

Listeria Monocytogenes

Asociada a

Encefalitis Lúpica*

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS · SERVICIO DE BACTERIOLOGIA

HOSPITAL PRIVADO CENTRO MEDICO DE CARACAS · SERVICIO DE BACTERIOLOGIA

Dr. José J. Gutiérrez Alfaro,
Bioanalistas Josefina Guariguata,
Inés de Rodríguez
y M. de Figueredo.

Con motivo de aislar recientemente el primer caso urbano de *Listeria monocytogenes*, a partir del líquido cefalorraquídeo de un paciente con el diagnóstico de "encefalopatía lúpica" en tratamiento desde hace un año con meticortelone, hemos creído conveniente hacer una revisión práctica del tema, insistiendo en los procedimientos, de aislamiento y diagnóstico, dedicada especialmente a los que ejercen dentro del campo de la bacteriología médica, teniendo presente los puntos siguientes:

- a) El alto grado de letalidad de la *Listeria monocytogenes* que en los EE. UU. en el lapso comprendido entre 1936 y 1966 alcanzó un 42% y que según Graber y Higgins llega hasta un 50%. (7)
- b) Al aislamiento cada vez más frecuente de la *Listeria monocytogenes* en zonas urbanas y hospitalarias. (1, 7).
- c) A la tendencia actual de incriminarla como complicación en los casos de enfermedades malignas. (15).
- d) A la escasez en la literatura y estadísticas Nacionales de casos debidos a esta bacteria de la cual hasta ahora sólo se conoce un caso bacteriológicamente bien estudiado, aislado por el Dr. Barnola D. en 1966 (2)

* Trabajo leído en las V Jornadas Venezolanas de Microbiología realizadas en Valencia del 2 al 5 de Junio de 1971.

- e) La posibilidad que existe de incluir a la *Listeria monocytogenes* en el vasto grupo de bacilos gram positivos denominados "difteroides", sin hacer previamente una identificación adecuada. (1, 3, 4, 18, 20)

Los interesados en ahondar este tema pueden consultar con provecho las magníficas monografías de: Seeliger (18), Gray y Killiger (9) y la reciente bibliografía que se cita al final de este trabajo.

MICRO HISTORIA CLINICA

Paciente CCTM - M2 45 83 57 - mujer, 22 años, soltera, estudiante de 4º año de bachillerato.

Bajo tratamiento por consulta externa con meticortelone 250 mg. diario, por lupus eritematoso diseminado.

Ingresa al hospital el 5-2-71 por presentar cuadro severo de:

Fiebre de 40°C, edema moderado, náuseas, vómitos, evacuaciones líquidas, cefalea frontal, visión doble, disminución de la audición bilateral y embotamiento.

Diagnóstico de entrada: Encefalopatía lúpica hipertensiva con paraplejía (MIS), posible ocupación de espacio--absceso-cerebral.

Al poco tiempo del ingreso entra en coma y se trata de acuerdo con los diagnósticos establecidos.

Urocultivo: + 100.000 colonias de *Proteus mirabilis*.

Escara sacra sórdida con *Pseudomonas aeruginosa*. Recibe tratamiento con Gentamicina.

El 11-2-71 se le efectúa punción lumbar, el examen del L.C.R. revela lo siguiente: Aspecto = turbio

Celulas= 288 por mm³

Proteínas= 54 mgm %

Glucosa= 21 mgm %

Cloruros= 112 meq. l.

Tinta China= No se vieron hongos

Segmentados: 73 % - Linfocitos: 27 %

Pandy=Positivo

Gram: Bacilos Gram Positivos

Cultivo = *Listeria monocytogenes*. Tipo 1b. Antibiograma = Sensible a: Cloromicetina, Colimicina, Eritromicina, Kanamicina, Penicilina, Terramicina, Kleflodin, Rifampicina, Novobiocin.

El 17-2-71, se repitió la toma de L.C.R. extremando las condiciones de asepsia y se aisló de nuevo el mismo germen.

Protocolos 378-71 y 440-71

Hematologías:

26-marzo-71=

Hematocrito: 30 %

Glóbulos Blancos: 12.800

Mielo: 2, Bastones: 4, Segmentados: 77, Linfocitos: 8, Monocitos: 9

Hemoglobina: 10,2

Plaquetas: 90

28-Marzo-71=

Glóbulos Blancos: 13.400

Segmentados: 70 Linfocitos: 30

30-marzo-71=

Glóbulos Blancos: 20.000

Segmentados: 86, Eosinofilos: 2, Linfocitos: 11, Monocitos: 1

1-abril-71=

Glóbulos Blancos: 27.000

Mielo: 2 Metamielocitos: 1, Segmentados: 95, Linfocitos: 2

1 % de Monoblastos.

5-mayo-71=

Hematocrito: 18 %

Glóbulos Blancos: 8.950

Bastones: 1, segmentados: 93, Linfocitos: 6, Monocitos: 1

Sedimentación Globular: 70 mm.

Sedimentación corregida: 22 mm.

Hemoglobina: 4,56

LISTERIA MONOCYTOGENES - Comentarios histórico-bacteriológicos:

La *Listeria monocytogenes* fue descubierta en 1926 durante una epizootia en conejos y acures, ocurrida en los Laboratorios de Cambridge, por Murray, Webb y Swann. En un comienzo se la llamó *Listerella hepatolytica*, pero al comprobarse su similitud con el *Bacterium monocytogenes*, se le designó con el nombre de *Listerella monocytogenes*.

En 1939 la Comisión Internacional de Nomenclatura encontró, que el nombre genérico de *Listerella* ya había sido utilizado en 1909 por Jahn para designar un micetozoó y en 1933 por Cushmann para especies de foraminíferos, por ello en 1940 Pirie sugirió llamarla *Listeria monocytogenes*, sin embargo algunos autores como Wilson y Miles (21) opinan debe incluirse en el género *Erysipelothrix*.

En Venezuela según Del Real (8) Gavalier en 1956 estudió 19 casos perinatales en la Maternidad Concepción Palacios de Caracas y posteriormente en 1960 relató otros 6 casos. En 1962 el mismo Del Real describió un caso en La Guaira. (8). Todos estos casos solo fueron comprobados por estudios histológicos.

El 3 de Noviembre de 1966 José Barnola D., presentó a la Academia Nacional de Medicina el primer caso rural en adulto, observado en un soldado de 21 años proveniente de Humocaro Alto, Estado Lara (2). Este caso muy bien estudiado desde el punto de vista bacteriológico fue clasificado como: tipo 1 a. (2).

Taxonomicamente se le ubica dentro de la familia de las *Corynebacteriaceae* de Lehman y Neumann, en el del género *Listeria* de Pirie que comprende cuatro especies.

