

Universidad Católica de Temuco
Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias
Escuela de Medicina Veterinaria



SEROTIPIFICACION DE CEPAS DE Listeria monocytogenes
AISLADAS DESDE ALIMENTOS DISTRIBUIDOS EN LA CIUDAD DE
TEMUCO, IX REGION

**Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
grado de Licenciado en Ciencias
Veterinarias.**

Patricia Andrea Melgarejo Navarrete

**Temuco
Chile
2004**

TESIS REALIZADA CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA
DIRECCION DE INVESTIGACION DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO.

**“ESTUDIO PRELIMINAR DE LA PRESENCIA DE LISTERIA
MONOCYTOGENES EN LECHE CRUDA, SALCHICHA Y LECHUGAS EN
LA CIUDAD DE TEMUCO IX REGION”**

DIUCT 2001-3-03

Profesor Guía:

Oriana Betancourt G., Biol., Ms. Sc.

Escuela de Medicina Veterinaria

Universidad Católica de Temuco

Informantes:

Karen Villagrán A., TM.

Escuela de Medicina Veterinaria

Universidad Católica de Temuco

Horacio Gil Mujica M.V.

Ms. Sc. Salud Pública

Escuela de Medicina Veterinaria

Universidad Católica de Temuco

AGRADECIMIENTOS

Detrás del desarrollo de este trabajo de tesis hubo muchas vivencias, aprendizaje, agradecimientos y sentimientos de felicidad al poder concretar un camino intenso de estudio y poder ver el fruto de éste reflejado más que en un término, en el comienzo de una gran realización personal.

Quisiera dar mis sinceros agradecimientos a dos queridas personas, mi profesora guía en este trabajo, la Sra. Oriana, que me brindó apoyo, orientación, aporte, tiempo y paciencia. Muchas gracias también a la profesora Karen Villagrán, una persona con una disposición a ayudar admirable, una docente muy cálida que refleja su carisma en todo momento, y que me ayudo mucho a comprender que el orden y la dedicación en los trabajos que se emprendan, es muy importante, lo cual lo vi muy reflejado en ella. Gracias también al profesor Horacio Gil que es una persona muy agradable y siempre dispuesta a ayudar en lo que el pueda, gracias a los ayudantes de laboratorio de microbiología, a mis amigas Marcela, Danae y Dany que me ayudaron también aportando con su apoyo en alguna cosa de este proceso. Sin duda, agradezco especialmente y de todo corazón a mi familia, a mis padres, por su tan largo apoyo y cariño incondicional, que me han ayudado mucho a llevar a cabo este proceso de educación. Los quiero mucho.

Además quiero agradecer a mis hermanos por su ayuda técnica, a mi gran amor Ricardo que también me apoya desde la distancia y a una persona que me ayudó mandándome un paper que necesitaba mucho desde muy lejos sin conocerme, un científico que a pesar de su gran peso laboral me demostró preocupación y generosidad. Y, finalmente gracias a DIOS por darme la satisfacción de tener, conocer y rodearme de estas maravillosas personas.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 <i>Listeria spp.</i>	13
2.2 Especies del género <i>Listeria</i>.....	14
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>.....	15
2.3.1 Características microbiológicas.....	15
2.3.2 Patogenicidad y Virulencia.....	17
2.3.2.1 Determinantes genéticos de virulencia.....	18
2.3.3 EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.3.3.1 Reservorios y población en riesgo.....	19
2.3.3.2 Signos clínicos.....	21
2.3.3.3 Incidencia, tasa de mortalidad y brotes.....	22
2.3.3.4 Serovariedades y seroprevalencia en alimentos.....	24
2.3.4 Tipificación de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos.....	26
2.3.4.1 Serotipificación.....	27
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo General.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32

4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSION.....	44
7. CONCLUSIONES.....	60
8. BIBLIOGRAFIA.....	62
Páginas Web.....	69

INDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Serovariedades de la especie <i>Listeria monocytogenes</i>	30

INDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Estructura antigénica para cada serotipo de <i>L. monocytogenes</i>	39
2. Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> presentes en alimentos con resultado de hemólisis correspondiente.....	42

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Fotografía de microscopía electrónica de <i>L. monocytogenes</i>	16
2. Cepas replicadas y rotuladas de <i>L. monocytogenes</i> ,..... sembradas en agar T.S.A.	33
3. Set de antisuero. Antisuero-O: 8 tipos.....	34
4. Set de antisuero. Antisuero-H: 4 tipos.....	34
5. Suspensión de antígeno bacterial atenuado.....	36
6 y 7. Placa de vidrio cuadrículada con antisuero-O y antígeno bacterial.....	37
8. Siembra en tubo de colonias de <i>L. monocytogenes</i> ,..... en agar T.S.A. más solución fisiológica con formalina al 1%.	37
9. Suspensión bacterial, tubos de pruebas bioquímicas y antisuero-H.....	38
10. Tubos con antisuero-H y antígeno bacterial incubados..... a baño maría a 50°C.	38
11. 1). Aglutinación positiva, 2). Aglutinación negativa.....	41
12. Gráfico de distribución del total de cepas estudiadas.....	43
13. Imágenes de cepas (alta formadora de biofilm) en acero inoxidable..... (A) y PVC (C) y cepa (baja formadora de biofilm) en acero inoxidable (B) y PVC (D). Las grietas visibles bajo las células en panel B son artefactos en la superficie del acero inoxidable. Escala, 8.6 µm. Borucki y Col., (2003).	47

