

Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico

Juan Manuel Zamora, Carolina Chaves y María Laura Arias

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales

RESUMEN. El uso actual de los antibióticos no se da únicamente con fines terapéuticos, sino que se ha extendido hacia la prevención de enfermedades y como promotores del crecimiento en animales. Estas prácticas han llevado a la propagación de resistencia a antibióticos, lo cual representa un riesgo en Salud Pública. En el presente estudio, se evaluó el perfil de sensibilidad a antibióticos de 20 cepas de *Listeria monocytogenes* y 40 cepas de *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos y se comparó con los perfiles de sensibilidad de 20 cepas de *L. monocytogenes* y 100 de *Salmonella* sp de origen clínico. El 95% de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de alimentos fue sensible a ampicilina, comparado con el 65% de las cepas de origen clínico. De la misma manera, el 100% de las cepas alimentarias mostraron sensibilidad a la gentamicina, comparado en el 85% de las cepas clínicas. El 95% de ambas mostró sensibilidad a triptopropin sulfametoxazol y el 100% a ciprofloxacina. Con respecto a *Salmonella* spp., para los antibióticos trimetoprim sulfametoxazol, gentamicina, ciprofloxacina, ácido nalidixico y amoxicilina/ácido clavulánico, los porcentajes de sensibilidad fueron similares, sin embargo, las cepas de origen alimentario mostraron un 97,5% y un 82,5% de sensibilidad a la tetraciclina y cefalexina respectivamente, comparado con un 83% y 90% obtenido a partir de las cepas de origen clínico. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el riesgo potencial que representan las cepas bacterianas aisladas de alimentos en la transmisión de resistencia a los antibióticos.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, perfil de sensibilidad a los antibióticos.

INTRODUCCION

Las enfermedades de transmisión alimentaria han presentado, en los últimos años, un aumento significativo en su frecuencia. Entre los principales patógenos involucrados, se encuentran *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, entre otros. Estos agentes producen una morbilidad y mortalidad importante, aunado a altos costos para el sector salud (1).

Estas infecciones requieren, generalmente, tratamiento con agentes antimicrobianos, con el fin de reducir la mortalidad y morbilidad asociadas (2).

El uso indiscriminado de antibióticos en diversas prácticas, incluyendo las médicas, veterinarias y agrícolas

SUMMARY. Comparison of the antibiotics sensibility pattern of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. strains isolated from food with clinical origin samples. The actual use of antibiotics includes, not just its therapeutic cases, but also for disease prevention and as a growth promoter in animals. These practices have resulted in the propagation of resistance to antibiotics, representing a threat for Public Health. In this work, the antibiotic sensibility pattern of 20 *Listeria monocytogenes* and 40 *Salmonella* spp. strains, isolated from foodstuff was studied and compared with the antibiotic sensibility patterns of 20 *L. monocytogenes* and 100 *Salmonella* strains of clinical origin. 95% of the *L. monocytogenes* strains isolated from food were sensible to ampicillin, compared with the 65% of the clinical origin strains. Same way, 100% of food strains were sensible to gentamicin, compared with 85% of clinical origin strains. 95% of both showed sensibility to trimethoprim sulfametoxazole and 100% to ciprofloxacin. For *Salmonella* spp., the sensibility patterns for trimethoprim sulfametoxazole, gentamicin, ciprofloxacin, nalidixic acid and amoxicilin/clavulanic acid from both origins were similar. Nevertheless, food origin strains showed a 97,5% and 82,5% sensibility for tetracycline and cephalosporin respectively, compared with a 83 and 90% sensibility shown by clinical origin strains. The results obtained demonstrate the potential risk that bacterial strains isolated from food represent in the transmission of antibiotics' resistance.

Key words: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, sensibility pattern to antibiotics.

resulta en una presión selectiva sobre las bacterias, contribuyendo a la selección de microorganismos con patrones de resistencia a antibióticos (3-6). La presencia y persistencia de bacterias resistentes a antibióticos ha sido descrita en diferentes ambientes, incluyendo suelos (7), agua superficial y potable (8,9) y alimentos (10) y representa un creciente problema de Salud Pública. En el caso de *Listeria monocytogenes*, se describe una creciente incidencia, especialmente en alimentos listos para consumir y que son conservados en refrigeración por tiempo prolongado (11). Al mismo tiempo, se describe un aumento en la transferencia de factores de resistencia por conjugación de plásmidos y transposones a partir de *Enterococcus* y *Streptococcus* (12).

