



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE PATRONES DE RESISTENCIA EN
CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y ASOCIACIÓN DE
RIESGO SEGÚN: ORIGEN, MATRIZ ALIMENTARIA Y
SEROTIPO**

DÁCIL RIVERA OTERO

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Medicina Preventiva Animal**

Santiago-Chile

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

**CARACTERIZACIÓN DE PATRONES DE RESISTENCIA EN
CEPAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y ASOCIACIÓN DE
RIESGO SEGÚN: ORIGEN, MATRIZ ALIMENTARIA Y
SEROTIPO**

DÁCIL RIVERA OTERO

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Medicina Preventiva Animal**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LISETTE LAPIERRE A.
CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARICEL VIDAL

Santiago-Chile

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR LA CANDIDATA

DÁCIL RIVERA OTERO

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS CON MENCIÓN EN MEDICINA PREVENTIVA ANIMAL, EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 5 DE DICIEMBRE DE 2016

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARICEL VIDAL

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. LISETTE LAPIERRE A.

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DRA. CONSUELO BORIE P.

DR. PATRICIO RETAMAL M..

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y en el Seremi de Salud de la Región Metropolitana y contó con financiamiento Fondecyt 11110200

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS MENCIÓN MEDICINA PREVENTIVA.

“Caracterización de perfiles de resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* y asociación de riesgo según: matriz alimentaria, origen y serotipo.”

Alumno: Dácil Rivera Otero
Dirección: Camino del Paisaje 6800 casa 52, La Florida, Santiago.
Teléfono: 9-72450702
Directores de tesis:
Dra. Lisette Lapierre Departamento de Medicina Preventiva Animal.
Dra. Maricel Vidal SEREMI de Salud Región Metropolitana. Santiago, Chile.
Financiamiento: Proyecto FONDECYT 11110200. SEREMI de Salud Región Metropolitana.

SANTIAGO – CHILE

2016

BIOGRAFÍA

Mi nombre es Dácil Rivera, nací en Tenerife, España en 1982. Me crié en una familia moderna. Debido al trabajo de mi padre, tuve que asistir a diferentes colegios en mi infancia, situación que me llevó a desarrollar una capacidad autodidacta para el aprendizaje. Dentro de los colegios más importantes en mi formación destaca el Instituto Pablo Neruda, en el cual terminé mi educación media.

Cuando era niña viví literalmente, buena parte de mi infancia, dentro de un laboratorio acompañando a mi padre y a mi tía, ambos dedicados a la ciencia. Estas dos personas influyeron fuertemente en mi decisión de seguir el camino científico, lo cual, en un comienzo fue muy difícil de concretar, pero que con mucha perseverancia ha logrado dar frutos. En este ámbito, mi primera experiencia científica correspondió a una pasantía desarrollada en el año 2010 en el Instituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio-Toscana en Italia, específicamente en el centro de control de calidad de la leche y sus derivados. Durante esta pasantía participé de un proyecto de análisis microbiológico de leche y el ambiente en lecherías de la zona, de un plan de asesorías para mejorar la calidad láctea orientada a pequeños productores y también colaboré en un plan de vigilancia del patógeno causante de mastitis en bovinos *Prototheca zopfii*. Producto de esta investigación presentamos un trabajo en el congreso Sumilk IDF World Dairy Summit. Esta experiencia dejó una gran inquietud en cuanto a la aplicación del conocimiento de microbiología y la posibilidad de ayudar a personas de recursos limitados para la obtención de productos pecuarios inocuos y con gran valor agregado. Es así como en el año 2013 decidí ingresar al programa de Magíster en Cs. Animales y Verterinarias, con la idea de adquirir mayores herramientas para desarrollar el tema de inocuidad alimentaria en producción primaria, de alimentos de origen pecuario. En esta nueva etapa fue fundamental el apoyo del Doctor Christopher Hamilton-West, el Doctor Mario Maino, la Doctora Betty San Martín y en especial la dedicación y el cariño de la Dra. Maricel Vidal.

Como parte del desarrollo del programa de magíster, realicé mi unidad de investigación caracterizando microbiológicamente lecherías medianas y pequeñas de la VI región. Además, parte de los resultados de mi tesis, fueron presentados en el XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología (ALAM, 2014). Agradezco sinceramente las herramientas que me dió la Facultad para continuar mi formación como investigadora, las que en el año 2015, me permitieron ingresar al programa de Doctorado en Nutrición y Alimentos de la Universidad de Chile, financiada por beca CONICYT.

Espero que esta tesis de Magíster contribuya al conocimiento sobre resistencia antimicrobiana en *Listeria monocytogenes*.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	2
ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS	3
RESUMEN	4
SUMMARY.....	6
1. INTRODUCCIÓN	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
3. OBJETIVOS.....	20
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6. RESULTADOS.....	33
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	47
Anexo 1: Certificación del cumplimiento de medidas de bioseguridad.....	48
Anexo 2: Tabla maestra de datos.	49
REFERENCIAS BIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información sobre el origen de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas en el estudio.	23
Tabla 2. Puntos de corte para Kiby Bauer.....	26
Tabla 3. Preparación de diluciones de antimicrobianos definidas por CLSI (2007).....	28
Tabla 4. Puntos de corte para CIM por antimicrobiano.	30
Tabla 5. Tipos de resistencia encontrada en cepas de <i>L. monocytogenes</i> de distinto origen n=122.	34
Tabla 6. Caracterización de los cluster encontrados en el análisis de conglomerados.....	36
Tabla 7. Tabla de contingencia. Matriz alimentaria y resistencia de las cepas.	39
Tabla 8. Tabla de contingencia. Origen y resistencia de las cepas.	40
Tabla 9. Tabla de contingencia. Serotipos y resistencia de las cepas.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Replicador de Steers y placa sembrada con el replicador.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Valor absoluto y porcentaje de resistencia de cepas de <i>L. monocytogenes</i> resistentes a los antimicrobianos.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Porcentaje de cepas resistentes por cada antimicrobiano.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Dendrograma con perfiles de resistencia a los antimicrobianos de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

Listeria monocytogenes es una bacteria ubicua, ampliamente distribuida en la naturaleza. Agente etiológico de la enfermedad llamada listeriosis, que puede transmitirse a través del consumo de alimentos contaminados o por el contacto directo con animales enfermos. La listeriosis presenta una alta tasa de letalidad en grupos susceptibles como mujeres embarazadas, niños y ancianos.

En Chile, no existen antecedentes de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Listeria monocytogenes* obtenidos desde alimentos. Por lo anterior, es relevante analizar cepas aisladas desde esta matriz y casos clínicos, contemporáneos a los brotes ocurridos entre los años 2008 y 2009 en Chile. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la resistencia antimicrobiana fenotípica en cepas de *L. monocytogenes*, analizar sus perfiles de resistencia y evaluar la posible asociación entre resistencia antimicrobiana, matriz alimentaria, origen y serotipo.

Fueron analizadas 222 cepas de *L. monocytogenes*, 182 aisladas desde alimentos y 40, desde casos clínicos. Como screening, se utilizó la metodología cualitativa de Kirby Bauer (KB) para evaluar la sensibilidad a distintos antibióticos, y luego la metodología cuantitativa, concentración inhibitoria mínima (CIM). Por ambas metodologías se analizaron 8 antimicrobianos: ciprofloxacino, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, eritromicina, cefalotina, ampicilina, penicilina-G y tetraciclina. Se obtuvieron 45 cepas resistentes que correspondieron al 20,3% del total de cepas analizadas. El tipo de resistencia más frecuente, fue a un sólo antimicrobiano, correspondiendo a un 58% de las cepas resistentes. El antimicrobiano que presentó mayor resistencia fue ciprofloxacino con un 51%. Se realizó un análisis multivariado de conglomerados mediante el cual se obtuvieron 5 grupos o cluster. El cluster que agrupó mayor número de cepas presentó un perfil de resistencia a: gentamicina, eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprim, y se encontró asociación entre el fenotipo de resistencia antimicrobiana y la matriz alimentaria.

Estos resultados contribuirán al conocimiento de resistencia antimicrobiana de *L. monocytogenes* en Chile, información fundamental a la hora de diseñar políticas públicas en cuanto a la prevención de la resistencia antimicrobiana.

Palabras claves: resistencia antimicrobiana, *Listeria monocytogenes*, Kirby Bauer, concentración inhibitoria mínima.

SUMMARY

Listeria monocytogenes is an ubiquitous bacteria widely distributed in nature, being the etiological agent of the listeriosis, which can be transmitted through consumption of contaminated food or by direct contact with sick animals. Listeriosis occurs with a high lethality rate in susceptible groups, such as pregnant women, children and the elderly.

There are not previous reports of antimicrobial resistance in *L. monocytogenes* isolated from food in Chile. Therefore, is relevant to analyze strains obtained from these food types and isolates from contemporary clinical cases outbreaks reported in 2008 and 2009 in Chile. The aim of this study was to characterize the phenotypic antimicrobial resistance in *L. monocytogenes* strains, analyze their resistance profiles and evaluate the possible association between antimicrobial resistance and food types, origin of strains and serotype.

Two hundred and twenty two *L. monocytogenes* strains were analyzed (182 obtained from food and 40 from clinical cases). Kirby Bauer (KB) test was used as qualitative screening, and minimum inhibitory concentration (MIC) as quantitative test to evaluate antimicrobial resistance. Eight antibiotics were tested: ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole, erythromycin, cephalothin, ampicillin, penicillin-G, tetracycline. Forty-five (20.3%) strains were resistant, and 58% of them were resistant to just one antibiotic, being these the most common resistance profile. The antibiotic associated with the highest resistance was ciprofloxacin (51% of resistant strains).

A multivariate cluster analysis identified 5 clusters, the main cluster grouped strains resistant to gentamicin, erythromycin and trimethoprim/sulfamethoxazole. Association was found just between antimicrobial resistance and food types.

Results of this study will contribute to the knowledge of antimicrobial resistance of *L. monocytogenes* in Chile, information that is needed for the development of public health policies to prevent antimicrobial resistance.

key words: Antimicrobial resistance, *Listeria monocytogenes*, Kirby Bauer, Minimum Inhibitory Concentration.

1. INTRODUCCIÓN

L. monocytogenes es una bacteria intracelular facultativa ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose de forma natural en el intestino de animales domésticos y/o silvestres, en alimentos, ambiente, y puede incluso crecer a temperaturas de refrigeración, de 4 a 5°C (Doyle *et al.*, 2011). Esta bacteria puede ocasionar la enfermedad denominada listeriosis, que se transmite principalmente a través del consumo de alimentos contaminados y por lo tanto, corresponde a una Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA). Pero también existe una fuente de infección, menos frecuente, a través del contacto directo con animales infectados.

El largo período de incubación de la enfermedad (11 a 70 días) dificulta la investigación epidemiológica (Doyle *et al.*, 2011). Durante los últimos años la listeriosis ha generado gran preocupación, tanto en la opinión pública como en la comunidad científica. Esta preocupación se basa en la alta tasa de letalidad que produce entre la población susceptible, principalmente en niños, ancianos, embarazadas y personas inmunosuprimidas. En países desarrollados se han implementado sistemas de notificación obligatoria de los casos de listeriosis y además existen redes de monitoreo constante para los brotes de ETA producidos por este patógeno. El mayor riesgo de contraer esta enfermedad, lo representa la manifestación del cuadro invasivo, que genera bacteremia y meningoencefalitis (Doyle *et al.*, 2011; CDC, 2015; EARS-Net, 2014).

El año 2014 el Center for Disease Control and Prevention de EE.UU. (CDC, 2015) declaró que *L. monocytogenes* ocasionó 118 casos con una incidencia de 0,24 casos por 100.000 habitantes y con la mayor letalidad dentro de las ETA (15,4%). En Chile, en el año 2014, se presentaron 60 casos de listeriosis confirmados por el Instituto de Salud Pública, los cuales presentaron una letalidad del 34% (EPIMINSAL, 2015).