RESUMEN

El propósito de este estudio fue poder definir y dar a conocer la prevalencia y distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos en la ciudad de Temuco y sus alrededores, debido a la falta de información sobre este tema en la región y en el país. La serotipificación se realizó de acuerdo a la variación de antígenos somáticos (O) y flagelares (H), utilizando un set de antisuero comercial. Fueron analizadas 53 cepas, de las cuales 21 fueron positivas al antígeno somático y 10 positivas al antígeno flagelar. De estas últimas, sólo 6 coincidieron con la correcta nomenclatura en la variación de ambos antígenos para la determinación de serotipo. Se determinó la presencia y prevalencia del raro serotipo 4e en 3 cepas provenientes de longanizas fabricadas en la ciudad de Temuco, y una cepa de los serotipos virulentos 1/2a, 1/2b y 4b, los dos primeros aislados de longanizas y el último desde hortalizas. La presencia del serotipo 4e no coincidió con los serotipos comúnmente aislados de alimentos mencionados en la literatura, pero la presencia de los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b plantean una clara amenaza de un eventual brote particularmente en consumidores susceptibles. Estos resultados representan un importante desafío de prevención y control para las autoridades sanitarias. No obstante, se recomienda asegurar estos resultados con métodos de subtipificación más específicos y sensibles, como la subtipificación molecular.

SUMMARY

This research has a proposal to define and show the sero-prevalence, distribution and sero-type of *Listeria monocytogenes* isolated from food samples in Temuco city and its surroundings. This topic was developed due to the lack of information about this subject in the mentioned region and the whole country. The serotyping was done according to the somatic (o) and flagellar (H) antigen variation using a commercial anti-serum set. They were analyzed 53 strains, the results were, 21 reacted to the somatic antigen, 10 reacted to flagellar antigen and from this group just 6 coincided with the right nomenclature in the variation of both antigens. It can be determined the presence and prevalence of a strange serovar 4e in 3 coming from some sausages produced in Temuco city. There was a strain of virulent serotype 1/2a, 1/2b and 4b. The first and second resulted from sausages isolated and the third one resulted from vegetables. The serotype 4e presence did not coincide with the common food isolated serovar mentioned in the literature. However the presence of serotypes 1/2a, 1/2b and 4b, so it is clear there is a threat of an eventual out-break, specially in persons quite sensitive, that is why, there is a huge risk for public health for customers from this region. Thus, these results represent for public health authorities an enormous challenge for controlling and prevention. Nevertheless, it is recommended to certify these serotyping results through more specific and sensitive subtyping methods as a molecular subtyping.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones transmitidas por alimentos constituyen un problema importante de salud pública y como consecuencia de esto tiene grandes repercusiones económicas en la industria alimentaria. Es por ello que cada vez más se trata de buscar nuevas y mejores técnicas de diagnóstico para poder obtener respuestas y así enfrentar de la mejor forma posible problemas que afectan tanto a la salud humana como también a la animal.

Desde 1980 brotes importantes, epidémicos y esporádicos de listeriosis mayormente en países industrializados han sido causados por *L. monocytogenes* presente en alimentos. La listeriosis es una enfermedad causada por *Listeria monocytogenes*, una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, que puede encontrarse en el suelo, agua, vegetación, las heces del hombre y un gran número de animales. Este microorganismo, conocido patógeno de los animales en los cuales causa meningitis bacilar, abscesos viscerales y abortos, captó un creciente interés al incrementarse las publicaciones de casos asociados a la creciente población de pacientes inmunodeprimidos.

L. monocytogenes es un microorganismo saprofito muy extendido, que puede ser encontrado no sólo en asociación con suelo, plantas y desperdicios animales, sino también como un organismo persistente en alimentos. Todos estos ambientes son potenciales fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* en alimentos frescos, refrigerados y listos para comer que también pueden ser

contaminados durante su manufactura, procesamiento y empaquetado, lo que plantea un importante riesgo para la salud pública. Para minimizar este riesgo, se aplican actualmente métodos de subtipificación, que permiten revelar genética, epidemiología, ecología y evolución de *L. monocytogenes*. Existe una variedad de métodos convencionales fenotípicos y basados en ADN que son descritos para la diferenciación de *L. monocytogenes* más allá del nivel de especies o subespecies.