En 1948, Sohler, Benazet y Piechaud aislaron de sangre de buey calentada, una bacteria que ellos designaron como *Listeria denitrificans*, que producía colonias lisas convexas (formas cortas) y colonias rugosas de centro deprimido y bordes dentados (formas largas), que al envejecerse presentan tinte amarillo. Reduce los nitratos a nitritos, hemólisis negativa en medio sólidos, y es letal para ratones por vía intraperitoneal (17). En 1966 Larsen y Seeliger (14) describieron la *Listeria grayi* que no reduce nitratos y fermenta manitol. En 1971, Welshimer y Meredith (25) describen la *Listeria murrayi* sp.n que reduce los nitratos y fermenta manitol. Las propiedades adicionales de estas especies están comprendidas en los cuadros 1 y 2.

C U A D R O 1

Comparación bioquímica de las reacciones (Welshimer y Meredith)

Reacciones	<i>L. monocytogenes</i>	Cepa V-1 <i>L. grayi</i>	<i>L. denitrificans</i>	<i>L. murrayi</i>
Catalasa	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	—	+
Rojo metilo	+	+	+	+
Reducción de nitratos	—	—	+	+
Acidificación del manitol	—	+	—	+

Thomsom y Welshimer (22) encuentran estudiando el porcentaje de moles GC del DNA de las especies de *Listeria*, que hay gran similitud entre las especies monocitogenes, grayi y murrayi, las cuales oscilan entre 37 a 39 %, existiendo en cambio una marcada diferencia con la *denitrificans* que llega hasta el 56 %.

“En el transcurso de 1969, se comunicaron en los Estados Unidos 90 casos de Listeriosis, los cuales se concentraron en los extremos de edad: 21.6% de los pacientes tenían 0-4 semanas y el 55%, más de 40 años. Una parte significativa de este último grupo es que presentaba una patología primaria, predisponiendo el apareamiento de la Listeriosis. Es posible que esta se trate de una de las enfermedades “con futuro” como lo eran la Toxoplasmosis, la Histoplasmosis y otras diversas, hace una o dos décadas”.

“Como sucede tantas veces en medicina, las divulgaciones de un cuadro nosológico raro, puede acompañarse de un aumento brusco en su frecuencia. Si hasta 1955, apenas 40 casos de Listeriosis pudieron

localizarse en la Literatura Médica Mundial, en la decada siguiente fueron descritos 1.500".

"A medida que este problema se torna motivo de mayor atención, es probable que se venga a reconocer la frecuencia con que ocurre las Listeriosis frustada o asintomática". *

* Listeriosis - United States, 1969 - Morbidity and mortality (National Communicable Disease Center) 19: 375-380, 1970.

C U A D R O 2

LISTERIA MURRAYI SP. N.

COMPARATIVO DE LAS REACCIONES DE LOS

CARBOHIDRATOS EN LAS DIFERENTES ESPECIES DE LISTERIA

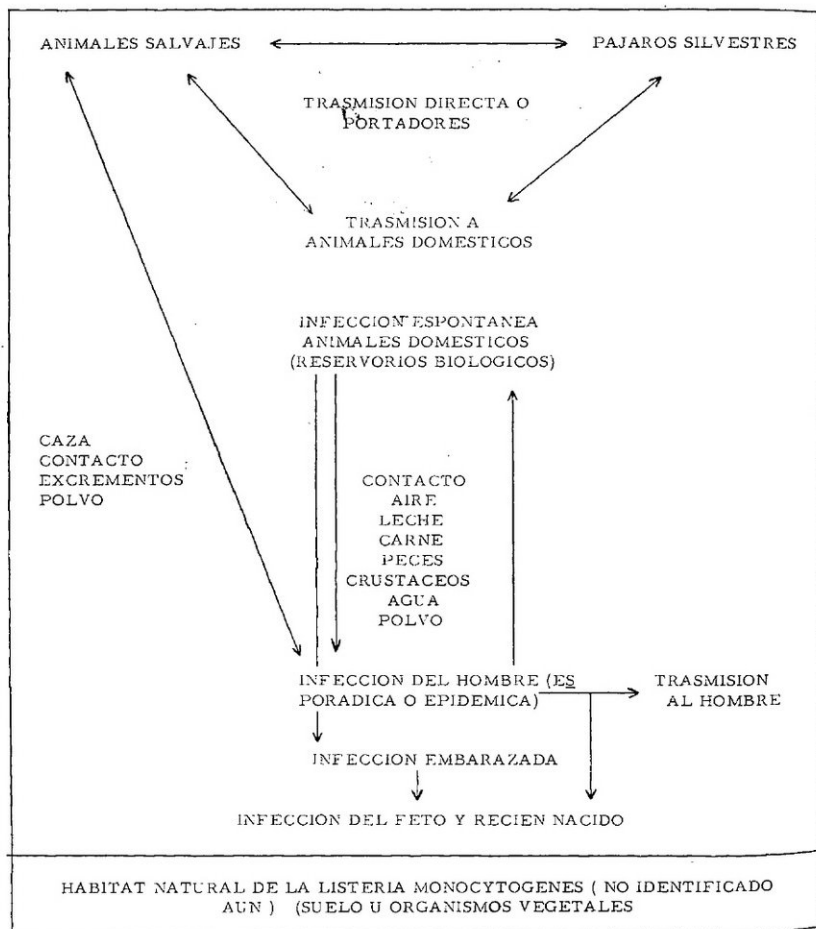
(WELSHIMER Y MEREDITH)

SUBSTRATO	L. monocytogenes	Copa V-1 y ATCC 19120	L. grayi L. murrayi (Nueve Cepas)	L. denitrificans
ADONITOL	—	—	—	—
ESCULINA	+	+	+	+
L.-ARABINOSA	—	—	—	+
AMIGDALINA	+	+	+	+ D
CELOBIOSA	+	+	+	+
DEXTRINA	+	+	+	+
DULCITOL	—	—	—	—
ERITRITOL	—	—	+	—
D-GALACTOSA	V/D	+	(72 horas)	+
GLUCOSA	+	+	+	+
GLUCOGENO	—	—	—	+
INOSITOL	—	—	—	—
INULINA	—	—	—	—

SIMBOLOS—: NO ACIDIFICAN EN 24 DIAS; +: ACIDIFICACION EN 24 A 48 HORAS; V: VARIABLE; D: ACIDIFICACION DESPUES DE VARIOS DIAS.

