

La longaniza es un derivado cárnico, compuesto por una mezcla de carne picada o troceadas de cerdo, grasa de cerdo, sal, y especias, amasada y embutida en tripas naturales o artificiales. Dependiendo del tratamiento posterior puede ser fresca, curada o semicurada.

El queso es el producto lácteo fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche (*Real Decreto 1113/2006*):

- Queso fresco: es el que está dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación.

- Queso madurado: es el que, tras el proceso de fabricación, requiere mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en condiciones tales que se produzcan los cambios físicos y químicos característicos del mismo.

Las cepas utilizadas en este estudio fueron aisladas en durante los años 1994 y 2011. Todas las cepas de *Listeria* spp. aisladas de éstos productos, se conservaron en crioviales a -80°C hasta el momento de su análisis.

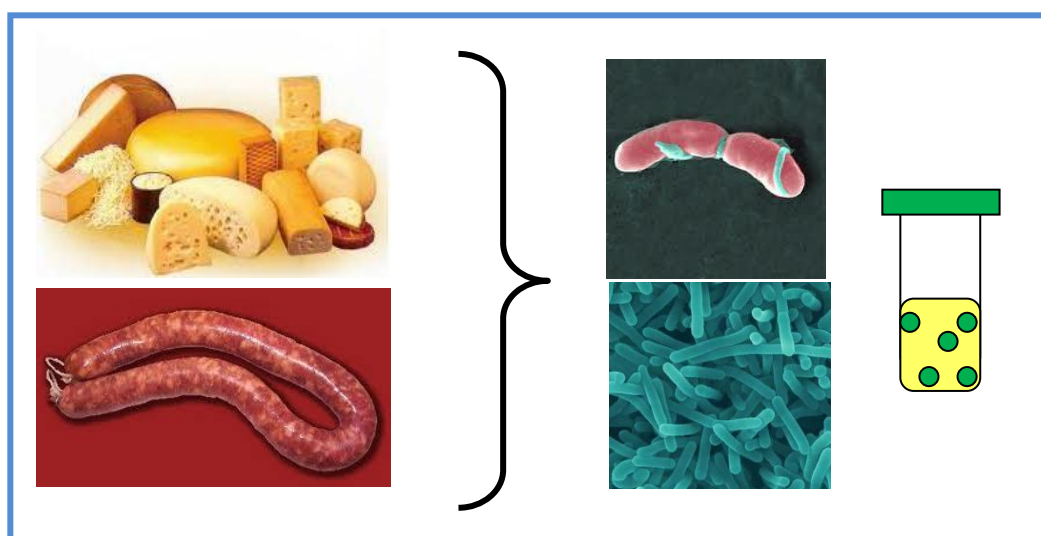


Figura 14. Origen de las cepas de *Listeria* spp.

El número total de cepas estudiadas en ambos períodos fue de 32; 23 de ellas fueron aisladas durante el año 1994 y las 9 restantes durante el año 2011. De las 32 cepas ensayadas, 10 pertenecían a la especie *L. monocytogenes* y 22 cepas a la especie *L. innocua*. En la Tabla 2, se detalla el número de referencia, la especie y el alimento de procedencia de cada una de las cepas.

Tabla 2. Cepas de *Listeria* spp. ensayadas

Nº de cepa	Cepa	Alimento
Año 1994		
1	<i>L. innocua</i>	Longaniza fresca
2	<i>L. innocua</i>	Longaniza fresca
3	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza fresca
5	<i>L. innocua</i>	Longaniza fresca
8	<i>L. innocua</i>	Longaniza fresca
9	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza fresca
11	<i>L. innocua</i>	Longaniza fresca
12	<i>L. innocua</i>	Longaniza fresca
13	<i>L. innocua</i>	Longaniza semicurada
14	<i>L. innocua</i>	Longaniza semicurada
16	<i>L. innocua</i>	Longaniza curada
17	<i>L. innocua</i>	Longaniza curada
18	<i>L. innocua</i>	Longaniza curada
19	<i>L. innocua</i>	Longaniza fresca
22	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza fresca
23	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza fresca
25	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza semicurada
27	<i>L. innocua</i>	Longaniza semicurada
66	<i>L. innocua</i>	Queso fresco
68	<i>L. innocua</i>	Queso fresco
70	<i>L. innocua</i>	Queso curado
71	<i>L. innocua</i>	Queso curado
72	<i>L. innocua</i>	Queso curado
Año 2011		
4	<i>L. innocua</i>	Longaniza semicurada
5	<i>L. innocua</i>	Longaniza semicurada
6	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza semicurada
7	<i>L. innocua</i>	Longaniza semicurada
8	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza semicurada
12	<i>L. innocua</i>	Longaniza semicurada
17	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza semicurada
20	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza semicurada
26	<i>L. monocytogenes</i>	Longaniza semicurada

4.4 Revivificación de *Listeria* spp.

Todas las cepas almacenadas a -80°C fueron revivificadas para su posterior estudio de sensibilidad/resistencia a antimicrobianos.

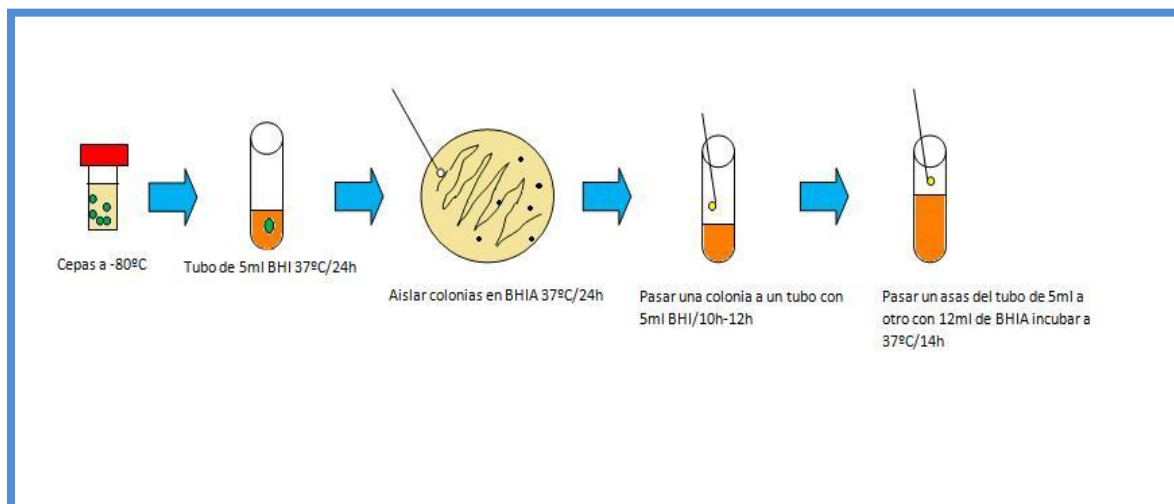


Figura 15. Revivificación de *Listeria* spp.

Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- De cada uno de los crioviales, se pasó una bolita con el microorganismo adherido a un tubo con 5ml de caldo BHI. Incubación a 37°C durante 24 horas.
- Siembra en superficie en medio BHIA para obtener un cultivo puro. Incubación a 37°C durante 24 horas.
- Siembra de una colonia de cada una de las placas en un tubo con 5 ml de BHI e incubar a 37°C entre 10/12 horas, con el fin de alcanzar la fase estacionaria del crecimiento bacteriano.
- Siembra de un asa del tubo de 5ml a otro conteniendo 12 ml de BHI. Incubación a la misma T° durante una noche (12/14 horas).

4.5 Ajuste de la concentración microbiana mediante Espectrofotometría

La concentración del inóculo para el posterior estudio de susceptibilidad antimicrobiana se ajustó por espectrometría mediante la medida de la transmitancia (*Spectronic 20*).

Para obtener la medida de transmitancia, el sistema de lectura del equipo Spectroinic 20 se pone a cero y el compartimento debe estar vacío de tal modo que el dispositivo oclusivo impida el paso del haz y la radiación no llegue al detector. Este proceso se

denomina calibración de 0% de T o ajuste. Se inserta en el portamuestras un blanco y el indicador se ajusta hasta 100% de transmitancia, esto se denomina calibración de 100% de T o ajuste. Una vez realizado el ajuste se introducen las muestras en el compartimento de la celda y se lee directamente la transmitancia.

