

BACTERIOLOGIA DE LA LISTERIOSIS

Por el Dr. FERNANDO M. L. MARCENAC

Introducción

La *Listeria monocytógenes* es el agente causante de la listeriosis. Pertenece al género *Listeria*, el que además cuenta con dos especies: *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi*. Este género está transitoriamente ubicado en el grupo Coryneforme.

L. monocytógenes es un bacilo gram positivo, con cierta tendencia al pleomorfismo, pudiendo aparecer como diplococo o bajo formas filamentosas. Es aerobia o facultativa y desarrolla bien en la mayoría de los medios comunes de aislamiento. La gran mayoría de las cepas son beta-hemolíticas, pero existen cepas que desarrollan tardíamente la beta-hemólisis y aún, cepas no hemolíticas. Es catalasa positiva. Fermenta glucosa y otros hidratos de carbono, acidificando el medio sin producción de gas. No licúa la gelatina, no reduce los nitratos a nitritos, ni produce SH₂. Hidroliza la bilis esculina y desarrolla en caldo-CINa al 6.5 %. Es una bacteria móvil, peritrica con no más de 6 cilias. La motilidad se evidencia cuando la temperatura de incubación es inferior a los 35°C, pudiéndose apreciar en la observación en fresco, su desplazamiento característico "a los tumbos" y en los medios para motilidad, el desarrollo también característico de una figura de "pino invertido" a lo largo del trazo de la punción. Sus temperaturas límites de desarrollo son de 2.5°C y 42°C^{1, 8, 16}.

Aislamiento de *L. monocytógenes* de distintos materiales clínicos

Es bien conocido el hecho de que *L. monocytógenes*, a pesar de ser una bacteria que no presenta requerimientos nutricionales especiales, en ciertas ocasiones, el resultado de la tentativa de su aislamiento no puede ser más desconcertante: en casos de presunta listeriosis oculta el resultado del aislamiento no correspondió al de la bacterioscopía de la lesión. Estos problemas de aislamiento se presentan cuando la bacteria está asociada a flora contaminante o colonizante, pero no ocurren cuan-

do la *L. monocytógenes* se encuentra al estado de flora única. Para su aislamiento a partir de materiales polimicrobianos, se preconizan medios selectivos que llevan en su formulación distintos agentes inhibidores de la flora acompañante: medio de Mc Bride (alcohol feniletílico), medio de Beerens (ácido nalidíxico) y la modificación de este último por Ralovich y col.¹⁵ y por Bockemuhl, Seeliger y col.², cuyos medios llevan ácido nalidíxico y tripaflavina. En el comercio, existe un medio selectivo (Merck) para aislamiento de *L. monocytógenes*, que contiene 10 mg de tripaflavina y 40 mg de ácido nalidíxico por litro de medio. Existen otros medios de cultivo selectivos con 3.12 ug/ml de polimixina B, como agente selectivo: caldo y agar triptosa fosfato. Como regla general, el agente selector debe estar relacionado a la naturaleza de la flora acompañante: la polimixina B, es muy activa sobre *Pseudomonas*, pero no lo es sobre bacterias del género *Proteus*. El ácido nalidíxico es muy activo sobre los *Proteus* pero es inactivo sobre *Pseudomonas*.

Método de enriquecimiento en frío, de Gray

La técnica de Gray⁸ de enriquecimiento en el frío, está basada en la capacidad de la *L. Monocytógenes* de desarrollar fácilmente a la temperatura de 4°C, contrariamente a otras bacterias que lo hacen difícilmente en esas condiciones. Esta técnica y sus modificaciones, permanece vigente a pesar de las críticas que puedan formularse, tales como: a) no estar fehacientemente establecido el tiempo total de conservación de un material clínico a 4°C, para ser declarado libre de listeriosis, y b) no estar fehacientemente demostrada la eficacia de la técnica. La modificación de esta técnica por Bojsen-Moller³ es, a nuestro criterio, recomendable: el material debe ser colocado en triptosa fosfato con 3.12 ug/ml de polimixina B y conservada en la heladera a 4°C. Cada semana debe hacerse un repique en agar triptosa fosfato con 3.12 ug/ml de polimixina B, durante 3 meses. Y luego, una vez al mes durante otros 3 meses. Si el último repique, al cabo de los 6 meses de la siembra inicial, fuese negativo, el material puede ser declarado libre de listeriosis.

De acuerdo a su naturaleza, los materiales clínicos pueden ser divididos en 4 grupos, a los efectos del aislamiento de *L. monocytógenes*:

1) Materiales libres de contaminación o colonización: LCR, sangre, líquidos de derrame en cavidades serosas (pleura, peritoneo, etc.). El aislamiento no ofrece dificultades. Los medios de rutina: caldo, caldo tioglicolato de sodio, agar nutritivo, agar sangre, etc., suelen ser sufi-

cientes. El LCR fue para nosotros el material más frecuente. Presenta las características del de las meningitis purulentas. La bacterioscopía fue constantemente negativa. En una sola oportunidad aislamos *L. monocytógenes* de un LCR, que presentaba las características del de las meningitis tuberculosas.

2) Tejidos (placenta, granulomas, restos fetales, etc.). Trituración de los mismos, y siembra de inóculos importantes en medios de aislamiento, en medios selectivos y de enriquecimiento en frío.

3) Pus, exudados cervicales, loquios, exudados uretrales, etc. Usar hisopos y medios de transporte. Efectuar las siembras como se indicó en el punto anterior.

4) Heces: deben sembrarse en medios selectivos y de enriquecimiento en frío. Los cultivos primarios suelen ser negativos.