La tipificación serológica divide a *L. monocytogenes* en 13 serotipos en base a la variación de antígenos somáticos-O y flagelares-H, lo que permite determinar las rutas de contaminación del alimento. De entre los 13 serotipos que presenta la especie, los mayormente asociados a brotes de listeriosis transmitida por alimentos en la literatura corresponden al 1/2a, 1/2b y 4b, considerados como los más virulentos.

En Chile hay poca información sobre la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos y no existe notificación obligada de listeriosis, razón por la cual no es posible establecer el nivel de riesgo de brotes. Nuestro país no estará ajeno a estas restricciones después de los tratados de libre comercio suscritos. Habiéndose establecido que en Chile se carece de amplia información epidemiológica de base así como de métodos estandarizados de detección rápida que permitan tomar decisiones rápidas y adecuadas, y a que las características de desarrollo de la provincia de Cautín la convierten en población en riesgo de contraer listeriosis, se plantea la necesidad de caracterizar en este estudio serotipos aislados de alimentos en la provincia como una forma de aportar información de base que contribuya a la vigilancia de la listeriosis en nuestro país.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas más importantes de salud pública en el mundo contemporáneo y, además, afectan negativamente a la productividad económica (O.P.S., 1998). Las enfermedades transmitidas por alimentos, entre las que se consideran las toxiinfecciones alimentarias, resultan de la ingestión de una gran variedad de alimentos y /o agua, contaminados con microorganismos patógenos, toxinas microbianas o agentes químicos en cantidades que afecten la salud del consumidor. Se han descrito aproximadamente 250 enfermedades con agente causal conocido. Estos agentes incluyen virus, bacterias, parásitos, toxinas, metales y priones (SESMA, 2001). Entre ellas cabe mencionar el cólera, la salmonelosis, la listeriosis, infecciones debidas a *Eschericcia coli* enterohemorrágica y las intoxicaciones alimentarias causadas por contaminantes químicos (O.P.S., 1998).

Dentro de las enfermedades infecciosas bacterianas de origen alimentario cabe destacar a la “Listeriosis” como una rara pero severa enfermedad con una tasa de mortalidad de aproximadamente un 30%. Ésta enfermedad es causada por la bacteria *Listeria monocytogenes*, y estudios recientes muestran que el origen de casos esporádicos y epidémicos de listeriosis en humanos son principalmente de origen alimentario (Boerlin y Col., 1997).

2.1 *Listeria spp.*

El género *Listeria* consiste en un grupo de bacterias gram-positivas de bajo G+C estando estrechamente relacionado a *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*,

Streptococcus, y *Staphylococcus*. *Listeria spp.* es un bacilo anaerobio facultativo de 0.4 por 1 a 1.5 μm no formador de esporas, no tienen cápsula, y es móvil en 10 a 25° C. Es aislada desde una diversidad de fuentes medio ambientales, incluyendo suelo, agua, efluentes, una gran variedad de alimentos, y las heces de humanos y animales. A fines de los años setenta y a comienzo de los años ochenta, el número de reportes de aislamientos en *Listeria spp.* en el mundo comenzó a incrementarse, y desde 1983 en adelante, una serie de brotes epidémicos en humanos en Norte América y Europa claramente estableció a la listeriosis como una importante enfermedad de transmisión alimentaria. Los alimentos más frecuentemente implicados son quesos suaves y productos lácteos, patés y embutidos, pescado ahumado, ensaladas, “delicatessen”, y en general alimentos producidos industrialmente, productos refrigerados listos para servir que se comen sin cocinar o recalentar. Esto indica que *Listeria spp.* es una seria amenaza a la seguridad de los alimentos y la sitúa entre las categorías de microorganismos de mayor preocupación de la industria de los alimentos (Vázquez-Boland y col., 2001).

2.2 Especies del género *Listeria*.

El género *Listeria* contiene 6 especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, y *L. grayi*. Cada una de estas dos últimas, contiene dos subespecies. *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* son patogénicas para ratones y otros animales. Sólo *L. monocytogenes* es comúnmente asociada con listeriosis humana. Listeriosis asociada a infección por *L. ivanovii*, y lo mismo para *L. seeligeri*, es extremadamente rara en humanos (B.A.M., 2003).

2.3 *Listeria monocytogenes*.

El hombre y los animales se infectan con *Listeria monocytogenes* por diferentes vías que van desde la transplacentaria hasta la cutánea. En las últimas décadas ha llamado la atención la presentación de casos que adquirieron el agente patógeno a través de la ingesta de alimentos, atribuyéndose primordial importancia a *L. monocytogenes* como agente de enfermedad transmitida por alimentos (Gesche, 1989). Este patógeno fue asociado por años a la mujer embarazada y al recién nacido, sin embargo en 1981 se confirmó como patógeno alimentario (Cordano, 2000). Hoy en día se sabe que se trata de una zoonosis a la cual se le han asignado nombres tales como listeriosis, leucocitosis, mononucleosis, infección listérica o listeriasis (Acha y Szyfres, 1997).