La resistencia antimicrobiana es un problema global. Desde el año 2008 algunas instituciones internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la

Alimentación y Agricultura (FAO), Organización Mundial de Salud (OMS) y Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), han trabajado bajo el concepto de una salud, entendiendo que ambiente, la salud animal y la salud humana son un todo, y que, para disminuir el riesgo de transmisión de enfermedades y de resistencia a antimicrobianos, se deben generar estrategias conjuntas que sean capaces de integrar a todos los actores. Estas organizaciones desde el año 2005, FAO/OMS/OIE, han trabajado también en la elaboración de criterios para definir una lista crítica de antimicrobianos de importancia para salud animal y humana. Actualmente, existe un trabajo conjunto de OMS, FAO y OIE para definir criterios con respecto a la elaboración y actualización de estas listas. El primer criterio incluye aquellos antimicrobianos que representan la única o una de las pocas alternativas para tratar infecciones graves de los seres humanos y el segundo criterio abarca a los antimicrobianos que se utilizan para tratar enfermedades causadas por bacterias que se pueden transmitir de fuentes no humanas a los seres humanos. Los grupos de antimicrobianos considerados dentro de estas listas corresponden a los grupos de aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, cefalosporinas, macrólidos y penicilinas, entre otros (WHO, 2011).

Tradicionalmente se reconoce a las bacterias Gram negativo como el principal reservorio de genes de resistencia antimicrobiana, destacando en particular la importancia de *E. coli*, *Campylobacter spp.* y *Salmonella spp.* (WHO, 2011). Pero actualmente se tiene, cada vez mayor conocimiento, del dinamismo de este proceso y de la posibilidad de transmitir elementos móviles de una bacteria a otra, de la misma o distintas especies, que puedan generar resistencia antimicrobiana en bacterias que antiguamente no se reconocían como problemáticas, este es el caso de *L. monocytogenes*.

Dentro de los vehículos de alto riesgo para transmitir resistencia antimicrobiana se encuentran las ETA, especialmente, en aquellos alimentos de origen animal, destinados al consumo humano. Es por este motivo, que los países desarrollados cuentan con programas de monitoreo de resistencia antimicrobiana, como por ejemplo la Red de Vigilancia Europea de la Resistencia de Antimicrobianos, (EARS-

Net, 2014). Este organismo proporciona datos de referencia para la comunidad Europea sobre resistencia a los antimicrobianos con fines de salud pública. En Estados Unidos y Canadá existen redes de vigilancia similares. En Chile, no existen programas de vigilancia de resistencia antimicrobiana para ETA, por lo que existe un gran desconocimiento sobre lo que ocurre en términos de resistencia antimicrobiana de *L. monocytogenes* en alimentos (García, 2003).

De acuerdo a los antecedentes presentados, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los perfiles de resistencia en cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde alimentos y casos clínicos y asociar estos perfiles de resistencia con: origen, serotipo y matriz alimentaria.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características de *L. monocytogenes*.

Corresponde a un coccobacilo Gram positivo psicrótrofo, móvil, no esporulado, anaerobio facultativo, patógeno de origen alimentario en humanos y animales con una amplia distribución en la naturaleza. *L. monocytogenes* es el único representante de su género que causa patogenicidad para el ser humano (Doyle *et al.*, 2011). Se considera una bacteria patógena emergente, ya que a partir de 1980, se comenzó a aislar desde alimentos y a relacionar como posible origen de cuadros clínicos. Se presume que esta bacteria emerge como consecuencia de cambios en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos (Doyle *et al.*, 2011). Algunas particularidades que dan cuenta de su éxito evolutivo son: su capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas (-1,5 °C a 45 °C), su capacidad de resistir a un amplio rango de pH (4,3-9,1), y su capacidad de desarrollarse a elevadas concentraciones de sal (10-14%). Adicionalmente, puede formar biopelículas que le confieren resistencia a sanitizantes, desinfectantes de uso habitual en la industria de alimentos y antimicrobianos, lo que dificulta enormemente su eliminación del ambiente (Doyle *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2014). Existen tres hipótesis que explicarían cómo podrían actuar las biopelículas para la mantención de la resistencia entre cepas bacterianas, estas son: a) barrera mecánica que dificulta la difusión de los antimicrobianos, b) alteración química microambiental, ya que desestabilizarían las moléculas de antimicrobianos dejándolos sin efectos y c) selección de bacterias resistentes, que se basa en que aproximadamente el 1% sobreviven y quedan en un estado de latencia (Stewart y Costerton, 2001).

2.2 Mecanismo de patogenicidad de *L. monocytogenes* y su impacto para la salud pública humana.

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a su capacidad para actuar como patógeno intracelular facultativo adhiriéndose, invadiendo y multiplicándose dentro de una gran variedad de células no fagocíticas. Esta propiedad, ha sido estudiada detalladamente en cultivos celulares (Gilot *et al.*, 1999). Su capacidad para traspasar las barreras del sistema inmune determina la gravedad de los cuadros clínicos, que afectan a la población susceptible de mayor riesgo. Esta población corresponde a individuos con inmunidad celular disminuida como son: mujeres embarazadas, ancianos, neonatos, personas inmunocomprometidas, y personas que presentan enfermedades crónicas (Torres *et al.*, 2005).

Existen dos formas básicas de presentación de listeriosis denominadas listeriosis perinatal y listeriosis en el paciente adulto. En ambos tipos, las formas clínicas predominantes corresponden a infección diseminada o infección local en el sistema nervioso central (Torres *et al.*, 2005). Los alimentos son la principal vía de transmisión de *L. monocytogenes*, sin embargo, resulta complejo comprobar el nexo epidemiológico entre alimentos y casos clínicos. Esto ocurre debido a la variabilidad del periodo de incubación. Por lo que llegar al origen de la patología resulta muy difícil (ICMSF, 2002). Con respecto a la dosis infectiva para seres humanos no existe consenso debido a que depende de varios factores como el estado inmunológico y fisiológico de los pacientes, la concentración bacteriana en el alimento, la virulencia de la cepa, y la cantidad de alimento consumido (McLauchin 1997; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Algunos autores han asociado cuadros de listeriosis humana con niveles de 10^2 a 10^4 células de *L. monocytogenes* por gramo de alimento (McLauchlin *et al.*, 1991; Pinner *et al.*, 1992).

En Chile se presentaron dos brotes de listeriosis que cambiaron el paradigma de producción de alimentos. Los brotes de los años 2008 y 2009 determinaron la aplicación de una serie de medidas sobre la elaboración de productos lácteos y fábricas de cecinas, junto a la remoción de ciertas marcas específicas. Estas acciones permitieron en el corto plazo, una disminución de infecciones invasoras

por esta bacteria. Sin embargo, se ha mantenido una manifestación endémica de *L. monocytogenes* de 60 casos al año aproximadamente, lo que revela que las medidas aplicadas no han sido del todo efectivas. Por lo anterior, la vigilancia y prevención de *L. monocytogenes* continúan siendo un desafío para la industria y para el gobierno (Sedano *et al.*, 2013).

2.3 Listeriosis en animales y su potencial riesgo para la contaminación de alimentos de origen pecuario.

L. monocytogenes es una bacteria zoonótica, que infecta a gran variedad de especies animales, por ejemplo bovinos, ovinos, aves, roedores y peces. Esta bacteria frecuentemente ingresa al sistema productivo a través de alimentos de mala calidad como silos, y ambientes contaminados, en donde *L. monocytogenes* puede permanecer por largo tiempo, debido a su gran resistencia a condiciones ambientales (Hoelzer *et al.*, 2012). Un mal proceso de ensilado, en el cual no se alcance un descenso efectivo del pH, aumenta la multiplicación de *L. monocytogenes*. Los brotes ocurren típicamente ≥ 10 días después de la alimentación con ensilaje de mala calidad. *L. monocytogenes* ha sido aislada en algunos estudios desde ensilado y paja alcalinizada en 62% y 67%, respectivamente (Skovgaard y Morgen 1988; Hoelzer *et al.*, 2012).

A pesar de que *L. monocytogenes* puede infectar una amplia variedad de especies animales, la listeriosis se manifiesta clínicamente sólo en algunos, por ejemplo en rumiantes. Dentro los rumiantes las ovejas son particularmente susceptibles, pudiendo cursar con cuadros clínicos neurológicos muy agudos y los individuos asintomáticos actúan como diseminadores de la enfermedad (Hoelzer *et al.*, 2012). La fuente de infección más común, para rumiantes, es el alimento y se le asocia con cierta estacionalidad de invierno-primavera en feedlot proporcionado a rumiantes confinados (Skovgaard y Morgen 1988). En el caso de aves, la listeriosis no representa una infección primaria, sino más bien, actúa como una consecuencia secundaria a algún cuadro clínico subyacente, afectando más importantemente a las aves jóvenes (Hoelzer *et al.*, 2012).

Se ha observado una prevalencia de *L. monocytogenes* en heces de bovino de 52% y en pollos destinados a la producción de carne del 28% (Skovgaard y Morgen 1988). En carnes crudas de aves de corral se ha encontrado una prevalencia del 45% al 47% (Doyle, 1987), y en un 26% (Nicolás, 1985) en carne de ave picada congelada.

La transmisión desde animales hacia seres humanos, puede ser de forma directa o a través de subproductos (Murray, 1955; Torres *et al* 2005; Drevets y Bronze, 2008). Por tratarse de una bacteria ubicua, *L. monocytogenes* puede encontrarse en una amplia variedad de lugares como: suelos, vegetales, aguas dulces y marinas, en explotaciones ganaderas e incluso en hogares. Puede llegar a sobrevivir de 1 a 2 años en suelo, por lo que, los animales pueden actuar como un nexo captando *L. monocytogenes* desde el alimento o ambiente contaminados y transmitiéndolas al ser humano (Drevets y Bronze, 2008).

2.4 Alimentos de mayor riesgo para la transmisión de *L. monocytogenes* resistente a los antimicrobianos.

a) Alimentos de origen pecuario.

Los alimentos de origen pecuario representan un riesgo importante para la transmisión de esta bacteria y posiblemente de genes de resistencia. Distintos autores han documentado el riesgo que representan ciertas matrices alimentarias, tanto por la presencia de *L. monocytogenes*, como por la probabilidad de transmitir genes de resistencia a través de alimentos tales como: la leche, los embutidos y carnes (Genigeorgis, 1989; Rota *et al.*, 1996; Pesavento *et al.*, 2010; Bae *et al.*, 2014). En estos alimentos se observa que los serotipos más frecuentemente encontrados corresponden al 4b y secundariamente al 1/2a y 1/2b (Cordano *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010; Terzi *et al.*, 2015). Dentro de los alimentos pecuarios, varios autores coinciden que existe mayor probabilidad en transmitir genes de resistencia antimicrobiana por alimentos como carnes y sus derivados (Rota *et al.*, 1996; Yucel *et al.*, 2005; Pesavento *et al.*, 2010; Osaili *et al.*, 2011). Por otra parte, también el sistema de producción industrial de productos pecuarios amplifica el riesgo de

adquirir cepas de *L. monocytogenes* resistentes a los antimicrobianos. Esto se produce porque durante el proceso, las cepas sufren daños subletales que favorecen la adquisición de genes de resistencia. Estas cepas son vitales pero difícilmente cultivables (Farber *et al.*, 1988; Doyle *et al.*, 2011)

b) Alimentos Listos para el consumo (LPC)

La existencia de alimentos procesados, ha coincidido con un aumento del poder adquisitivo de la población, y el consiguiente incremento en el consumo de comidas preparadas, o en el aumento del hábito de comer fuera de casa (Noriega, 2008). Este cambio en el paradigma sociocultural ha generado que las infecciones invasoras por *L. monocytogenes* hayan aumentado en los últimos años en algunos países industrializados, tales como el Reino Unido, Alemania y España. En contraste con estos antecedentes, otros países se han mantenido estable dado principalmente por la adopción de estrategias de control de la contaminación en los productos alimentarios, junto a programas de difusión de medidas preventivas en la población (EFSA, 2014). En Chile, el lugar donde ocurre el mayor porcentaje de ETAs es en el hogar (Noriega, 2008).