Identificación de la *Listeria monocytógenes*

Las características morfológicas y culturales de *L. monocytógenes* fueron señaladas al comienzo de este relato. Las características bioquímicas de las cuatro especies del género *Listeria* están resumidas en el cuadro N° 1:

CUADRO N° 1

Características bioquímicas de las especies del género *Listeria*

	<i>L. monocytógenes</i>	<i>L. denitrificans</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>
Manitol (ácido)	—	—	+	+
NO ₃ a NO ₂	—	+	—	+
Motilidad	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Beta-hemólisis	+	—	—	—
Poder patógeno (ratón)	+	+	—	—
Kerato-conjuntivitis (conejo)	+	—	—	—

L. grayi: aislada de heces de chinchilla

L. murrayi: habitat natural: suelo y vegetales.

L. denitrificans: habitat natural: desconocido.

Desde el punto de vista práctico, el problema radica en evitar confusiones de *L. monocytógenes* con las siguientes especies: *Streptococcus*

faecalis, *Erysipelothrix rhusiopathiae* y *Corynebacterium sp.* En el cuadro N° 2 están resumidas las pruebas diferenciales entre las 4 bacterias mencionadas.

La seroaglutinación no debe faltar como prueba confirmatoria del aislamiento. El serotipo IV es el más frecuente en nuestro país como así también a escala mundial.

Poder patógeno experimental

Fue muy usado por nosotros con nuestros primeros aislamientos, cuando no disponíamos fácilmente de antisueros específicos.¹¹ Las cepas patógenas presentan ciertas características bioquímicas, las que fueron cuidadosamente estudiadas por Groves y Welshimer sobre 112 cepas aisladas de materiales clínicos y no clínicos.⁹

Para estos autores, las cepas patógenas deben reunir las siguientes características:

- a) ser beta-hemolíticas, exaltando la hemólisis por medio del CAMP test.
- b) acidificación de la rhamnosa.
- c) no acidificación de la xilosa.

Todas las cepas patógenas fueron beta-hemolíticas y acidificaron la rhamnosa. Pero no todas las acidificantes de la rhamnosa fueron patógenas. Todas las cepas no patógenas no fueron hemolíticas y acidificaron la xilosa. Pero no todas las cepas no patógenas fueron acidificantes de la xilosa. Los autores de este estudio verificaron la validez de las pruebas por inoculación al ratón por vía intraperitoneal, de una densidad bacteriana de 2.10^9 *L. monocytógenes*/ml. Las cepas consideradas patógenas fueron letales para el ratón dentro de los 5 días. Cuando los ratones sobrevivieron este período de observación, las cepas fueron consideradas no patógenas. Los citados autores encuentran una buena correlación entre las pruebas citadas y el poder patógeno sobre el ratón y preconizan las reacciones para ser usadas en estudios epidemiológicos, como screening de cepas no patógenas.

Cuando se trata de establecer el poder patógeno de una cepa aislada, sin negar el valor de estas pruebas, preferimos recurrir directamente a los animales de experimentación. Las inoculaciones, en todos los casos, deben ser hechas con cultivo de la cepa en caldo de 24 horas de incubación. Las suspensiones en solución salina no dan resultados seguros ni comparables.

CUADRO N° 2

Pruebas diferenciales entre *L. Monocytogenes* y especies afines

	Morfología	Hemólisis	Hidrólisis de la bilis esculina	Catalasa	Desarrollo en caldo ClNa . 22° C 6,5%	Motilidad
<i>L. monocytogenes</i>	Cocos y bacilos	β	+	+	+	+
<i>S. faecalis</i>	Cocos	γ, β	+	-	+	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	Bacilos	γ, β	-	+	-	-
<i>E. Rhusiopathiae</i>	Bacilos	α	-	-	-	-

Identificación serológica

Aglutinación con sueros específicos antilisteria, para serotipos I, II III, IV.

El serotipo IV, es el más frecuente.

1) *Ratón*: prueba segura y muy sensible. Para que la inoculación al ratón sea válida, deben guardarse ciertos recaudos: a) certeza de que la cepa de ratones empleada esté libre de listeriosis latente, la que podría reactivarse suministrando falsos positivos; b) son necesarias densidades bacterianas de 10^5 a 10^7 /bacterias inoculada para desarrollar la enfermedad típica, de lo contrario, se corre el riesgo de la enfermedad latente, con sobrevida prolongada, suministrando falsos negativos. Todas las cepas ensayadas por nosotros desarrollaron sepsis mortal en un tiempo variable de 12 horas a 3 días. La bacteria fue recuperada del exudado peritoneal y por hemocultivo por punción cardíaca.

2) *Conejo*: test de Anton, Julianelli y Pons, o de la keratoconjuntivitis. Se inocula el cultivo en el saco conjuntival del ojo. Se obtiene una conjuntivitis purulenta en un tiempo variable de 30 a 48 horas, con adhesión de párpados. Luego, en un tiempo variable de 4 a 7 días, desarrolla una keratitis con total opacidad de la córnea, la que comienza a desaparecer lentamente entre los 10 y 15 días. Alrededor de las 3 semanas de evolución, el animal cura totalmente sin secuelas. La keratitis es una lesión específica de la *L. monocytógenes*.

3) *Cobayo*: por inoculación en el saco conjuntival, se obtiene una keratoconjuntivitis más atenuada que la desarrollada por el conejo y con un tiempo de evolución más corto. Por inoculación intraperitoneal, desarrolla sepsis mortal, semejante a la del ratón. Cobayas y ratones hembras preñadas, inoculadas por vía intraperitoneal, abortan antes

de desarrollar sepsis mortal. La bacteria puede recuperarse al estado puro de los cuernos uterinos.

4) *Embrión de pollo* de 7-14 días: técnica nueva, preconizada como muy sensible. Los autores de la técnica aseguran que sólo son necesarias 50 unidades bacterianas para matar el embrión en 4 días.