Para *Salmonella* spp., se ha descrito una rápida y creciente emergencia de cepas multirresistentes provenientes de animales y humanos (2,13-15) lo cual incide en un creciente número de fracasos terapéuticos (16). La resistencia a algunos antibióticos, incluyendo β lactámicos, tetraciclina, cloranfenicol y trimetoprim sulfametoxazol es cada vez mayor (8,14). Además, en los últimos tiempos se ha observado, a nivel mundial, la emergencia de cepas de *S. typhimurium* multirresistentes, procedentes de animales y humanos (2).

Dado lo anterior, el propósito del presente trabajo es comparar la susceptibilidad a antibióticos de cepas de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico de Costa Rica.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó entre los meses de enero y abril del 2005 en el Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Población estudiada

Se analizó el perfil de sensibilidad a antibióticos de 20 cepas de *Listeria monocytogenes* y 40 cepas de *Salmonella* sp aisladas e identificadas a partir de alimentos en el Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica entre los años 2002 y 2004.

Para la comparación con cepas de origen clínico se utilizaron registros de sensibilidad a antibióticos de 100 cepas de *Salmonella* y 20 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Nacional de Niños entre los años 2002 y 2004.

Prueba de sensibilidad a antibióticos

La susceptibilidad a los antibióticos de las cepas aisladas de muestras de alimentos se determinó por difusión en agar usando discos impregnados con antibióticos de la casa comercial Oxoid, según la técnica Kirby Bauer (17). El diámetro de los halos de inhibición fue medido e interpretado según las recomendaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (18). Como control de calidad, se emplearon las cepas *E.coli* ATCC 25922, para Gram negativos y *S. aureus* ATCC 25923 para Gram positivos.

Para *Listeria monocytogenes*, se probaron los antibióticos ampicilina (AMP 10 μ g), penicilina (P 10 μ g), tetraciclina (TE 30 μ g), trimetoprim-sulfametoxazol (STX 25 μ g), cloranfenicol (C 30 μ g.), gentamicina (CN 10 μ g), ciprofloxacina (CIP 5 μ g), clindamicina (CLI 5 μ g) y rifampicina (RIF 5 μ g). Para *Salmonella* spp, se incluyó tetraciclina (TE 30 μ g), trimetoprim-sulfametoxazol (STX 25 μ g), gentamicina (CN 10 μ g), ciprofloxacina (CIP 5 μ g), neomicina (N 30 μ g), ácido

nalidíxico (NA 30 μ g), amoxicilina (AM10 μ g), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC 10 μ g), cefalexina (CI 30 μ g) y cloranfenicol (C 30 μ g.)

Prueba de sensibilidad a antibióticos de cepas aisladas de muestras clínicas

La prueba de sensibilidad a antibióticos de las cepas de *Listeria monocytogenes* se realizó con el método microdilución, usando el sistema Vitek con la tarjeta de sensibilidad GPS 107. Se determinó la sensibilidad de los aislamientos a 4 antibióticos de uso clínico: ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacina.

La prueba de sensibilidad de los aislamientos clínicos de *Salmonella* sp se realizó también usando el sistema Vitek con la tarjeta de sensibilidad GNS 204. Se probaron los antibióticos tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, amoxicilina/ácido clavulánico y cefalexina.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la prueba de sensibilidad para los 20 cultivos de origen alimentario de *Listeria monocytogenes* se muestran en la Tabla 1. De los 20 cultivos, el 95% presentó sensibilidad a ampicilina, penicilina, trimetoprim sulfametoxazol, rifampicina, amoxicilina y cloranfenicol. El 100% de los cultivos fue sensible a gentamicina, ciprofloxacina y amoxicilina-ácido clavulánico, el 90% fue sensible a tetraciclina. Los resultados para estos 10 antibióticos muestran una buena sensibilidad a antibióticos de primera elección, betalactámicos como ampicilina y penicilina y aminoglucósidos como gentamicina y otros de segunda elección como trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina. Sin embargo, los cultivos mostraron una resistencia de 95% a cefalexina. El alto porcentaje de cultivos resistentes a cefalosporinas es un evento bastante descrito en la literatura (19). El 100% de los cultivos mostró resistencia a clindamicina. Este hallazgo concuerda con la resistencia descrita de *Listeria monocytogenes* a este antibiótico, como lo demuestra los estudios de Saldar en el 2002, donde describió 96.2% de resistencia a clindamicina en 84 aislamientos de pacientes con listeriosis sistémicas en un centro para pacientes con cáncer (10).

Es importante destacar que una de las cepas de *L. monocytogenes* aislada a partir de alimentos (UCR *Listeria monocytogenes* 20) presentó resistencia a 8 de los 12 antibióticos probados, exceptuando gentamicina, ciprofloxacina, cefalexina y amoxicilina-ácido clavulánico.