En la actualidad, la mayor proporción de los brotes se vinculan al consumo de productos de origen pecuario tales como: leche cruda o quesos elaborados con leche sin pasteurizar, pescados, carne molida y embutidos. La forma de presentación de mayor riesgo se encuentra en alimentos LPC (CDC, 2012). A pesar de que en los últimos años la listeriosis ha sido asociada mayormente al consumo de alimentos LPC y de origen pecuario, en el último tiempo también se han reportado aislamientos en frutas y verduras (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007; Cordano y Jacquet, 2009).

2.5. Problemática internacional en cuanto a la resistencia antimicrobiana.

La resistencia antimicrobiana es un proceso natural pero en los últimos años se ha visto una gran evolución de la resistencia, ya sea, por su abuso en producción animal, la falta de control de las instituciones gubernamentales y el mal uso por parte de la medicina humana. En producción animal aún existe en algunos países

un uso poco controlado de antimicrobianos, principalmente con fines productivos, como promotor de crecimiento, con fines de profilaxis, para prevenir el desarrollo de enfermedades, o con fines terapéuticos, para el tratamiento de enfermedades. La discusión se produce sobre todo en el caso de su utilización como promotor de crecimiento en alimentos o con fines de profilaxis, en alimentos y agua de bebida. Adicionalmente, algunos sistemas productivos, como la acuicultura, son responsables de la liberación al medioambiente de toneladas de antimicrobianos. Entonces, la preocupación se centra en que dosis bajas de antimicrobianos podrían ejercer una presión de selección positiva hacia las bacterias resistentes. Por otra parte, se sabe que bacterias multiresistentes pueden transmitirse, a través de alimentos de origen pecuario a los seres humanos como por ejemplo *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.*

En medicina humana, la falta de protocolos de administración de antimicrobianos, la autoprescripción de éstos y el no respetar dosis ni ritmos horario, se mencionan como los problemas más relevantes (García, 2003; Torres *et al.*, 2005).

Este fenómeno preocupa a nivel global debido al gran dinamismo del comercio internacional y a la relevancia que está tomando la inocuidad alimentaria en el mundo. Entonces cobra sentido entender este problema bajo el concepto de una salud, considerando que la salud humana depende de la salud animal y de la sustentabilidad medioambiental (OIE, 2009). Frente a esta situación FAO, OMS y OIE han generado estrategias conjuntas para abordar el problema de resistencia antimicrobiana con la idea de minimizar el riesgo de transmisión de resistencia antimicrobiana. Actualmente, existe un trabajo tripartito para abordar de forma colaborativa temas que vinculen la salud animal, salud humana y la sustentabilidad medio ambiental (OIE, 2010).

Dentro de los avances en esta área, se encuentra la elaboración de la lista de antimicrobianos de uso crítico para salud humana, donde aparecen listados como críticos los principales grupos de antimicrobianos bajo criterios de uso restringido en humanos y utilización en bacterias de origen no humano (WHO, 2011).

2.6. Vigilancia de resistencia antimicrobiana en Chile.

En Chile existen 7 fuentes de información de resistencia antimicrobiana en seres humanos.

a) El Instituto de Salud Pública, a través de su red de vigilancia de cepas clínicas ambulatorias.

b) Programa de control de infecciones del MINSAL, que incorpora a cepas derivadas de casos clínicos hospitalarios.

c) Red Pronares que se implementó en 11 centros hospitalarios de 5 regiones e incluyó a cepas clínicas de origen hospitalario y ambulatorio.

d) Datos RED SENTRY: incluyó a cepas de origen clínico hospitalario y ambulatorio.

e) Publicaciones locales

f) Encuestas

g) Grupo colaborativo de resistencia bacteriana creado el año 2007 con 39 centros de vigilancia (Cifuentes *et al.*, 2012)

De todas estas metodologías de vigilancia sólo el caso de las publicaciones locales, han aportado con la información de resistencia antimicrobiana de patógenos derivados de alimentos. Sin embargo, ninguna de estas fuentes hace referencia a resistencia antimicrobiana en *L. monocytogenes* y menos se hace mención de vigilancia en alimentos (García, 2003).

2.7. Mecanismo de resistencia antimicrobiana en *L. monocytogenes*.

Se han detectado dos tipos de resistencia en cepas de *L. monocytogenes*, por un lado está la resistencia natural o intrínseca, que puede presentarse mediante la interferencia de enzimas inactivadoras, ocasionadas por mutaciones espontáneas en genes constitutivos de las bacterias; y por otro lado la resistencia adquirida, que puede darse mediante mecanismos de resistencia cromosomales o extracromosomales, mediados principalmente por plásmidos.

L. monocytogenes presenta resistencia natural o intrínseca a las cefalosporinas de tercera generación, aztreonam (AZT), fosfomicina (FOS), ácido pipemidico y dalfopristin (SYN) (Troxler *et al.*, 2000).

Los primeros estudios de resistencia antimicrobiana en *L. monocytogenes* describían principalmente resistencia a un sólo antimicrobiano (Walsh *et al.*, 2001; Conter *et al.*, 2009), pero actualmente se puede ver que los últimos estudios se están centrando en describir y analizar la multiresistencia (Yang *et al.*, 2010; Garedew *et al.*, 2015).

Dentro de los antimicrobianos más frecuentemente implicados en mecanismos de resistencia se encuentran las tetraciclinas y gentamicina (Charpentier y Courvalin, 1999; Vela *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2001; Conter *et al.*, 2009; Bertsch *et al.*, 2014; Khen *et al.*, 2015), seguido por otros antimicrobianos como penicilina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim (Walsh *et al.*, 2001; Conter *et al.*, 2009; Bertsch *et al.*, 2014;). En el último tiempo, también se ha visto la relevancia de ciprofloxacino, encontrando alta resistencia a este antimicrobiano de un total de 18 probados (Yan *et al.*, 2010), y por otro lado, observando susceptibilidad disminuida o resistencia intermedia en cepas de alimentos y en cepas clínicas principalmente en el caso de ciprofloxacino y gentamicina (Soni *et al.*, 2014).

2.8. Resistencia antimicrobiana de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de casos clínicos

Actualmente, la mayoría de los autores coinciden en que la resistencia antimicrobiana encontrada en cepas clínicas de *L. monocytogenes* es baja, pero existen pocos estudios realizados con muestras provenientes de casos clínicos y de alimento posiblemente implicado en la transmisión. Se ha reportado una susceptibilidad a ampicilina del 60% lo que es bastante positivo en términos de éxitos terapéuticos (Torres *et al.*, 2005; Haraek *et al.*, 2009).

Para tratar los casos de listeriosis la terapia recomendada en la actualidad corresponde a la asociación de ampicilina y gentamicina. Y en el caso de las personas alérgicas se utiliza una combinación de trimetoprim y sulfametoxazol. En estudios *in vitro* se ha registrado baja resistencia a los antimicrobianos de uso clínico habitual (Torres *et al.*, 2005; Pesavento *et al.*, 2011).

En Chile, no existen reportes científicos ni gubernamentales referentes a resistencia antimicrobiana de cepas de *L. monocytogenes*, por lo que, considerando los datos presentados, el objetivo de este estudio fue analizar la resistencia antimicrobiana en cepas de *L. monocytogenes* aisladas durante los años 2008 y 2009, y evaluar la existencia de una posible asociación entre resistencia antimicrobiana y origen de las cepas, tipos de matriz alimentaria y serotipo.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar perfiles de resistencia de cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde alimentos y casos clínicos y asociar estas cepas resistentes con: origen, serotipo y matriz alimentaria.

Objetivos específicos

1. Evaluar sensibilidad a distintos antimicrobianos en cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde alimentos y de casos clínicos.
2. Determinar perfiles de resistencia para cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde alimentos y de casos clínicos.
3. Identificar la existencia de asociación entre resistencia antimicrobiana, matriz alimentaria, origen y serotipo.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Considerando que especies animales de abasto son sometidas a manejos terapéuticos con distintos tipos y dosis de antimicrobianos durante sus etapas de producción, y que estas especies actúan como reservorios naturales de *L. monocytogenes*, y que un porcentaje de sus subproductos contaminados originan matrices alimentarias de consumo habitual y masivo para el humano, es posible plantear que:

Cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde diferentes matrices alimentarias, y desde casos clínicos pertenecientes a diferentes serotipos, presentarán distintos patrones de resistencia a los antimicrobianos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas: *L. monocytogenes* sujetas a análisis

Se analizaron 222 cepas de *L. monocytogenes* identificadas y tipificadas por técnicas moleculares en la sección Microbiología, del Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral, de la SEREMI de Salud RM. Estas cepas fueron obtenidas durante el desarrollo del proyecto FONDECYT 11075051. Las cepas fueron criopreservadas a una T° -80 °C, utilizando como medio de preservación glicerol al 30%.

Para vitalizar las cepas a partir de los criotubos almacenados a -80 °C, se utilizó un medio nutritivo, agar TSA marca AES CHEMUNEX® con un 0,6% de extracto de levadura AES CHEMUNEX® (TSA+EL). Las cepas fueron incubadas por 24 hrs a 37°C. Para verificar la pureza de las cepas se les realizó un control fenotípico, que consistió en realizar una prueba de hemólisis, crecimiento por 24 horas en agar sangre (Trypticase de soya con 5% de sangre de oveja) y su crecimiento en agar cromogénico ALOA marca bioMérieux®. Todas aquellas cepas que no crecieron con el patrón típico de *L. monocytogenes*, se les realizó tinción Gram para ver morfología de las colonias, y a las sospechosas, se les realizó una galería de pruebas bioquímica, API *Listeria*.

Tabla 1. Información sobre el origen de las cepas de *L. monocytogenes* utilizadas en el estudio.

Origen	Nº de cepas según origen	Tipo	Número de cepas	Matriz	Número de cepas por matriz
Alimentos	182	Vegetales	27	Verduras	27
		Pecuarios	155	Carnes rojas	20
				Embutidos	28
				Pescados y mariscos	52
				Pollo	10
				Quesos y derivados lácteos	45
Casos clínicos	40				
Total	222				

5.2. Materiales de Laboratorio

Los materiales, reactivos e insumos fungibles para el desarrollo de este trabajo, fueron aportados por el Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral, de la SEREMI de Salud RM y por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

5.3. Base de datos

Se trabajó con una base de datos que contenía información sobre la caracterización de serotipo y matriz alimentaria de cada una de las cepas analizadas, perteneciente al proyecto FONDECYT 11075051

5.4. Programas estadísticos

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa INFOSTAT en su versión estudiantil.

5.5. Selección de antimicrobianos

Se seleccionó un número de 8 antimicrobianos marca OXOID®. Sulfametoxazol-trimetoprim 1,25-23,75 µg (Sxt), Cefalotina 30 µg (Kf), Gentamicina(Cn), Ciprofloxacino 5 µg (Cip), Eritromicina 15 µg (Eri), Ampicilina de 10 µg (Am), Tetraciclina de 10 µg (Te) y Penicilina 10 µg (PG). Esta selección se realizó utilizando como criterios la bibliografía internacional de estudios en casos clínicos y alimentos.

5.6. Análisis cualitativo: Kirby Bauer (KB)

Para evaluar la sensibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* se realizó un screening mediante KB, metodología cualitativa que consiste en la aplicación de discos de antimicrobianos sobre una superficie de agar sembrada con una concentración estándar de bacterias según lo recomendado por Watts *et al.*, 2002 y CLSI, 2007.

