

37
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* A PARTIR
DE EXUDADOS CERVICO VAGINALES EN UNA
POBLACION ABIERTA DE MUJERES QUE
ACUDEN A CONSULTA EXTERNA EN EL H.G.O.-3
DEL CENTRO MEDICO LA RAZA.**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
REINA ESTHER MIRANDA MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Q. F. I. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA F.E.S.-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Aislamiento de Listeria monocytogenes a partir de exudados cervico-vaginales en una población abierta de mujeres que acuden a consulta externa en el H.G.O.-3 del Centro Médico la Raza.

que presenta la pasante: Reina Esther Miranda Martínez
con número de cuenta: 8653077-8 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de Junio de 1994

PRESIDENTE	<u>N.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Idalia Avila Hinzawa</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera</u>	

Todo mi ser, mi existencia, mi risa, mis tristezas, alegrías y todo lo que soy es gracias a Ti.

*Gracias Dios por haberme creado
y dejarme vivir cerca de Ti.*

Mi más sincero agradecimiento a cada una de las instituciones educativas, que me dieron crecer y formarme hasta llegar a ser una profesionalista con metas, anhelos y ambiciones frente a la vida.

Muy en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por haberse convertido en mi segundo hogar. Por todas las horas felices y tristes que pasé dentro de sus aulas, laboratorios, pasillos y jardines, quienes dieron a mí y a mis compañeros hacernos hombres y mujeres útiles.

A todos y cada uno de mis profesores, que participaron durante toda mi formación escolar, ya que de no haber sido por ellos no sería quien soy.

Nunca mientras viva los olvidaré.

Un apolegma indú señala: " Que agradecer a alguien por algo, es quitar parte de su significado al acto de dar". Sin embargo; no puedo dejar guardado el inmenso agradecimiento que siento hacia quienes hicieron de una manera u otra posible un sueño de todos y realidad de pocos por eso quiero decir a:

Dr. Luis Toca Porras

Q.F.B. Marcela Hernández Vargas

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

Q.F.B. José Luis Cruz Rojas y Familia.

M.C. Jorge Luis Nieves Frausto.

M.C. Ma. Eugenia J. Miranda Martínez

Y muy especialmente a:

Q.F.I. Andrea A. Becerril Osnaya

*Gracias por ser quienes son
y haberme permitido la oportu-
nidad de conocerlos y recibir
su ayuda incondicional en
todo momento.*

Mamá:

Si pudiera a nacer simplemente le elegiría a ti como mi guía, por que has sabido hacer de mí quien soy.

Te quiero: Gracias por trascender en mí.

Papá:

Gracias por darme un ejemplo a seguir.

Hermanos:

Kenna, Yenny y Eddy. Gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntos y por todo su cariño.

Benito:

Gracias por haber sembrado en mí la semilla del amor y la humildad a Dios y a los demás.

Trataré de hacerla florecer.

Porque has hecho con tus palabras y amistad el haber encontrado un nuevo significado a mi vida.

Soy feliz:

Las únicas personas verdaderamente felices, son aquellos que han encontrado a alguien, alguna razón para amar y alguien a quien pertenecer.

Y Yo soy feliz ... porque te he encontrado a ti y te amo.

Gracias Juan.

INDICE

I RESUMEN	1
II REVISION BIBLIOGRAFICA	
1. ANTECEDENTES HISTORICOS	3
2. CARACTERISTICAS GENERALES	
2.1 Morfología	3
2.2 Clasificación serológica	4
3. PROBLEMAS CLINICOS	
3.1 Principales problemas clínicos e infecciones	4
3.2 Manifestaciones clínicas en humanos	4
4. TRANSMISION EN HUMANOS	
4.1 Rutas de transmisión	5
4.2 Reservorios naturales	6
5. PODER PATOGENO	
5.1 Estudio experimental	8
5.2 Dosis infecciosas	8
6. IDENTIFICACION	
6.1 Morfológica	9
6.2 Bioquímica	9
6.3 De otras especies	10
6.4 Serológica	11

7. CONDICIONES DE CRECIMIENTO	
7.1 Temperatura	11
7.2 pH	12
7.3 Agentes químicos	12
7.4 Factores nutricionales	12
7.5 Estudios realizados	13
8. TRATAMIENTO DE MUESTRAS POLIMICROBIANAS	
8.1 Influencia de bajas temperatura	14
9. EPIDEMIOLOGIA	15
10. APARATO GENITAL FEMENINO	
10.1 Fisiología y anatomía de la vagina	17
10.2 Flora normal	17
11. TRATAMIENTO Y CONTROL DE LISTERIOSIS	19
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
IV OBJETIVOS	21
V MATERIAL	22
VI METODOLOGIA	
1. MEDIO DE CULTIVO	24
1.1 Estandarización	24
1.2 Procedimiento	26
2. EXUDADOS CERVICO-VAGINALES	
2.1 Colección y tratamiento	27
3. IDENTIFICACION	
3.1 Morfología colonial	27
3.2 Bioquímica	27
3.3 Diagrama general de trabajo	28

4. METODO ESTADISTICO	
4.1 Estadística no paramétrica y prueba de Wilcoxon	29
VII RESULTADOS	
1. MEDIO DE CULTIVO OPTIMO	30
2. FRECUENCIA DE <i>Listeria monocytogenes</i>	30
3. RELACION DE <i>Listeria monocytogenes</i> CON LA PRESENCIA DE ABORTO REPETITIVO	
3.1 Hipótesis y regla de decisión	31
3.2 Analisis estadístico	31
VIII DISCUSION	33
IX CONCLUSIONES	36
X BIBLIOGRAFIA	37
XI ANEXOS	41

I RESUMEN

El difícil aislamiento, los escasos estudios de frecuencia en México y la asociación que se le ha dado a *Listeria monocytogenes* con problemas de aborto repetitivo es motivo para realizar un medio de cultivo altamente selectivo en el aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de exudados cervico-vaginales, para determinar la frecuencia del microorganismo y para verificar la asociación de *Listeria monocytogenes* con problemas de aborto repetitivo.

El presente estudio se desarrolló en el Hospital Ginecobstetricia Número 3 del Centro Médico la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (H.G.O. 3 del C.M.R. del I.M.S.S.) ubicado en México Distrito Federal, durante el período que comprendió del 13 de febrero de 1991 al 12 de agosto de 1991 trabajando con 1200 muestras de exudados cervico-vaginales en una población abierta de mujeres que acudieron a consulta externa en este Hospital.

El estudio se inició implementando un medio de cultivo para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* denominado medio A-C que consta de una base de agar Listeria-Brucella, extracto de levadura, Acriflavina y el antibiótico Ceftazidima, utilizando como medio disolvente agua destilada. Para optimizar el medio de cultivo se realizaron diferentes pruebas modificando las concentraciones de los componentes en donde se logró que con 41 g de Base agar Listeria-Brucella, 56 g de extracto de levadura, 2.5 ml de Ceftazidima [12.5 mg/ml] y 2.5 ml de acriflavina [2.5 mg/ml] en 1000 ml de agua, fuera un medio óptimo para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*.

Una vez que se optimizó el medio para el aislamiento del microorganismo se trabajaron la 1200 muestras de exudados cervico-vaginales, en donde se logró un aislamiento de *Listeria monocytogenes* identificando al microorganismo mediante su morfología, pruebas de motilidad y pruebas bioquímicas.

De estas 1200 pacientes estudiadas se pudo obtener en los archivos del hospital, los datos de 275 pacientes, en donde unicamente 113 de estas 275 pacientes presentaron problemas de aborto. La frecuencia de *Listeria monocytogenes* en las 1200 muestras es de 0.08%, en las 275 es de 0.36 % y en las 113 muestras con problemas de aborto se presenta una frecuencia de 0.88 %.

Utilizando el método estadístico de Wilcoxon, tomando en cuenta las 113 muestras con problemas de aborto y utilizando un 95 % de confiabilidad podemos decir que *Listeria monocytogenes* no tiene una relación significativa con problemas de aborto repetitivo.

II REVISION BIBLIOGRAFICA.

1. ANTECEDENTES HISTORICOS

Listeria monocytogenes es un microorganismo que ha sido aislado por un gran número de investigadores y ha sido denominado con diferentes nombres. Hulphers (1919), asignó el nombre de *Bacillus hepatis* a un organismo identificado en un foco necrótico característico en hígado de conejo. Este microorganismo fue posteriormente identificado como *Listeria monocytogenes*; en 1924 se produjo un brote epizootico en Inglaterra identificando al agente etiológico como *Bacterium monocytogenes*, nombrado así, por la monocitosis producida en conejos. En 1925 se localizó un brote epizootico en Sudafrica, llamando al agente causal *Tiger river bacillus* que posteriormente se le llamó *Listeria hepatolytica* en honor de Lord Joseph Lister quien fue el padre de la antisepsia. En 1929 Nyfeldt aisló el agente etiológico de la mononucleosis y lo llamó *Bacterium monocytogenes hominis*, finalmente en 1940 se le dió el nombre de *Listeria monocytogenes* (18).