CUADRO 3

RESERVORIOS BIOLÓGICOS ANIMALES



SEGUN SEELIGER. MODIFICADO

C U A D R O 4

**PORCENTAJE MOLE GC DEL DNA DE ESPECIES DE LISTERIA
SEGUN S. S. THOMSON Y H. J. WELSHIMER**

L. MONOCYTOGENES	19303	38
L. MONOCYTOGENES	H D	37
L. MONOCYTOGENES 18	V 11	37
L. GRAYI	A T T C 19120	39
L. GRAYI	V 1	39
L. MURRAYI	F 6	39
L. MURRAYI	F 9	38
L. MURRAYI	F 12	39
L. DENITRIFICANS		56

C U A D R O 5

**MAMIFEROS CONOCIDOS DE SER PORTADORES DE LISTERIA
MONOCYTOGENES COMPILACION HECHA
POR GRAY Y KILLINGER**

Rumiantes Domésticos:	Animales Zoológicos:
Oveja, Chivo, Vaca, Bufalo de Agua	Chinchilla, Mono Tití, Paca, Leopardo, Coyote
Animales domésticos Monogástricos:	
Cochino, Caballo, Conejo	Rumiantes Salvajes:
Animales Domésticos:	Venado, Alce
Perro, Gato, Ardilla	
Animales de Laboratorio:	Animales Monogástricos Salvajes:
Conejo, Acure, Rata, Ratón Silvestre	Conejo, Rata Salvaje, Zorro, Ratón de Monte, Rata de Agua, Rata Almizclera, Marta, Mofeta, Arpia de Agua, Arpia Común, Coatí.
Animales de Piel:	
Hurón, Turón de Noruega, Chinchilla, Zorro, Visón	

CUADRO 6

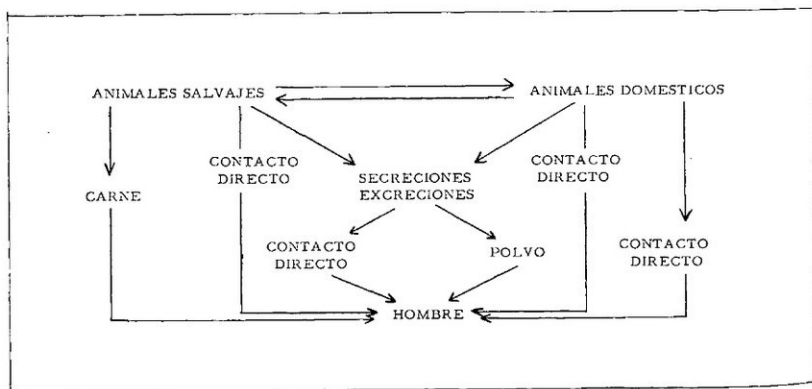
AVES CONOCIDAS COMO PORTADORAS DE LISTERIA MONOCYTOGENES

POLLOS, GANSOS, PATOS, PAVOS, PICHONES, CANARIOS,
LOROS, AGUILAS, GUACOS, GALLINAS SILVESTRES, FAISANES
BLANCOS, PERDICES, HARPANGOS, PALOMOS.

ADEMAS: VARIAS ESPECIES DE PECES Y CRUSTACEOS.

CUADRO 7

TRANSMISION DE LA LISTERIA SEGUN SEELIGER



C U A D R O 8

EFFECTOS MORBIGENOS PRODUCIDOS POR LISTERIA

- MENINGO-ENCEFALITIS:** MAS FRECUENTE EN NEONATOS Y PERSONAS SOBRE 40 AÑOS.
- SEPTICEMIA LIGERA:** SEMEJANTE A CATARROS LIGEROS EN GESTANTES CON PARTO PREMATURO O FETO NO VIABLE A TERMINO.
- SEPTICEMIA EN PERIODO PERINATAL:** USUALMENTE EN PREMATUROS.
- SEPTICEMIA EN EL ADULTO:** A MENUDO DESPUES DE OTITIS MEDIA, FARINGITIS, AMIGDALITIS O SINUSITIS.
- SINDROME MONONUCLEOSICO.**
- NEUMONIAS.**
- ENDOCARDITIS.**
- ABSCESOS LOCALIZADOS:** EXTERNOS O INTERNOS
- LESIONES CUTANEAS:** PAPULARES O PUSTULARES
- CONJUNTIVITIS.**
- ABORTO HABITUAL.**
- URETRITIS.**
- RETARDO MENTAL.**
- PSICOSIS EN EL ADULTO (*).**
-

(* EVIDENCIA SEROLOGICA UNICAMENTE

En los cuadros tomados de Seeliger a los cuales hemos agregado algunos hechos de reciente descubrimiento debemos añadir:

- 1.—La posibilidad de la transmisión de la Listeria por intermedio del *Ixodes ricinus* como lo indica Kratochvil. (17)
- 2.—La posibilidad de contagio sexual (uretritis-cervicitis). (2)
- 3.—Su aislamiento en alimentos (crustaceos, peces, pollos) y en trabajadores manipuladores de alimentos. (3)
- 4.—La posibilidad de infección por vía de las vainas de los nervios de las raíces del trigémino, citada por Borman. (2)
- 5.—El señalamiento muy reciente que han hecho Welshimer y Donker-Voet del aislamiento de Listeria en:
11 de 12 haciendas examinadas (Hanover) Virginia. (20)

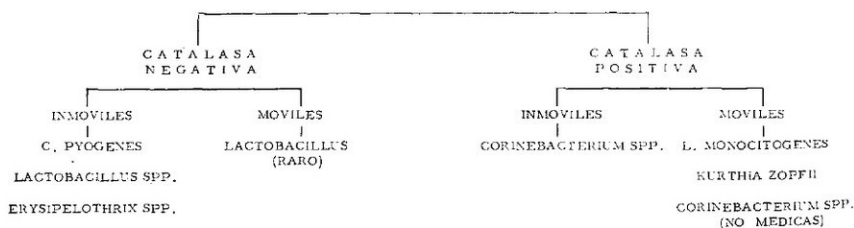
6 de 7 muestras locales urbanas (Henrico). (20)

- 6.—Meditar la expresión de los autores citados Welshimer y Donker-Voet: "La epidemiología de la *Listeria monocytogenes* nos deja perplejos y el habitat es oscuro". (20)
- 7.—En el hogar de nuestra paciente tan solo existía un loro, de aparente buena salud y el cual no ha sido posible controlar hasta ahora.
- 8.—En Venezuela la *Listeriosis* animal debe ser muy escasa pues hasta la fecha no ha sido aislada en los animales estudiados en el Instituto Superior de Investigaciones Veterinarias (Comunicación personal, Dr. Francisco Jelambi Cols, Jefe de la Sección de Bacteriología.

Watson y Lavisso (27) comprobaron estudiando la infección de las *Listeria* a nivel celular que estas pueden sobrevivir dentro de las células que la fagocitan. Las cepas virulentas poseen antígenos hemolíticos (H) y lipolíticos (L).—

C U A D R O 9

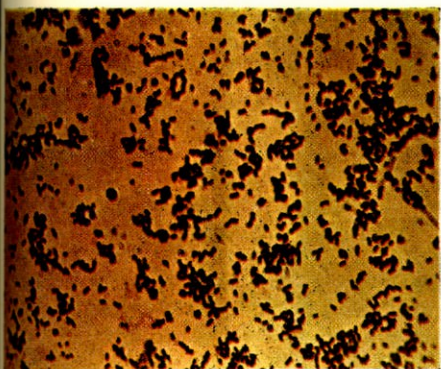
BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS NO ACIDORESISTENTES



RESUMEN DE SUS CARACTERISTICAS:

La *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, no capsulado ni esporulado, que usualmente forma como empalizadas o parejas semejantes a Diplococos. Es móvil por flagelos peritricos y cuando se le cultiva entre 18 y 20° presenta su máxima motilidad con un movimiento característico. Este puede describirse como de rotación extrínseca y luego hacia una determinada dirección dando vueltas sobre su eje mayor.

