

AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* EN CASOS DE ENCEFALITIS OVINA, POR INOCULACION EN RATON

*Por M. Fernández Díez,
P. Cármenes Díez,
J. M. Aller Gancedo y
M. Alvarez Martínez*

INTRODUCCION

El aislamiento de *Listeria monocytogenes*, mediante siembras en diversos medios, a partir de muestras procedentes de animales con infección septicémica o de fetos abortados, no presenta ninguna dificultad. Sin embargo, en casos de listeriosis encefalítica tiene mayores inconvenientes, pues no siempre se obtienen resultados favorables en las primeras siembras a partir del tejido nervioso.

Desde hace ya unas tres décadas, la presencia de un posible factor inhibitorio en el cerebro, así como en otros tejidos y líquidos corporales, ha sido señalada, siendo soslayado mediante el mantenimiento de los macerados nerviosos a 4°C². Durante esta conservación, el crecimiento de bacterias contaminantes puede dificultar notablemente el aislamiento del germen en las sucesivas y periódicas siembras; a este respecto, se ha tratado de incorporar a las suspensiones tisulares y a los medios de cultivo diversas sustancias inhibitorias.

En un estudio previo, se dio cuenta del diagnóstico de un foco de aborto infeccioso ovino por listerias en la provincia de León¹. Como cabría esperar, el agente fue aislado a las 24-48 horas de todos los órganos fetales sembrados, utilizándose un medio de agar con triptosa y 5 % de sangre ovina.

En el presente trabajo, hacemos referencia al diagnóstico de un foco de encefalitis listérica ovina, ocurrido durante el mes de febrero de 1979 en un rebaño de la Estación Agrícola Experimental de León, que fue confirmado etiológicamente en un plazo relativamente corto mediante la inoculación en ratón, sin haberse logrado comprobar la presencia del agente por el procedimiento cultural.

An. Fac. Vet. León, 1978, 24, 73-77.

MATERIAL Y METODOS

Muestras:

Se recibieron tres cabezas ovinas en el laboratorio de esta cátedra, procedentes de un rebaño de 160 cabezas de la Estación Agrícola Experimental de León. En un plazo de ocho días aparecieron siete animales enfermos con trastornos nerviosos, siendo aguda la evolución del proceso, de unos 3-4 días de duración.

Los animales afectados fueron un morueco de cuatro años y seis hembras de edades variables, desde una cordera de cuatro meses a una oveja de 10 años, teniendo las cuatro restantes de 2 a 2,5 años; estas cuatro últimas se encontraban en el quinto mes de gestación.

El rebaño es explotado en régimen intensivo, recibiendo una alimentación principalmente a base de ensilado de maíz. El primer enfermo apareció el día 5 de febrero y el último el día 12, tres días después de haber sido suprimido el ensilado ante la firme sospecha de una infección por listerias. Varios enfermos, entre ellos los analizados, fueron tratados precozmente tras la observación de los primeros síntomas, con oxitetraciclina y corticoides a dosis elevadas, sin resultado favorable.

Medios:

Tras la apertura de las cavidades craneales se extrajeron los encéfalos, de los que pequeñas porciones fueron macerados en mortero con caldo nutritivo. La concentración tisular final fue aproximadamente del 10 % para el primer macerado y del 50 % para los dos restantes.

Después de una ligera centrifugación, a 800 r.p.m. durante cinco minutos, se sembró del sobrenadante próximo al sedimento en placas de agar con triptosa y 5 % de sangre ovina. Paralelamente, se inocularon ratones blancos NMRI, de 25-30 g, por vía intraperitoneal, con 1 ml del macerado tomado del mismo lugar. Los macerados fueron llevados a continuación al refrigerador para posteriores siembras.

De los órganos de los ratones muertos, se sembró en el mismo medio referido anteriormente.

Con los cultivos obtenidos se verificó la identificación serológica, por el método de aglutinación en tubo, frente a los antisueros de *Listeria* tipos 1 y 4.

El medio de cultivo y los antisueros fueron de la casa Difco.

RESULTADOS Y DISCUSION

A partir del primer macerado encefálico no se consiguió aislar las listerias en el cultivo primario, ni tampoco se observó alteración alguna en los ratones inoculados durante los quince días que se mantuvieron en observación.