2.3.1 Características Microbiológicas.

Listeria monocytogenes es una bacteria bacilar gram positiva, anaerobia facultativa que crece entre - 0.4 y 50° C (Figura 1). Es catalasa positiva y oxidasa negativa y expresa una β - hemolisina que produce zonas de hemólisis alrededor de las colonias en agar sangre (Farber y Peterkin, 1991). En las tinciones de Gram puede adoptar un aspecto cocoide o diplococoide y confundirse con neumococos, corynebacterias, estreptococos beta-hemolíticos y *Erysipelothrix rhusiopathiae* y más excepcionalmente con *Haemophilus spp.* (Pigrau, 2000). El organismo posee flagelos peritricos que otorgan motilidad, ocurriendo ésta sólo en un rango de temperatura estrecho. Cuando el organismo crece entre 20-25° C, la flagelina que compone a los flagelos, se ensambla a la superficie celular, pero a 37°C la producción de esta proteína se ve reducida notoriamente. Las colonias demuestran

una característica azul-verde brillante en agar de crecimiento debido a la oblicuidad transmitida por luz. El pH mínimo requerido para iniciación de crecimiento es de 5.0 a 5.7 a 4°C y desde 4.3 a 5.2 a 30°C. (Farber y Peterkin, 1991). La reacción de CAMP en sangre ovina y todas las cepas examinadas producen ácido desde L-ramnosa y α -metil-D-manosida. No produce ácido desde D-xilosa ni desde D-manitol (Seeliger y Jones, 1986). El medio de aislamiento selectivo diferencial para *Listeria monocytogenes* es el agar PALCAM que ha sido introducido como agar selectivo compañero para agar Oxford (oxa), reemplazando opcionalmente al agar Lithium chloride Phenylethanol Moxalactam (LPM) más esculina y Fe³⁺ o sólo LPM como requerimiento secundario al agar selectivo (B.A.M., 1995). Si bien los métodos difieren en los caldos de cultivo de pre-enriquecimiento y el agar selectivo empleados, los inhibidores de flora acompañante que utiliza, coinciden en gran medida (Gesche y Soto, 1991).



Fig. 1. Fotografía de microscopía electrónica de *L. monocytogenes*.

2.3.2 Patogenicidad y Virulencia.

L. monocytogenes ha emergido como un modelo de sistema para el estudio molecular de parasitismo intracelular. Esto permite la entrada dentro de una extensa variedad de células por fagocitosis (Dramsi y Cossart, 2002).

Lo central en esta patogénesis es una hemolisina listeriolisina O (LLO). La hemolisina de *L. monocytogenes* (LLO) es una citolisina similar en función y antigenicidad a la estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus pyogenes*, correspondiendo a la familia de toxinas dependientes del colesterol y formadoras de poros (CDTX). Una de las características claves de esta toxina es el bajo pH óptimo (5.5) y el estrecho rango de pH al cual es activa (4.5 a 6.5) (Vásquez-Boland y Col., 2001). Dentro de sus funciones está ser un potente factor de virulencia que es absolutamente necesario para la sobrevivencia y crecimiento intracelular. De esto hay muchas evidencias para sugerir que las funciones de LLO son lisar la membrana del fagosoma dejando libre al patógeno dentro de un relativamente buen ambiente dentro del citoplasma donde el crecimiento bacteriano puede proceder aún detectado por la inmunidad celular. Dentro de este ambiente subsecuentemente movilizan filamentos celulares de actina para motilidad y así pueden invadir directamente células vecinas sin una fase extracelular (Cormac y Colin, 2000).

LLO no sólo es un mediador en la lisis del fagosoma primario formado después de captar la bacteria extracelular, sino también requerida para el eficiente escape de *L. monocytogenes* desde la doble membrana vacuolar que se forma sobre la separación de célula a célula. Los poros o lesiones causadas por LLO probablemente facilitan el acceso de fosfolipasas de *Listeria* a sus sustratos,

conduciendo a la total disolución de las barreras físicas que delimitan el compartimento fagosomal (Vásquez-Boland y Col., 2001).

2.3.2.1 Determinantes genéticos de virulencia.

Los genes de virulencia de *L. monocytogenes* están localizados en un grupo que incluye genes que codifican a una proteína reguladora (PrfA), una fosfatidilinositol específica fosfolipasa C (PlcA), hemolisina (Hly), una metaloproteasa (Mpl), una polimerasa de actina (ActA) y una lecitinasa (PlcB).

El gen hemolisina *hly*, fue el primer determinante identificado y secuenciado en *Listeria* spp. La subsiguiente caracterización del locus *hly* condujo al descubrimiento del gen de virulencia en cuyo grupo deben estar muchos de los determinantes genéticos requeridos para el ciclo de vida intracelular patogénico de *Listeria* spp. (Vásquez- Boland y Col., 2001). Un locus separado codifica proteínas implicadas en la invasión celular, (InlA) y (InlB), como también las proteínas de estrés (ClpC) que están localizadas fuera de este grupo. La expresión de los genes de virulencia es estrictamente regulada por (PrfA) y un supuesto factor unido a PrfA, para asegurar que los genes sean expresados sólo cuando sea necesario.