2. CARACTERISTICAS GENERALES

2.1 Morfología

Listeria monocytogenes es un pequeño cocobacilo Gram(+), que mide de 1 a 2 μm , de extremos redondeados o ligeramente afilados cuya forma de agruparse no es habitualmente característica no obstante, el microorganismo puede agruparse por pares y también en cadenas cortas, así como adoptar forma de empalizadas; éste microorganismo no forma esporas y no tiene cápsula, su movilidad es debida a la presencia de flagelos, es móvil a 20 y 25°C e inmóvil a 37°C (6,18).

2.2 Clasificación serológica

Listeria monocytogenes, se clasifica en base a los esquemas de Paterson en cuatro grupos serológicos, de acuerdo con la distribución de antígenos somáticos y flagelares; la tipificación se lleva a cabo mediante reacciones de aglutinación, empleando antisueros adsorbidos. Presenta antígenos somáticos "O" numerados del I al X y antígenos flagelares "H" A,B,C,D. La presencia de ambos tipos de antígenos ha permitido clasificarlos en once serotipos : 1a, 1b, 2, 3a, 3b, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d y 4e. Los grupos serológicos 1 y 4b son los más frecuentes en infecciones humanas (36).

3. PROBLEMAS CLINICOS

3.1 Principales problemas clínicos e infecciones

A *Listeria monocytogenes* se le ha asociado como agente causal de problemas en animales y humanos. Así mismo desde hace 50 años se reporta a este microorganismo como un patógeno causante de enfermedades en grupos de personas inmunocomprometidas, recién nacidos, mujeres embarazadas y en personas de edad avanzada. Dentro de las afecciones que se han relacionado con *Listeria monocytogenes* podemos encontrar: Infección perinatal en humanos, Septicemia en embarazadas, Meningoencefalitis, Infecciones localizadas, Linfadenitis, Faringoamigdalitis, Conjuntivitis, Metritis, Cistitis, Abscesos, Endocarditis, Hepatitis y Abortos (12,27).

3.2 Manifestaciones clínicas en humanos

Las diversas expresiones clínicas de la enfermedad listérica han sido resumidas por Seeliger en :

- 1) Listeriosis durante el embarazo
- 2) Listeriosis del recién nacido
- 3) Infecciones del sistema nervioso

- 4) Infección cutánea
- 5) Forma septicémica con faringitis y mononucleosis
- 6) Forma oculoglandular
- 7) Forma cervicoglandular
- 8) Granulomatosis infantiséptica

De todas la formas clínicas existentes de listeriosis en el humano, nos vamos a enfocar en la listeriosis durante el embarazo (5).

La listeriosis durante el embarazo, en la mayoría de los casos se manifiesta por hipertemia acompañada de escalofríos y cefalea antes del aborto o del parto, con baja frecuencia, se ve acompañada de faringitis y diarrea. En un alto porcentaje la bacteremia por *Listeria monocytogenes* suele manifestarse como un cuadro catarral febril. Cuando la listeriosis se presenta antes del cuarto mes de gestación puede condicionar a aborto, habiéndose establecido que puede ser la etiología del aborto habitual entre el 1 al 6% de los casos. Se ha sugerido que la reinfección causa necrosis de la placenta favoreciendo de esta manera la presencia de aborto y septicemia (5,7,15).

En el trabajo realizado por Giono y Pérez Miravete, encontraron en mujeres embarazadas que uno de los sitios de infección de *Listeria monocytogenes* es la cavidad vaginal (13).

4. TRANSMISION EN HUMANOS

4.1 Rutas de transmisión

Listeria monocytogenes es un microorganismo ampliamente distribuido en el medio ambiente, de aquí que el humano puede estar expuesto a la bacteria de varias maneras. Las posibles rutas de transmisión se muestran en la figura 1.

Fig. 1. Posibles rutas de transmisión de *Listeria monocytogenes* en humanos (4).

-
- 1.- Suelo ----> Plantas ----> Humanos
 - 2.- Animales ----> Suelo ----> Plantas ----> Humanos
 - 3.- Forrajes ----> Animales ----> Humanos
 - 4.- Animales ----> Humanos
 - 5.- Polvo ----> Aire ----> Humanos
 - 6.- Insectos ----> Humanos
 - 7.- Alimentos ----> Humanos
 - 8.- Humanos ----> Humanos
-

4.2 Reservorios naturales

El suelo es un reservorio natural de *Listeria monocytogenes*, y de hecho se ha aislado de suelo cultivado y no cultivado incluyendo suelos boscosos, plantas tales como: maíz, cereales, semillas de soya, trébol y hierba mala. De aquí la posibilidad de que los humanos se lleguen a infectar con plantas las cuales pueden a su vez, estar contaminadas por el suelo en el que crecen (8,9).

En los animales, la listeriosis se cree, puede presentarse a partir de las plantas cultivadas en el suelo contaminado, de las cuales se produce el forraje, cuando estos animales contaminados son consumidos por el hombre se presenta la listeriosis. *Listeria monocytogenes* también ha sido aislada de forrajes, maíz, centeno, avena y leguminosas. Cuando el forraje no se fermenta adecuadamente favorece la presencia de levaduras y hongos incrementándose la producción de ácido que sirve como sustrato para *Listeria monocytogenes* (37).

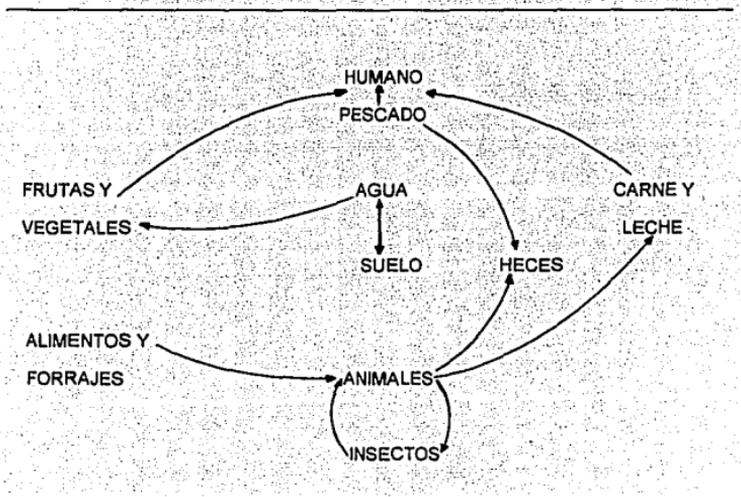
Se tienen varios reportes sobre la transmisión de *Listeria monocytogenes* en humanos por la ingestión de alimentos contaminados por esta bacteria, los cuales se han asociado con la

ingestión de ensaladas de col, leche pasteurizada, queso estilo mexicano y vegetales silvestres (10,22).

En alimentos conservados a bajas temperaturas, se ha detectado la presencia de *Listeria monocytogenes*, ya que éste microorganismo es capaz de resistir temperaturas de refrigeración (34,40).

En la figura 2. se muestra una posible hipótesis acerca de la infección por *Listeria monocytogenes* en humanos a partir de sus reservorios naturales (4).

Figura 2. Ciclo de infección de *Listeria monocytogenes* en humanos a partir de sus reservorios naturales (4).



5. PODER PATOGENO

5.1 Estudio experimental

Los resultados de la experimentación animal, dependen ampliamente de la virulencia del cultivo, la dosis, la vía de inoculación y de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre el animal. Entre los animales de laboratorio que comunmente se emplean para realizar el estudio de patogenia de *Listeria monocytogenes* se encuentran los roedores (conejos, ratones, cobayos) y aves. Entre los cuales el conejo es el animal de elección en el estudio de patogenia, la inoculación es por vía intravenosa o por vía intraperitoneal inyectándosele 0.5 ml de un cultivo en un caldo de 24 horas, produciéndose la muerte, con la afección característica del hígado, que se cubre de un punteado de manchas blanco-amarillentas correspondiendo a los focos de necrosis (6).

La reacción de Anton en conejo, consiste en la inoculación a nivel del ángulo externo del ojo, de una gota de un cultivo joven del microorganismo en caldo, provocando entre las 24 y 48 horas una conjuntivitis eventualmente asociada a una queratitis superficial.

En el ratón la inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea produce la muerte con lesiones necróticas como en el conejo. El cobayo es un poco más resistente, pero igualmente sensible a la inyección conjuntival.