Para conocer el porcentaje de transmitancia que se correlaciona con una concentración microbiana de 1×10^8 ufc/ml, se hicieron medidas de transmitancia desde un 100% a un 16%. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- A partir de un cultivo fresco (12 ml de BHI) de la cepa CECT935, se pasó 0,1ml a un frasco con 100 ml de BHI.
- Medida de la transmitancia cada 5 minutos y una vez alcanzada una transmitancia de 50-70% se tomaron medidas cada 15 minutos.
- De cada punto de medida anterior se realizan diluciones decimales en caldo Mueller- Hinton, siembra en placa en medio PCA, e incubación a 37°C/24 h. Tras la incubación se realizan los recuentos correspondientes. Las diluciones que se realizan en cada punto se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Diluciones para cada transmitancia.

T%/ dilución	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
80-100				X	X			
70-80					X	X	X	
50-70						X	X	
<40						X	X	X

A menor porcentaje de transmitancia mayor concentración microbiana, por lo que es necesario incrementar el número de diluciones.

Medida de la transmitancia

Para medir la transmitancia se realizaron los siguientes pasos:

- Preparación del blanco: 3ml de BHI en tubo de Spectronic estéril.
- Preparación de las muestras: 3,5 ml de BHI y 0,4 ml de la suspensión microbiana. Las cepas ensayadas fueron: *E. faecalis* (cepa de referencia) y 3 cepas de *Listeria spp.*
- Insertar el blanco y ajustar a 100% la Transmitancia.
- Medida la transmitancia de cada una de las muestras previamente homogenizadas en vortex. Si no se obtiene la transmitancia deseada se ajusta

con añadiendo caldo BHI estéril. Cada 300µl caldo de BHI aumenta la transmitancia alrededor de dos unidades.

Para comprobar la concentración del inóculo se realizaron diluciones decimales (hasta la -7) en caldo Mueller-Hinton, de cada cepa *Listeria spp.*, en fase exponencial. Posteriormente de las diluciones -6 y -7 se sembró en masa y por duplicado en el medio PCA. Una vez solidificado el agar, se incubaron a 37°C durante 24 horas. En la figura 16 se observa el esquema de trabajo.

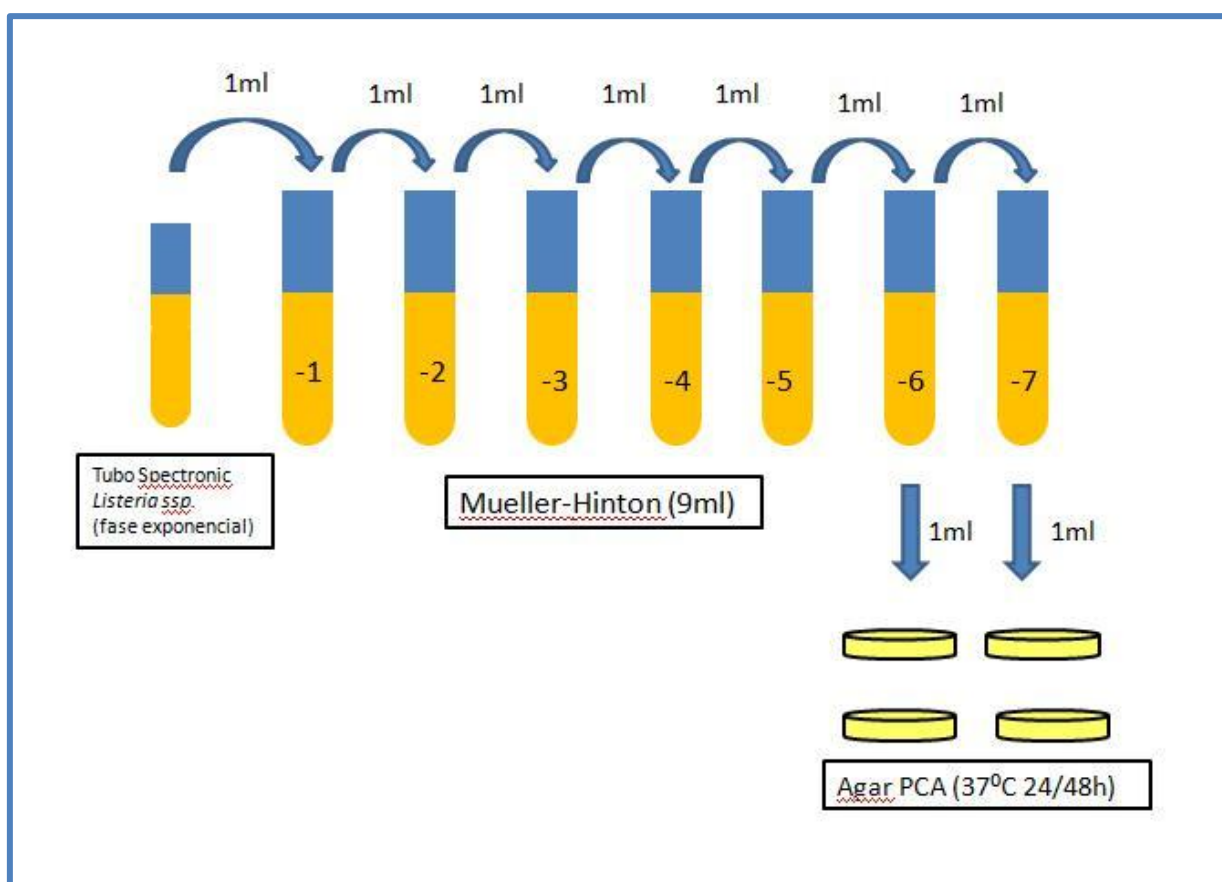


Figura 16. Verificación de la transmitancia

4.6 Test de sensibilidad/resistencia a antimicrobianos

4.6.1 Selección de los antimicrobianos

Se han seleccionado un total de 9 antimicrobianos pertenecientes a los diferentes grupos:

- **β-Lactámicos:** Penicilina G y Ampicilina, antibióticos de elección en el tratamiento de la listeriosis.
- **Glicopéptidos:** Vancomicina utilizada para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram-positivas en pacientes alérgicos a la penicilina en la terapia de infecciones debidas a especies bacterianas resistentes a β-Lactámicos.
- **Aminoglucósidos :** Gentamicina, fármaco utilizado para tratamiento de infecciones por *Listeria monocytogenes* junto a la Ampicilina.
- **Macrólidos:** Eritromicina ha demostrado que es efectiva frente a las Gram-positivas, se usa en pacientes alérgicos a la penicilina.
- **Rifamicinas:** Rifampicina
- **Tetraciclinas:** Tetraciclina
- **Quinolonas:** Ciprofloxacina, quinolona de segunda generación
- **Lincosamidas:** Clindamicina

4.6.2 Preparación de las soluciones de antibióticos

Todos los antibióticos fueron adquiridos de diferentes casas comerciales (véase apartado 4.1) y cuyas condiciones de conservación fueron las siguientes:

- Penicilina, Ampicilina, Gentamicina, Clindamicina y Vancomicina a temperatura de refrigeración (2-8°C).
- Tetraciclina y Rifampicina a temperatura de congelación (-20°C).
- Ciprofloxacina y Eritromicina a temperatura ambiente.

Preparación de las soluciones de antibióticos:

Las soluciones de cada uno de los antibióticos se almacenaron a -80°C, en alícuotas de 1 ml.

Para determinar la cantidad de antimicrobiano (mg de ATB) o volumen de solvente (ml de SE) necesario para preparar la solución madre (SM) se utilizaron las siguientes fórmulas:

Fórmula 1

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (ml)} \times \text{Concentración de SM (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia de ATB (}\mu\text{g/mg)}}$$

Fórmula 2

$$\text{Volumen de SE (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg)} \times \text{Potencia de ATB (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentración de SM (}\mu\text{g/ml)}}$$

Cada antibiótico se pesó en una balanza analítica calibrada, con una precisión igual o superior al décimo de miligramo. Si al realizar la pesada se obtiene un exceso de antimicrobiano, se aplica la fórmula 2 para conocer el exacto volumen de solvente a agregar para obtener la concentración deseada.

En la preparación de cada solución de antibiótico se tuvo en cuenta los siguientes factores:

- La MIC cercana a las bacterias objeto de estudio.
- Los puntos de corte establecidos para estas bacterias: resistente, sensible o intermedia.
- La MIC de la cepa de referencia o control utilizada en el test de susceptibilidad antimicrobiana.
- La concentración más alta de antibiótico utilizada en el test de susceptibilidad antimicrobiana.