Recientes evidencias indican que listeriolisina, PlcA y ClpC son expresadas en altos niveles dentro del fagosoma. Estas proteínas que son secretadas dentro del fagosoma de células hospederas representan antígenos candidatos para estimular una respuesta inmune celular (Cormac y Colin, 2000). Otra es otra proteína detectada exclusivamente en la superficie de la bacteria, que corresponde a una bacteriolisina y puede jugar un rol en la adhesión (Jacquet y Col., 2002). La proteína flagelar "flagelina" de *L. monocytogenes* es codificada por el gen (*flaA*). A continuación de *flaA*, dos genes (*cheY*) y (*cheA*), codifican productos homólogos a

las proteínas quimiotácticas de otras bacterias. Éstos productos facilitan el contacto inicial con las células epiteliales y contribuyen a la efectiva invasión celular (Dons y Col., 2004). También se ha descrito la clonación de tres genes de *L. monocytogenes* ItrA, ItrB, y ItrC, esenciales para el crecimiento de la bacteria a bajas temperaturas (4°C) pero prescindibles a altas temperaturas (Zheng y Kathariou, 1995). Recientemente fue identificada una proteína de 21.6 kDa inducida por estrés, designada (ClpP), requerida por *L. monocytogenes* para crecer bajo condiciones hostiles, esta actúa como una proteasa de serina y previene la acumulación de proteínas alteradas que podrían ser tóxicas para la bacteria bajo condiciones de estrés. En ausencia de ClpP la secreción de LLO funcional es reducida debido a que ClpP modula la producción inmune anti listeria (Gaillot y Col., 2001).

Por lo tanto, existe una amplia variedad de genes de virulencia codificando numerosas proteínas de superficie en *L. monocytogenes* que condicionan su patogenicidad y sobrevivencia en un amplio rango de ecosistemas.

2.3.3 EPIDEMIOLOGIA

2.3.3.1 Reservorios y población en riesgo.

L. monocytogenes es capaz de crecer sobre amplios rangos de temperatura (1 a 45°C), pH (pH 5 a 9), y osmolaridad (1 a 10% NaCl), que hacen a esta bacteria un agente contaminante ideal de los alimentos después de su procesamiento (Erdenlig y Col., 1999). *L. monocytogenes* ha demostrado sobrevivir bajo condiciones ácidas de pH (4.4), y resistir a altas concentraciones de NaCl (sobre 14%) y finalmente, aunque mesofílica, muchas cepas han demostrado permanecer

metabólicamente activas a temperaturas bajas como a 5°C, una temperatura a menudo usada durante el almacenamiento de alimentos (Bereksi y Col., 2002).

Por lo anterior, *L. monocytogenes* puede sobrevivir en alimentos por largos períodos de tiempo y constituyen reservorios de *L. monocytogenes* alimentos como la leche que se considera particularmente susceptible dado que las vacas en producción pueden eliminar listerias en concentraciones de 10 unidades por mL de leche o más. También otros alimentos la portan y es así como en USA, un estudio preliminar indica una contaminación con *L. monocytogenes* del 70% de la carne molida, 43% de cecinas de cerdo y 48% de pollos. Frutas y vegetales también se contaminan a través de la fertilización con guano de corral. No quedan ajenos a la contaminación los productos del mar, especialmente los moluscos filtradores que captan la listeria en las aguas contaminadas.

Dada la amplia distribución de *L. monocytogenes* en el medio ambiente, son múltiples las posibilidades de infección a través del suelo, agua, plantas, animales, insectos, aire y alimentos, sobre todo porque las personas que desarrollan la enfermedad continúan como portadores sanos eliminando el agente por las heces, por tiempo indefinido, existiendo así también la transmisión de hombre a hombre por la vía fecal-oral (Gesche, 1989). Casos descritos de brotes originados por la leche o por verdura contaminada con heces de animales listéricos demuestran que los animales pueden ser una importante fuente de infección (Acha y Szyfres, 1997). Se describe también transmisión nosocomial de *L. monocytogenes* a través de materiales, inoculación directa en caso de veterinarios, cuidadores de animales y agricultores (Cisternas y Col., 2002).