En las aves es común utilizar palomas, a las cuales se les inocula un cultivo joven de listeria ocasionándoles septicemia con participación cardíaca predominante (6).

5.2 Dosis infecciosas

Se ha demostrado que para producir listeriosis por ingestión de alimentos contaminados, influye la dosis bacteriana ingerida en el alimento y esto crea una pregunta no contestada en cuanto a la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos, ¿cuántas bacterias pueden ser ingeridas para causar enfermedad?. Para contestar ésta pregunta, se realizó un estudio en el que se empleó un modelo primate no humano (*Macaca fascicularis*) al que se le administró leche

completa, en la cual se suspendió *Listeria monocytogenes* para obtener concentraciones de 10⁷, 10⁶ y 10⁵ células por mililitro (3). Posteriormente se tomaron muestras de sangre, materia fecal y secreción nasal, las muestras se tomaron a diferentes intervalos de tiempo y se encontró que sólo los animales que recibieron dosis de 10⁷ cel/ml enfermaron notablemente, presentando síntomas de septicemia, irritabilidad y pérdida del apetito y ocasionalmente diarrea. Además estos animales eliminaron *Listeria monocytogenes* en las heces aproximadamente por 21 días (3). Se han realizado otros trabajos en cabras y ratones relacionando la dependencia de la dosis para observar el desarrollo de la enfermedad y determinar la excreción de *Listeria monocytogenes* (30).

6. IDENTIFICACION

6.1 Morfológica

Listeria monocytogenes se caracteriza por ser un pequeño cocobacilo Gram (+), que mide de 1 a 2 µm, cuya forma de agruparse no es habitualmente característica no obstante, el microorganismo puede agruparse por pares y también en cadenas cortas así como adoptar forma de empalizadas. Este microorganismo es móvil por la presencia de flagelos (6).

6.2 Bioquímica

Listeria monocytogenes es un microorganismo aerobio y anaerobio facultativo que crece a temperaturas de 1 a 45°C siendo su temperatura óptima de 30 a 37°C, esta especie presenta las siguientes características bioquímicas: (10).

Catalasa	(+)	Urea	(+)	
Oxidasa	(+)	Arginina	(+)	con la producción de amoniaco
Reducción de nitratos	(+)	Voges-Proskauer	(+)	
Indol	(+)	CAMP	(+)	
H ₂ S	(+)	Motilidad	(+)	a 20 y 25 °C observándose imagen de sombrilla en tubo con medio semisólido
Coagulasa	(+)			

A *Listeria monocytogenes* se le identifica por la fermentación de carbohidratos tales como: Glucosa, Threalosa, Rhamnosa, Xilosa, Manosa, Salicina e Hidrólisis de esculina (33).

6.3 De otras especies

Existen otras especies de *Listeria* las cuales pueden diferenciarse de *Listeria monocytogenes* mediante las siguientes características bioquímicas, que se pueden observar en el cuadro 1.

CUADRO 1. Identificación bioquímica de algunas especies de *Listeria* (12).

LISTERIA	HEMOLISIS en A.S.	NO ₃	CAMP	PRODUCCION DE ACIDO			
				Mol	Rha	Xil	MMan
<i>monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-	+
<i>ivanovi</i>	+	-	-	-	-	+	-
<i>innocua</i>	-	-	-	-	v	-	+
<i>welshimeri</i>	-	-	-	-	v	+	+
<i>seeligeni</i>	+	-	+	-	-	+	v
<i>grayi</i>	-	-	-	+	-	-	NP
<i>murrayi</i>	-	+	-	+	v	-	NP
<i>denitrificans</i>	-	+	-	-	-	+	NP

v = reacción variable

Rha = rhamnosa

NP = no probada

Xil = xilosa

A.S. = agar sangre

MMan = metilmanosido

Mol = manitol

NO₃ = reducción de nitratos

6.4 Identificación serológica

Se puede realizar el diagnóstico serológico gracias a la presencia de antígenos somáticos y flagelares que presenta *Listeria monocytogenes*, pero éste tipo de diagnóstico es de uso limitado en la identificación epidemiológica de listeriosis, esto se debe a que *Listeria monocytogenes* presenta varios antígenos que dan reacción cruzada con otros microorganismos Gram (+) y los resultados pueden ser falsos positivos (36).

7. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Listeria monocytogenes se desarrolla en un medio de cultivo que requiere de ciertas condiciones tales como temperatura, pH, agentes químicos y factores nutricionales.

7.1 Temperatura

La temperatura óptima para el desarrollo del microorganismo se sitúa entre los 30 y 37°C, a temperatura ordinaria el crecimiento es a veces retardado, pero a los 3 ó 4 días el cultivo es satisfactorio. El límite superior de crecimiento está en 42 y 44°C; además, los microorganismos mueren a los 56°C en 1 hora (16). De hecho la particularidad más importante para el diagnóstico bacteriológico es la posibilidad del microorganismo de crecer a temperaturas relativamente bajas, entre 1 y 4°C (14). Naturalmente bajo éstas condiciones de temperatura, el crecimiento es muy retardado, pero en 15 días empiezan a aparecer las colonias de *Listeria monocytogenes*. Además de su interés para el aislamiento, ésta propiedad es utilizada para la conservación del microorganismo, los cultivos en caldo nutritivo se mantienen vivos varios meses a temperatura de laboratorio y varios meses a 4°C sobre agar sangre o algún medio nutritivo. Además este microorganismo soporta muy bien la congelación (40).

7.2 pH

Listeria monocytogenes para su crecimiento, requiere de un pH neutro o ligeramente alcalino, siendo el pH ideal de 7.5. Por debajo de 5.6 no se cultiva y además las resiembras a menudo son imposibles. Con pH alcalino e incluso hasta de 9.6 este microorganismo todavía se puede cultivar (9).

7.3 Agentes químicos

Listeria monocytogenes, se cultiva en presencia de altas concentraciones de NaCl, de bilis y de telurito de potasio (6).

7.4 Factores nutricionales

Estos factores favorecen el crecimiento de los microorganismos, la presencia de glucosa, vitaminas del grupo B, aminoácidos tales como valina, cisteína, glutamina, leucina e isoleucina (33).

La influencia de éstos factores, son necesarios para un buen desarrollo de las cepas de *Listeria monocytogenes*; sin embargo los medios de cultivo empleados para el aislamiento y crecimiento del microorganismo difieren dependiendo del tipo de muestra clínica que se vaya a trabajar (21).

En general el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en muestras estériles como son líquido cefalorraquídeo, sangre, fluido pleural, etc. se realiza sin mayor dificultad, empleando medios de cultivo ordinarios utilizados comúnmente en un laboratorio de bacteriología como son agar sangre, medio de infusión cerebro corazón o con algún medio altamente nutritivo será excelente para el aislamiento de la *Listeria* (20).

Sin embargo el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en muestras polimicrobianas (cervix, vagina, exudado faríngeo, meconio, pus, esputo, orina o heces) es un tanto difícil ya que se requiere de un tratamiento previo de la muestra y del empleo de un medio altamente selectivo para *Listeria monocytogenes* (3).

7.5 Estudios realizados

Subsecuentemente en 1960 Mc. Bride y Girard describen un medio selectivo para el aislamiento de *Listeria*; este medio contiene fenil-etanol y agar base, al cual se le agrega un 0.05% de cloruro de litio, 1% de glicina y 3% de sangre. Otros estudios fueron realizados posteriormente en donde se le adicionó a los medios azida de sodio, guanofuracina, cloruro de sodio, telurito de potasio, amino-guanidina, etanol, fenilbarbitol de sodio, ácido bórico, tiosulfato de sodio y otros compuestos más, pero el resultado de los medios probados no fue satisfactorio, como el medio utilizado por Mc. Bride y Girard, sin embargo, durante un período de cinco años Ralovich desarrolló y probó una combinación de ácido nalidixico (50µg/ml) y acriflavina (50µg/ml) con una base de agar y lo utilizó para el aislamiento de *Listeria* (3).

Hofer encontró que una combinación de ácido nalidixico y acriflavina en caldo triptosa como enriquecimiento fue un medio óptimo para el aislamiento de *Listeria* a partir de heces de bovino y que el agar triptosa con suero de caballo, esclulina al 1%, citrato férrico, sulfato de polimixina B, ácido nalidixico, acriflavina y 50µg de acetato de talio resultó ser un medio más selectivo. Cuando la esclulina y el hierro estaban presentes, las colonias de *Listeria* presentaban áreas centrales oscuras, en tanto que el acetato de talio inhibía frecuentemente el crecimiento de estreptococos (20).