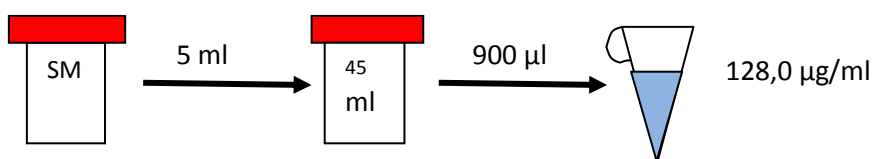
La dilución madre de cada uno de los antibióticos objeto de estudio, se preparó a una concentración de 1280 $\mu\text{g/ml}$. A partir de estas se realizó una dilución la 1/10 con el fin de obtener una concentración final de 128 $\mu\text{g/ml}$.

Los diluyentes utilizados, la potencia y pureza de cada uno de los antibióticos se describen en la Tabla 4.

Tabla 4: Características de cada uno de los antibióticos ensayados

Antibiótico	Pureza	Potencia	Solvente	Diluyente
Ampicilina	93,8%	938 µg/mg	Tampón fosfato Ph 6 0,1M	Tampón fosfato Ph 6 0,1M
Eritromicina	93,7%	937 µg/mg	Etanol 95%	Agua destilada estéril
Clindamicina	99,0%	990 µg/mg	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Ciprofloxacina	98,7%	987 µg/mg	HCl 0,1N	Agua destilada estéril
Gentamicina	59,9%	599 µg/mg	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Pencilina G	99,6%	996 µg/mg	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Rifampicina	98,0%	980 µg/mg	Dimetilsulfóxido	Agua destilada estéril
Tetraciclina	97,1%	971 µg/mg	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril
Vancomicina	102,9%	1029 µg/mg	Agua destilada estéril	Agua destilada estéril

A partir de la solución madre (1280 µg/ml) se realizó la dilución 1/10:



En la tabla 5 se indican los pesos (mg) utilizados de cada uno de los antibióticos ensayados y el volumen (ml) de solvente.

Tabla 5: Peso de cada antibiótico /volumen solvente

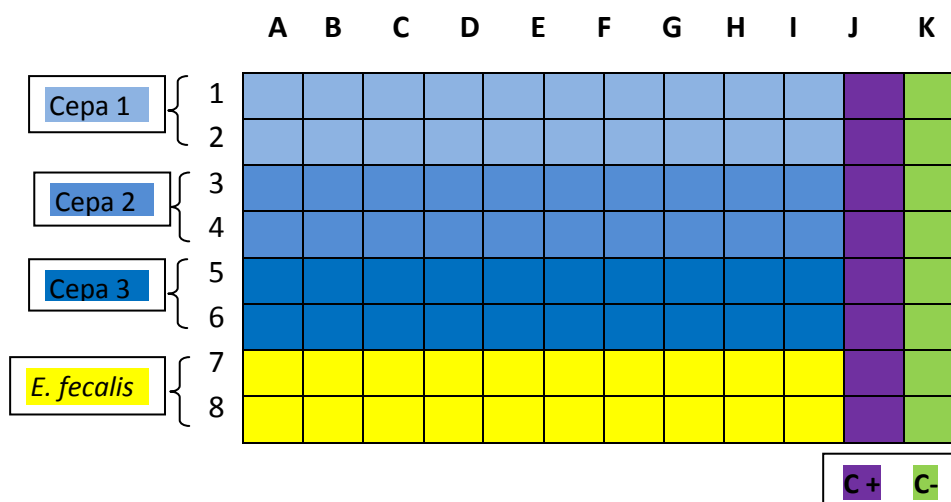
	mg de antimicrobiano	Volumen solvente (ml)
Ampicilina	136,46 mg	100,10 ml
Ciprofloxacina	129,68 mg	99,99 ml
Clindamicina	129,30 mg	100,00 ml
Eritromicina	136,60mg	99,99ml
Gentamicina	213,68 mg	100,00 ml
Penicilina	128,50 mg	99,90 ml
Rifampicina	136,60 mg	99,90 ml
Tetraciclina	131,80 mg	99,98ml
Vancomicina	124,40 mg	100,00 ml

4.6.3 Método de Microdilución en placa

El ensayo se realizó en placa de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos (12 x 8), con fondo en U.

En cada una de las placas de microtitulación se estudió la sensibilidad/resistencia de 3 cepas diferentes de *Listeria spp.* a un mismo antibiótico. La cepa de referencia utilizada en cada una de éstas ha sido *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, adquirida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (figura 17)

Todas las cepas se ensayaron por duplicado. Además en cada una de las placas se incluyó un control positivo y negativo.

**Figura 17.** Distribución de la placa de microtitulación

Los pasos a realizar fueron los siguientes (figura 18):

- Se añaden 50 µl de **caldo Mueller-Hinton** estéril en cada pocillo, excepto en el pocillo del control negativo donde se añaden 100 µl.
- Se añaden 50 µl del **inóculo** de los diferentes microorganismos, a una concentración de 5×10^5 CFU/ml, aproximadamente, excepto en el control negativo. Es importante añadir el inóculo dentro de los 15 minutos posteriores a su ajuste por transmitancia. La concentración inicial ajustada con el Spectronic 20 fue de 1×10^8 ufc/ml, aproximadamente. A continuación se realizó una dilución 1:100 en Mueller-Hinton y posteriormente se diluyó a la mitad en cada pocillo, de este modo se obtuvo una concentración final del inóculo de 5×10^5 CFU/ml, aproximadamente.
- Por último, se añaden 50 µl del **antimicrobiano** objeto de estudio a cada uno de los pocillos de la primera columna y con pipeta multicanal se realizan diluciones $\frac{1}{2}$, traspasando 50 µl de un pocillo a otro con el fin de obtener concentraciones decrecientes de cada antimicrobiano. De este modo se obtuvieron 10 diluciones para cada antibiótico comprendidas en el rango: 64 a 0,125 µl/ml. A los pocillos del control positivo y negativo no se adicionó antibiótico.

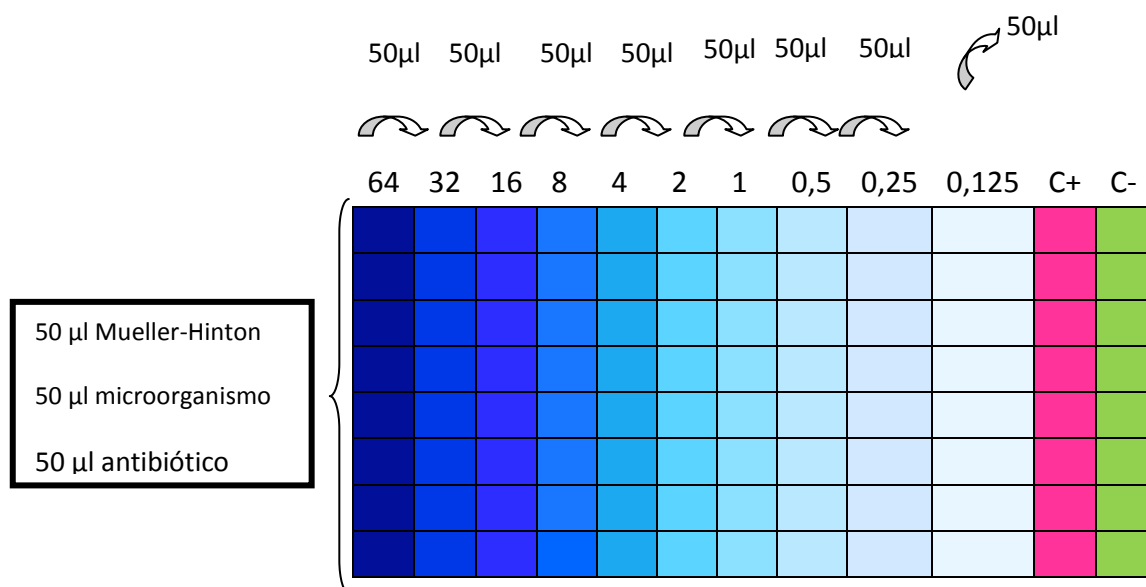


Figura 18. Esquema método microdilución en placa

- Todas las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación las placas de microtitulación se apilaron en grupos de no más de cuatro o cinco placas.

- Lectura de la MIC para cada antibiótico. La MIC se define como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento del microorganismo estudiado. La lectura las placas se realizó con el fotómetro Multiskan EX (Thermo labsystem), fotómetro básico para lectura de microplacas de 96 pocillos en ensayos cinéticos y de punto final, especialmente adaptado para aplicaciones de inmunoensayos enzimáticos (ELISA). Se homogeneizaron las placas con la opción “shake” del aparato a 1020 rpm durante 30 segundos. La absorbancia se midió por espectrofotometría a longitud de onda de 620 nm.