Aunque *L. monocytogenes* puede infectar a gente sana, las personas que presentan mayor riesgo son cualquiera de los extremos de vida (< 1 mes o > de 60 años de edad), embarazadas, o inmunocomprometidos en alguna forma (Taege, 1999; Wiedmann, 2002; Borucki y Call, 2003). En mujeres embarazadas se informa más del 25% de los casos, más comúnmente en el tercer trimestre de gestación, aunque la enfermedad ha sido informada en todos los trimestres. En los pacientes con alguna alteración maligna de inmunidad mediada celular se informa aproximadamente un 70% como infecciones no peri natales. La quimioterapia, receptores de trasplante de órganos, particularmente pacientes transplantados renales, tienen más riesgo por su estatus inmunodeprimido. Pacientes HIV positivos posiblemente tienen 150 veces más riesgo de listeriosis que otras personas. Otros grupos en riesgo son personas con diabetes, falla renal, abuso de alcohol, abuso de drogas endovenosas, hipoclorhidria y estados de sobrecarga de hierro (Taege, 1999).

En el caso del recién nacido, éste se contagia a partir de la madre por vía transplacentaria o durante el parto. Sin embargo el origen alimentario es sin duda el mecanismo de transmisión más frecuente, tanto en los casos esporádicos como epidémicos (Pigrau, 2000).

2.3.3.2 Signos clínicos.

Se presentan dos tipos de cuadros: el gastroentérico y el invasivo. El cuadro gastroentérico puede presentar desde portadores sin síntomas hasta individuos con signos gastrointestinales y el cuadro más severo, presenta severas manifestaciones invasivas (F.A.O., 2004). Los signos clínicos y síntomas al primer o segundo día después de la exposición pueden incluir fiebre, calambres abdominales, diarrea,

fatiga, dolor de cabeza y dolor muscular (Taege, 1999). Se presentan diversas formas clínicas de listeriosis tales como: Listeriosis de la mujer durante el embarazo (su consecuencia es el aborto), Listeriosis del recién nacido o granulomatosis infantiséptica, Meningoencefalitis y romboencefalitis por listeria que se presenta en neonatos y adultos mayores de 50 años, Listeriosis cutánea, Listeriosis septicémica con faringitis y mononucleosis, Listeriosis óculo glandular, Listeriosis cervicoglandular y otras formas de listeriosis que se describen como infecciones focales que provocan artritis, osteomielitis, abscesos espinales o cerebrales, peritonitis, colecistitis y endocarditis (Gesche, 1989).

L. monocytogenes puede ser un común colonizador perteneciente al tracto gastrointestinal humano pero con una pequeña inclinación a causar una infección invasiva a menos que estén presentes factores predisponentes del hospedero para causar la enfermedad infecciosa masiva, o la cantidad entregada al tracto intestinal sea suficientemente grande para destruir las barreras gastrointestinales locales como son el tejido linfoide de mucosas, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células plasmáticas que secretan principalmente IgA de secreción , todas las cuales cumplen un rol preventivo (Schlech, 2000).

2.3.3.3 Incidencia, tasa de mortalidad y brotes.

La incidencia de listeriosis humana es muy baja, normalmente alrededor de 2 a 8 casos esporádicos anuales por millón de la población en Europa y USA, con una tasa de mortalidad entre 13 y 34%. Específicamente en USA se estima que de 2.500 casos de listeriosis clínica al año, resultan aproximadamente 500 muertes (Wiedmann, 2002). Un alto índice puede ser informado para listeriosis esporádica (por ejemplo, 10.9 por millón de la población por año en Barcelona, España, y 14.7

en Francia), pero esto es excepcional. En situaciones epidémicas, la incidencia en la población susceptible incrementa por un factor de 3 a 10. De ésta manera, *L. monocytogenes* pareciera tener un bajo potencial patogénico que otros patógenos causantes de enfermedades alimentarias. Esto es coherente con la relativamente alta dosis letal (LD50) (Vásquez-Boland y Col., 2001).

No obstante de su baja prevalencia, los primeros casos de listeriosis humana fueron reportados en 1929 en Dinamarca. Sin embargo, el primer cultivo registrado de *L. monocytogenes* data desde 1921, con la bacteria aislada en Francia por Dumont y Cotonni desde un paciente con meningitis (Vásquez-Boland y Col., 2001). La inquietud por la acción patógena de *L. monocytogenes* como contaminante de alimentos surgió al presentarse, en el año 1981 en Canadá, un brote de listeriosis cuyo estudio epidemiológico determinó que se había producido por el consumo de coles cultivadas en suelos fertilizados con estiércol de animales diseminadores de listerias (Gesche y Ferrer, 1995). Recientemente dos brotes consecutivos de listeriosis en Francia entre octubre de 1999 y marzo del 2000, fueron detectados en el análisis de historias de alimentos de casos de pacientes y revisiones de datos que insinuaban una clase de "rilletes", un paté rico en productos de carne como vehículo de infección. El otro brote, un caso control estudiado, mostraba el consumo de gelatina de lengua de cerdo que fue fuertemente asociada a la infección con la cepa del brote de *L. monocytogenes* (De Valk y Col., 2001).