Es aerobio facultativo y crece bien en los medios de cultivo comunes en el Laboratorio. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°, pero se desarrolla bien en el amplio margen comprendido entre 25° y 42°C. Cuando se le trata de aislar en muestras contaminadas, su crecimiento es favorecido por la refrigeración previa a 4° C., durante 1 a 3 meses,



Listeria teñida por Gram



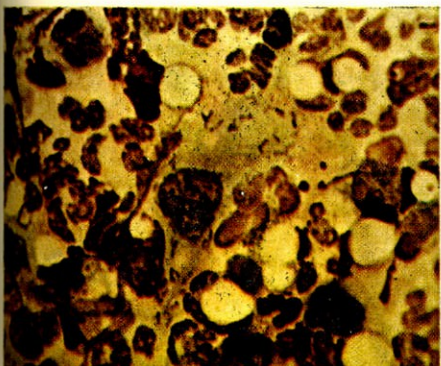
Colonias presentando la coloración azulverdosa característica, observadas en triptosa agar con iluminación oblicua



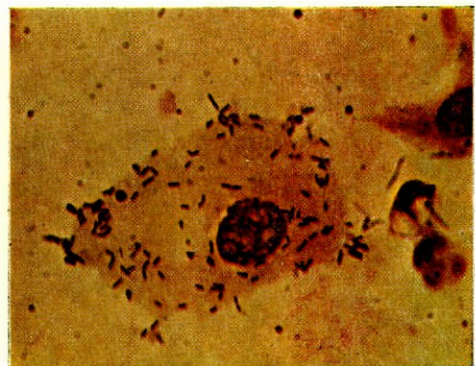
Acure antes de la instilación en el saco conjuntival de II gotas de cultivo de Listeria en caldo



El mismo acure 48 horas después de la instilación del cultivo de Listeria (Reacción de Anton)



Reacción conjuntival del acure a las 48 horas de la instilación



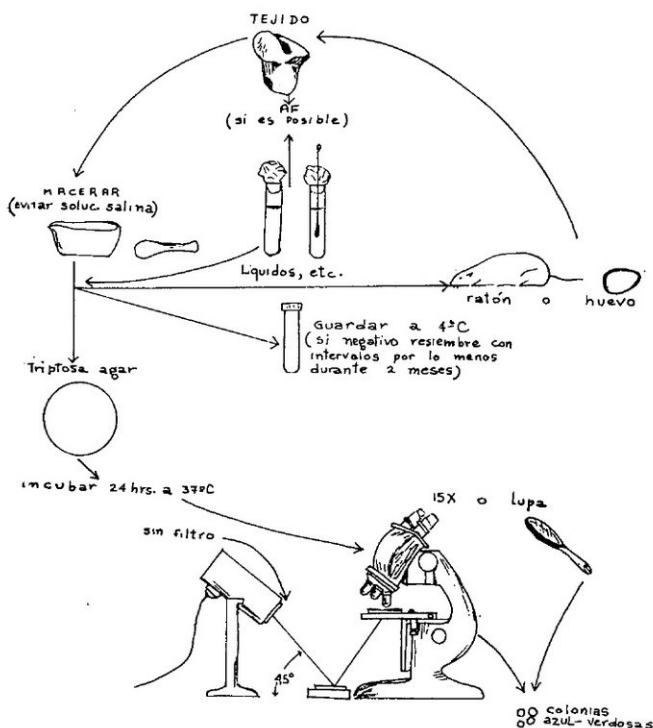
Celula mononuclear con gran cantidad de Listerias

del material a sembrar. En placas de medios especiales, sólidos y traslúcidos, los cultivos muestran colonias con una coloración azul verdosa al ser observados con iluminación oblicua. En placas de agar sangre de carnero, produce hemólisis beta en 24 horas, cuando se utiliza sangre humana o de conejo la hemólisis beta aparece tardíamente a las 48 horas. Las características útiles para la identificación de esta bacteria están comprendidas en forma completa en los cuadros Nos. 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20.

La inoculación de unas gotas de cultivo en medio líquido después de 18 a 24 horas de incubación, en el fondo del saco conjuntival de conejos y acures provocan una conjuntivitis característica (Prueba de Anton) y la inyección endovenosa en las condiciones señaladas en el cuadro No. 20 produce un aumento de los monocitos en la sangre del conejo hasta en un 40% a los 3 - 4 días.

C U A D R O 1 0

ESQUEMA PARA EL AISLAMIENTO DE LISTERIA MONOCYTOGENES



METODOLOGIA PARA EL EXAMEN DE LAS MUESTRAS

1.—Examen Directo:

1.1 Líquido cefalo raquideo:

- 1.11 Centrifugarlo a 1.500 g. por 15 minutos.
- 1.12 Decantar el líquido sobrenadadamente dejando en el tubo aproximadamente 0.4 ml.
- 1.13 Guardar el líquido decantado en refrigeradora a 4°C para siembra ulterior.
- 1.14 Hacer preparación para coloración de Gram.
- 1.15 Hacer preparación para anticuerpos fluorescentes.

Las técnicas directas de inmuno-fluorescencia presentan grandes ventajas:

- a) Rapidez del procedimiento.
- b) Diagnóstico posible con organismos no viables.
- c) Diagnóstico factible cuando los cultivos no son posibles.

1.2 Meconio:

- 1.21 Hacer examen en fresco en gota pendiente para la búsqueda de bacilos móviles con movimiento característico.
- 1.22 Hacer frotos para coloración de Gram.
- 1.23 Hacer extendidos para anticuerpos fluorescentes.

1.3 Hisopados de genitales de mujeres con abortos:

- 1.31 Hacer frotos para coloración de Gram.
- 1.32 Hacer extendidos para anticuerpos fluorescentes.

2.—Cultivo:

La *Listeria monocytogenes* es fácil de cultivar pero difícil de aislar de muestras contaminadas. Se utilizan los medios usuales especialmente agar sangre, triptosa agar (a 35°C y Co₂ 10%), caldo triptosa, Medio de Mc. Bride, Medio de Beerens con ácido nalidixico, caldo-triptosa con polimixina B, caldo con tiocianato de potasio, etc.

Es muy muy útil y recomendable la utilización del enriquecimiento en frío (Gray).

2.1 Líquido cefalo raquideo:

- 2.11 Rutinariamente inocular 0.1 ml del sedimento en cada una de dos placas de agar sangre y agar chocolate incubandolas en atmósfera de 10% de Co₂.

2.12 Cuando se investiga particularmente Listeria:

2.121 Inocular además una placa de triptosa agar para examinar colonias para iluminación oblicua (azul verdosas)

2.122 Añadir al centrifugado restante 5 ml. de caldo-triptosa y guardarlo en refrigeradora a + 4°C

De este tubo hacer pases semanales durante el primer mes y luego mensualmente a triptosa-agar, durante 3 a 4 meses.