Con los dos restantes macerados tampoco se logró el aislamiento del germen en las primeras siembras, pero todos los ratones inoculados murieron a los tres días, presentando múltiples foquitos necróticos en hígado, bazo y riñones, principalmente. De dichos órganos fue aislado el germen en cultivo puro a las 24 horas.

En la identificación serológica se obtuvo aglutinación al 1/1.280 frente al antisuero tipo 4 con las dos cepas aisladas. En nuestra provincia, habíamos aislado este mismo serotipo a partir de dos fetos ovinos¹.

El hecho de no haberse logrado la infección de los ratones con el primer inóculo pudiera haberse debido a que la suspensión encefálica fue menos concentrada y, consecuentemente, la cantidad de listerias presentes pudo ser insuficiente para determinar la enfermedad y muerte de los ratones. Ha sido constatado que los ratones inoculados con material que contiene solamente unos pocos organismos no llegan a desarrollar signos clínicos inherentes a una infección activa. SEELIGER y PLAB (cit. por GRAY y KILLINGER²) señalaron que se requería la presencia de $4,6 \times 10^6$ organismos en la muestra para que se establezca la infección activa, por vía intraperitoneal, ya que con cifras inferiores se determinan infecciones crónicas o inaparentes.

En un esfuerzo para obviar las dificultades del aislamiento de *L. monocytogenes* en medios artificiales, que por lo menos en las primeras siembras pueden conducir a resultados negativos, inhabilitando el establecimiento de un diagnóstico suficientemente precoz, diversos investigadores han sugerido el procedimiento de la inoculación en ratón u otros animales de laboratorio con el material sospechoso. GRAY y KILLINGER², en una amplia revisión sobre listeriosis, dicen que ha sido un procedimiento prósperamente utilizado durante muchos años en la Unión Soviética, pero que no ha sido aceptado ampliamente en la Europa Occidental y Estados Unidos.

A falta de una adecuada casuística, hemos de señalar que, al menos en esta ocasión, el llamado «método biológico» superó en rendimiento al método cultural, logrando confirmarse por inoculación en ratón el presuntivo diagnóstico clínico de listeriosis, en el plazo relativamente corto de cuatro días. Posiblemente, la preparación de una suspensión encefálica mucho más concentrada que en el primer caso favoreció la obtención de resultados positivos en los otros dos.

Como previamente hemos citado, a partir de los cultivos no se llegó al aislamiento de las listerias en las primeras siembras con el material fresco. Tampoco se lograron aislar en las sucesivas y periódicas siembras efectuadas con los macerados mantenidos en refrigeración.

En nuestro país, MORENO GARCÍA⁴ no obtuvo aislamiento de listerias, en los cultivos primarios, en dos de los ocho focos de encefalitis ovina, caprina o bovina estudiados, aunque refiere haberlo obtenido después de un período de 2-3 semanas de refrigeración.

Nosotros obtuvimos cultivos enormemente contaminados tras la refrigeración, lo que sin duda debió influir claramente en la imposibilidad de obtener resultados positivos, ya que tras la conservación de las muestras por el frío parece lograrse regularmente el aislamiento de listerias en un plazo más o menos dilatado. Es indudable que durante la preparación de los macerados pueden resultar algo contaminados, pero nos ha sorprendido la importante multiplicación de las bacterias contaminantes a 4.°C; la gran riqueza orgánica de los macerados pudo contribuir a ello.

La contaminación de los macerados no ha debido ser cosa infrecuente, pues diversos investigadores han intentado desarrollar medios selectivos satisfactorios para el aislamiento de las listerias. GRAY y col. (cit. por GRAY y KILLINGER²) sugirieron inocular el material contaminado en caldo nutritivo con 0,05 % de telurito potásico, haciendo un precultivo de 6-8 horas y resembrando después en agar con triptosa sin o con el 0,05 % de telurito potásico. No obstante, se le ha achacado a este proceder el grave inconveniente de determinar la inhibición de muchas cepas de listeria.