En los años de 1984 a 1988 se reportaron aproximadamente 11 publicaciones en donde se describen caldos y agares selectivos para el aislamiento de especies de *Listeria* a partir de materiales contaminados y de productos alimenticios, además de enfatizar el aislamiento a partir de leche y de productos lácteos. Varias de las fórmulas fueron inventadas y probadas por Domínguez y colaboradores, quienes publican el uso de una combinación de caldos y un agar selectivo para el aislamiento de *Listeria* (23,24).

La combinación de caldos se formuló de la manera siguiente: Caldo substrato (Threalosa y esclulina) y Caldo de enriquecimiento a esta combinación se les adicionó ácido nalidixico y azul de tripan.

El agar de aislamiento se formuló de la manera siguiente: Agar base, esclulina, ácido nalidixico, acriflavina y sangre desfibrada (16).

Varios trabajos se realizaron tomando como base el medio selectivo Mc. Bride con sus respectivas modificaciones, en las cuales se utilizaron diversos carbohidratos como glucosa, threalosa; algunos adicionaron cloruro de litio, tiocianato de potasio y además el ácido nalidixico y acriflavina. También se adicionaron a los medios polimixina B, extracto de levadura y ciclohexamida; a todos los medios empleados, se les adicionó los nutrientes que ya se han mencionado en párrafos anteriores para el buen crecimiento de *Listeria*. Para observar la beta hemólisis se utiliza sangre de carnero desfibrada a un 5% (41).

Estos medios se han utilizado para el aislamiento de *Listeria*, a partir de leche y productos lácteos. Pero se han obtenido excelentes resultados utilizando agar columbia como base, acriflavina y ceftazidima pentahidratada para el aislamiento de *Listeria* en quesos contaminados, este medio ha observado mejores resultados que el medio Mc. Bride (3,16).

Al realizar una revisión de los medios selectivos que existen para *Listeria*, el aislamiento del microorganismo no se hace tan difícil cuando se trabaja con muestras polimicrobianas ya que existen reportes en la literatura de un número amplio de medios selectivos para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* (3).

8. TRATAMIENTO DE MUESTRAS POLIMICROBIANAS

8.1 Influencia de la temperatura

El tratamiento previo de la muestra, requiere del uso de un caldo enriquecido y guardar la muestra a 4°C por tres días mínimo, con el objeto de que las bacterias que pudieran interferir con el microorganismo que se está estudiando no se desarrollen a esta temperatura y solo se desarrolle *Listeria monocytogenes* utilizando su capacidad de sobrevivencia bajo condiciones de bajas temperaturas. Una vez realizado éste tratamiento, se proseguirá a inocular la muestra en el medio que se haya seleccionado para el trabajo de aislamiento del microorganismo (40).

Para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* de muestras polimicrobianas, se han realizado diferentes estudios acerca de los medios de cultivo que se pueden utilizar para el aislamiento y crecimiento de éste microorganismo (2).

Los estudios que puntualizan la importancia de utilizar medios de cultivo específicos para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* se iniciaron hace 30 o 40 años. Gray y colaboradores (1984), reportaron el aislamiento de *Listeria monocytogenes* en cinco casos de listeriosis bovina, donde se utilizó suspensiones de cerebro en caldo triptosa a 4°C por 3 ó 12 semanas para después sembrarlo en un medio de agar triptosa. Este fue el primer reporte del crecimiento de *Listeria monocytogenes* a temperaturas bajas el cual se utiliza hoy en día como base para el aislamiento de *Listeria* a partir de muestras polimicrobianas (22).

9. EPIDEMIOLOGIA

En 1972 Bojsen-Moller, describió la listeriosis humana como, una infección de la mujer embarazada y del recién nacido y como una infección de personas de edad avanzada e inmunocomprometidas. Caracterizándose en estas situaciones por septicemia, meningitis o meningoencefalitis (12).

En la actualidad ha sido demostrado el amplio espectro de enfermedades que puede producir en el feto o neonato, ya que su presentación clínica depende del tiempo y de la ruta de infección (1).

El concepto inicial de que la listeriosis es una zoonosis se ha modificado, aunque los mismos serovars infectan tanto a animales como a los humanos (lo que permite concluir que la infección por *Listeria* puede producirse a partir de reservorios animales), la transmisión de la madre al feto siempre es directa (12).

Se han documentado más de 10,000 casos en el mundo de infección listérica en humanos. En la actualidad la mortalidad y morbilidad han sido pobremente definidas aún en Norteamérica y Europa, debido a que la infección por *Listeria* no es una enfermedad de

notificación obligatoria (27). En nuestro país existen muy pocas publicaciones del aislamiento de *Listeria monocytogenes* (casi todas realizadas en la ciudad de México, con excepción de un trabajo efectuado en Puebla) (13). El primer aislamiento fue realizado por Gardida en 1960, Giono y Pérez Miravete en 1963 efectuaron un estudio completo para establecer la importancia de la infección perinatal listérica en una maternidad, logrando describir los cuatro primeros casos en recién nacidos de un grupo seleccionado de niños, a los que se les practicó un hemocultivo y cuyas madres presentaban amniotitis. En el mismo trabajo, de 2121 muestras de exudados vaginales estudiados, sólo se logró un aislamiento (que correspondió a una mujer con aborto repetido) (13,35,39). Una encuesta serológica por aglutinación en el mismo grupo de mujeres, usando antígeno somático y flagelar tipo 1 y 4b, reveló la presencia de anticuerpos en el 16.6% de embarazadas y en el 7.9% de no embarazadas (13,14).

La verdadera frecuencia de la listeriosis en México es difícil de conocer, quizá porque es una enfermedad de poca frecuencia que habitualmente escapa a diagnóstico microbiológico.

En la patogénesis de las infecciones perinatales por *Listeria* se ha encontrado que el feto puede ser infectado vía transplacentaria a través de la ventana umbilical produciendo septicemia; éste es el único ejemplo en infecciones por *Listeria* en que se ha probado la transmisión de humano a humano. La infección también puede ser adquirida durante el parto por contacto con secreciones infectantes (1,13).

Si la infección ocurre en las primeras etapas del embarazo puede condicionar aborto, cuando la infección es producida antes del parto, *Listeria* se disemina a partir de la placenta afectando múltiples órganos del feto en los que origina focos granulomatosos; a ésta infección perinatal listérica se le conoce como "granuloma infantiséptico" o sépsis granulomatosa del recién nacido (15). También pueden provocar amniotitis, y en estos casos el líquido amniótico suele ser de color oscuro o turbio, sin mal olor; en la placenta, cuando se observa cuidadosamente hay pequeños focos necróticos. La madre puede permanecer asintomática y durante los primeros días posparto es posible aislar *Listeria* de vagina, cuello de útero, orina y loquios (1,5,27)

10. APARATO GENITAL FEMENINO

10.1 Fisiología y anatomía de la vagina

La vagina es un tubo fibromuscular de 7.5 a 10 cm. de longitud, anterior al recto y el canal anal, y posterior a la vejiga y la uretra. Para su estudio, el aparato genital femenino se divide en dos grupos de órganos: (32)

A) Organos Externos:

- Vulva
- Vestíbulo vaginal
- Monte de venus o pubis
- Labios mayores y menores
- Clítoris
- Glándulas vestibulares
- Orificio uretral
- Himen (en las mujeres vírgenes)
- Orificio vaginal
- Períneo

B) Organos internos:

- Vagina
- Utero
- Trompas uterinas
- Ovarios

10.2 Flora normal

Las áreas que normalmente albergan microorganismos son los genitales externos, uretra anterior y vagina. La flora de los genitales externos comprende los siguientes microorganismos: *Staphylococcus epidermidis*, Estreptococos del grupo viridans, Enterococos, Peptoestreptococos, Corinebacterias, Micobacterias, distintos miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, Micoplasmas, *Candida albicans* y otras levaduras (2).

En los órganos internos como son el útero, trompas uterinas y endocervix en un sentido estricto no presentan ningún tipo de flora microbiana, es decir, todos los órganos internos de la reproducción son estériles (34).

La superficie vaginal se mantiene húmeda gracias a la secreción de las glándulas cervicales y en grado menor a la trasudación en su propia superficie (11).

El epitelio vaginal sufre descamación constante por lo que el fluido vaginal puede contener porciones de epitelio cervical, uterino, vulvar, folicular, fluido peritoneal, células epiteliales de exfoliación, bacterias y productos bacterianos. Ocasionalmente semen, anticonceptivos, y productos de higiene (26).

Las características de un flujo vaginal normal son: color blanco, viscoso, con floculaciones, no se adhiere a la pared vaginal y resbaladizo (33).

El microorganismo predominante en la flora vaginal de mujeres sanas en edad fértil es un lactobacilo acidófilo fermentador de glucógeno (*Lactobacillus acidophyllus*), comunmente llamado *Bacilo de Doderlein*. Descubierta en 1887 por Goenner, y ampliamente estudiado por Doderlein en 1892. Este bacilo, es un indicador de la acidez vaginal además de que su presencia denota una buena actividad estrogénica (32).