2.2 Hemocultivo

2.21 Cuando no se sospecha Listeriosis:

Seguir una técnica depurada: limpieza extrema de la región, sembrar la sangre en medio de cultivo adecuados, dilución no menor de 1/30, cultivos seriados por lo menos 3, uno cada media hora.

2.22 Si se sospecha Listeriosis:

Uno de los frascos inoculados se guarda en la refrigeradora a 4° C

Se hacen siembras semanalmente por lo menos durante un mes.

2.3 Hisopados de órganos contaminados:

En estos casos el aislamiento es difícil. Se utilizan los medios selectivos indicados anteriormente (Beerens, Mc. Bride modificado, caldo con tiocianato de potasio, caldo con sulfato de polimixina). Todavía no existe un medio ideal para este fin.

2.31 Depositar un hisopo en tubo tapa de rosca con 5 ml. de caldo triptosa y guardarlo en la refrigeradora a 4°C.

2.32 Transfiera 0.2 ml. del caldo en el cual se depositó el hisopo a un tubo con 5ml. de caldo-triptosa-thiocianato e incúbelo a 22-25°C por 48 horas. Semanalmente durante el primer mes y luego mensualmente durante 3 a 4 meses, si no se obtiene aislamiento antes, repita el pase.

2.33 Siembre además placas de agar sangre y triptosa-agar e incúbelas por 24 a 48 horas a 35°C.

2.4 Tejidos o Heces:

2.41 Triturar con arena estéril en mortero 1 ó 2 gramos de material y añadirle 10 ml. de caldo triptosa (Tener en cuenta que se señala a la solución salina isotónica como tóxica para la listeria) ver gráfica página 105.

- 2.42 Deje sedimentar la arena y material triturado.
- 2.43 Decante la suspensión a un tubo tapa rosca estéril.
- 2.44 Lleve este tubo a refrigeración a 4°C.
- 2.45 Realice lo señalado en los apartes 2.32 y 2.33.

3.0 Diagnóstico macroscópico de las colonias:

3.1 Agar sangre:

Colonias redondas, translucidas, poco elevadas, grisáceas, de textura fina, de 0.3 a 0.5 mm. de diámetro, con estrecha zona de hemólisis beta.

- 3.2 Triptosa agar o Mc Bride utilizando iluminación oblicua (Henry) y aumento de 10 a 15 (en su defecto lupa adecuada): Colonias de coloración azul verdosa (este procedimiento es útil para descubrir las en cultivos contaminados).

4.—Movilidad

Característica: rotación con vueltas excéntricas, luego progresión en un sentido dando vueltas sobre su eje mayor. Se puede apreciar su movilidad:

4.1 En fresco:

- 4.11 Gota pendiente
- 4.12 Fondo oscuro
- 4.13 Contraste de fases

4.2 En cultivo:

- 4.21 Procedimiento de Valhne, recomendado por Seeliger, utilizando agar al 0.2-0.4% en tubo en U.
- 4.22 Agar movilidad.
- 4.23 C.T.A. con 1% de glucosa (contraste colores-amarillo sobre rojo aumentado a medida que va incrementando la expansión).

Aproximadamente a 0.5 cm. por debajo de la superficie del medio utilizado se observa un aumento del tamaño de la zona de crecimiento debido a la zona de tensión de oxígeno reducida en la cual se desarrolla mejor la *Listeria*.

5.—Pruebas Biológicas.

- 5.1 Prueba de Anton (Morris-Jullianelle): Positiva. (Descrita en el cuadro No. 20).

5.2 Prueba de la Monocitosis en el Conejo: Positiva (Descrita en el cuadro No. 20).

También los autores citados han obtenido en sus experimentos resultados que comprueban este efecto sobre la toxicidad. Las bacterias suspendidas en sol. salina presentan una acción de LD_{50} que oscila entre 3.4×10^6 a 3.2×10^7 , siendo esta en cambio de LD_{50} para suspensiones de 1.5×10^6 y 2.1×10^6 cuando se utiliza suspensiones de agua peptona al 0.5%.

5.3 Patogenicidad para los ratones:

5.31 Inyectar por vía intraperitoneal a ratones de 16 a 20 gm. de peso, 0.2 ml. de cultivo de 24 horas de *Listeria* en caldo-triptosa. Generalmente los ratones mueren en 5 días.

5.32 A la autopsia se observan focos necróticos en hígado y bazo, de los cuales puede cultivarse la *Listeria*.

5.33 Inyección endovenosa (Louria y col. 15).

5.331 Seleccionar ratones de 17 a 20 g. de peso.

5.332 Inyectar en la vena de la cola en aproximadamente 0.2 ml. de vehículo 10^6 a 10^7 de gérmenes virulentos

5.333 A las 48 horas - hacer autopsia y buscar focos necróticos en hígado y bazo.

Posteriormente hay invasión epitelial y formación de granulomas.

A los 7 días de la inoculación pueden observarse lesiones necróticas en riñón y pulmón.

6.—Embrión de pollo:

6.1 Inyectar 0.2 ml. de material por investigar en el saco vitelino de un embrión de pollo de 10 a 12 días.

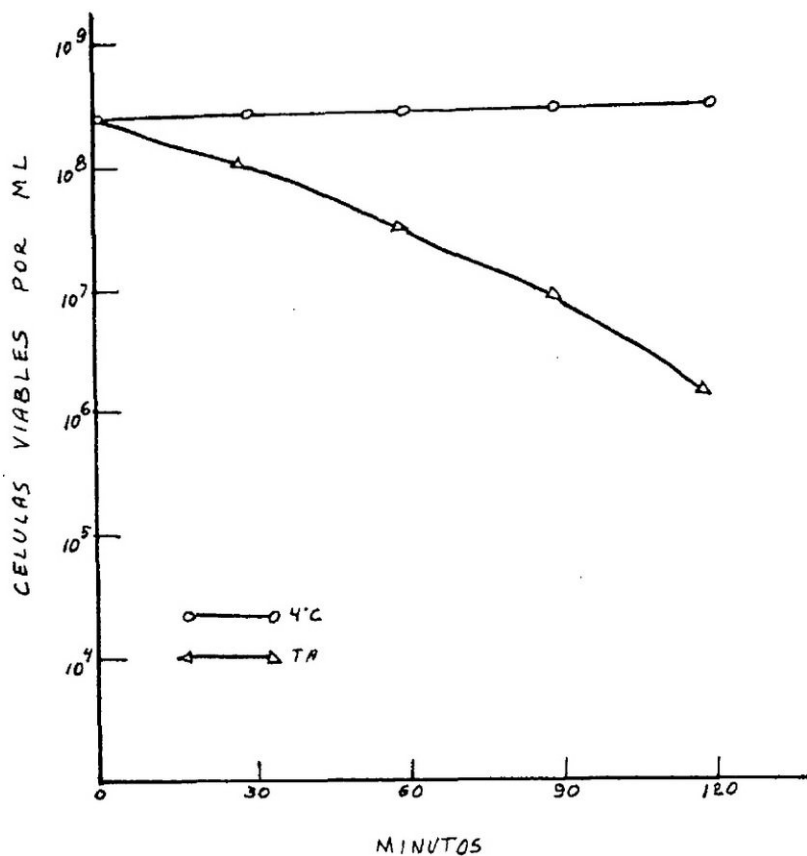
6.2 El embrión muere en 48 horas.