McBRIDE y GIRARD (cit. por GRAY y KILLINGER²) desarrollaron un método consistente en un previo enriquecimiento en caldo con triptosa y fosfato, adicionado de nitrofurazona en una concentración final del 1/100.000, haciendo una incubación de 48 horas seguida de un cultivo posterior de otras 24-48 horas en un medio selectivo, a base de agar con triptosa y feniletanol más 0,05 % de cloruro de litio y 1 % de glicina.

KAMPELMACHER (cit. por GRAY y KILLINGER²) utilizó la adición de 0,05 % de telurito potásico y 0,2 mg de cloranfenicol por 100 ml a un medio de agar con extracto de carne.

SHOW y BELLHOUSE⁵ comunicaron que la incubación en frío favorecía el aislamiento, utilizando caldo y agar de Kramer y Jones con ácido nalidíxico y acetato de talio.

La elección de determinadas zonas del sistema nervioso central para la preparación de los macerados puede resultar interesante, ya que ha sido señalada una marcada tendencia del germen a localizarse en la médula oblongada². JULIÁN³ señaló que frecuentemente obtenía el organismo en los cultivos originales, partiendo de triturados de médula y cordón cervical superior que mantenía en caldo dextrosa y refrigeración para repetidos cultivos.

A la vista de nuestros resultados, en el diagnóstico de la forma encefálica de listeriosis parece aconsejable no omitir la incorporación de sustancias inhibidoras de posibles bacterias contaminantes a los macerados encefálicos. Igualmente, además de las siembras se realizará la inoculación de ratones, por vía intraperitoneal, con macerados de alta concentración tisular, para favorecer el desarrollo de una infección activa que permita el rápido aislamiento del agente y consiguiente diagnóstico del proceso.

RESUMEN

Durante el mes de febrero de 1979, un foco de encefalitis ovina debido a listerias fue diagnosticado en un rebaño de la Estación Agrícola Experimental de León. El proceso afectó a siete animales del efectivo (4 %) en un plazo de ocho días. Los animales fueron de diferentes edades y sexo. La alimentación consistía principalmente en un ensilado de maíz, cesando la aparición de nuevos casos a los tres días de haberse suprimido.

La confirmación etiológica del proceso se obtuvo por aislamiento del agente, mediante inoculación intraperitoneal en ratón del macerado encefálico fresco. En esta ocasión no se consiguió el aislamiento por cultivo, ni en las primeras siembras de macerado fresco ni en las ulteriores del refrigerado, resultando éste enormemente contaminado.

Se aisló *Listeria monocytogenes* serotipo 4, que parece ser el más frecuente en nuestro país por el momento.

SUMMARY

During the month of February of 1979 we diagnosed ovine encephalitis due to *Listeria*. The process affected to seven animals (4 % of the flock) of different age and sex, appearing all cases within eight days. The feeding of the flock consisted mainly of corn silage. There was not any new case three days after the removal of the silage from the diet.

The etiology of this process was confirmed by isolating the microbial agent by mouse intraperitoneal inoculation of fresh encephalic macerate. We could not isolate *L. monocytogenes* in culture neither from the fresh macerate nor from the refrigerated material, which on the other hand showed a great contamination. The serological studies did allow the identification of the serotype 4 of *L. monocytogenes*, which seems to be the most common one in our country.

BIBLIOGRAFIA

- 1) FERNÁNDEZ Díez, M., ROJO VÁZQUEZ, J. y ALLER GANCEDO, J. M. (1977).—Sobre un foco de aborto listérico ovino en la provincia de León. *An. Fac. Vet. León*, **23**: 57-63.
- 2) GRAY, M. L. y KILLINGER, A. H. (1966).—*Listeria monocytogenes* and listeria infections. *Bact. Rev.*, **30**: 309-382.
- 3) JULIÁN, B. J. (1975).—Isolating *Listeria monocytogenes*. *Vet. Rec.*, **96**: 411.
- 4) MORENO GARCÍA, B. (1974).—Listeriosis en rumiantes: aspectos epidemiológicos y relación con la higiene de los alimentos. *An. Fac. Vet. León*, **20**: 207-224.
- 5) SHAW, W. B. y BELLHOUSE, R. (1975).—Isolating *Listeria monocytogenes*. *Vet. Rec.*, **96**: 493-494.