Procedimiento:

- 1.- Cultivo bacteriano en placas. Para revitalizar las bacterias se utilizaron placas Petri de TSA+EL y se incubaron a 37°C durante aproximadamente 18 hrs.
- 2.-Preparación del inóculo. Para preparar el inóculo se utilizaron colonias de *L. monocytogenes* cultivadas previamente en placa. Con una tórula estéril se tomaron aproximadamente 5 colonias y se re-suspendieron en tubos con 5 mL de caldo Mueller Hinton marca bioMérieux®, y se incubaron a 37°C por 18 hrs. Se prepararon en paralelo todos los inóculos de las cepas en estudio y de la cepa control, correspondiente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- 3.- Estandarización del inóculo. A partir del inóculo preparado previamente en caldo Mueller Hinton, se dispensaron cantidades de 200 µL, hasta llegar a la concentración requerida de 0,5 Mc Farland, para lo cual se utilizaron tubos con solución fisiológica 0,8% de NaCl. Para medir la concentración bacteriana se utilizó un nefelómetro marca OXOID®, previamente calibrado con un estándar de Mc Farland 0.5 de la misma marca comercial.

4.- Siembra de las placas de agar Mueller-Hinton. A partir del inóculo estandarizado a 0,5 Mc Farland se sembró en placas de agar Mueller-Hinton, en forma de cesped, utilizando tómulas estériles. Se utilizó una placa por cepa en estudio, más la placa de la cepa control.

5.- Disposición de discos de antimicrobianos. Los discos de antimicrobianos fueron dispuestos en cada placa utilizando un dispensador multicanal marca OXOID con capacidad para 8 discos por placa. Se trabajó en ambiente de esterilidad, bajo campana de flujo laminar. A continuación se incubaron las placas durante aproximadamente 18 hrs a 37°C.

6.- Lectura de resultados. Para la determinación de la resistencia o sensibilidad de las cepas a cada antimicrobiano, se midió el diámetro del halo de inhibición con un pie de metro. Para evaluar la calidad del ensayo se realizó la lectura de la cepa control *S. aureus* ATCC 25923 (control de sensibilidad). El resultado fue expresado como sensible, intermedia o resistente, dependiendo de la medida del halo.

7.- Interpretación de resultados. Para interpretar los resultados se utilizaron los puntos de corte publicados por: Vela *et al* (2001); CLSI M31-S (2004), EUCAST (2014). Ver tabla 2.

Tabla 2. Puntos de corte para Kiby Bauer

Antimicrobiano	Zona de diámetro en (mm)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Tetraciclina(Te) (c)	19	15-18	<14
Gentamicina(Cn) (d)			< 11
Sulfametoxazol+ Trimetoprim (Sxt) (a)	> 29		<29
Ampicilina (Amp) (a)	> 26	19-25	< 16
Penicilina G (Pg) (c)	> 24	11-12	<28
Ciprofloxacino (Cip)			<15
Eritromicina (Eri) (a)	> 25		<25
Cefalotina (Kf) (c)	> 18	15-17	<14

(a) EUCAST, 2014; (b) CLSI, 2007;(c) CLSI, 2004 M31_S1;(d) VELA et al., 2001

5.7 Análisis cuantitativo: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por método de Dilución en agar.

Las cepas que resultaron resistentes al screening por KB, se les realizó la CIM para estimar cuantitativamente a que concentración presentaron resistencia (CLSI, 2007). Se utilizó una técnica de crecimiento en micro gotas para evaluar la sensibilidad de las bacterias, frente a distintas concentraciones de antimicrobianos (Figura 1).

1.-Preparación de la solución madre de cada antimicrobiano.

Para preparar la solución madre (solución estandarizada) de cada antimicrobiano, se utilizó una fórmula que incorpora la potencia del antimicrobiano, la pureza y su contenido de agua, con el fin de calcular el peso necesario para obtener una

concentración de 5120 µg/mL. En el CLSI (2012), se indica el diluyente y solvente recomendado para la preparación de cada antimicrobiano (ver tabla 3).

Para calcular el peso de cada antimicrobiano se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso del antimicrobiano (mg)} = \frac{\text{volumen (mL)} \times \text{concentración (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg)}}$$

* La potencia (Assay purity %) se calculó con la siguiente fórmula.

$$\text{Potencia} = (\text{ensayo de pureza}) \times (\text{fracción activa}) \times (1 - \text{contenido de agua})$$

2.-Preparación de diluciones seriadas de antimicrobianos

Las soluciones seriadas se prepararon en tubos de centrifuga de 15 mL con 7mL, 2 mL y 3mL de solución fisiológica al 0,8%. Esta secuencia se repitió 4 veces. Desde la solución madre se traspasó 1 mL al tubo 1, dejando una concentración de 640 µg /mL. Se homogeneizó con Vortex marca TCL®y desde este tubo se traspasaron 2 mL al tubo 2 (quedando con una concentración de 320 µg /mL) y 1 mL al tubo 3 (quedando con una concentración 160 µg /mL). Esta secuencia se repitió según se indica en la tabla 3, hasta llegar a una concentración de 0,3 µg /mL). Las concentraciones que se utilizaron incluyeron como mínimo el rango del control de calidad para la cepa *S. aureus* ATCC 29213 y los puntos de corte para cada antimicrobiano en particular. Como diluyente se utilizó agua estéril. De acuerdo al número de diluciones requeridas, se muestran las concentraciones de trabajo para cada antimicrobiano (Tabla 3).

Tabla 3. Preparación de diluciones de antimicrobianos definidas por CLSI (2007).

Número de tubo	Concentración(ug)	Diluyente: Solución fisiológica (mL)	Dilución en tubo(ug/mL)	Concentración final en placa(ug/mL)
Tubo 1	5120	7	640	64 ug/mL
Tubo 2	640	2	320	32
Tubo 3	320	3	160	16
Tubo 4	160	7	80	8
Tubo 5	80	2	40	4
Tubo 6	40	3	20	2
Tubo 7	20	7	10	1
Tubo 8	10	2	5	0,5
Tubo 9	5	3	2,5	0,25
Tubo 10	2,5	7	0,125	0,0125
Tubo 11	0,125	2	0,6	0,06
Tubo 12	0,6	3	0,3	0,03
Tubo 13	0,3	7	0,15	0,015

3.- Preparación de las placas con antimicrobianos

A partir de las diluciones de antimicrobiano, se alicuotaron 2 mL de cada dilución en tubos de centrifuga estériles con capacidad para 25 mL. Se agregaron 18 mL de agar Mueller Hinton a cada tubo. Posteriormente, se mezcló y se vertió en placas estériles desechables. Este procedimiento se repitió para cada uno de los antimicrobianos. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se almacenaron en bolsas plásticas selladas a 4 – 8 C° en refrigerador por menos de 72 horas. Las placas fueron secadas semi-abiertas bajo el gabinete de flujo laminar antes de ser utilizadas.

4.- Preparación y estandarización del inóculo

El inóculo de trabajo se preparó a partir de cepas incubadas en placa por 18 horas. Se tomaron 5 colonias y se resuspendieron en 5 mL de caldo Mueller Hinton, que se incubó durante 18 hrs aproximadamente. Este inóculo se estandarizó a 0,5 Mc Farland utilizando 5 mL de solución fisiológica a 0,8% para lo cual se utilizó un nefelómetro marca OXOID®.

5.- Inoculación de las placas de agar Mueller Hinton

Para la inoculación de las cepas en agar Mueller Hinton, se utilizó un replicador de Steers. Trecientos μl de cada cepa estandarizada a 0,5 Mc Farland fueron dispuestos en las policubetas del replicador. En la primera policubeta se colocó cristal violeta, como guía para la lectura, a continuación la cepa control y luego cada una de las cepas a analizar. Las placas fueron sembradas desde la menor concentración de antimicrobiano hasta llegar a la más concentrada, para no arrastrar antimicrobiano. Finalmente se secó el inóculo a temperatura ambiente e incubó a 35-37°C por aproximadamente 18 hrs (ver figura 1).

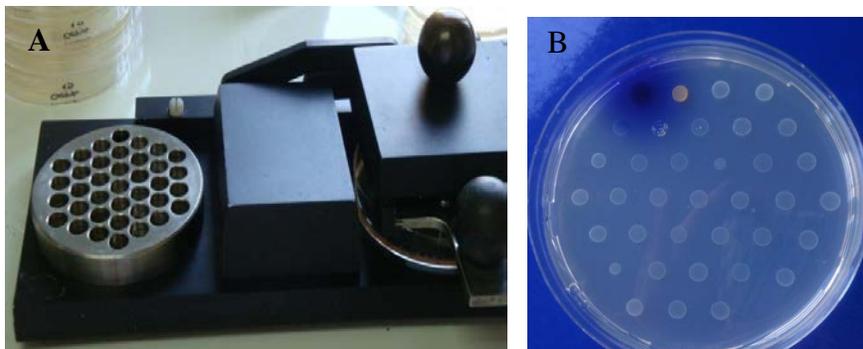


Figura 1. A) Replicador de Steers. B) placa sembrada con el replicador.

6.- Lectura e interpretación de resultados

Se leyeron los controles para evaluar la calidad del ensayo y comprobar que no existiera contaminación y que los antimicrobianos estén funcionando correctamente. Las cepas se leyeron después de aproximadamente 18 hrs de incubación a 37°C y se determinó CIM del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. Para interpretar los resultados se utilizaron los puntos de corte publicados por CLSI M31-S (2004), EUCAST (2014), CLSI M31_S1 (2004), CLSI M31_A2, (1999), Conter *et al* (2009) y Granier *et al* (2011) (ver tabla 4).

Tabla 4. Puntos de corte para CIM por antimicrobiano.

Antimicrobiano	Punto de corte de referencia (µg/mL)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Tetraciclina(Te) (c)	≤ 4		≥ 16
Gentamicina (Cn) (d)	≤ 0,5		≥ 16
Sulfametoxazol+ Trimetoprim(Sxt)(a)	≤ 0,06		≥ 0,06
Ampicilina (Amp) (c y e)	≤ 0,06		≥ 1
Penicilina G (Pg)(c)	≤ 2	0,25-2	≥ 4
Ciprofloxacino (Cip) (d)	≤ 0,5		≥ 8
Eritromicina (Eri)(a)	≤ 1		≥1
Cefalotina (Kf) (b)	≤ 8	16	≥32

a) EUCAST, 2014; b) CLSI M31_S1,2004; c) CLSI M31_A2, 1999; d) Conter *et al* 2009; e) Granier *et al* 2011.

5.8. Análisis de datos.

1. Determinación de perfiles de resistencia para cepas clínicas y de alimentos

A partir de la información proveniente del análisis de sensibilidad antimicrobiana, se generó una base de datos en Microsoft Excel 2010. Esta base de datos incluyó la sensibilidad obtenida por el screening con KB y la resistencia obtenida por CIM. La variable respuesta incluyó cepas con resistencia intermedia y completa.

2. Matriz de datos

En esta base de datos se incluyó un número correlativo para identificar cada cepa, junto con la codificación: 0 y 1. Donde 0= no resistente y 1= Intermedio o resistente. Además, se incorporó la información de serotipo y matriz alimentaria.

3. Análisis estadístico

Se utilizó análisis multivariado de tipología para conglomerados de tipo jerárquico. La información fue analizada con el programa estadístico INFOSTAT versión estudiantil 14. El análisis de conglomerado jerárquico permitió evaluar la similitud entre los casos y agruparlos mediante algoritmos de clasificación, a partir de la matriz de datos generada previamente, con el fin de obtener grupos homogéneos. Estos grupos fueron excluyentes y exhaustivos (Vivanco, 1999). El esquema de aglomeración fue expresado en un dendrograma. Se incluyó en este gráfico la distancia de unión entre casos y grupos (Vivanco, 1999).