6.3 La *Listeria* puede cultivarse a partir de material del saco vitelino.

6.4 Este método no es utilizable en material contaminado.

En Enero de 1971 Wilkinson y Hall comprobaron la acción nociva de la sol. salina sobre la *Listeria*. A temperatura ambiente a las 120 horas hay una disminución de la viabilidad en aproximadamente 2 logs.; a temperatura de $4^{\circ}C$ este efecto no se manifiesta. (ver gráfica página 105).

CUADRO 11



Sobrevida de la *Listeria monocytogenes* en solución salina a temperatura ambiente y a 4°C.

C U A D R O 1 2

**DIFERENCIACION ABREVIADA ENTRE LOS GENEROS
PARECIDOS A LISTERIA**

	MOTILIDAD	HEMOLISINA	CATALASA	NITRATOS	ESCULINA	SALICINA	XILOSA	MANITOL
L. Monocytogenes	+	+	+	+	+	+	-	-
Erysipelothrix	+	-	-	-	-	-	+	-
Corynebacterias aerobicas	-	+	+	+	-	-	-	+
Streptococcus grupo D	+	+	+	-		+	+	-
Kurthia	+	+	-		+	+		-

C U A D R O 1 3

**CARACTERISTICAS DIFERENCIALES ENTRE
LISTERIA Y ERYSIPELOTHRIX**

	LISTERIA	ERYSIPELOTHRIX
CATALASA	+	-
MOVILIDAD	+	-
ACETOINA	+	-
CULTIVO A 4 C	+	-
ESCULINA	+	-

C U A D R O 1 4

CUADRO DIFERENCIAL PARA LISTERIA Y ERYSIPELOTHRIX

SEGUN E. O. KING (1.966) N. C. D. C.

	Listeria Monocytogenes	Erysipelothrix
G R A M	+	+
Morfología	Bacilos Pequeños Regulares en Empa- lizada	Bacilos Delgados y largos en Cadenas
O^o Requerimiento	Aerobica	Prefiere Co₂
Glucosa Gas	—	—
Oxidativa o Fermentativa	F'	
Glucosa	+	+
Xilosa	—	—
Manitol	—	
Sacarosa	L	
Maltosa	+	
Glucosa 10 %	A	
Lactosa (Bisel)	A	
Catalasa	+	—
Oxidasa	—	—
Hemolisis	Beta	Alfa, Ocasional- mente Beta
Infusión (Bisel)	Disgonico	Disgonico

C U A D R O 1 5

**CUADRO DIFERENCIAL PARA LISTERIA Y ERYSIPELOTHRIX
SEGUN E. O. KING (1966) N. C. D. C.**

		Listeria monocytogenes	Erysipelothrix
Crecimiento	Caldo Nutritivo	+	No crece
	Mac Conkey	—	—(*)
	S. S Agar	—	—
	Citrato	—	—
	Cetrimida	—	—
Urea		—	—
Nitrato		—	—
Indol		—	—
H ₂ S	TSI	(TACO)	—
		(PAPEL)	+
MR - VP		+	No crece
Gelatina		—	—*
Leche Tornasolada		Ligeramente Rosado	Acido Debil
Movilidad		+	—
Pigmento (no soluble en Agua)		—	—
Agua - Soluble		—	—
Crecimiento a: 25°C		+	Debil
37°C		+	+
42°C		+	—

(°) Crecimiento en Cepillo por Punción a 25°C.

CUADRO 16

TABLA DIFERENCIAL PARA LISTERIA, CORYNEBACTERIUM,
Y KURTHIA SEGUN S.T. COWAN Y K.J. STEEL (1.965)

	LISTERIA	C. DIPHTERIAE V. GRAVIS	C. DIPHTERIAE V. MITIS	C. DIPHTERIAE V. INTERMEDIUS	C. ULCERANS	C. XEROSIS	C. MIRIUM	C. RENALE	C. OVIS	C. BOVIS	C. EQUI	C. HOFMANNII	C. HAEMOLYTICUM	C. PYOGENES	KURTHIA SPP.
CATALASA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
MOBILIDAD	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ARGININA HIDROLISIS		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
GELATINA LICUEFACCION	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d
GLUCOSA (ACIDO)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
LACTOSA (ACIDO)	d	-	-	-	-	-	-	d	d	-	-	-	+	+	-
MALTOSA (ACIDO)	+	+	+	+	d	+	+	d	+	-	-	-	+	+	-
SACAROSA (ACIDO)	d	-	-	-	-	+	+	-	d	+	-	-	+	d	-
TREHALOSA (ACIDO)	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ALMIDON (ACIDO)	d	+	-	-	+	-	+	d	+	-	-	-	d	+	-
SALICINA (ACIDO)	+	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-
NITRATO REDUCCION	-	+	+	+	-	+	+	+	d	-	+	+	-	-	-
UREA	-	-	-	-	+	-	d	+	+	-	+	+	-	-	-
PIGMENTO ROSADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
HEMOLISIS	+	-	+	-	+	-	-	d	d	-	-	-	+	+	-

C U A D R O 17
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA LISTERIA
MONOCYTOGENES SEGUN WETZLER Y SONNEWIRTH

REACCIONES	L. MONOCYTOGENES	REACCIONES	L. MONOCYTOGENES
Catalasa (3 % H ₂ O ₂)	+	Fermentación anaeróbica (2)	
Movilidad (1)		Glucosa	+
a 8°C	+ (6 a 14 Días)	Celobiosa (3)	+
a 20°C	+ (1 a 3 Días)	Lactosa	+
a 35°C	+ (1 a 3 Días)	Maltosa	+
O-F (Hugh-Leifson)	F	Manitol (3)	—
Fosfatasa Alcalina	+	Rafinosa (3)	—
Reducción de Nitratos	—	Sacarosa	±
Hemolisis	+ (13 % —)	Salicina	+
Rojo Metilo	+	Trehalosa	+
Ureasa	—		

1. Medio-Movilidad (DIFCO GI) a 2 ml. de medio en tubos de Kahn se inocula con alambre poco cargado hasta 1 cm. en profundidad.
2. Caldo Púrpura DIFCO con 10% de Carbohidratos.
3. Carbohidratos esterilizados por filtración.

F = Fermentativo.