En la actualidad con los adelantos en los laboratorios de microbiología clínica, se ha visto que la flora vaginal es más compleja y que a pesar del control ejercido por el *Lactobacillus*, muchos otros microorganismos pueden ser cultivados de muestras vaginales de mujeres sin sintomatología o sanas como son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus* del grupo B, *Neisseria spp* no patógenas, *Corynebacterium spp*, algunos actinomicetos, miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Acinetobacter spp*, *Chlamydia spp*, *Gardnerella vaginalis*, ocasionalmente *Clostridium spp*, y otros bacilos anaerobios, Micoplasmas, *Candida albicans* y otras levaduras, *Trichomona vaginalis*, *Moraxella spp*, difteroides y bacteroides (2).

Los hallazgos microscópicos y microbiológicos del exudado, además de la acidez vaginal son de gran valor predictivo para el médico sobre el riesgo potencial de algunas pacientes a desarrollar una infección postquirúrgica ya sea por cesárea, salpingoclasia, Histerectomía, parto o por la posible instalación del dispositivo intrauterino. Además durante el parto el riesgo potencial de infección al neonato es de considerable importancia por lo cual debe tomarse en cuenta (11).

11. TRATAMIENTO Y CONTROL DE LISTERIOSIS

Entre los agentes antimicrobianos activos contra la *Listeria monocytogenes* "in vitro" se incluyen: penicilina G, ampicilina, eritromicina, sulfametoxazol y trimetoprim, cloramfenicol, rifampicina, tetraciclina, aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina que tiene mayor actividad en contra de *Listeria*. Se ha demostrado que la combinación de gentamicina-ampicilina en estudios de laboratorio es recomendable como tratamiento de elección de la listeriosis (25).

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dado que a *Listeria monocytogenes* se le conoce como un patógeno asociado con problemas de aborto repetitivo (13,14) y debido a que en México no se conoce la frecuencia de este microorganismo, ni se le ha dado la importancia que merece, debido a que es un patógeno de poca frecuencia, que habitualmente escapa al diagnóstico microbiológico de rutina en un exudado cervico-vaginal.

En el Hospital de Ginec Obstetricia No. 3 del Centro Médico la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social, ubicado en México Distrito Federal. Se realizó un estudio experimental con el fin de establecer la frecuencia de *Listeria monocytogenes* a partir de exudados cervico-vaginales, provenientes de una población abierta de mujeres que acudieron a consulta externa en este hospital.

Para lograr el estudio se implementará un medio de cultivo altamente selectivo en el aislamiento del microorganismo y una vez aislado, se realizará su identificación.

El trabajo concluirá con la utilización de una prueba estadística que determine la relación significativa que tenga *Listeria monocytogenes* con la presencia de aborto repetitivo.

IV OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de *Listeria monocytogenes* a partir de exudados cervico-vaginales en una población abierta de mujeres que acuden a consulta externa en el H.G.O-3 del C.M.R. del I.M.S.S.

OBJETIVOS PARTICULARES

Implementar un medio de cultivo selectivo, para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de muestras de exudados cervico-vaginales.

Identificar a *Listeria monocytogenes* mediante pruebas bioquímicas específicas para *Listeria* (Gram, Catalasa, Motilidad, β -hemólisis, H₂S, NO₃ Y CAMP).

Determinar mediante una prueba estadística si *Listeria monocytogenes* tiene un efecto significativo con la presencia de aborto repetitivo.

V MATERIAL

- Incubadora bacteriológica
- Microscopio con objetivo de inmersión
- Autoclave
- Refrigerador
- Material usual en un laboratorio de bacteriología diagnóstica
- Medio de transporte de Stuart
- Base para agar sangre
- Medio Acriflavina-Ceftazidima para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* (Medio A-C)
- Medio MIO
- Base de agar Listeria Brucella
- Aceite mineral
- Cristal violeta
- Lugol
- Zafranina
- Alcohol-acetona
- Peróxido de hidrógeno
- Agua estéril
- Agua destilada
- Acriflavina (1.5%)
- Ceftazidima (5%)
- Extracto de levadura

-Muestras de exudados cervico vaginales de pacientes femeninas que acudieron a consulta externa en el H.G.O-3 del C.M.R. del I.M.S.S.

-Cepa de *Listeria monocytogenes* (donación de la Dra. Silvia Giono de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas).

VI METODOLOGIA

1.MEDIO DE CULTIVO.

En muestras polimicrobianas, como son los exudados cervico-vaginales el aislamiento de *Listeria* necesita un medio de cultivo altamente selectivo que inhiba el crecimiento de organismos g(+) y g(-) que habitan como flora normal en la vagina, por lo que se implementó un medio de cultivo selectivo denominado Medio Acriflavina-Ceftazidima (Medio A-C) para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*.

El medio de cultivo utilizado se preparó inicialmente según la fórmula del manual "Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes*" (19).

El Agar Columbia se substituyó por el Agar *Listeria-Brucella* utilizando las cantidades indicadas de cada componente. Posterior al sembrado e incubación de la cepa de *Listeria* no se observó crecimiento colonial por lo que se inició la tarea de realizar diluciones de Acriflavina y Ceftazidima hasta lograr el medio óptimo que permitiera el crecimiento de las colonias de *Listeria* y se agregó un complemento nutritivo que fue el extracto de levadura.

1.1Estandarización.

La estandarización del medio se realizó modificando la cantidad de Acriflavina y Ceftazidima como lo muestra el cuadro 2.

En el cuadro 2 podemos observar que la concentración óptima de Acriflavina es de 2.5 mg/ml y Ceftazidima de 12.5 mg/ml, se procedió a preparar 1000 ml del medio de cultivo siendo las cantidades de los componentes las siguientes:

Agar <i>Listeria-Brucella</i>	41 g
Extracto de levadura	56 g
Acriflavina [2.5mg/ml]	2.5 ml
Ceftazidima [12.5mg/ml]	2.5 ml
Agua destilada	1000 ml

CUADRO 2. Estandarización del medio de cultivo variando las concentraciones de Acriflavina y Cefotaxima.

A	B	C	D	E	F	G	H
10mg/ml	0.25	50mg/ml	0.25	4.1	5.6	100	No hay crecimiento
5mg/ml	0.25	25mg/ml	0.25	4.1	5.6	100	No hay crecimiento
2.5mg/ml	0.25	12.5mg/ml	0.25	4.1	5.6	100	Crecimiento de <i>L.mon</i>
2mg/ml	0.25	10mg/ml	0.25	4.1	5.6	100	Crecimiento de <i>L.mon</i> y otros microorganismos.

A=Concentración de Acriflavina.

B = Volumen de Acriflavina en ml.

C = Concentración de Cefotaxima.

D = Volumen de Cefotaxima en ml.

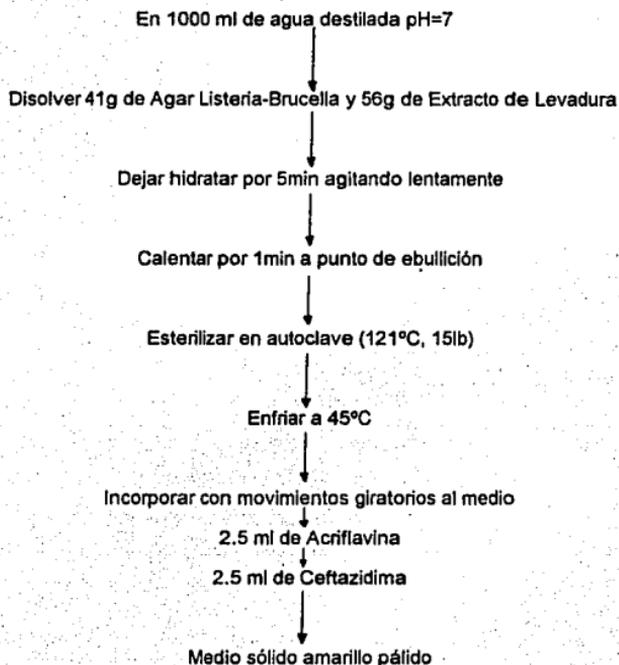
E = Agar Listeria-Brucella en gramos.

F = Extracto de levadura en gramos

G = Agua destilada en ml.

H = Observación del crecimiento de colonias de *L. monocytogenes*.

1.2 Procedimiento.



Llevando acabo el procedimiento anterior se obtiene un medio óptimo para el crecimiento de las colonias de *Listeria* en 24 hrs. a 37° C presentandose colonias de forma puntiforme, color blanco y consistencia suave.