Figura 19. Multiskan Ex (Thermo labsystem)

- Interpretación de la MIC obtenidos, utilizando como referencia los establecido para *S. aureus* y los que están establecidos para *Listeria spp.* para la penicilina G y la ampicilina por la CLSI. Las cepas de *Listeria spp.* que tengan un MIC superior al establecido, serán resistentes, aquellas que estén por debajo serán sensibles y las que estén dentro del rango intermedias. En la siguiente tabla se pueden observar los MIC usados como referencia:

Tabla 6. MIC establecidos para *Listeria spp* y *S. aureus* (CLSI)

Antibióticos	MIC
<i>Listeria spp.</i>	
Penicilina G	≤ 2
Ampicilina	≤ 2
<i>Staphyococcus aureus</i>	
Ciprofloxacina	≤ 2
Clindamicina	1-2
Eritromicina	1-4
Gentamicina	≤ 8
Rifampicina	≤ 2
Tetracilina	≤ 8
Vancomicina	8-16

5. Resultados y discusión

5.1 Transmitancia

La correlación entre el porcentaje de Transmitancia y la concentración microbiana (log ufc/ml) para la cepa CECT 935, se puede observar en la Tabla 7.

Tabla 7: Transmitancia y recuento microbiano (log ufc/ ml)

Transmitancia (%)	Ufc/ml	Log ufc/ml
100	4,16 E6	6,61909333
92,5	7,7E6	6,88649073
79,5	2,43E8	8,38560627
67,9	5,22E8	8,71725431
51,5	1,06E9	9,02530587
38	1,9E9	9,2787536
26	3,41E9	9,53275438
16	3,47E9	9,53970324

Para obtener un recuento de 1×10^8 ufc/ml, el porcentaje de transmitancia debe ser ajustado a valores entorno al 80%. Se puede observar que a menor Transmitancia, aumenta la concentración microbiana.

Valores de Transmitancia y recuentos (ufc/ml) de las cepas objeto de estudio.

Previo al estudio de susceptibilidad microbiana, se ajustó el porcentaje de Transmitancia y posterior recuento en placa de las 32 cepas de *Listeria* objeto de estudio, así como de la cepa de referencia *E. faecalis* ATCC 29212.

En la Tabla 8 se pueden observar los % de Transmitancia y los recuentos obtenidos (ufc/ml) de las 32 cepas de *Listeria* spp, así como la cepa de referencia.

La Transmitancia varía en función al microorganismo y medio de cultivo utilizado. Los resultados de Transmitancia obtenido para cepas de *Listeria* spp., no son extrapolables a la cepa de referencia *E. faecalis* ATCC 29212. En este caso, la concentración de 1×10^8 ufc/ml, se correlacionó con un porcentaje de Transmitancia del 72%, aproximadamente. Los porcentajes de Transmitancias para *Listeria* se ajustaron entre 80-84% que se han correspondido con recuentos entre 7×10^7 y $1,5 \times 10^8$. En la misma tabla podemos ver que las concentraciones finales del inóculo (pocillos de las placas de microtitulación) se encuentran en el rango (3 y 7×10^5 ufc/ml). Estas concentraciones de inóculo son las recomendadas para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana en el método de microdilución en caldo.

Tabla 8: % de Transmitancia y recuentos (ufc/ml) de las cepas

Nº de Ceba	Ceba	% Transmitancia	Recuento inicial (ufc/ml)	Recuento placa de microtitulación (ufc/ml)
			1x10 ⁸ ufc/ml (CLSI)	3-7x10 ⁵ ufc/ml (CLSI)
1994				
1	<i>L. innocua</i>	81%	1,2X 10 ⁸ ufc/ml	6x10 ⁵ ufc/ml
2	<i>L. innocua</i>	81%	1,28X 10 ⁸ ufc/ml	6,4x10 ⁵ ufc/ml
3	<i>L. monocytogenes</i>	81%	1,1X 10 ⁸ ufc/ml	5,5x10 ⁵ ufc/ml
5	<i>L. innocua</i>	80%	1,15X 10 ⁸ ufc/ml	5,7x10 ⁵ ufc/ml
8	<i>L. innocua</i>	80%	1,5X 10 ⁸ ufc/ml	7,5x10 ⁵ ufc/ml
9	<i>L. monocytogenes</i>	80%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
11	<i>L. innocua</i>	83%	8X 10 ⁷ ufc/ml	4x10 ⁵ ufc/ml
12	<i>L. innocua</i>	80%	1X 10 ⁸ ufc/ml	5x10 ⁵ ufc/ml
13	<i>L. innocua</i>	83%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
14	<i>L. innocua</i>	83%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
16	<i>L. innocua</i>	82%	1,4X 10 ⁸ ufc/ml	7x10 ⁵ ufc/ml
17	<i>L. innocua</i>	82%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
18	<i>L. innocua</i>	82%	8X 10 ⁷ ufc/ml	4x10 ⁵ ufc/ml
19	<i>L. innocua</i>	81%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
22	<i>L. monocytogenes</i>	81%	8X 10 ⁷ ufc/ml	4x10 ⁵ ufc/ml
23	<i>L. monocytogenes</i>	81%	1X 10 ⁸ ufc/ml	5x10 ⁵ ufc/ml
25	<i>L. monocytogenes</i>	83%	1,4X 10 ⁸ ufc/ml	7x10 ⁵ ufc/ml
27	<i>L. innocua</i>	82%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
66	<i>L. innocua</i>	80%	1,23X 10 ⁸ ufc/ml	6,1x10 ⁵ ufc/ml
68	<i>L. innocua</i>	80%	1,08X 10 ⁸ ufc/ml	5,4x10 ⁵ ufc/ml
70	<i>L. innocua</i>	80%	1,29X 10 ⁸ ufc/ml	6,4x10 ⁵ ufc/ml
71	<i>L. innocua</i>	80%	1,24X 10 ⁸ ufc/ml	6,2x10 ⁵ ufc/ml
72	<i>L. innocua</i>	80%	1,35X 10 ⁸ ufc/ml	6,7x10 ⁵ ufc/ml
2011				
4	<i>L. innocua</i>	84%	1X 10 ⁸ ufc/ml	5x10 ⁵ ufc/ml
5	<i>L. innocua</i>	83%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
6	<i>L. monocytogenes</i>	81%	1,3X 10 ⁸ ufc/ml	6,5x10 ⁵ ufc/ml
7	<i>L. innocua</i>	83%	1,1X 10 ⁸ ufc/ml	5,5x10 ⁵ ufc/ml
8	<i>L. monocytogenes</i>	80%	1,4X 10 ⁸ ufc/ml	7x10 ⁵ ufc/ml
12	<i>L. innocua</i>	84%	1,4X 10 ⁸ ufc/ml	7x10 ⁵ ufc/ml
17	<i>L. monocytogenes</i>	80%	1,1X 10 ⁸ ufc/ml	5,5x10 ⁵ ufc/ml
20	<i>L. monocytogenes</i>	85%	1X 10 ⁸ ufc/ml	5x10 ⁵ ufc/ml
26	<i>L. monocytogenes</i>	83%	9X 10 ⁷ ufc/ml	4,5x10 ⁵ ufc/ml
Ceba de referencia				
ATCC 29212	<i>E. faecalis</i>	73%	1,1X 10 ⁸ ufc/ml	5,5x10 ⁵ ufc/ml

5.2 Método de microdilución en caldo

5.2.1 Test de susceptibilidad antimicrobiana

En este estudio se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de 32 cepas de *Listeria* spp., pertenecientes a dos especies: *L. innocua* y *L. monocytogenes*, frente a 9 antibióticos diferentes con el objetivo de conocer su patrón de resistencia y sensibilidad. Mediante el test de microdilución en placa, se ha obtenido la MIC de cada una de las cepas estudiadas (Tabla 9).

Tabla 9. MIC de las 32 cepas de *Listeria* spp.