CUADRO 18

SUMARIO DE LAS CARACTERISTICAS DE LISTERIA
MONOCYTOGENES SEGUN GRAY Y WETZLER

+ 48 Horas a 35°C	+ 3 a 14 Días	ACIDIFICACION SIN GAS	
		Variable algunas	+ otras -
			Negativo a los 14 Días
Celobiosa (*)	Dextrina	Melzitosa	Manitol (*)
Glucosa (*)	Glicerol	Rhamnosa	Rafinosa (*)
Levulosa (*)	Lactosa	Sacarosa	Adonitol
Salicina (*)	Maltosa	Sorbitol	Arabinosa
Trehalosa (*)		Xilosa	Dulcitol
Amígdalina			Eritrol
Esculina			Inulina
Galactosa			Melibiosa
Manosa			Sorbosa

(*) Fundamental para su Clasificación.

C U A D R O 19
PROPIEDADES BIOQUIMICAS

No Reduce Nitratos (*)	No licua gelatina ni el suero coagulado.
Indol: negativo	
H ₂ S Negativo	Fosfatasa alcalina: positiva (*)
Catalasa: Positiva (*)	Almidón y Urea: no Hidrolisis
Voges Proskauer: Positivo	Hemolisis: Beta moderada o ausente, puede depender de especie de sangre, translúcida cuando existe.
Rojo Metilo: Positivo (puede depender de la clase de peptonas utilizadas) (*)	No crece en Citrato ni Malonato.
Leche tornasolada: lentamente acidificada, decolorada, no coagulada; leche con Bromocresol púrpura: acidez neta.	Arginina, Lisina y Ornitina Decarboxilasa: Negativas.
	Aerobico y Anaerobico Facultativo.

C U A D R O 20
OTRAS CARACTERISTICAS

1º Móvil a Temperatura ambiente 18 a 22°C. Pero no usualmente a 37°C.	3º Produce mononucleosis en el conejo: inyectar por vía endovenosa a un conejo de talla mediana, 0.5 ml. de suspensión de cultivo de 18 a 24 horas estandarizado con el patrón No. 1 de Mac. Farland. Se observa mononucleosis de 30% o más en 4 a 5 días.
2º Conjuntivitis (Prueba de Anton) en conejos o acures. Suspender el cultivo de 18 a 24 horas en tubos de Triptosa inclinada en 5 ml. de agua destilada: depositar II a III gotas dentro del saco conjuntival. (*)	

(*) Fundamental para su clasificación.

COMPOSICION ANTIGENICA Y CLASIFICACION SEROLOGICA

La tipificación serológica se hace por la investigación de los diferentes antígenos O y H como se muestra en el cuadro No. 21. En el cuadro se citan 11 serotipos agrupados en cuadro grandes grupos: 1a, 1b, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 4c, 4ab, 4d, 4e.

Nuestras cepas 378-71 y 440-71 han sido clasificadas por nosotros como pertenecientes al grupo 1. Hemos remitido al N.C.D.C. Atlanta, Georgia, U.S.A. muestras de ellas para la confirmación de la clasificación y determinación del serotipo (1a. ó 1b.); resultando 1b. Este serotipo tiene los antígenos O I, II, (III) y flagelares A, B y C. (*).

Recientemente (1971) Janette Donker Voet (20) ha descrito una cepa aislada por Larsen en Copenhague con un nuevo antígeno somático que designó como "O XV". Posteriormente éste fue comprobado en 17 cepas aisladas en los EE. UU.

Para la tipificación serológica de las Listerias es necesario remitir las cepas a centros especializados.

La casa Difco prepara antisueros para A.F. y aglutinación polivalente y para los tipos I y IV (los más frecuentes en EE. UU.)

Cuando se utiliza impresiones de tejido para anticuerpos fluorescentes es aconsejable la utilización de una coloración de fondo (Eveland). La casa Difco recomienda el uso de Bacto-Eriochrome Black, que es un chelato normalizado Eriochromo.

(*) Agradecemos al Dr. Wallis L. Jones, del N.C.D.C. la clasificación del serotipo de nuestra cepa.

C U A D R O 2 1

ESTRUCTURA ANTIGENICA DE LA LISTERIA MONOCYTOGENES

SEROTIPOS	FACTORES O	FACTORES H	ANTIGENOS PARA ABSORBER	FACTOR (ES) ESPECIFICOS
1a	I, II, (III)*	A, B	TIPO 3 O	I
1b	I, II, (III)	A, B, C	TIPO 1a H	C
2	I, II, (III)	B, D	TIPO 1 H	D
3a	II, (III), IV	A, B	TIPO 1 o 2 O	IV
3b	II, (III), IV	A, B, C	TIPO 1a H	C
4a	(III), (V), VII, IX	A, B, C	TIPO 4c O	IX
4b	(III), V, VI	A, B, C	TIPO 4a O	VI
4c	(III), V, VII	A, B, C	TIPO 4b O	VII
4ab	(III), V, VI, VII, IX	A, B, C	TIPO 4c O	VI, IX,
4d	(III), VI, VIII	A, B, C	TIPO 4b O	VIII
4e	(III), V, VI, VIII, IX	A, B, C	TIPO 3 O	V, VI, VIII, IX

(*) Los factores incluidos entre paréntesis ocurren irregularmente.

R E S U M E N

- 1.—Se presenta el primer caso de Listeriosis humana en adulto aparentemente adquirido en la zona metropolitana de Caracas, con enfermedad crónica (Lupus eritematoso) y bajo tratamiento con corticoides desde hace un año, condiciones éstas que actualmente se describen como causas predisponentes importantes en la epidemiología de la Listeriosis.
- 2.—No ha sido posible, hasta el momento establecer la puerta de entrada del germen.
- 3.—Se llama la atención de la poca frecuencia con que la Listeriosis humana ha sido señalada en Venezuela.
- 4.—Pensamos que si tal vez se identificaran mejor el grupo de Bacilos Gram positivos denominados "Difteroides" posiblemente habrían más aislamientos especialmente si ellos lo son de: casos neonatales, líquido céfalo raquídeo, secreciones uterinas, etc., etc.
- 5.—Hacemos una actualización de los procedimientos y métodos de diagnóstico en la esperanza de ser útil a los que ejercen la bacteriología médica y veterinaria.
- 6.—Consideramos de mucho interés repetir las palabras de Moody y Cherry, citadas por Busch (3): "Todo bacilo Gram positivo, uniformemente teñido, semejantes a un difterioide, que es móvil, produce hemólisis beta en agar sangre y ha sido aislado de sangre, líquido céfalo-raquídeo, u otros tejidos, es casi seguro sea una *Listeria monocytogenes*".
- 7.—Se presenta el primer aislamiento en Venezuela de *Listeria monocytogenes* tipo 1b..

COMPOSICION DE ALGUNOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL AISLAMIENTO DE LISTERIAS

CALDO TIOCIANATO

Tiocianato de potasio	37.5 g.
Triptosa o Biosate	20.0 g.
Dextrosa	2.0 g.
Cloruro de Sodio	5.0 g.
Fosfato disódico	2.5 g.
Agua destilada	1.000.0 ml.