4. Asociación entre resistencia antimicrobiana y matriz alimentaria, origen y serotipo.

Se analizó la información, con respecto a algunos antecedentes de las cepas (serotipo, origen y matriz alimentaria) facilitada por la Dra. Maricel Vidal en el marco del proyecto FONDECYT de Iniciación 11075051. Esta información se utilizó para determinar la asociación que podría existir entre resistencia antimicrobiana y serotipo, origen de las cepas y matriz alimentaria, utilizando la prueba de Chi-cuadrado. Para lo cual se realizaron tablas de contingencia con las variables

seleccionadas anteriormente. La información se dispuso en tres tablas de contingencia, para cada una de las cuales se realizó un análisis de chi-cuadrado:

- Se determinó la asociación entre resistencia antibiótica y serotipo.
- Se determinó asociación entre resistencia antibiótica y origen de la cepa (alimento o clínica)
- Se determinó asociación entre resistencia antibiótica y matriz alimentaria

Para confeccionar estas tablas de contingencia se utilizó el programa estadístico INFOSAT versión estudiantil.

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación de la sensibilidad a los antimicrobianos en cepas de *L. monocytogenes*.

De las 222 cepas estudiadas 182 fueron aisladas desde alimentos, de las cuales, 40 fueron resistentes al menos a 1 antimicrobiano. Dentro de ellas, 37 correspondieron a alimentos de origen pecuario y 3 a vegetales. De las 40 cepas clínicas, 5 presentaron resistencia antimicrobiana (CLSI M31_A2, 1999; CLSI M31_S1, 2004; Conter *et al* 2009; Granier *et al* 2011; EUCAST, 2014).

Se obtuvo una resistencia general de 45 cepas correspondientes al 20,3%. (Figura 2).

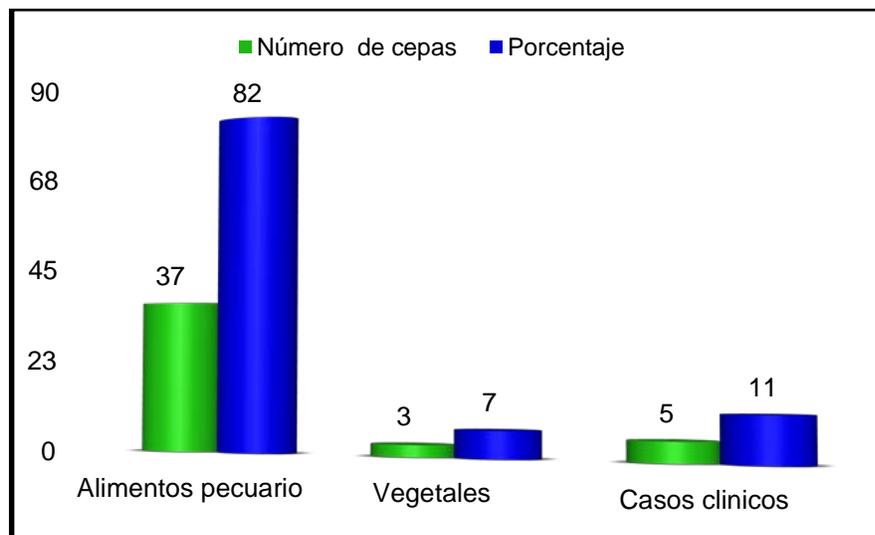


Figura 2. Valor absoluto y porcentaje de resistencia antimicrobiana en cepas de *L. monocytogenes*.

Se pudo observar que la mayoría de las cepas presentaron resistencia a un sólo antimicrobiano o resistencia simple, lo que correspondió a 26 cepas y en porcentaje al 58% de las cepas resistentes. Diecinueve cepas presentaron resistencia múltiple (resistencia a más de un antimicrobiano), correspondiendo al 42% de las cepas

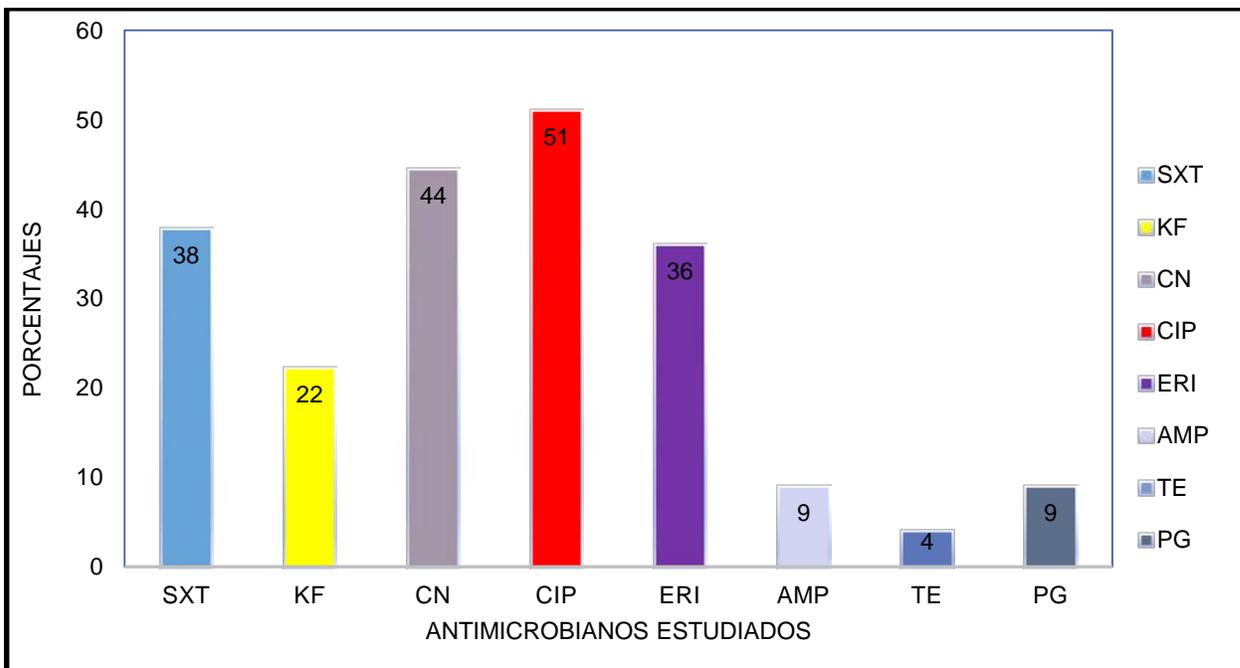
resistentes. Las cepas que presentaron resistencia simple, lo hicieron frente a: sulfametoxazol-trimetoprim, ampicilina, eritromicina, ciprofloxacino o gentamicina. (Ver tabla 5).

Tabla 5. Tipos de resistencia encontrada en cepas de *L. monocytogenes* de distinto origen n=45

	Resistencia simple	Multiresistencia
Nº de cepas resistentes	26 (25 cepas de alimentos 1 cepa clínica)	19 (15 cepas de alimentos 4 cepas clínicas)
Porcentaje de resistencia	58%	42%
Antimicrobianos	Sxt, Cn,Eri,Cip.	Todos en distintas combinaciones

Sulfametoxazol-trimetoprim (Sxt), gentamicina (Cn), eritromicina (Eri), ciprofloxacino (Cip)

Del total de cepas resistentes (n=45), el mayor porcentaje de resistencia fue a ciprofloxacino con un 51%. El antimicrobiano que le siguió en importancia fue gentamicina con un 44%, sulfametoxazol-trimetoprim con un 38% y eritromicina con un 36%. Luego con menor porcentaje de resistencia cefalotina con un 22%, ampicilina 9%, penicilina G con un 9% y tetraciclina con un 4%.



Sulfametoxazol-trimetoprim (Sxt), cefalotina (Kf), gentamicina (Cn), ciprofloxacino (Cip), eritromicina (Eri), ampicilina (AMP), tetraciclina (TE), penicilina G (PG).

Figura 3. Expresión porcentual de resistencia antimicrobiana en cepas de *L. monocytogenes*.

Se encontró que de las 45 cepas resistentes, 21 presentaron resistencia intermedia, de las cuales, 11 correspondieron a cepas resistentes a ciprofloxacino, 4 a gentamicina, 4 a ampicilina, y 2 a eritromicina. Ninguna cepa presentó resistencia intermedia a sulfametoxazol-trimetoprim ni a cefalotina. Todas las cepas analizadas frente a ampicilina resultaron tener resistencia intermedia.

El serotipo que registró mayor porcentaje dentro de las cepas resistentes de origen alimentario (N=40) fue el serotipo 4b, presentado un 52,5%. Se debe mencionar que este fue el serotipo de mayor frecuencia dentro de las cepas analizadas en este trabajo.

Las cepas que presentaron mayor resistencia, fueron las obtenidas desde la matriz alimentaria carnes rojas (50%), seguidas por las que se aislaron desde carne de pollo (30%).

6.2 Determinación de perfiles de resistencia para cepas clínicas y de alimentos.

Para realizar el análisis multivariado se utilizó una base de datos que incluyó: 45 cepas resistentes por CIM, más las variables de origen de las cepas, serotipo y matriz alimentaria. Con estos datos se realizó un análisis multivariado de conglomerado (Anexo 2). De acuerdo a este análisis se obtuvo un dendrograma donde destacan 5 clúster de importancia que asocian a la mayoría de las cepas como se puede observar en la tabla 6.

Tabla 6. Caracterización de los clúster encontrados en el análisis de conglomerados para 45 cepas de *L. monocytogenes* resistente a los antimicrobianos.

Clúster	Nº de cepas	Origen	Tipo de cepas	Perfil de antimicrobianos
1	11	Pecuario, vegetal y clínico.	1 clínica, 1 verdura, 3 paté, 3 choritos, 1 queso y 1 marisco surtido	Sxt, Cn, Cip, Eri
2	5	Pecuario	2 choritos, 1 de pollo, 1 carne vacuno, 1 cecina.	Sxt
3	5	Mayor importancia clínico y 1 representante de pecuario	4 clínicas y 1 cepa de salmón ahumado	Cn y Eri
4	3	Pecuario	4 Carne molida	Sxt, Kf,Cn,Eri, PG
5	3	Pecuario y vegetal	1 pecuario y 2 vegetal	Sxt, Kf,Cn y Eri

Sulfametoxazol-trimetoprim (Sxt), gentamicina (Cn), eritromicina (Eri), ciprofloxacino (Cip), cefalotina (Kf), penicilina G (PG).

Del total de 45 cepas, 27 se agruparon en alguno de los 5 clúster. Como se puede observar, se obtuvieron 3 tipos de perfiles, uno representado por cepas de alimento específicamente de origen pecuario y otro representado por cepas clínicas y de

alimentos. El resto de las cepas no se agruparon bajo ninguno de los perfiles de resistencia. Un sólo clúster presentó un patrón de resistencia a un sólo antimicrobiano.

Para todos los clúster hubo coincidencia de los antimicrobianos gentamicina y eritromicina excepto para el clúster 2. Las cepas de origen alimentario presentaron mayor diversidad de resistencia frente a los antimicrobianos y dentro de este grupo todas fueron resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim, a excepción del clúster N°3 conformado por sólo una cepa de alimento y 4 cepas clínicas. Casi todas las cepas clínicas presentaron un patrón de resistencia coincidente, siendo resistentes a gentamicina y eritromicina. En la figura 4 se muestran los clúster y se señala el perfil antimicrobiano y a que tipo de cepa corresponden.