	CEPA	AMP	CIP	CLI	ERI	GEN	PEN	TCY	VAN	RIF
Año 1994										
<i>L. innocua</i>	1	0,5	2	8	0,5	2	1	2	0,125	0,125
<i>L. innocua</i>	2	0,5	2	8	0,5	2	1	1	0,125	0,125
<i>L. mono.</i>	3	2	4	8	0,5	1	1	1	0,125	0,125
<i>L. innocua</i>	5	1	2	8	0,25	2	1	0,5	0,125	0,125
<i>L. innocua</i>	8	0,5	2	16	1	1	1	2	0,125	0,125
<i>L. mono.</i>	9	0,25	1	16	0,25	2	2	0,25	0,125	0,125
<i>L. innocua</i>	11	4	4	16	4	4	2	32	4	2
<i>L. innocua</i>	12	2	4	8	4	4	2	8	4	2
<i>L. innocua</i>	13	4	4	16	2, 4	4	2	16	4	1
<i>L. innocua</i>	16	4	4	8	2	8	2	8	4	1
<i>L. innocua</i>	17	4	4	8	2	8	2	8	4	1
<i>L. innocua</i>	18	4	8	8	2	8, 4	2	8	4	1
<i>L. innocua</i>	19	2	1	16	2	8	2	8	4	1
<i>L. mono.</i>	22	2	2	8	2	2	2	8	8, 4	0,5
<i>L. mono.</i>	23	2	1	8	2	4	1	8	4	0,5
<i>L. innocua</i>	14	4	4	8	2	16	8	8	4	1
<i>L. mono.</i>	25	8	8	4	2	4	2	4	4	1
<i>L. innocua</i>	27	8	8	8	2	4	8	8	4	1
<i>L. innocua</i>	66	1	4	16	0,25	0,5	0,5	1	0,125	0,125
<i>L. innocua</i>	68	1	2	8	1	1	0,5	1	0,125	0,125
<i>L. innocua</i>	70	1	2	8	0,5	1	4	1	0,125	0,125
<i>L. innocua</i>	71	1	4	8	0,5	1	4	1	0,125	0,25
<i>L. innocua</i>	72	1	2	8	0,5	1	1	1	0,125	0,125

Año 2011										
<i>L. innocua</i>	6	1	4	16	2	8	8	4	4	0,25
<i>L. innocua</i>	8	2	2	4	1	1	2	2	4	0,5
<i>L.mono.</i>	17	2	1	4	0,125	8	8	16	4	0,25
<i>L. innocua</i>	12	2	4	16	2	8	2	4	4	1
<i>L.mono.</i>	20	2	2	4	0,5	1	2	4	2	0,5
<i>L. innocua</i>	26	2	2	4	2	8	2	8	4	0,25
<i>L.mono.</i>	4	4	4	8	4	4	4	4	4	1
<i>L.mono.</i>	5	4	4	4	4	16	8	4	4	0,5 0,125
<i>L.mono.</i>	7	2	4	4	2	4	2	4	4	0,25

AMP (ampicilina), CIP (ciprofloxacina), CLI (clindamicina), ERI (eritromicina), GEN (gentamicina), PEN (penicilina), TCY (tetraciclina), VAN (vancomicina) y RIF (rifampicina). Sombreado en azul (véase apartado 4).

A partir de estos datos se ha evaluado la:

1. Susceptibilidad antimicrobiana general de las 32 cepas de *Listeria* spp.
2. Comparación de la susceptibilidad antimicrobiana entre las especies *L. innocua* y *L. monocytogenes*.
3. Evolución del patrón de sensibilidad/resistencia de cepas aisladas en los años 1994 y 2011.
4. Patrón de multirresistencia de las cepas anteriores.

1. Susceptibilidad antimicrobiana general

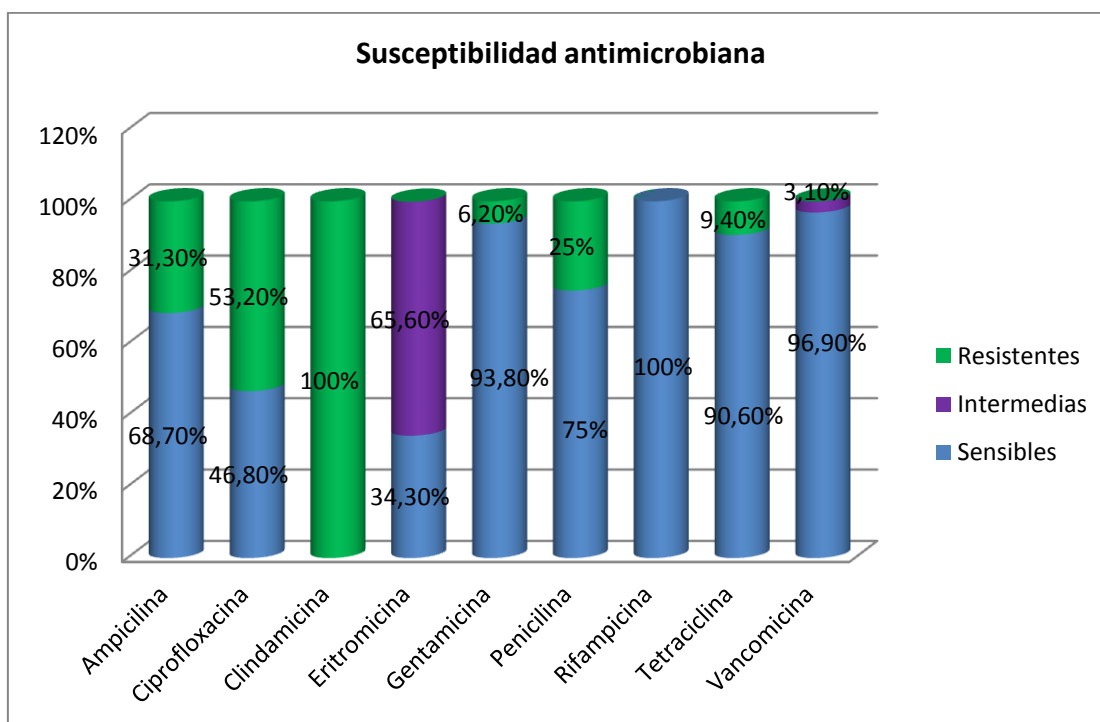
En la Tabla 10 se muestra el número de cepas de *Listeria* que son resistentes, sensibles o presentan sensibilidad intermedia a los diferentes antimicrobianos ensayados

Tabla 10: N° de cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* sensibles, intermedias y resistentes

Antibiótico/Especie	Sensibles	Intermedias	Resistentes
Ampicilina	22	-	10
Ciprofloxacina	15	-	17
Clindamicina	-	-	32
Eritromicina	11	21	-
Gentamicina	30	-	2
Penicilina	24	-	8
Rifampicina	32	-	-
Tetraciclina	29	-	3
Vancomicina	31	1	-

En la figura 20 se representan gráficamente el porcentaje de cepas de *Listeria* spp. sensibles (color azul), sensibilidad intermedia (color morado) y resistentes (color verde) a los antibióticos ensayados.

Figura 20: Gráfica del porcentaje de cepas de *Listeria* spp. sensibles, intermedias



Ninguna de las 32 cepas fueron sensibles a los 9 antimicrobianos, si bien 13 de las 32 cepas de *Listeria* spp. (40,6%) fueron sensibles a 8 de los 9 antimicrobianos.

Todas las cepas de *Listeria* mostraron sensibilidad o sensibilidad intermedia a 3 de los 9 antibióticos: rifampicina, eritromicina y vancomicina. Resultados similares fueron obtenidos Arslan y Özdemir (2007), utilizando el método de difusión en disco en agar Mueller-Hinton.

Por otro lado, el porcentaje de cepas que mostraron resistencia a 6 de los 9 antibióticos ensayados, fueron del 100% a la clindamicina, 53,2% a la ciprofloxacina, el 31,3% a la ampicilina, el 25% a la penicilina, el 9,4% a la tetraciclina y el 6,2% a la gentamicina.

Ebrahim et al (2010) estudiaron la susceptibilidad antimicrobiana de 54 cepas de *Listeria* aisladas de leche y productos lácteos mediante el método de difusión en disco. Estos autores comprobaron que el 98,2% de las cepas estudiadas eran resistentes a uno o más antimicrobianos, obteniendo resultados similares a los nuestros ya que todas sus cepas eran sensibles a la vancomicina, el 12,7% resistentes a la ampicilina, el 20% a la ciprofloxacina, el 1,8% a la gentamicina, el 34,5% a la penicilina y el 27,3% a la tetraciclina. Sin embargo difieren en la resistencia a la eritromicina (12,8%) ya que todas nuestras cepas mostraron sensibilidad o sensibilidad intermedia a este antibiótico.