AGAR SANGRE CON ACIDO NALIDIXICO (BEERENS)

Extracto de carne	3.0 g.
Triptosa (Difco)	10.0 g.
Cloruro de sodio	5.0 g.
Acido nalidixico	0.04 g.
Agar en polvo	15.0 g.
Agua destilada	1.000.0 ml.

Es posible también agregarle a 20 ml. de agar base estéril, antes de añadirle la sangre, 1 ml. de una solución de ácido nalidixico al 0.08 g. por ciento.

MEDIO DE Mc. BRIDE (MODIFICADO)

Phenyl ethanol agar (Difco)	35.5 g.
Glicina	10.0 g.
Cloruro de Litio	0.5 g.
Agua destilada	1.000.0 ml.

Esterilizar 20' a 121°C.

Si se va a sembrar material muy contaminado se puede añadir 200 mcg. de (actidiona) por ml.

CALDO CON SULFATO DE POLIMIXINA B.

Utilice caldo triptosa que contenga 25 U. (3.12 mcg.) de sulfato de Polimixina B por ml.

Mantenga los hisopos, tejidos, etc., en este caldo.

Proceda como para un enriquecimiento en frío.

Haga pases del caldo a placas de triptosa-agar que contengan 25 U de polimixina B. por ml. de medio.

SOLUCION BUFFER-FOSFATO CON PEPTONA Y TRIPSINA O PEPSINA (SEGUN WILKINSON Y HALL, 1971).

Estos autores recomiendan estas soluciones en cantidades de 1 ml. en tubos de Kahn para utilizarlos en la siembra de pequeños fragmentos de tejidos triturados. Incubarlos a 37°C por 24 horas con agitaciones periódicas del contenido.

Peptona	0 5 %
Tripsina (Difco certificada 1:250)	0.25 %
Solución-buffer-fosfato pH 7.2	C.S.
Pepsina (National Biochemicals Corp.)	2 %
Solución-buffer fosfato pH 7.2	C.S.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—AUBERTIN JEAN.—Listeriosis Humaines, 1967. Progress en Pathologie Infectieuse-Vic-Dupont-Editions Medical Flammarion. Págs. 178-198.
- 2.—BARNOLA D. JOSE, SALAS RAFAEL.—1971. Meningitis por Listeria Monocytogenes. Boletín Médico Hospital Central de las Fuerzas Armadas de Venezuela. Vol. II N° 1.
- 3.—BUSCH L. A.—Human Listeriosis in the United States, 1967-1969; 1971 Jour, of Inf. Dis 123 págs. 320 y sigts.
- 4.—BUTTIAUX R., BEERENS H., TACQUET A.—Mannuel de Technicques Bacteriologiques 1969. Edt. Medical Flammarion.

- 5.—EVELAND W. C., BAUBLIS J. V.—1966. Two cases reports of the Association of Human and canine listeriosis -III- Simposio Internacional de Listerias-Bilthoven, Holanda.
- 6.—COWAN ST., STEEL K. J.—Identification of Medical Bacterias-Cambridge University Press 1965.
- 7.—GRABER CH., HIGGINS L., DANIS G.—1965. Seldon Ecoutered Agents of Bacterial meningitis 1965, Jama Vol. 192-págs. 111, 114, 118.
- 8.—DEL REAL E. A.—1962. Bol. Soc. Med. Centro S. S. O. Caracas, 2-49.
- 9.—GRAY KILLINGER A. H.—1966. Listeria Monocytogenes and listerie infections. Bacteriological Reviews. Vol. 30 No. 2-309-383.
- 10.—GRAY M. L.—1963. Epidemiological aspects of Listeriosis-A.J.P.H. Vol. 53 N° 4, págs. 554-563.
- 11.—KILLINGER A.—Listeria monocytogenes, 1970. Manual of Clinical Microbiology American Society for Microbiology págs. 95-100.
- 12.—HOOD M.—Listeria infections 1970. Diagnostic Procedures. American Public Health Association. Inc.
- 13.—LAPEYSONNIE. D. L.—Listeria et Listeriosis-Donnees Récents de biologie et d"epidemiologie 1959. Biologie Medical XLVIII-2-99-109.
- 14.—LARSEN H. E., SEELIGER H. P. R.—A manitol fermenting Listeria strain. Third International Symposium on Listeriosis, 1966. Bilthoven, Holanda.
- 15.—LOURIA D. B. HENDE T., ARMSSTORY D., COLLINS H. S., BLENUS A., KREYMAN D., BUSE M.—Listeriosis Complicating Malignat Disease: a new association, 1967 Am Jou Int. Medi-67-2-261-281.
- 16.—MEDOFF G., KUNZ L. J., WERNBEY A.—Listeriosis in human. An Evaluation -1971 Jour of Infec. Dis.-123-3; Mayo 1971 pág. 247 y sigts.
- 17.—PREVOT, A. R. Traité de Systématique Bactérienne, Tomo 2, págs. 502, Dunod, Paris 1961.
- 18.—PIATKIN K.—1968 Microbiología. Editorial MIR, Moscú págs. 486-490.
- 19.—SEELIGER H. P. R.—Listeriosis 1961, Hafner Publishing Comp. INC, N. Y.
- 20.—SEGMAND O. H.—The Merck Veterinary Manual 1967, págs. 1122-1125.
- 21.—SONNEWIRTH, A. y GRAY M. L.—1970, Listeria-Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, Vol. 2, 1202-1209.
- 22.—THOMSON S. S. y WELSHIMER H. J.—Deoxyribonucleic Acid Homologies Among Listeria Species. 71 st. Annual Meeting American Society for Microbiology-Minneapolis, 2-7 Mayo de 1971.
- 23.—TOPLEY, WILSON, MILES.—Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Inmunity, 4 Et. 1955.
- 24.—B. B. WATSON y J. C. LAVIZZO.—"Efects of Listeria monocytogenes and its Extracellular Antigens on Cultured Macrophages". 71 Anual Meeting American Society for Microbiology, Minneapolis, 2-7 de Mayo de 1971.
- 25.—WELSHIMER, H. J. y MEREDITH A. L.—Listeria murrayi sp. n.: a Nitrate-Reducing Mannitol-Fermenting Listeria. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 21, N° 1, Enero de 1971, pág. 3-7.
- 26.—WELSHIMER, H. J., DONKER-VOET J.—Listeria monocytogenes in Nature. Appl. Microbiology, March, 1971, págs. 516-519.
- 27.—WILKINSON, T. R. y HALL ELIZABETH R.—Survival of Listeria monocytogenes in Experimentally infectad mice. Appl. Microbiology, Enero de 1971, pág. 108-11.
- 28.—WILKINSON T. R. y HALL ELIZABETH R.—Rapid method for insolation of Listeria monocytogenes from experimentally infectad mice. Appl. Microbiology, Enero 1971, pág. 112-118.
- 29.—WOOD DOROTHY.—Isolation of Listeria monocytogenes. Isolation Methods for Microbiologists. Academic Pres. 1969, págs. 64-69.