En Chile la listeriosis es una enfermedad al parecer de muy baja incidencia, y no se han detectado brotes epidémicos, o por lo menos, no se informan casos. Sin embargo, debido a su gravedad el Instituto de Salud Pública de Chile realizó un

estudio de aproximadamente 2.000 muestras de alimentos, detectándose presencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos (0,8%), helados de leche (3,5%), cecinas (3,6%) y en alto porcentaje de mariscos congelados (11,6%). Estos resultados son preocupantes pudiéndose presentar un eventual brote que, como en otros países, afectaría de preferencia a mujeres embarazadas, inmunocomprometidos, y a afectados de cirrosis u otras patologías crónicas (Cordano, 2000).

2.3.3.4 Serovariedades y seroprevalencia en humanos y alimentos.

Las cepas de *Listeria monocytogenes* exhiben la composición antigénica de serovariedades 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y serovariedad 7; esta última no ha sido estudiada extensivamente (Seeliger y Jones, 1986).

Si bien la listeriosis humana puede ser causada por 13 serovariedades de *L. monocytogenes*, las serovariedades 1/2a, 1/2b y 4b causan la mayoría de los casos. Si bien la serovariedad 4b predomina en la mayoría de Europa, aparece una distribución pareja de serovariedades 1/2a, 1/2b y 4b en Canadá y los Estados Unidos (Farber y Peterkin, 1991). Un número de casos de listeriosis causados por la ingesta de alimentos tales como queso, carne, helado y pescado han sido reportados a comienzo de los años ochenta y los serotipos de *Listeria monocytogenes* 1/2a, 1/2b y 4b han sido casi exclusivamente implicados en estos incidentes (Iida y Col., 1998).

El serotipo 4b de *Listeria monocytogenes* ha sido implicado en el 40% de los casos esporádicos de listeriosis y en mucho mayor porcentaje en epidemias de origen alimentario (Clark y Col., 2000). En aislamientos desde alimentos y muestras fecales envueltos en casos de brotes de gastroenteritis febril listerial ha sido encontrado el serogrupo 1/2 de *L. monocytogenes* (Sim y Col., 2002). *L.*

monocytogenes también ha sido aislada desde muestras de suelo y plantas, siendo los serotipos 1/2b y 4b los encontrados más frecuentemente (Schuchat y Col., 1991).

En alimentos, la mayoría de las cepas de *L. monocytogenes* obtenidas desde carne y aves de corral corresponden al serogrupo 1/2, con una pequeña proporción de serogrupos 3 y 4 aislados. El serogrupo 3 de *L. monocytogenes* es común en USA., mientras que los aislamientos del serogrupo 4 son raros. El serogrupo 1 es la serovariedad predominante encontrada en carnes en todo el mundo. Una excepción es el paté en Gran Bretaña, donde el serotipo 4b fue el aislado más frecuentemente durante una inspección en 1989. Aparentemente se observan diferencias geográficas en la distribución global de serotipos. En vegetales aparece el serogrupo 1 que es la serovariedad predominante de *L. monocytogenes* al igual que en las carnes (Farber y Peterkin, 1991). El serogrupo 1/2 ha sido encontrado más frecuentemente que el serogrupo 4 en leche cruda y queso (Jay, 2000), y el aislamiento de *L. monocytogenes* desde alimentos del mar corresponden todos a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b (Iida y Col., 1998).

Dos brotes de listeriosis fueron foco de atención en un potencial problema de salud de enfermedad por leche con *L. monocytogenes*. En 1983 un brote en Massachussets por leche pasteurizada fue incriminado como el vehículo, si bien *L. monocytogenes* fue aislada sólo de leche del tanque de enfriamiento, todos los pacientes aislados fueron serotipo 4b, mientras que una variedad de serotipos fueron aislados desde la leche. En un brote en California en 1985, un queso estilo Mexicano fue el vehículo. *L. monocytogenes*, serogrupo 4, fue aislado desde pacientes, del medio ambiente de la planta manufacturera y el queso (Lovett y Col.,

1987). Durante 11 años (1990-2001), fueron aislados los serotipos 1/2a (53%) y 4b (27%) de *L. monocytogenes* desde casos de listeriosis humana en Finlandia (Lukinmaa y Col., 2003). En 1999 un brote de *L. monocytogenes* serotipo 3a fue aislado desde pacientes y de mantequilla debido al consumo de ésta en Finlandia (Lyytikäinen y Col., 2000), y el último brote grave de listeriosis ocurrió entre Octubre de 1999 y Febrero del 2000, donde 42 casos de enfermedad causada por *L. monocytogenes*, serovariedad 4b, y aislada desde un tipo de "paté," fue identificada en departamentos fuera de Francia (De Valk y Col., 2001).