Otros estudios, que utilizan el mismo método de difusión en disco, con cepas de *Listeria* spp. aisladas de productos a base de pollo, ready-to-cook (RTC) y ready-to-eat (RTE), obtuvieron los siguientes patrones de susceptibilidad microbiana: resistencia a la ampicilina (35,5%), ciprofloxacina (30,0%), eritromicina (6,4%), penicilina (35,5%), rifampicina (7%), tetraciclina (32%) y vancomicina (0%) (Fallah et al, 2012). Resultados similares a los nuestros excepto a la rifampicina (7%) y a la eritromicina (6,4%) ya que ninguna de nuestras cepas mostraron resistencia a ambos antibióticos.

Los β -lactámicos: ampicilina y la penicilina han sido los antimicrobianos de elección para el tratamiento de la listeriosis, pero se han ido sustituyendo por otros ya que *Listeria* spp. ha ido adquiriendo resistencia a estos antibióticos (Charpentier y Courvalin, 1999). En este estudio comprobamos que el 31,3% y 25% de las cepas fueron resistentes a la ampicilina y penicilina, respectivamente.

Otros tratamientos alternativos para la listeriosis es el uso de tetraciclina, gentamicina o eritromicina, solos o combinados (Holf et al 1991). En este trabajo detectamos que el 9,4% de las cepas fueron resistentes a la tetraciclina, el 6,2% y ninguna de ellas presentó resistencia a la eritromicina, aunque un 65,6% presentan una sensibilidad intermedia a este último antimicrobiano. Hay autores que señalan el tratamiento de esta infección alimentaria con la combinación: cloranfenicol y gentamicina, (Lorber et al, 1997; Schlech et al, 2000).

Nuestros resultados demuestran que algunas cepas de *Listeria* spp. de origen alimentario presentan resistencia a antimicrobianos a los que antes eran sensibles, como penicilina, ampicilina, tetraciclina, clindamicina etc, (Troxler *et al.* 2000). Sólo siguen manteniendo sensibilidad a la vancomicina, eritromicina y rifampicina. La combinación de eritromicina-vancomicina es la que se usa para el tratamiento de la listeriosis en mujeres embarazadas. (Alonso *et al.* 2012)

La alta resistencia encontrada a la clindamicina es apoyada por otros autores, como Harakeh *et al.*, 2009 que alegan que la resistencia del 100% de las cepas a este antibiótico puede ser debido al uso excesivo de éste en medicina veterinaria. El incremento lento que se va observando a la penicilina y a la ampicilina puede deberse a su uso generalizado en el tratamiento de diferentes enfermedades en animales y hombre. La resistencia a la tetraciclina se puede deber al uso años atrás de este medicamento como promotor del crecimiento en la alimentación animal y como medicamento de segunda elección en el tratamiento de enfermedades humanas (Prazak *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2001). La baja resistencia a la gentamicina puede deberse a que estos antimicrobianos ya no se utilizan, ya sea como agentes antimicrobianos terapéuticos en medicina veterinaria o como promotores del crecimiento en animales de engorde convencional (Klein *et al.* 1998).

Resultados similares son publicados por otros autores (Toxler *et al.*, 2000, Alonso *et al.*, 2012, Conter *et al.*, 2009) que señalan que la situación está cambiando y que estas bacterias están incrementando lentamente la resistencia a diversos antimicrobianos.

2. Comparación de susceptibilidad antimicrobiana entre las especies *L. innocua* y *L. monocytogenes*

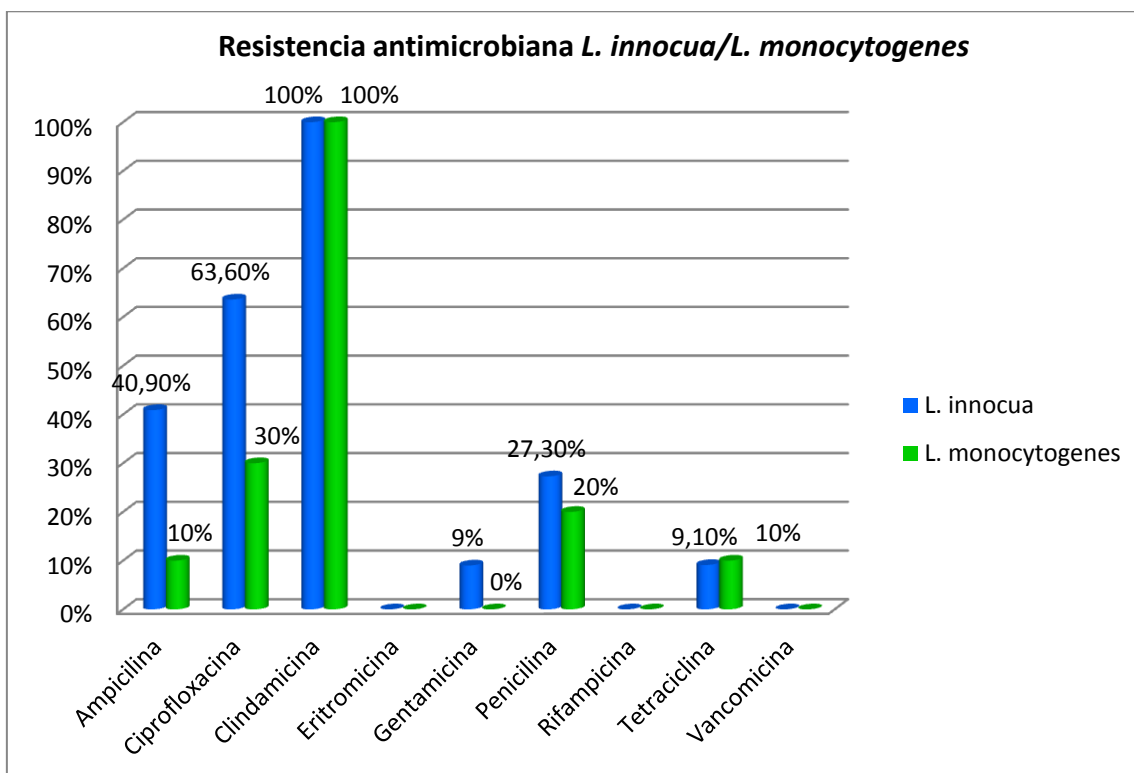
En la Tabla 11 se muestran el números de cepas de las dos especies ensayadas que son sensibles, con sensibilidad intermedia y resistentes a los 9 antibióticos ensayados.

Tabla 11: Nº de cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* sensibles, intermedias y resistentes

Antibiótico/Especie	Sensibles		Intermedias		Resistentes	
	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Ampicilina	13	9	-	-	9	1
Ciprofloxacina	8	7	-	-	14	3
Clindamicina	-	-	-	-	22	10
Eritromicina	7	4	15	6	-	-
Gentamicina	20	10	-	-	2	-
Penicilina	16	8	-	-	6	2
Rifampicina	22	10	-	-	-	-
Tetraciclina	20	9	-	-	2	1
Vancomicina	22	9	-	1	-	-

A partir de estos datos, se ha hecho una representación gráfica comparando la resistencia entre especies. Las barras de color azul representan el porcentaje de cepas de *L. innocua* resistentes a los antibióticos ensayados y las barras verdes el porcentaje de cepas de la especie *L. monocytogenes*

Figura 21: Gráfica del porcentaje de cepas de *L. innocua* y *L. monocytogenes* resistentes a los diferentes antimicrobianos



Al analizar los resultados observamos que hay mayor porcentaje de cepas de la especie *L. innocua* resistentes que de la especie *L. monocytogenes*; diferencia que se manifiesta en los 6 de los 9 antibióticos que a los que *Listeria* presenta resistencia. Este comportamiento se manifiesta principalmente frente a los antibióticos: ampicilina y ciprofloxacina, cuya diferencia es del 30,9% y 33,6% de cepas de *innocua* más resistentes que la especie patógena, respectivamente.

Osaili *et al* (2011) estudiaron la susceptibilidad antimicrobiana de 17 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de pollo crudo y pollo RTE, utilizando el método de microdilución en caldo. De estas cepas un 11,8% eran resistentes a la tetraciclina, porcentaje muy similar al nuestro (10%), En ambos casos las cepas son sensibles a la eritromicina y a la gentamicina, si bien, nuestras cepas mostraron un porcentaje de

resistencia del 10% a la ampicilina y del 30% a la ciprofloxacina, las de este estudio no mostraron resistencia a ambos antibióticos.

En principio estos resultados deberían ser satisfactorios ya que la especie patógena para el hombre es *L. monocytogenes*, sin embargo, ésta puede adquirir genes de resistencia a partir de otra especie, uno de los mecanismos más comunes de que adquieran resistencia (Balsalobre y Hernández 2004).