2. EXUDADOS CERVICO-VAGINALES

2.1 Colección y tratamiento de muestras.

1) Se recolectaron 1200 muestras de mujeres que acudieron a consulta externa en el HGO-3 del C.M.R. Las muestras de exudados cervico vaginales fueron enviadas al laboratorio de bacteriología en medio de transporte Stuart y se refrigeraron a 4° C. por 24 hrs.

2) Se sembraron las muestras en el medio A-C incubandolas a 37°C por 24 horas.

3) Al cabo de las 24 horas si no se observaba crecimiento colonial, se procedió a refrigerar las muestras a 4°C por un lapso de veinte días (con una revisión por períodos de tres días).

3. IDENTIFICACION.

3.1 Morfología colonial.

1) Las colonias de *Listeria monocytogenes* en el medio A-C se observan de color blanco, de consistencia suave y de forma puntiforme semejantes al rocío.

2) A partir de las colonias presentes en el medio A-C se procedió a realizar una tinción de Gram, observando pequeños coco bacilos Gram (+), generalmente dispuestos en forma de empalizadas.

3.2 Bioquímica.

Para identificar bioquímicamente a la *Listeria monocytogenes* se utilizaron las siguientes pruebas:

- Prueba de catalasa
- Observación de beta-hemólisis en gelosa sangre
- Prueba de motilidad en gota suspendida a 25 y 37°C.
- Prueba de motilidad en medio MIO a 25 y 37°C
- Reducción de Nitratos
- Producción de H₂S
- Prueba de CAMP, utilizando cepa de *Staphylococcus aureus*.

3.3 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

Toma de muestra.
↓
Medio de Transporte de Stuart.
↓
Refrigeración a 4° C durante 24 horas.
↓
Cultivo en medio A-C por 24 horas a 37° C

28

DESARROLLO DE COLONIAS BLANCAS

PUNIFORMES

SIN DESARROLLO COLONIAL

Refrigerar a 4° C por 20 días

Revisión cada tercer día

Desarrollo de colonias blancas puntiformes

IDENTIFICACION

Tinción de Gram

Prueba de Catalasa

Motilidad en gota
suspendida a 25 y
37°C

Motilidad en medio
MIO a 25 y 37°C

β hemólisis
en Agar sangre

Reducción de
Nitratos

H₂S

CAMP

4. METODO ESTADISTICO.

4.1 Estadística no paramétrica y prueba de Wilcoxon.

Existe una gran cantidad de experimentos en los que las observaciones no admiten ser operadas arítmicamente sobre ellas, debido a que la escala de medición es muy débil. Cuando la escala de medición es débil, o cuando no es razonable suponer que la muestra proviene de una distribución normal es conveniente utilizar los métodos no paramétricos.

Dentro de los métodos estadísticos no paramétricos encontramos que la prueba de rangos con signo de Wilcoxon es una prueba estadística que se ajusta a las características del estudio realizado y podemos determinar estadísticamente con esta prueba el efecto significativo que tiene *Listeria monocytogenes* sobre el aborto repetitivo.

Se hace incapié que en la prueba de Wilcoxon se descartarán todos los valores de la variable x_i que sean iguales a cero, es por ello que de los 275 datos recopilados únicamente trabajamos con 113 debido a que corresponden a pacientes que presentaron casos de aborto.

La prueba de Wilcoxon requiere de datos que son los siguientes.

- 1) Número de observaciones = n
- 2) Un par de observaciones = y_i, x_i
- 3) Diferencia de las dos variables = $D_i = y_i - x_i$
- 4) Valores absolutos de cada diferencia = $|D_i|$
- 5) Determinar rangos a las diferencias = Rango
- 6) Rango = R_i ($R_i = \text{Rango si } y_i - x_i \text{ es un valor positivo}$)

En el anexo 1 se pueden observar los valores que adquieren cada uno de los datos anteriores según la prueba de Wilcoxon.

VII RESULTADOS

1. MEDIO DE CULTIVO OPTIMO

En el presente estudio el medio de cultivo óptimo para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* es el medio Acriflavina-Ceftazidima con la siguiente composición:

Agar Listeria-Brucella	41 g
Extracto de levadura	56 g
Acriflavina [2.5mg/ml]	2.5 ml
Ceftazidima [12.5mg/ml]	2.5 ml
Agua destilada	1000 ml

Este medio de cultivo es de color amarillo claro, altamente selectivo en donde las colonias de *Listeria monocytogenes* crecen de color blanquecino de consistencia suave, puntiformes semejantes a las gotas del rocío.

De las 1200 muestras trabajadas se logró un solo aislamiento del microorganismo el cual se identificó positivamente como *Listeria monocytogenes* según las siguientes pruebas:

Morfología = cocobacilo	Catalasa = (+)	Indol = (-)
Gram = (+)	Oxidasa = (-)	H ₂ S = (-)
Motilidad = (+ a 25°C)	Red. NO ₃ = (-)	Urea = (-)
Coagulasa = (-)	Arginina = (+)	V.P = (+)
CAMP = (+)	CHO's = (+)	

2. FRECUENCIA DE *Listeria monocytogenes*

La frecuencia de este microorganismo en las 1200 muestras estudiadas corresponde a un 0.08 % y en las 113 muestras de pacientes con caso de aborto confirmado mediante los datos verificados en los archivos del H.G.O.-3 del C.M.R del I.M.S.S. corresponde a un 0.88 %.

3. ANALISIS ESTADISTICO DE LA RELACION DE *Listeria monocytogenes* CON LA PRESENCIA DE ABORTO REPETITIVO.

3.1 Hipótesis y regla de decisión.

Ho : *Listeria monocytogenes* tiene un efecto significativo en la presencia de aborto repetitivo.

Ha : *Listeria monocytogenes* no tiene un efecto significativo en la presencia de aborto repetitivo.

Regla de decisión : Rechazo Ho si $T_c > T_{\alpha}(n)$

3.2 Análisis estadístico.

Para el cálculo de T_c se utiliza la ecuación siguiente:

$$T_c = \frac{T - \frac{n(n+1)}{4}}{\left[\frac{n(n+1)(2n+1)}{24} \right]^{1/2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$$T = \sum R_i$$

n = número de caso con aborto

Cálculo de T.

Con los datos del Anexo 2 se calcula el valor de T a partir de las siguientes expresiones:

$$T = \sum T_{i, \dots, T_{ij}}$$

$$T_i = \frac{1 + 2 + 3 + 4 + \dots + 69}{69} = 2415$$

$$T_{ii} = \frac{70 + 71 + 72 + \dots + 93}{24} = 1956$$

$$T_{iii} = \frac{94 + 95 + 96 + \dots + 107}{14} = 1407$$

$$T_{iv} = \frac{108 + 109 + 110}{3} = 327$$

$$T_v = \frac{111 + 112}{2} = 111.5$$

$$T_{vi} = \frac{113}{1} = 113$$

$$T = 2415 + 1956 + 1407 + 327 + 111.5 + 113 = 6441$$

Una vez calculada T se procede al cálculo de Tc empleando la Ecuación 1

$$T_c = \frac{6441 - \frac{113(113+1)}{4}}{\left[\frac{113(113+1)(2(113)+1)}{24} \right]^{1/2}}$$

$$T_c = 9.22$$

De las tablas se obtiene que $T_{0.05(113)} = 1.65$, por lo que se concluye que: $T_c > T_\alpha$ y entonces se rechaza H_0 , es decir *Listeria monocytogenes* no tiene un efecto significativo en la presencia de aborto repetitivo.

VIII DISCUSION

El aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de muestras estériles no presenta mayor problema, ya que puede realizarse en medios de uso general dentro del laboratorio, pero podemos aislar a *Listeria monocytogenes* a partir de muestras polimicrobianas como en el caso de exudados cervico-vaginales, en donde se deben emplear medios de cultivo selectivos con antibióticos para inhibir el crecimiento de otros organismos (2).

Durante más de cinco años se probaron medios de cultivo selectivos para el crecimiento de *Listeria* a partir de muestra polimicrobianas (3). Uno de los primeros estudios donde se hace mención del uso de Acriflavina combinada con el ácido nalidixico en agar para realizar un aislamiento de *Listeria monocytogenes* fue en el reporte realizado por Ralovich y Hofer, quienes encontraron que la combinación de Acriflavina con ácido nalidixico en un caldo triptosa era excelente medio para el aislamiento de *Listeria* en heces de bovinos. La Acriflavina también se utilizó en combinación con otras sustancias como la esculina, citrato férrico, sulfato de polimixina B, entre otras (20).

En los años de 1984 a 1988, se escribieron aproximadamente 11 publicaciones en donde describieron agares y caldos selectivos para el aislamiento de *Listeria*.