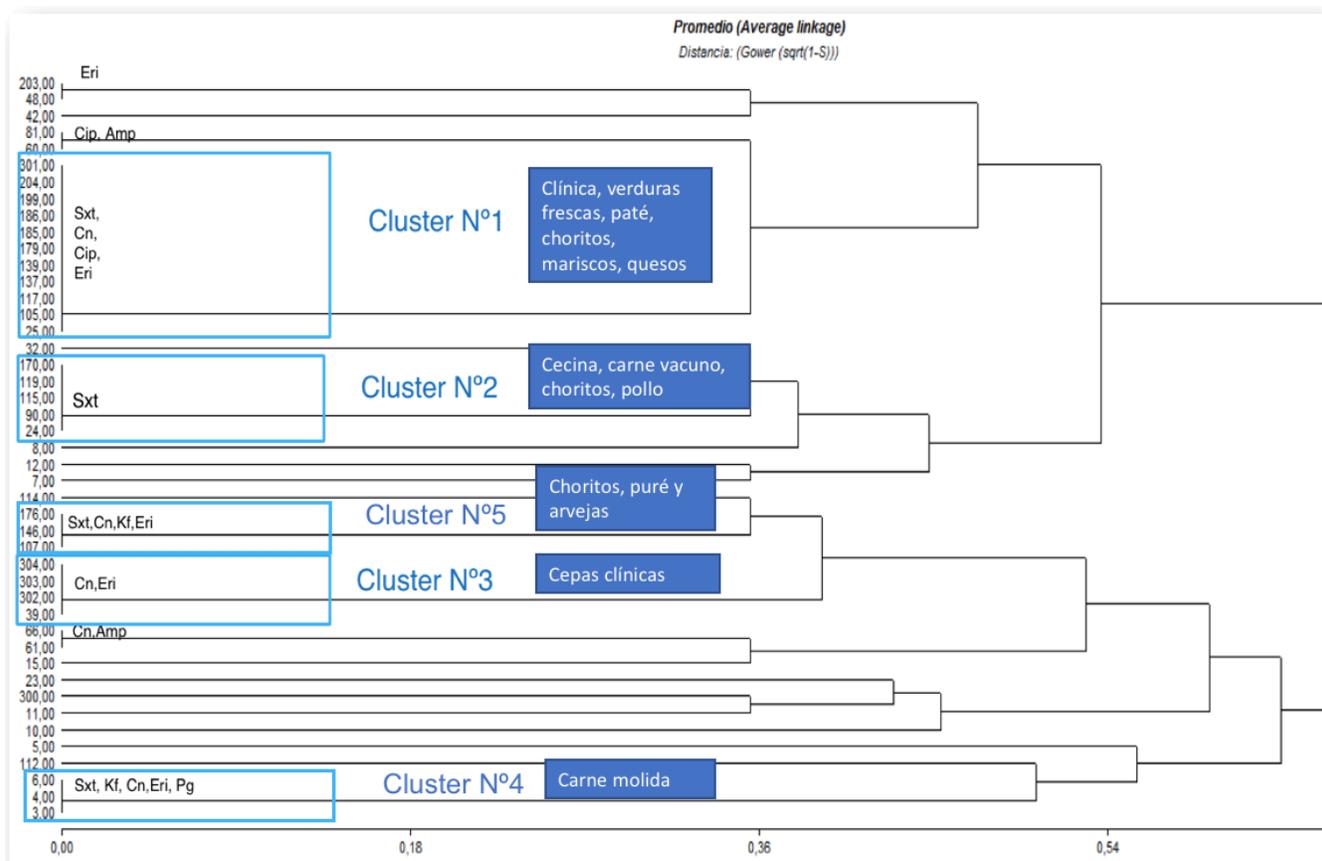


Figura 4. Dendrograma con perfiles de resistencia a los antimicrobianos de cepas de *L. monocytogenes*.

Sulfametoxazol-trimetoprim (Sxt), cefalotina (Kf), gentamicina (Cn), ciprofloxacino (Cip), eritromicina (Eri), ampicilina (AMP), tetraciclina (TE), penicilina G (PG).

6.3 Asociación entre resistencia antimicrobiana, matriz alimentaria, origen y serotipo.

El test de Chi-cuadrado mostró los siguientes resultados:

Tabla 7. Tabla de contingencia considera número de cepas por matriz alimentaria y resistencia de *L. monocytogenes*.

Matriz alimentos								
		carne rojas	embutidos	pescados y mariscos	pollo	lácteos	verduras	Total
	Sensible	obs	10,00	22,00	41,00	7,00	38,00	24,00
esp		15,60	21,85	40,57	7,80	35,11	21,07	142,00
Resistente	obs	10,00	6,00	11,00	3,00	7,00	3,00	40,00
	esp	4,40	6,15	2,86	2,20	9,89	5,93	31,43
total		20,00	28	52	10	45	27	182,00

χ^2 calculado: 35,692

χ^2 tabular: 11,070

χ^2 , 5 Grados de libertad (gl)

Interpretación: Existe evidencia estadística, con un 95% de confianza, para decir que se obtuvo dependencia entre matriz alimentaria y resistencia antimicrobiana. Esta dependencia entre las variables se debe en gran medida a las carnes rojas y pescados que presentaron mayor diferencia entre valores esperados y observados. Entonces se encontró una asociación significativa entre matriz alimentaria y resistencia antimicrobiana.

Tabla 8. Tabla de contingencia considera número de cepas por origen y resistencia de *L. monocytogenes*.

Origen de las cepa					
		Vegetales	Pecuario	Clínico	Total
Sensible	obs	24,00	118,00	40,00	182,00
	esp	21,65	124,27	36,08	182,00
Resistente	obs	3,00	37,00	5,00	45,00
	esp	5,35	30,73	8,92	36,08
total		27,00	155	45	227,00

χ^2 calculado: 5,036

χ^2 tabular: 5,990

χ^2 , 2 gl

α : 0,05

Interpretación: No existe evidencia estadística, con un 95% de confianza, para decir que origen de las cepas y resistencia antimicrobiana, son variables dependientes. Por lo tanto, no hay asociación significativa entre origen y resistencia antimicrobiana.

Tabla 9. Tabla de contingencia los serotipos y número de *L. monocytogenes* resistentes.

Serotipos						
		1/2a	1/2b	1/2c	4b	Total
Sensible	obs	56,00	24,00	6,00	88,00	174,00
	esp	52,27	24,97	5,46	84,26	166,97
Resistente	obs	11,00	8,00	1,00	20,00	40,00
	esp	14,73	7,03	1,54	23,74	47,03
total		67,00	32	7	108	214,00

χ^2 calculado: 2,373

χ^2 tabular: 7,814

χ^2 , 3 gl

α : 0,05

Interpretación: No existe evidencia estadística, con un 95% de confianza, para decir que el serotipo de las cepas y la resistencia antimicrobiana, son variables dependientes. Por lo tanto, no hay asociación significativa entre serotipo y resistencia antimicrobiana.

7. DISCUSIÓN

En la literatura existe gran variabilidad con respecto a los datos aportados sobre la resistencia antimicrobiana de *L. monocytogenes*. Algunos autores documentan una resistencia baja, menor al 10% (Garnier *et al.*, 2011; Bertsch *et al.*, 2014), mientras que otros autores mencionan una resistencia mayor al 15% de las cepas estudiadas (Walsh *et al.*, 2001; Conter *et al.*, 2009; Pasavento *et al.*, 2010). En este estudio, se encontró un total de 20,3% de cepas resistentes a los antimicrobianos de un total de 222 cepas estudiadas. Este porcentaje de resistencia total coincide con lo reportado por Pasavento *et al.*, (2010); Yan *et al.*, (2010); Shi *et al.*, (2015); Garedew *et al.*, (2015). Este porcentaje podría ser explicado por las características de las cepas con las cuales se trabajó, que se obtuvieron de forma contemporánea con los dos brotes de listeriosis ocurridos los años 2008 y 2009. Hasta ese momento las industrias productoras de alimentos no habían implementado métodos de vigilancia y prevención de *L. monocytogenes*. Las cepas incluidas en este trabajo presentaron características moleculares particulares, como la presencia de genes de virulencia (Montero *et al.*, 2015). Esto se condice con lo presentado por Krawczyk-Balska y Markiewicz (2015), quienes describen que el resistoma no sólo determina la respuesta fenotípica a la resistencia antimicrobiana, sino que también condiciona la respuesta de la célula bacteriana a diferentes condiciones de estrés y virulencia. Sería de gran relevancia estudiar si actualmente cepas de origen alimentario y casos clínicos, asociados a listeriosis, presentan porcentajes similares de resistencia y virulencia a los observados en este estudio.

Dentro de los antimicrobianos que generalmente causan problemas de resistencia en *L. monocytogenes* se encuentran: ciprofloxacino, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, cefalosporinas de 3^{era} generación (Walsh *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2001; Conter *et al.*, 2009; Pasavento *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Garedew *et al.*, 2015; Krawczyk-Balska y Markiewicz 2015; Shi *et al.*, 2015).

Las cepas analizadas en este estudio mostraron resistencia a: ciprofloxacino 51%, gentamicina con un 44%, sulfametoxazol-trimetoprim con un 38%, eritromicina 36%, cefalotina 22%, ampicilina 9%, penicilina-G 9% y tetraciclina 4%. Los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado por Yan *et al.*, (2010), quienes encontraron un alto porcentaje de resistencia fenotípica a ciprofloxacino, de un total de 18 antimicrobianos probados. También encontraron susceptibilidad disminuida o resistencia intermedia a eritromicina y gentamicina, en cepas de alimentos y en cepas clínicas. Con respecto a otros perfiles de resistencia Khen *et al* (2015), manifestaron que la mayor importancia en resistencia, la representaban ampicilina y gentamicina. Otro estudio, destaca la importancia de resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim encontrada por Charpentier y Courvalin (1999), han documentado la existencia de resistencia a este antimicrobiano en cepas de *L. monocytogenes*, asociada a elementos móviles como plasmidios y transposones, que podrían explicar este fenómeno derivado de otras bacterias Gram positivo y Gram negativo (Courvalin, 1994).

La mayoría de las cepas analizadas en este estudio (58%) mostraron resistencia a un sólo antimicrobiano, resultados que coinciden con lo descrito por Walsh *et al.*, (2001); Conter *et al.*, (2009); Garnier *et al.*, (2011). Se debe mencionar que existen otros estudios que han observado que la forma más importante de resistencia es múltiple, es decir, a más de 2 antimicrobianos (Conter *et al.*, 2009; Pesavento *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010). En cuanto a la multiresistencia, en este estudio se encontró una multiresistencia de 42% coincidente con lo encontrado por Yang *et al* (2010) y Garedew *et al* (2015).

No se pudo establecer un patrón único de multiresistencia por origen, matriz alimentaria o serotipo, pero en algunos clúster se pudo observar un origen común, como en el caso del clúster N°3, donde 4 de 5 cepas resistentes fueron de origen clínico. Estas cepas fueron resistentes a gentamicina y eritromicina. En el caso del clúster N° 4, agrupó solamente a cepas aisladas desde carne molida. Casi todas las cepas clínicas resistentes presentaron un patrón de resistencia coincidente, fueron resistentes a gentamicina y eritromicina. Estos antecedentes coinciden con lo

encontrado por Barbosa *et al.*, (2013), quienes analizaron patrones de resistencia de cepas de alimentos y clínicas. Sería muy interesante continuar con el estudio de las cepas clínicas resistentes a gentamicina, ya que es uno de los antimicrobianos de elección para el tratamiento de listeriosis en seres humanos.

Para todos los clúster hubo coincidencia en los antimicrobianos gentamicina y eritromicina, excepto para el clúster 2. La mayoría de los clúster que incluyeron alimentos tienen presente el antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprim, a excepción del clúster N°3, conformado principalmente por cepas clínicas.