La presencia de cepas multirresistentes a antibióticos en *Listeria monocytogenes* es un fenómeno relativamente reciente. Los estudios de Charpentier, 1999, demuestran la adquisición de resistencia a cloranfenicol, tetraciclinas,

macrólidos y trimetoprim-sulfametoxazol por transmisión de "clusters" de genes de *Enterococcus* y *Streptococcus* hacia *Listeria monocytogenes*. (12,20).

TABLA 1
Perfil de sensibilidad a 12 antibióticos de 20 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de alimentos, UCR, 2005

Antibiótico	Porcentaje de sensibilidad	
Ampicilina	(19 /20)	95%
Penicilina	(19 /20)	95%
Tetraciclina	(18/20)	90%
Trimetoprim sulfametoxazol	(19 /20)	95%
Gentamicina	(20/20)	100%
Ciprofloxacina	(20/20)	100%
Clindamicina	(0/20)	0%
Rifampicina	(19 /20)	95%
Amoxicilina	(19 /20)	95%
Amoxicilina ácido clavulánico	(20/20)	100%
Cefalexina	(1/20)	5%
Cloranfenicol	(19 /20)	95%

El perfil de sensibilidad a antibióticos de los cultivos de *Listeria monocytogenes* realizados a partir de muestras de origen clínico se muestra en la Tabla 2. Es importante resaltar la resistencia a los antibióticos de primera elección ampicilina y gentamicina. De los 20 cultivos, el porcentaje de resistencia a ampicilina fue de 35% y el de gentamicina fue de 15%. Los cultivos mostraron una buena sensibilidad a antibióticos de segunda elección como trimetoprim-sulfametoxazol, 95% de sensibilidad, y ciprofloxacina 100% de sensibilidad.

TABLA 2
Perfil de sensibilidad a cuatro antibióticos de uso clínico de 20 cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de enfermedad invasiva. Laboratorio de Bacteriología, HNN, 2002-2004

Antibiótico	Porcentaje de sensibilidad	
Ampicilina	(13/20)	65%
Trimetoprim sulfametoxazol	(19/20)	95%
Gentamicina	(17/20)	85%
Ciprofloxacina	(20/20)	100%

Fuente: Laboratorio Clínico, Sección de Bacteriología, Hospital Nacional de Niños.

Al comparar los cultivos de origen alimentario con los clínicos, el perfil de sensibilidad a ampicilina y gentamicina fue diferente en los primeros. El 95% de las cepas de origen alimentario fue sensible a ampicilina, mientras que sólo el 65% de las cepas de origen clínico fue sensible a este

antibiótico. El 100% de las cepas aisladas de muestras de alimentos fue sensible a gentamicina, comparado con el 85% de los aislamientos clínicos.

El perfil de sensibilidad a antibióticos para *Salmonella* spp aisladas a partir de muestras de origen alimentario se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3
Perfil de sensibilidad a antibióticos de 40 cepas de *Salmonella* sp aisladas a partir de alimentos, UCR, 2004

Antibiótico	Porcentaje de sensibilidad	
Tetraciclina	(39/40)	97,5%
Trimetoprim sulfametoxazol	(39/40)	97,5%
Gentamicina	(40/40)	100%
Ciprofloxacina	(40/40)	100%
Ácido nalidíxico	(39/40)	97,5%
Amoxicilina	(34/40)	85%
Amoxicilina ácido clavulánico	(35/40)	87,5%
Cefalexina	(33/40)	82,5%
Cloranfenicol	(39/40)	97,5%
Neomicina	(40/4)	100%

Los aislamientos mostraron un perfil de resistencia a antibióticos betalactámicos. Los porcentajes de resistencia variaron entre 12.5% para amoxicilina-ácido clavulánico, 15% para amoxicilina y un 17.5% para cefalexina.

Cabe resaltar que una única cepa de *Salmonella* spp, (UCR *Salmonella* 01) aislada de una muestra de alimentos, presentó resistencia a tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, amoxicilina, amoxicilina- ácido clavulánico, cloranfenicol y ampicilina. Este hallazgo representa el primer caso documentado de multirresistencia en *Salmonella* en Costa Rica. La multirresistencia en *Salmonella* es un fenómeno reciente que cada vez logra mayor importancia en salud pública. Así lo demuestran los aislamientos de *Salmonella* serotipo *typhimurium* portadora del fago DT104, el cual transmite resistencia a 5 antibióticos (2,17) La cepa UCR *Salmonella* 01 presentó resistencia a 7 antibióticos, 4 de los cuales son inactivos frente a *Salmonella typhimurium* DT104. Es importante resaltar el riesgo que representa la presencia de una cepa multirresistente a nivel alimentario y la posibilidad de transmisión de genes de resistencia mediada por integrones (8).