En 1988 Bannerman y Bille con su artículo "A new medium for isolating *Listeria spp.* from heavily contaminated material", hacen referencia al uso de la combinación de Ceftazidima con la Acriflavina utilizando una base de agar Columbia y lo refieren como un medio altamente selectivo para el aislamiento de este microorganismo (23,24).

Si el medio probado por Bannerman y Bille resultó favorable para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, nos dimos a la tarea de probar este medio para el crecimiento del microorganismo.

Posteriormente a varios ensayos, el medio óptimo para el aislamiento y crecimiento de *Listeria* fue en donde se utilizó:

Agar <i>Listeria</i> - <i>Brucella</i>	41 g
Extracto de levadura	56 g
Acriflavina [2.5mg/ml]	2.5 ml
Ceftazidima [12.5mg/ml]	2.5 ml
Agua destilada	1000 ml

Los resultados obtenidos con este medio fueron óptimos ya que el medio resulto selectivo para el desarrollo y aislamiento de *Listeria monocytogenes* observando a las colonias de *Listeria* de forma puntiforme, de color blanquecino semejantes a las gotas del rocío, logrando inhibir la presencia de otros microorganismos gram (+) y gram (-) existentes en la flora cervico-vaginal y que podrían interferir con el desarrollo de *Listeria*.

Una vez que se tuvo el medio de cultivo apropiado para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*, se inició la búsqueda de la frecuencia del microorganismo en los exudados cervico-vaginales, en donde al finalizar el estudio encontramos que *Listeria monocytogenes* estuvo presente en un 0.08 % de los 1200 casos estudiados en el H.G.O.-3 del C.M.R. En la literatura han sido reportados datos de frecuencia de *Listeria monocytogenes* en donde observamos que nuestro dato se encuentra dentro de los porcentajes reportados, como en el caso del estudio en la ciudad de los Angeles en 1986, donde se estimó la presencia de *Listeria monocytogenes* en un 0.043 %. En otras áreas de los Estados Unidos de Norteamérica, se reportó una frecuencia de un 0.068 a 0.27 % de frecuencia del microorganismo (14).

En el estudio realizado por la Dra. Silvia Gióno y Pérez Miravete, reportaron un solo aislamiento del microorganismo en 2121 muestras de exudados cervico-vaginales, lo que correspondió a una sola mujer con antecedentes de aborto repetitivo (13).

El reporte anterior, respalda el resultado de nuestro trabajo en donde de un estudio de 1200 muestras de exudados cervico-vaginales encontramos un solo caso positivo de aislamiento, siendo también de una paciente con aborto repetitivo, de 24 años de edad, con 5 gesta, ninguna para, 4 abortos hasta la fecha del diagnóstico y con 23 semanas de gestación. Posteriormente en el archivo del Hospital se pudo confirmar que la última gesta, había finalizado en aborto donde el producto presentó un cordón umbilical muy delgado verde, líquido sanguinolento, no fétido y placenta friable.

El reporte de Gióno y Pérez Miravete, nos llevó a presumir que probablemente *Listeria monocytogenes* tenía una asociación con la presencia de aborto repetitivo; por lo que de las 1200 pacientes estudiadas se pudieron obtener en los archivos del hospital 275 datos acerca del número de abortos que habían presentado, en donde 113 de estos datos correspondieron a pacientes con problemas de aborto y fueron los que se consideraron en el análisis estadístico.

Utilizando la prueba estadística de Wilcoxon se puede decir que *Listeria monocytogenes* no tiene un efecto significativo con la presencia de aborto repetitivo.

Dentro de la literatura no se tiene más información en donde se relacione la presencia de *Listeria monocytogenes* con el aborto repetitivo con excepción del estudio de la Dra. Gióno (13).

IX CONCLUSIONES

En el Hospital de Ginecobstetricia No. 3 del Centro Médico la Raza, dentro del período que comprendió del 13 de febrero al 12 de agosto de 1991, la frecuencia encontrada de *Listeria monocytogenes* en 1200 muestras de exudados cervico-vaginales corresponde a un 0.08 %.

El medio cuya fórmula corresponde a 41 g. de Base agar Listeria-Brucella, 56 g. de extracto de levadura, 2.5 ml. de solución de Acriflavina [2.5 mg/ml] y 2.5 ml. de solución de Cefotaxidima [12.5 mg/ml] en 1000 ml de agua destilada; resultó ser un medio óptimo para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* y altamente selectivo, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos g (+) y g (-), presentes en la flora vaginal.

La identificación de *Listeria monocytogenes* corresponde a un coccobacilo g (+), agrupado generalmente en forma de empalizada, con motilidad positiva a 25 ° C y negativa a 37 ° C en gota suspendida y en medio MIO, catalasa (+), oxidasa (-), NO3 (-), indol (-), H2S (-), coagulasa (-), urea (-), arginina (+), VP (+) y CAMP (+).

Utilizando la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon, podemos concluir con un 95% de confianza que no existe un efecto significativo que relacione la presencia de aborto repetitivo con *Listeria monocytogenes*.

X BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albritton W.L., Cochi S.L. and Feeley J.C. Overview of neonatal listeriosis. Clin Inv Med. 1984; 7:311-314.
- 2.- Azcarate S.E. y Pérez M.A. Estudio sobre flora vaginal II. R Lat Microbiol. 1985; 6:51-62.
- 3.- Bannerman E.S. and Bille J. A new selective medium for isolation *Listeria s.p.p.* from heavily contaminated material. Appl Environ Microbiol. 1988; 54:165-167.
- 4.- Brackett E. R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Tech. 1988; 1:176-178.
- 5.- Calderón J.E., Arredondo J.L., Karchmer S. y Nasrallah E. 1988. Conceptos actuales de infectología perinatal. Editorial Cervantes, México D.F. p.c 317-324.
- 6.- Daguét G.L. 1987. Técnicas en bacteriología 1, 1a. ed. Editorial JIMS, Barcelona España, p.c 165-173.
- 7.- De la Cruz G.R. y Calderón J.E. Diagnóstico rápido de infecciones cervicovaginales. Infect. 1985; 1:115-120.
- 8.- Domínguez R.L. Isolation de microorganismes du genere *Listeria* a partir de lait crudestine ala consommation humaine. Can J Microbiol. 1985; 31:938-941.
- 9.- Doyle M.P. Effect of enviromental and proccesing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Tech. 1988; 40:169-171.
- 10.- Fleming D.W., Cochi S.L., Mac Donald K.L. Brondum J., Hayes P.S. , Pilikaytis B.D., Holmes M.B., Audurier A., Broome C.V. and Reingold A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N Eng J Med. 1985; 312:404-407.
- 11.- García A.G. 1993. Estudio retrospectivo de dos años en Microbiología de exudados cervicovaginales de pacientes con leucorrea adscritas a la unidad de medicina familiar No. 62. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma de México. Cuautitlan Izcalli, Edo. de México. p.c 1-3

- 12.- Gellin B.G., Claire M.D. and Broome M.D. Listeriosis. JAMA. 1989; 261:1313-1320.
- 13.- Giono C.S. y Solórzano S.F. Infecciones perinatales: *Listeria monocytogenes*. Infect. 1986; 6:140-143.
- 14.- Gray M.L. Genital listeriosis as cause of repeated abortion. Lancet 1960; 1:315-317.
- 15.- Gray M.L., Seeliger H.R. and Potel J. Perinatal infections to *Listeria monocytogenes*: Do these affect subsequent pregnancies? Clin Pediatr. 1983; 2:614-623.
- 16.- Hao A., Beuchat L.R. and Bracket R.E. Comparison of media and methods for detecting and enumeration *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage. Can J Microbiol. 1987; 31:955-957.
- 17.- Heyes P.S., Feeley J.C., Graves L.M., Ajello G.W. and Fleming D.W. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Appl Environ. Microbiol. 1986; 51:438-440.
- 18.- Jawetz E., J.L. Melnick and E.A. Adolberg. 1985. Microbiología médica 11ava ed. Editorial El manual moderno, México, D.F., 169-171.
- 19.- Jones G.L. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes*. The public by Health Service or by the V.S., Atlanta Georgia. 1989; pp.56.
- 20.- Lee W.H. and Mc Lain D. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. Appl Environ. Microbiol. 1986; 52:1215-1217.
- 21.- Leighton I. Use of selective agent for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Med Lab Sci 1979; 36:283-288.
- 22.- Linnan M.J., Mascola L., Xiao D.L., Goulet V., May S., Salminen C., Hird D.W. and Yonekura M.L. Epidemic listeriosis associated with Mexican-Style cheese. N Eng J Med. 1988; 319:823-28.
- 23.- Lovett J., Francis D.W. and Hant J.M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: deflection, incidence and pathogenicity. J. Food Prot. 1987; 50:188-192.
- 24.- Lovett J.F. and Hunt J.M. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Food Tech 1988; 9:172-175.