A pesar de que en este trabajo la multiresistencia no fue frecuente, resulta relevante de mencionar que, se ha visto una tendencia mundial a la multiresistencia bacteriana en cepas de *L. monocytogenes*. Autores como Doyle (2011), y Rakic-Martinez *et al* (2011), encontraron que la mutación en genes que codifican para bombas de eflujo, pueden ocasionar resistencia a ciprofloxacino y a otros antimicrobianos y desinfectantes, simultáneamente, observándose que estas mutaciones no sólo ocasionan resistencia múltiple, sino también, disminución de la susceptibilidad antimicrobiana o resistencia intermedia, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

También es interesante destacar que el mayor porcentaje de las cepas analizadas en este estudio resultaron resistentes a ciprofloxacino y presentaron una resistencia de tipo intermedia. Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos muy utilizados en medicina veterinaria por su fácil administración, alta liposolubilidad y amplio espectro de acción, por lo que, la alta resistencia encontrada para ciprofloxacino es preocupante, coincidente con lo encontrado por Conter *et al.*, (2009) y Soni *et al.*, (2014). Dentro de las cepas de alimentos analizadas, presentaron mayor resistencia a ciprofloxacino y los antimicrobianos con menores porcentajes de resistencia fueron penicilina y tetraciclina, coincidente con lo descrito por Conter *et al.*, (2009) y Soni *et al.*, (2014). Estos autores encontraron una emergencia de resistencia a ciprofloxacino y cefalotina en productos vegetales, y plantean la gran importancia de implementar vigilancia antimicrobiana en producción primaria de alimentos, ya que, es preocupante encontrar resistencia antimicrobiana en productos de origen

vegetal, y adicionalmente, que esta resistencia sea a quinolonas y cefalosporinas de tercera generación. En este mismo sentido, resulta relevante mencionar el trabajo de Krawczyk-Balska y Markiewicz (2015), quienes caracterizan el resistoma de cefalosporina para *L. monocytogenes* y señalan que existe una conexión molecular entre resistencia y otros procesos de la bacteria, tales como metabolismo, respuesta al estrés y virulencia.

En cuanto a los perfiles de resistencia en las cepas estudiadas no se encontró un alto porcentaje de resistencia a tetraciclina, como lo reportado en algunos estudios donde se analizaron cepas de origen animal (Vela *et al.*, 2001; Charpentier y Courvalin, 1999). Este resultado se podría explicar porque el origen de las cepas no es directamente desde animales sino que también puede provenir de alimentos de origen distinto.

Dentro de las cepas resistentes, analizadas en este trabajo, 16 correspondieron al serotipo 4b, seguido por 1/2a (9 cepas) y el resto a otros serotipos. Esta tendencia coincide con lo que reporta el CDC (2013), como los serotipos que causan más frecuentemente casos de listeriosis en seres humanos. Estos resultados también coinciden con lo reportado por Garnier (2011) y Terzi (2015). Por otro lado, Obaidat *et al* (2015), analizaron muestras de pescado de distintos países y encontraron una asociación entre resistencia antimicrobiana y serotipo, la primera que se ha descrito. En este caso, los serotipos más comunes fueron 1/2a y 3a y a pesar de tener mayor presencia de algunos serotipos, no se observó una dependencia estadísticamente significativa, entre resistencia antimicrobiana y serotipo de las cepas en estudio.

En el análisis por origen de las cepas, se encontró un 82% de cepas resistentes de origen pecuario. Al analizar estos resultados y compararlos con la prueba de chi-cuadrado no hubo evidencias estadísticamente significativas para establecer la dependencia entre las variables.

Con respecto al análisis por matriz alimentaria, se encontró una dependencia estadísticamente significativa, entre el tipo de matriz y la resistencia antimicrobiana. Lo que implica que ciertas matrices alimentarias (carne bovina, pescados y

mariscos) aumentarían el riesgo de transmisión de *L. monocytogenes* resistente a los antimicrobianos. En el caso de matrices cárnicas, algunos investigadores coinciden en que representan importantes vehículos de transmisión de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a los antimicrobianos (Rota *et al.*,1996); Yucel *et al.*, (2005); Pesavento *et al.*, (2010), Osaili *et al.*, (2011). En el caso de los pescados y mariscos, los datos publicados por Montero *et al* (2015), para el estudio de las mismas cepas, sugieren una fuerte correlación entre casos clínicos y la matriz de pescados y mariscos. Nuestros datos coinciden con este trabajo en cuanto al riesgo que representa esta matriz alimentaria.

El análisis multivariado de conglomerados permitió agrupar los perfiles de resistencia en grupos principales o clústeres. Del total de 45 cepas, 27 se agruparon dentro de 5 clúster. Se obtuvieron 3 tipos de perfiles, uno representado por cepas de alimentos específicamente de origen pecuario (2 y 4), otro representado por cepas clínicas y de alimentos (clúster 1 y 3) y finalmente, un grupo representado por alimentos pecuarios y vegetales (5). El clúster que agrupó al mayor número de cepas presentó un perfil de resistencia a: gentamicina, eritromicina, sulfametoxazol-trimetoprim. Para todos los clúster hubo coincidencia, en cuanto a la presencia de resistencia a gentamicina y eritromicina, excepto para el clúster 2. La mayoría de los clúster de alimentos tuvieron presente la resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim, coincidente con lo observado por Charpentier y Courvalin (1999). El clúster N°3 conformado principalmente por cepas clínicas, presentaron un patrón de resistencia común a gentamicina y eritromicina. Este patrón se diferencia a los encontrados en los clúster que incluían alimentos.

Considerando la información de perfiles de resistencia, es posible pensar que existe una tendencia entre las cepas que circulan en alimentos, a presentar perfiles de resistencia distintos a los que se presentan en cepas clínicas, pero es necesario contar con un diseño experimental preciso para poder estudiar este fenómeno en detalle.

8. CONCLUSIONES

- De las 222 cepas analizadas 45 presentaron resistencia a los antimicrobianos estudiados, correspondiendo al 20,3%. El tipo de resistencia más frecuente, fue a un sólo antimicrobiano (58%).
- Del total de 45 cepas, 27 se agruparon dentro de alguno de los 5 clúster definidos por el análisis de conglomerados. Se obtuvieron 3 tipos de perfiles, uno representado por cepas de alimento de origen pecuario y otro representado por cepas clínicas y de alimentos. No se pudo establecer un patrón único de multiresistencia por origen, matriz alimentaria o serotipo, pero en algunos clúster se pudo observar un origen común, clúster 3 (principalmente clínico) y clúster 4 (alimentos, carne molida). El clúster que agrupó mayor número de cepas presentó un perfil de resistencia a gentamicina, eritromicina y sulfametoxazol-trimetoprim.
- Existe una asociación entre la matriz alimentaria y *L. monocytogenes* resistente a los antimicrobianos.
- No se encontró asociación entre resistencia antimicrobiana y serotipo, ni tampoco entre resistencia y origen de las cepas.
- Se observó una tendencia distinta de perfiles de resistencia en cepas de origen alimentario y casos clínicos.

Anexo 1: Certificación del cumplimiento de medidas de bioseguridad

Santiago, Enero 12 de 2015.

A quien corresponda,

La presente carta tiene por objeto declarar que la tesis titulada “Caracterización de patrones de resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* y asociación de riesgo según: origen, matriz alimentaria y serotipo”, será realizada en la Sección Microbiología del Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral de la SEREMI de Salud de la Región Metropolitana. Este Laboratorio cuenta con la infraestructura necesaria para el trabajo con patógenos bacterianos, de acuerdo a las normas de bioseguridad exigidas por el Manual de Normas de Bioseguridad editado por Conicyt (versión 2008). Las bacterias del género *Listeria* se consideran patógenos de alto riesgo y se ubican en el nivel de bioseguridad 3. De acuerdo con esto, se cuenta con seis áreas independientes de trabajo:

Recepción de muestras

Preparación y siembra de muestras

Sala de estufas

Sala de traspasos y lectura

Sala de biología molecular

Sala de lavado, preparación y esterilización de material

Específicamente, el área de preparación y siembra de muestras, corresponde a una sección de contención que posee accesos de seguridad y medidas para el control de acceso. Tanto en la sala de preparación de muestras como en la de biología molecular, se cuenta con campanas de flujo laminar y gabinetes de bioseguridad con filtros EPA y características técnicas que garantizan la bioseguridad del personal que las usa. Todo el material residual se autoclave en recipientes especialmente destinados para tal efecto y el proceso se lleva a cabo en equipos y en un sector de la sala de esterilización, específicamente destinado a la descontaminación de material.

Además, todas las cepas que utilizará este estudio fueron obtenidas a partir del proyecto Fondecyt de Iniciación 11075051, que contó con la aprobación del Comité Asesor de Bioética de Fondecyt.

Maricel Vidal Oyarce

Doctor en Ciencias Biomédicas

Laboratorio de Salud Pública Ambiental y Laboral

SEREMI de Salud Región Metropolitana

Anexo 2: Tabla maestra de datos.

ID	Tipo de alimento	Origen	SXT	KF	CN	CIP	ERI	Amp	Te	PG	Matriz	Serotipo
3	Carne molida	Alimento	1	1	1	0	1	0	0	1	Pec	NT
4	Carne molida	Alimento	1	1	1	0	1	0	0	1	Pec	NT
5	Carne molida	Alimento	1	1	1	1	1	0	1	1	Pec	NT
6	Carne molida	Alimento	1	1	1	0	1	0	0	1	Pec	NT
7	Carne molida	Alimento	1	0	1	1	0	0	0	0	Pec	4b
8	Carne molida	Alimento	1	0	1	0	0	0	0	0	Pec	4b
10	Carne molida	Alimento	1	1	1	1	1	1	0	0	Pec	1/2a
11	Carne molida	Alimento	1	1	1	1	1	0	0	0	Pec	1/2b
12	Carne molida	Alimento	1	0	0	1	0	0	0	0	Pec	1/2a
15	Pollo molido	Alimento	0	0	1	0	0	0	0	0	Pec	1/2b
23	Pollo	Alimento	0	1	1	1	1	0	0	0	Pec	1/2a
24	Pollo	Alimento	1	0	0	0	0	0	0	0	Pec	1/2a
25	Queso	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	4b
32	Queso	Alimento	1	0	0	0	0	1	0	0	Pec	4b
39	Salmon ahumado	Alimento	0	0	1	0	1	0	0	0	Pec	1/2b
42	Salmon ahumado	Alimento	0	0	0	1	1	0	0	0	Pec	1/2b
48	Queso	Alimento	0	0	0	0	1	0	0	0	Pec	4b
60	Queso	Alimento	0	0	0	1	0	1	0	0	Pec	4b
61	Queso	Alimento	0	0	1	0	0	1	0	0	Pec	4b
66	Queso	Alimento	0	0	1	0	0	1	0	0	Pec	4b
81	Queso de cabra	Alimento	0	0	0	1	0	1	0	0	Pec	4b
90	Carne vacuno	Alimento	1	0	0	0	0	0	0	0	Pec	1/2c
105	Choritos	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	4b
107	Choritos	Alimento	0	1	1	0	1	0	0	0	Pec	4b

112	Choritos	Alimento	0	1	1	0	0	0	0	1	Pec	4b
114	Choritos	Alimento	1	1	1	0	1	0	0	0	Pec	4b
115	Choritos	Alimento	1	0	0	0	0	0	0	0	Pec	4b
117	Choritos	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	4b
119	Choritos	Alimento	1	0	0	0	0	0	0	0	Pec	1/2a
137	Mariscos surtidos	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	4b
139	Choritos	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	1/2a
146	Arvejas	Alimento	0	1	1	0	1	0	0	0	Veg	1/2a
170	Cecina cocida	Alimento	1	0	0	0	0	0	0	0	Pec	1/2b
176	Paté	Alimento	0	1	1	0	1	0	0	0	Pec	1/2a
179	Paté	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	1/2a
185	Paté	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	NT
186	Paté	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	4b
199	Paté	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Pec	1/2a
203	Verduras	Alimento	0	0	0	0	1	0	0	0	Veg	1/2b
204	Verduras	Alimento	0	0	0	1	0	0	0	0	Veg	1/2b
300	N.A.	Clínica	1	0	1	1	1	0	0	0	Caso	4b
301	N.A.	Clínica	0	0	0	1	0	0	0	0	Caso	1/2b
302	N.A.	Clínica	0	0	1	0	1	0	0	0	Caso	1/2a
303	N.A.	Clínica	0	0	1	0	1	0	0	0	Caso	4b
304	N.A.	Clínica	0	0	1	0	1	0	0	0	Caso	4b

*En la tabla se mencionan alimentos de origen pecuario con la abreviación Pec y alimentos de origen vegetal con la abreviación Veg.