Esta situación podría cambiar con el tiempo debido a que *L. innocua*, frecuentemente aislada en diferentes alimentos, especialmente en carne y productos cárnicos, presentan ya frecuentes resistencias pudiendo existir transferencia de información genética de una especie a otra a través de diversos mecanismos transferencia horizontal (conjugación, transformación transposición y transducción) (Vicente *et al*, 1998). Por ello, son varios los autores que destacan el interés del estudio de susceptibilidad antimicrobiana en otras especies de *Listeria* diferentes a la patógena, principalmente *L. innocua*.

3. Evolución del patrón de sensibilidad/resistencia del año 1994 a 2011

La adquisición lenta de resistencias antimicrobianas de *Listeria* a lo largo de tiempo, es un peligro biótico que preocupa a las autoridades sanitarias. Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana obtenido a partir de cepas de *Listeria* aisladas de alimentos en 2 períodos diferentes (año 1994 y 2011) se presentan en las Tablas 12 y 13, en las que se indica el nº de cepas sensibles, resistentes y con sensibilidad intermedia de las cepas de *Listeria spp*, separadas por años.

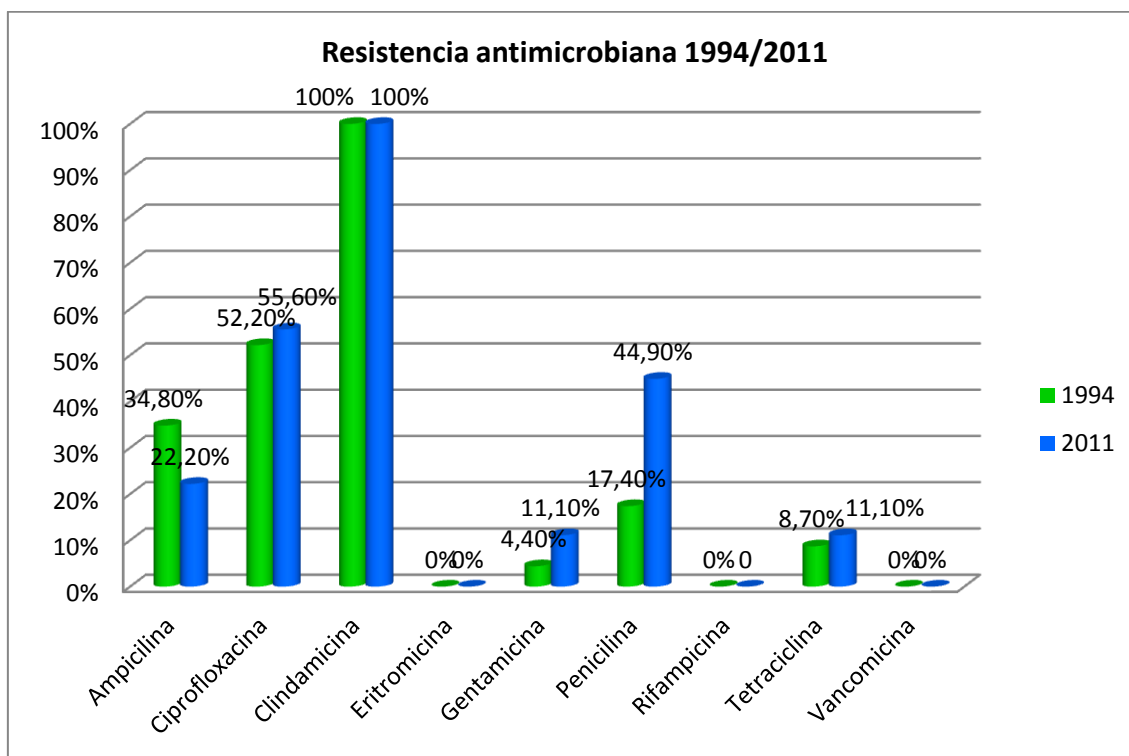
Tabla 12: Nº de cepas de *Listeria* sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia (año 1994)

	Sensibles		Intermedias		Resistentes	
	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Cepas 1994						
Ampicilina	11	4	-	-	7	1
Ciprofloxacina	8	3	-	-	10	2
Clindamicina	-	-	-	-	18	5
Eritromicina	7	2	11	3	-	-
Gentamicina	17	5	-	-	1	-
Penicilina	14	5	-	-	4	-
Rifampicina	18	5	-	-	-	-
Tetraciclina	16	5	-	-	2	-
Vancomicina	18	4	-	1	-	-

Tabla 13: Nº de cepas de *Listeria* sensibles, resistentes o con sensibilidad intermedia (año 2011)

	Sensibles		Intermedias		Resistentes	
Cepas 2011	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Ampicilina	2	5	-	-	2	-
Ciprofloxacina	-	4	-	-	4	1
Clindamicina	-	-	-	-	4	5
Eritromicina	-	2	4	3	-	-
Gentamicina	3	5	-	-	1	-
Penicilina	2	3	-	-	2	2
Rifampicina	4	5	-	-	-	-
Tetraciclina	4	4	-	-	-	1
Vancomicina	4	5	-	-	-	-

Tras la representación gráfica de los datos anteriores obtenemos la siguiente gráfica donde se compara el porcentaje de cepas resistentes aisladas en el año 1994 (color verde) y en el año 2011 (color azul).

Figura 22: Gráfica de la adquisición de resistencia a lo largo del tiempo

Como se puede observar en la gráfica hay mayor porcentaje de cepas resistentes aisladas en el año 2011 en comparación a las cepas aisladas en 1994, excepto para la

ampicilina, dónde se obtiene en 2011 un menor porcentaje de cepas resistentes (34,8 vs. 22,20%) y clindamicina que se mantiene la resistencia en el 100% de las cepas en ambos períodos.

Se ha observado un incremento en 4 de los 6 antibióticos a los que las cepas ensayadas habían presentado resistencia: ciprofloxacina, gentamicina, penicilina y tetraciclina con incremento en el porcentaje de cepas resistentes de 1994 a 2011, del 3,4% , 6,7%, 27,5% y 2,4%, respectivamente.

Alonso *et al* (2012) comprueban un incremento de resistencia antimicrobiana en cepas de *Listeria* aisladas de carne de ave, del año 1993 al 2006, con lo que queda patente un incremento de la resistencia a lo largo del tiempo.

Estos resultados confirman la tendencia general en todo el mundo de la creciente prevalencia de la resistencia a antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, in press). El excesivo y mal uso de los antibióticos en animales y hombre se ha convertido en el factor más importante en la aparición de resistencia bacteriana a los antimicrobianos (Capita y Alonso Calleja-, en Presss). Este hecho pone en peligro el control de las enfermedades infecciosas, las infecciones por microorganismos resistentes no responden a los tratamientos habituales, lo cual prolonga la duración de la enfermedad y aumenta el riesgo de muerte, amenaza de hacer retroceder a la humanidad a la época anterior al descubrimiento de los antibióticos. (OMS, 2012)

La primera revisión importante de los efectos del uso de antibióticos sobre la resistencia en los patógenos humanos y animales se llevó a cabo en el Reino Unido por el Comité de Swann en 1969. La principal recomendación de este Comité fue la no aplicación de antibióticos utilizados en medicina humana como promotores del crecimiento, ya que esto podría poner en peligro su eficacia en el hombre. Estas recomendaciones han sido reiteradas recientemente por el Comité Asesor de Especialistas sobre la Resistencia a los Antimicrobianos (SACAR) (Wise, 2007). La Organización Mundial de la Salud también ha reconocido que el uso de antibióticos en los animales es probable que tenga un gran impacto en la incidencia de resistencia a los antibióticos en los seres humanos y ha publicado documentos que reconocen este problema (OMS, 2009).

Teniendo en cuenta que *Listeria* es una bacteria que adquiere lentamente resistencia antimicrobiana, es importante llevar a cabo una vigilancia continua de resistencias emergentes de este patógeno para garantizar el tratamiento eficaz de listeriosis humana.

4. Patrón de multirresistencia.

Se ha evaluado el número de cepas de *Listeria* multirresistentes (Tabla 14)

Como se puede observar en la tabla anterior 19 cepas (59, 4%) presentaron resistencia a dos o más antibióticos, en estudios como el de Pesavento *et al* (2010), obtuvieron resultados similares donde el 27,5% de las cepas de *L. monocytogenes* y el 27,6% de *L. innocua* fueron multirresistentes.