En la Tabla 4 se presenta el perfil de sensibilidad de los aislamientos clínicos. Se puede observar que el comportamiento de las cepas bacterianas de ambos orígenes fue similar, excepto en dos antibióticos: tetraciclina (97.5% muestras de alimentos, 83% de muestras clínicas) y cefalexina (82.5% muestras de alimentos, 90% de muestras clínicas). La mayor resistencia descrita para cefalexina a partir de las muestras de origen alimentario comparadas con las de origen

clínico, resulta una llamada de atención para el sector productor del país y sugiere la necesidad de evaluar la alimentación dada a animales de engorde o al uso indiscriminado de antibióticos en los sectores agrícolas y ganaderos nacionales.

TABLA 4
Perfil de sensibilidad a antibióticos de 100 aislamientos de origen clínico de *Salmonella* sp. HNN, 2002-2004

Antibiótico	Porcentaje de sensibilidad	
Tetraciclina	(83/100)	83%
Trimetoprim sulfametoxazol	(96/100)	96%
Gentamicina	(99/100)	99%
Ciprofloxacina	(99/100)	99%
Ácido nalidíxico	(98/100)	98%
Amoxicilina ácido clavulánico	(87/100)	87%
Cefalexina	(90/100)	90%

Fuente Laboratorio Clínico, Sección de Bacteriología Hospital Nacional de Niños

La selección y diseminación en la naturaleza de cepas resistentes a los antibióticos es una práctica que se debe controlar, con el fin de mantener un balance ecológico que favorezca el predominio de bacterias susceptibles y asegurar el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas humanas.

REFERENCIAS

- Reuben A, Treminio H, Arias ML y C. Chaves. Presencia de *Escherichia coli* O157H7 *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. Arch Latinoamer Nutr. 2003; 53: 389-392.
- Aidara-Kane A. Dual emergence in food and humans of a novel multiresistant serotype of *Salmonella* in Senegal: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype 35:c:1,2. J Clin Microb. 2001; 39: 2373-2374.
- Andersson D, Levin B. The biological cost of antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology. 1999; 2: 489-493.
- Aarestrup FN, Wegener HC. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. Microbes Infect. 1999; 1: 639-644.
- Al Jebouri M. A note on antibiotic resistance in the bacterial flora of raw sewage and sewage polluted river Tigris in Mosul, Iraq. J Appl Bacteriol. 1985; 58: 401-405.
- van den Bogaard AE & Stobberigh E. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. Drugs. 1999; 58: 589-607
- Galland J, Hyatt D, Crupper S & Acheson D. Prevalence, antibiotic susceptibility and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 1619-1627.
- Gallardo F, Ruiz J, Marco F, Towner KJ, Vila J. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype *typhimurium* with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. J Med Microbiol 1999; 48: 367-74.
- Sayah R, Kaneene J, Johnson Y & Miller R. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild animal fecal samples, human sewage and surface water. Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 1394-1404.
- Saldar A & Armstrong D. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). J Clinical Microbiol. 2003; 49: 483-485.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration; Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture and Center for Disease Control and Prevention. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready to eat foods. Online http: www. foodsafety.gov/dms/lmr2.toc.html 2003.
- Gray M, Zadoks R, Fortes E, Dogal B, Cai S, Chen Y, Scott V, Gombas David, Boor K & Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 5833-5841.
- Martel JL, Chaslus-Dancla E, Coudert M, Lafont JP. Evolution de la sensibilité aux antibiotiques des *Salmonelles* d'origine bovine en France. Med Mal Infect 1996; 26: 415-9
- Breuil J, Berger N, Dublanche A et le collège BVH. Sensibilité aux antibiotiques de 2800 souches de *Salmonelles* et *Shigelles* isolées en France en 1994. Med Mal Infect 1996; 26: 420-5
- Yang H, Chen S, White D, Zhao S, McDermott P, Walker R & Meng J. Characterization of multiple antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3483-3489.
- Aarestrup, FM. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. Inter J Antimicrob Ag 1999; 12:279-85.
- Anonymous. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington, 1995, p 460-539.
- National Committee of Clinical Laboratory Standard. 1997. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test, 6th ed. Approved Standard Documents M2. National Committee of Clinical Laboratory Standard, Wayne, Pa.
- Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuju H & Schlundt J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods: the FAO/WHO approach. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;35: 263-267.
- Lorber B. Listeriosis. Clin Infect Dis. 1996; 24: 1-11.

Recibido: 05-12-2005

Aceptado: 06-06-2006