*N.A: no aplica

REFERENCIAS BIOGRÁFICAS

BAE, D., MEZAL, E.H., SMILEY, R.D., CHENG, C.-M. & KHAN, A.A. (2014). The Sub-species Characterization and Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Domestic and Imported Food Products from 2004 to 2011, *Food Research International* Disponible en: <10.1016/j.foodres.2014.07.049> [En consulta: 01/02/2014].

BARBOSA J, MAGALHÃES R, SANTOS I, FERREIRA V, BRANDÃO TR, SILVA J, ALMEIDA G, TEIXEIRA P. (2013). Evaluation of antibiotic resistance patterns of food and clinical *Listeria monocytogenes* isolates in Portugal. *Foodborne Pathogenes Disease* 10(10):861-6.

BERTSCH, D., MUELLI, M., WELLER, M., URUTY, A., LACROIX, C., & MEILE, L. (2014). Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listeria* spp. isolates including *Listeria monocytogenes*. *Microbiology Open*, 3(1), 118–127.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2015). Morbidity and Mortality Weekly Report. Updated May, 2015. Disponible en: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6418a4.htm#Tab>> [En consulta: 20/06/2015].

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). (2013). Disponible en: <<http://www.cdc.gov/listeria/surveillance.html>> [En consulta: 01/12/2014].

CIFUENTES, M., SILVA, F., GARCÍA, P., BELLO, H., BRICENO, I., CALVO, M., & LABARCA, J. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. *Revista Chilena de infectología*, 31(2), 123-130.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARS INSTITUTE (CLSI) M31-S1. (2004). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Informational Supplement. 17(24).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARS INSTITUTE (CLSI) M45-P. (2004). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. M45-P. 26(25).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARS INSTITUTE (CLSI). (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth informational supplement. M100-S17.1(27).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARS INSTITUTE (CLSI). (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Twenty-second informational supplement M100-S21 1(31).

CONTER M., PALUDI D., ZANARDI E., GHIDINI S., VERGARA A., IANIERI A. (2009). Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 128 497–500.

CORDANO AM, JACQUET C. (2009). *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: prevalence and strain characterization. *International Journal of Food Microbiology* 132 Jun (30)176–179.

COURVALIN, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapies*, 38, 1447–1451.

CHARPENTIER E, COURVALIN P. Minireview. (1999). Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.43.2103-2108.

DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA, MINISTERIO DE SALUD, CHILE (EPIMINSAL) (2015). Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA). Disponible en:<http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Entericas/Informe_entericas_2014.pdf>[En consulta 20/06/2015].

DOYLE M.P., BEUCHAT L.R., MONTVILLE T.J. (2011). Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. 355-370 pp Capítulo18. Editorial Acribia S.A.

DOYLE, M.D. (1987) The emergence of *Listeria monocytogenes* as a foodborne pathogen of concern. *Food. Res. Inst., Univ. Wisconsin-Madison*. 1-25.

DREVETS, D. A., Y BRONZE, M. S. (2008). *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 53. 151-165.

EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE NETWORK.

EARS-Net. (2014). Disponible en:<<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>> [En consulta: 10/09/2014].

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Foodborne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*. 12(2):3547, 312pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547. Disponible en: <www.efsa.europa.eu/efsajournal> [En consulta 09/09/2014].

FARBER J.M.TITTIGER F., GOUR L. (1988). Surveillance of Raw-Fermented (Dry-Cured) Sausages for the Presence of *Listeria* spp. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*.21: 430–434

GARCIA C, PATRICIA. (2003). Resistencia bacteriana en Chile. *Revista chilena de infectología*. (20), suppl.1, 11-23. ISSN 0716-1018. [En consulta: 10/09/2014].

GAREDEW L., TADDESE A., BIRU T., NIGATU S., KEBEDE S., EJO M., FIKRU A., AND BIRHANU T. (2015) Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of listeria species from ready-to-eat foods of animal origin in Gondar Town, Ethiopia. BMC Microbiology 15:100. DOI 10.1186/s12866-015-0434-4.

GENIGEORGIS, C. A. AND DUTULESCU, D. AND GARAYZABAL, J. (1989). Prevalence of *Listeria* spp. in Poultry Meat at the Supermarket and Slaughterhouse Level, Journal of Food Protection. 52: 9.

GILOT P, ANDRÉ P, CONTENT J. (1999). *Listeria monocytogenes* Possesses Adhesins for Fibronectin. Infection and Immunity. 67(12): 6698-6701.

GRANIER S, MOUBARECK C, COLANERI C, LEMIRE A, ROUSSEL S, DAO T, COURVALIN P, BRISABOIS A. (2011). Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from Food and the Environment in France over a 10-Year Period. Applied and Environmental Microbiology. 77 (8): 2788–2790.

HARAKEH S, ZOUHAIRI O, BAYDOUN E, BABOUR E, AND ALWAN N. (2009). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. Science of the Total Environment. 407, 4022-4027

HOELZER K., POUILLOT R., DENNIS SH. (2012). Veterinary Research, 43:18. Disponible en. <<http://www.veterinaryresearch.org/content/43/1/18>> :[En consulta: 09/07/2015]

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. (ICMSF). (2002). “*Listeria monocytogenes* en salchichas cocidas (Frankfurters)”. Microorganismos de los alimentos 7. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. ICMSF. Acribia, S.A., Zaragoza, España.

KHEN B. K., LYNCH O. A., CARROLL J. MCDOWELL D. A. AND DUFFY D. A. (2015). Occurrence, Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* in the Beef Chain in the Republic of Ireland. Zoonoses and Public Health. 62, 11–17

KRAWCZYK-BALSKA A. AND MARKIEWICZ Z. (2015). The intrinsic cephalosporin resistance of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics. Journal of Applied & Environmental Microbiology. 2015 Oct 28. doi: 10.1111/jam.12989.

MCLAUCHLIN J, HALL S M, VELANI S K, GILBERT R J. (1991). Human Listeriosis and Paté: a possible association to *Listeria monocytogenes* in Milk. British Medical Journal. 303: 773-775.

MCLAUCHLIN, J. (1997). The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: A public health perspective. Reviews in Medical Microbiology, 8, 1–14.

MONTERO, D., BODERO, M., RIVEROS, G., LAPIERRE, L., GAGGERO, A., VIDAL, R. M., & VIDAL, M. (2015). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Frontiers in Microbiology*, 6.

MURRAY EGD. A. (1955). Characterization of Listeriosis in Man and Other Animals. *Canadian Medical Association Journal*. 72(2):99-103.

NICOLAS, J.A. (1985) Contamination des viandes et des produits de charcuterie par *Listeria monocytogenes* en Haute-Vienne. *Sciences des Aliments* (IV), 175-180.

NORIEGA, R., MIGUEL, L., IBÁÑEZ, S., GONZÁLEZ, P., YAMAMOTO, M., ASTUDILLO, J., ... & PÉREZ, J. (2008). *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología*, 25(5), 342-349.

OBAIDAT M.M., BANI SALMAN A.E., LAFI S.Q. AND AL-ABBOODI A.R. (2015). Characterization of *Listeria monocytogenes* from three countries and antibiotic resistance differences among countries and *Listeria monocytogenes* serogroups. *Letters in Applied Microbiology*. 60(6):609-14. doi: 10.1111/lam.12420

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE SALUD ANIMAL (OIE). (2010). The FAO-OIE-WHO Collaboration. Sharing responsibilities and coordinating global activities to address health risks at the animal-human-ecosystems interfaces. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Current_Scientific_Issues/docs/pdf/FINAL_CONCEPT_NOTE_Hanoi.pdf

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE SALUD ANIMAL (OIE).(2009). Un mundo, una salud. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/bulletin/Bull_2009-2-ESP.pdf [En consulta 02/01/2016].

OSAILI T.M. A., ALABOUDI A.R., NEISAR E. 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

PESAVENTO G., DUCCI B., NIERI D., COMODO N., LO NOSTRO, A. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*. 21. 5. 708–713

PINNER RW, SCHUCHAT A, SWAMINATHAN B, HAYES P, DEEVER K, WEAVER R, PLIKAYTIS B, REEVES M, BROOME C, WENGER J. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis II. *Microbiologic and Epidemiologic Investigation*. 267: 2046-2050.

RAKIC-MARTINEZ, M., DREVETS, D. A., DUTTA, V., KATIC, V., & KATHARIOU, S. (2011). *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride, and other toxic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), 8714-8721.

ROTA, C., YANGÜELA, J., BLANCO, D., CARRAMINANA, J., ARINO, A., & HERRERA, A. (1996). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in 144 *Listeria* isolates from Spanish dairy and meat products. *Journal of Food Protection*. 59(9), 938-943.

SEDANO, R. FICA A., GUIÑEZ D., BRAUN S., PORTE L., DABANCH J., WEITZEL TH., SOTO A. (2013). Infecciones por *Listeria monocytogenes*, una experiencia de dos décadas: A two decade experience. *Revista Chilena infectologia*. 30: 4 417-425. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000400011&lng=es&nrm=iso>. [En consulta 08/04/2014].

SHI WU., QINGPING WU., JUMEI ZHANG, MOUTONG CHEN, ZEAN YAN. (2015). Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control* 47. 340-347.

SKOVGAARD, N., & MORGEN, C. A. (1988). Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 6(3), 229-242.

SONI D.K., SINGH M., SINGH D.V. AND KUMAR S. D. (2014). Virulence and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable and soil samples. *BMC Microbiology* 2014, 14:241 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/241>

STEWART PHILIP S, AND COSTERTON J WILLIAM. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilm. *THE LANCET* Volume 358, No. 9276, p135–138.

SWAMINATHAN B., GERNER-SMIDT P. (2007) The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9: 1236–1243.

TERZİ G., GÜCÜKOĞLU A., ÇADIRCI Ö., UYANIK T., ALİŞARLI M. (2015). Serotyping and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Samsun, Turkey. *Turk J. Veterinary Animal Science*. 39: © TÜBİTAK doi:10.3906/vet-1407-15

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). (2014). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0. Disponible en: <<http://www.eucast.org>> [En consulta 19/08/2014].

TORRES, K., SIERRA, S., POUTOU, R., CARRASCAL, A., Y MERCADO, M. (2005). Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Revista MVZ Córdoba. 10, 511-543.

TROXLER R, VON GRAEVENITZ A, FUNKE G, WIEDEMANN B, 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.

VÁZQUEZ-BOLAND J, KUHN M, BERCHE P, CHAKRABORTY T, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, GOEBEL W, GONZÁLEZ-ZORN B, WEHLAND J, KREFT J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clinical Microbiology Reviews; 14(3): 584-640.

VELA A., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBALA J., LATREB M. RODRÍGUEZ A., DOMÍNGUEZA L., MORENOA M. (2001) Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. International Journal of Antimicrobial Agents 17 : 215–220.

VIVANCO M. (1999). Análisis estadístico multivariable. Teoría y práctica, 1 Edición. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 234 p.

WALSH, D. , DUFFY, G. , SHERIDAN, J.J. , BLAIR, I.S. AND MCDOWELL, D.A. (2001). Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. Journal of Applied Microbiology, 90: 517–522. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01273.x

WATTS J.L, SHRYOCK T.R, APLEY M, JONES R.N, LEIN D.H, THORNSBERRY C, WALKER R.D, WHITE D.G, WU C.C (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition, 22:6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2011). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 3rd Revision 2011. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-third/en/> en consulta: 30/12/15.

YANG H., NEOGIC S., MO Z., GUAN W., SHEND Z., ZHANGD S., LI L., YAMASAKI S., SHI L., ZHONG N. (2010). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510005672> [En consulta 08/06/2014].

YUCEL N, ÇITAK S, ÖNDER M. (2005). Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria species* in meat products in Ankara, Turkey. Food Microbiology, 22:241–5.