Fallah *et al* (2011) estudiaron el patrón de multirresistencia de cepas de diferentes especies de *Listeria*, comprobando que el 60,2% de las cepas de *L. monocytogenes* y el 50,9% de *L. innocua* presentaron multirresistencia. Estos datos presentan similitud con los nuestros ya que el 59,4% de nuestras cepas *Listeria spp.* fueron resistentes a dos o más antibióticos.

Si comparamos el patrón de multirresistencia de las cepas aisladas en el año 1994 con las del año 2011, se observa un incremento un 10%, resultado que demuestra el aumento de las resistencias bacterianas a lo largo de tiempo. En estudios anteriores como el de Alonso *et al* (2012) se demuestra un incremento de las multirresistencias (60%) a lo largo del tiempo (de 1993 a 2006).

En la siguiente tabla se puede observar el número y porcentaje de cepas resistentes a 2, 3, 4 y 5 antibióticos:

Tabla 14: Número y porcentaje de cepas multirresistentes (1994/2011)

Resistencia	Antibióticos	Nº de cepa	
		1994	2011
2 antibióticos	CIP-CLI	3 (13,04%)	2 (22,2%)
	CLI-PEN	1 (4,3%)	
3 antibióticos	AMP-CIP-CLI	4 (17,4%)	
	CIP-CLI-PEN	1 (4,3%)	1 (11,1%)
	CLI-PEN-TCY		1 (11,1%)
4 antibióticos	AMP-CIP-CLI-TCY	2 (11,1%)	
	AMP-CIP-CLI-PEN	1 (4,3%)	1 (11,11%)
5 antibióticos	AMP-CIP-CLI-GEN-PEN	1 (4,3%)	1 (11,1%)

El patrón de multirresistencia con mayor prevalencia fue CIP-CLI con un 35,2%. El resto de los patrones se presentaron con porcentajes similares de alrededor del 16%, a excepción de CLI-PEN con un 4,3% de presentación.

La justificación de estos resultados es la demostrada adquisición de genes de resistencia de *Listeria spp.* a diferentes antibióticos a través de la transferencia de

plásmidos y transposones de los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus* al G^o *Listeria*, así como entre diferentes especies de este mismo género (Charpentier y Courvalin, 1999).

La multirresistencia a diferentes antimicrobianos es un grave problema de salud pública, ya que disminuye la eficacia de los tratamientos antibióticos de infecciones de transmisión alimentaria (Pesevato et al. 2010).

6. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas de los resultados anteriores son las siguientes:

- 1ª.** Las cepas de *Listeria* spp. de origen alimentario que han sido ensayadas en este estudio, han mostrado una resistencia generalizada a varios de los antimicrobianos de uso habitual en el tratamiento de la listeriosis.
- 2ª.** Con los antimicrobianos ensayados se ha comprobado un mayor porcentaje de resistencias en las cepas de la especie *L. innocua* que en las de *L. monocytogenes*; dada que está demostrada la capacidad de transferencia de genes de resistencia desde *L. innocua* a la especie patógena se pone de manifiesto la importancia de estudiar la prevalencia de resistencia en esta especie.
- 3ª.** En el estudio comparativo de cepas de *Listeria* spp aisladas de alimentos en los años 1994 y 2011, se observa un incremento de prevalencia en la resistencia a antibióticos y en la multirresistencia a lo largo del tiempo.
- 4ª.** El hecho manifestado en la conclusión anterior puede incrementar el riesgo de listeriosis de origen alimentario, ya que *Listeria* es una bacteria que adquiere lentamente la resistencia microbiana. Es por ello se considera importante llevar a cabo una vigilancia continuada de las resistencias emergentes de este patógeno y con ello contribuir a la garantía de seguridad en el tratamiento eficaz de la listeriosis humana.
- 5ª.** A partir de los resultados obtenidos en este estudio parece necesario ampliar el número de cepas de *Listeria* de origen alimentario y de antibióticos, así como el estudio de genes de resistencia a determinados antibióticos, con el fin de contribuir al mejor conocimiento del riesgo de listeriosis asociada a los alimentos.

Bibliografía

- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja C., Capita R (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food control*, 8:327-332
- Arslan, S., Özdemir, F. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. *Food control*, 19:360-363
- Aureli, P., Ferrini, A., Mannoni, V., Hodzic, S., Wedell-Weergaard, C., Brunello, O. (2003) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 325-330.
- Balsalobre-Hernández, B., Joaquín Hernández-Godoy (2004). Antibiotic resistances in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* isolated from foods with animal origin. *Revista salud ambient*, 4: 42-46.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Segunda edición.
- Betriu, C., Gomez, M., Sanchez, A., Cruceyra, A., Romero J., and Picazo, J. (1994). Antibiotic resistance and penicillin tolerance in clinical isolates of group B *Streptococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9): 2138-2186.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. in press.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline (M45-A). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2006.
- Conter, M., Paludi D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara A., Ianieri, A. (2008). Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 497-500.
- Erika. *Listeria monocytogenes*. Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. Marzo 2006

- Fallah, A., Saei-Dehkordi, S., Rahnama, M. , Tahmasby, H., Mahzounieh, M. (2012).Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species isolated from poultry products marketed in Iran *Food Control*, 28: 327-332.
- García, J., Cantón, R., García, E., Gómez-Lus M. L. and Martínez, L. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Gómez-Garcés, J., Aracil, B. y Gil, Y. (2009).Comparación entre dilución en agar y otras 3 técnicas para la determinación de la sensibilidad de 228 aislamientos clínicos de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27:331-337
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Sauders BD..(2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60:1280-8.
- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, E. (2009).Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products . *Science of The Total Environment*, 407:4022-7.
- He Yan, Sucharit Basu Neogi, Ziyao Mo, Wenying Guan, Zhixin Shen, Shuhong Zhang, Lin Li, Shinji Yamasaki, Lei Shi, Nanshan Zhong. (2010). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 310-316
- Hervé, B., Porte, L., Briebe, F. Instituto de Salud Pública. Centro Nacional de Referencia. Buenos Aires, Argentina. 2001.
- Jorgensen, J. and Hindler, J., (2007).New Consensus Guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 44:280–6

- Klein, A. Pack, Reuter, G. (1998). Antibiotic resistance patterns of *enterococci* and occurrence of Vancomycin-resistant *enterococci* in raw minced beef and pork in Germany. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 1825-1830
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont P.A. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60: 2210-4
- Ledermann D.W. (2008). En memoria de Lister. *Rev Chilena Infectol*, 25 (5): 351-356
- Levy S.B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10: 122 - 129
- Levy S.B. (1998). The challenge by antibiotic resistance. *Nature Medicine.*, 278, 46–53
- Malbrán, G. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Departamento Bacteriología Servicio Antimicrobianos .Buenos Aires, Argentina 2001.
- 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. Documento M31-A. NCCLS-Junio 1999.
- Maxine Rosaler (2004). Listeriosis .*Epidemics Deadly Diseases Throughout History*, 19.
- Moura, C., Barbosa A., Alves, L., Vallim, D. and Hofer, E. (2011). Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44: 173-176
- Naghmouchi, K., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I. (2007). Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 24: 718-27
- NCBI (National Center for Biotechnology Information)

- NCCLS. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard M11-A6. Wayne, PA: NCCLS, 2004.
- Osaili, T., Alaboudi, R., Nesiari, A. (2011). Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control*, 22: 586-590.
- Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cout, A., Courtieu, A. L., Courvalin, P. (1990). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *The Lancet*. 335: 1422- 1426.
- Prazak, E. Murano, I. Mercado, G. Acuff. (2002). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. *Journal Food Protection*, 65(11):1796-9
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. Microbiología .McGraw Hill Interamericana; 2001.
- Rahimi, E., Ameri, M., Momtaz, H. (2010).Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control*, 21: 1448-1452
- REAL DECRETO 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos.
- Resistencia a los antimicrobianos (RAM). OMS. Marzo 2012.
- Tortora Gerard J. , Berdell R. Funke, Christine L. Case. Introducción a la microbiología. Panamericana 2007. Capítulo 8, 227-245.
- Troxler R., Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann B. and Stock, I. (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L.monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 525-535.
- Vicente M.F., Baquero, F. and Peres-Díaz, J.C. (1988). Conjugative acquisition and expression of antibiotic resistance determinants in *Listeria* spp. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 43(9): 2103–2108

- Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J., Blair, I., and McDowell, D. (2001). Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 517–522
- Wise, R. (2007). An overview of the Specialist Advisory Committee on Antimicrobial Resistance (SACAR). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 5-7.

Enlaces WEB

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>

Anexos

Esquema de trabajo