- 25.- Mac Gowan A.P., Reeves D.S. and Mc. Laughlin J. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. Lancet 1990; 336:513-514.
- 26.- Mardh P.A. The vaginal ecosystem. A J Obst Gynec. 1991; 165 II:1163-1167.
- 27.- Marth E.H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Tech. 1988; 42:176-178.
- 28.- Mavrothalassitis P. A method for the rapid isolation of *Listeria monocytogenes* from infected material. J Appl Bacteriol. 1977; 43:47-52.
- 29.- Mc. Bride M.E. and Girard K.F. A selective method for isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial population. J Lab Clin. 1960; 55:53-57.
- 30.- Mc. Lauchlin J. *Listeria monocytogenes* recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J Appl Bacteriol. 1987; 63:1-11.
- 31.- Miller M.A. and Leavell L.C. 1989 Manual de Anatomía y Fisiología 2a. ed. Editorial. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. p.c. 731-733.
- 32.- Pérez M.A. Estudios sobre flora vaginal. R Lab Microbiol. 1963; 6:51-62.
- 33.- Pine L. and Malcolm G.B. Physiological Studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. Can J Microbiol. 1989; 35:243-254.
- 34.- Pinner W. and Robert S.A. Role of Foods in sporadic listeriosis J.A.M.A. 1992; 267:2046-2050.
- 35.- Rappaport R., Rabinovitz M. and Toaff R. Genital listeriosis as a cause of repeated abortión. Lancet 1960; 1:1273-1275.
- 36.- Seeliger HPR. and Hohnek. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related specie in Bergun T. Norris J.R. eds. Methods in microbiology vol. 13 London: Academic Press 1979; 31-49.
- 37.- Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Allen A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E., King S.H., Nicholls E.S. and Broome C.V. Epidemic listeriosis-Evidence for transmission by food. N Eng J Med. 1983; 308:203-206.
- 38.- Schwartz B., Hexter D., Broome C.V., Hightower A.W., Hirschhorn R.B., Porter J.A., Hayes P.S., Bibb W.F., Lorber B. and Faris D.G. Investigation of an outbreak of listeriosis: New

hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. J Infect Dis. 1989; 159:680-685.

39.- Tessier F., Boville J. and Daguët G.L. Listeriosis and obstetrics: A review of ten years experience in a french maternity hospital. J Gynecol Obstet. 1986; 15:305-313.

40.-Walker S.J., Archer P. and Banks J.G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J Appl Bact. 1990; 68:157-162.

41.- Watkins J., and Sleath K.R. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge, and river water. J Appl Bacteriol. 1981; 50:1-9.

ANEXO 1. Valores de los datos experimentales utilizando la prueba de rangos con signos de Wilcoxon.

CASOS	ABORTOS y_i	LISTERIA x_i	$D_i = y_i - x_i $	D_i	RANGO D_i	R_i
1	1	0	1	1	35	35
2	1	0	1	1	35	35
3	4	0	4	4	109	109
4	1	0	1	1	35	35
5	1	0	1	1	35	35
6	2	0	2	2	81.5	81.5
7	1	0	1	1	35	35
8	1	0	1	1	35	35
9	1	0	1	1	35	35
10	1	0	1	1	35	35
11	1	0	1	1	35	35
12	1	0	1	1	35	35
13	2	0	2	2	81.5	81.5
14	1	0	1	1	35	35
15	3	0	3	3	100.5	100.5
16	1	0	1	1	35	35
17	4	0	4	4	109	109
18	5	0	5	5	111.5	111.5
19	1	0	1	1	35	35
20	3	0	3	3	100.5	100.5
21	2	0	2	2	81.5	81.5
22	1	0	1	1	35	35
23	1	0	1	1	35	35
24	1	0	1	1	35	35
25	3	0	3	3	100.5	100.5
26	3	0	3	3	100.5	100.5
27	1	0	1	1	35	35
28	3	0	3	3	100.5	100.5
29	2	0	2	2	81.5	81.5
30	1	0	1	1	35	35
31	2	0	2	2	81.5	81.5
32	1	0	1	1	35	35
33	3	0	3	3	100.5	100.5
34	2	0	2	2	81.5	81.5
35	1	0	1	1	35	35
36	1	0	1	1	35	35
37	1	0	1	1	35	35
38	1	0	1	1	35	35
39	1	0	1	1	35	35
40	2	0	2	2	81.5	81.5
41	2	0	2	2	81.5	81.5
42	2	0	2	2	81.5	81.5

43	1	0	1	1	35	35
44	1	0	1	1	35	35
45	3	0	3	3	100.5	100.5
46	3	0	3	3	100.5	100.5
47	2	0	2	2	81.5	81.5
48	3	0	3	3	100.5	100.5
49	1	0	1	1	35	35
50	1	0	1	1	35	35
51	2	0	2	2	81.5	81.5
52	3	0	3	3	100.5	100.5
53	1	0	1	1	35	35
54	1	0	1	1	35	35
55	1	0	1	1	35	35
56	1	0	1	1	35	35
57	1	0	1	1	35	35
58	1	0	1	1	35	35
59	2	0	2	2	81.5	81.5
60	1	0	1	1	35	35
61	2	0	2	2	81.5	81.5
62	2	0	2	2	81.5	81.5
63	2	0	2	2	81.5	81.5
64	1	0	1	1	35	35
65	1	0	1	1	35	35
66	2	0	2	2	81.5	81.5
67	1	0	1	1	35	35
68	1	0	1	1	35	35
69	6	0	6	6	113	113
70	2	0	2	2	81.5	81.5
71	1	0	1	1	35	35
72	2	0	2	2	81.5	81.5
73	1	0	1	1	35	35
74	1	0	1	1	35	35
75	1	0	1	1	35	35
76	1	0	1	1	35	35
77	1	0	1	1	35	35
78	1	0	1	1	35	35
79	1	0	1	1	35	35
80	1	0	1	1	35	35
81	2	0	2	2	81.5	81.5
82	1	0	1	1	35	35
83	1	0	1	1	35	35
84	2	0	2	2	81.5	81.5
85	1	0	1	1	35	35
86	3	0	3	3	100.5	100.5
87	1	0	1	1	35	35
88	1	0	1	1	35	35
89	1	0	1	1	35	35
90	2	0	2	2	81.5	81.5
91	2	0	2	2	81.5	81.5
92	1	0	1	1	35	35
93	1	0	1	1	35	35
94	1	0	1	1	35	35
95	1	0	1	1	35	35
96	1	0	1	1	35	35

97	1	0	1	1	35	35
98	1	0	1	1	35	35
99	1	0	1	1	35	35
100	1	0	1	1	35	35
101	1	0	1	1	35	35
102	1	0	1	1	35	35
103	1	0	1	1	35	35
104	1	0	1	1	35	35
105	3	0	3	3	100.5	100.5
106	2	0	2	2	81.5	81.5
107	5	0	5	5	111.5	111.5
108	3	0	3	3	100.5	100.5
109	1	0	1	1	35	35
110	3	0	3	3	100.5	100.5
111	4	1	3	3	100.5	100.5
112	1	0	1	1	35	35
113	2	0	2	2	81.5	81.5

ANEXO 2. Número de abortos presentados en 113 pacientes.

CASOS	ABORTOS
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1
6	1
7	1
8	1
9	1
10	1
11	1
12	1
13	1
14	1
15	1
16	1
17	1
18	1
19	1
20	1
21	1
22	1
23	1
24	1
25	1
26	1
27	1
28	1
29	1
30	1
31	1
32	1
33	1
34	1
35	1
36	1
37	1
38	1
39	1
40	1
41	1
42	1

43	1
44	1
45	1
46	1
47	1
48	1
49	1
50	1
51	1
52	1
53	1
54	1
55	1
56	1
57	1
58	1
59	1
60	1
61	1
62	1
63	1
64	1
65	1
66	1
67	1
68	1
69	1
70	2
71	2
72	2
73	2
74	2
75	2
76	2
77	2
78	2
79	2
80	2
81	2
82	2
83	2
84	2
85	2
86	2
87	2
88	2
89	2
90	2
91	2
92	2
93	2
94	3
95	3
96	3

97	3
98	3
99	3
100	3
101	3
102	3
103	3
104	3
105	3
106	3
107	3
108	4
109	4
110	4
111	5
112	5
113	6

i = casos con 1 aborto = 69

ii = casos con 2 abortos = 24

iii = casos con 3 abortos = 14

iv = casos con 4 abortos = 3

v = casos con 5 abortos = 2

vi = casos con 6 abortos = 1