En Chile un estudio para control de rutina del Instituto de Salud Pública de Chile, demostró la presencia de numerosas variedades de *L. monocytogenes* en los alimentos chilenos. *L. monocytogenes* fue obtenida desde tres diferentes sabores de helado, cuyas cepas fueron serotipo 4b, 1/2a y 1/2b. Las cepas fueron caracterizadas por cinco diferentes serovariedades, con alta proporción del serogrupo 1. Cepas serovariedad 4b, 1/2a y 1/2b frecuentemente asociadas a listeriosis humana, fueron detectadas en alimentos lácteos y carnes; serotipo 1/2c en carne de pescado y mariscos; serotipo 3b fue encontrado exclusivamente en camarones (Cordano y Rocourt, 2001). En suma las tres serovariedades más prevalentes aisladas desde alimentos en orden decreciente, son 1/2a, 1/2b, y 4b, mientras que desde listeriosis humana, 4b, 1/2a, y 1/2b son las más prevalentes (Jay, 2000).

2.3.4 Tipificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

Los métodos de tipificación discriminatorios son esenciales para enlazar casos de listeriosis humana si se sospecha de alimentos (Unnerstad y Col., 1999).

Una variedad de métodos de subtipificación pueden ser usados para distinguir *L. monocytogenes* mas allá del nivel de especies (Nadon y Col., 2001). Los métodos convencionales de subtipificación fenotípica usados comúnmente para *L. monocytogenes* incluyen la serotipificación, fago tipificación, y electroforesis enzimática multilocus (MEE) (Wiedmann, 2002).

2.3.4.1 Serotipificación.

La identificación de una cepa es crítica para determinar la fuente o fuentes de infección, el índice de casos, el producto que origina el brote, o el foco de contaminación en una fábrica, como también la ruta de propagación de una infección pasada (F.A.O, 2001), y dado que las bacterias poseen antígenos característicos, los anticuerpos utilizados para su detección constituyen una potente herramienta diagnóstica como lo es la "Serotipificación". Es una técnica universal usada a veces como un prerrequisito para otros métodos de subtipificación, la cual posee una alta calidad confiable, y que es actualmente usada sólo en un pequeño número de laboratorios de referencia (Nadon y Col., 2001).

Estas pruebas serológicas pueden realizarse para identificar microorganismos con diferentes características: inertes frente a las pruebas bioquímicas, de crecimiento difícil o imposible, asociación a síndromes específicos o necesidad clínica de identificación rápida. Además, la determinación de los serotipos se emplea también con fines epidemiológicos. Por lo tanto, los anticuerpos se pueden utilizar como herramientas sensibles y específicas para detectar, identificar y cuantificar los antígenos de un virus, de una bacteria o de un parásito (Murray y Col., 2002).

Los estudios serológicos de valor usados en taxonomía bacteriana son divididos en dos amplias clases:

- a) Aquellos relacionados con la detección de diferencias o similitudes entre bacterias, basándose en la superficie celular y sus componentes antigénicos asociados (por ejemplo flagelos, pili, pared celular, membrana citoplasmática, cápsulas y capa mucosa); y
- b) el uso de antisueros obtenidos de enzimas purificadas para evaluar similitudes estructurales entre proteínas homólogas de bacterias diferentes (Jones y Krieg, 1986).

En relación a los estudios serológicos basados en la superficie celular bacteriana y sus componentes antigénicos asociados, la serología divide a *L. monocytogenes* sobre las bases de sus antígenos somáticos y flagelares (Nadon y Col., 2001).

Al ser *Listeria* una bacteria grampositiva, su pared celular está compuesta de alrededor de 35% de peptidoglicano al cual se unen de manera covalente ácidos tectoicos. Estos son polímeros hidrosolubles que contienen ribitol o residuos de glicerol unidos por enlaces fosfodiéster y que tienen uno o más aminoácidos o azúcares sustitutos (Brooks y Col., 2002). Los ácidos tectoicos se parecen en estructura y función a los lipopolisacáridos-O de la pared de las bacterias gramnegativas (Farber y Peterkin, 1991). Los polímeros de ácido tectoico de la pared celular de *L. monocytogenes* han mostrado inducir la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 α , IL-6, TNF- α en monocitos humanos (Vásquez-Boland y Col., 2001). Por lo tanto, los ácidos tectoicos son importantes antígenos de superficie de *L. monocytogenes*, y su accesibilidad a los anticuerpos se ha

considerado como evidencia de que se encuentran en la superficie exterior del peptidoglicano (Brooks y Col., 2002).

Otras importantes estructuras que cumplen un rol antigénico en *Listeria* son los flagelos. Estos son apéndices filiformes, largos y delgados, libres por un extremo y unidos a la célula bacteriana por otro, y compuestos en su totalidad por proteína. Son los órganos de la locomoción por las formas que poseen. Un flagelo está constituido por varios millares de moléculas de una subunidad proteínica denominada flagelina (Brooks y col., 2002). A ésta proteína "flagelina" se la conoce como antígeno H e induce la formación de anticuerpos específicos que permiten la serotipificación de una bacteria móvil (Vadillo y Col., 2002).

Uno de los primeros criterios por los cuales las especies de *L. monocytogenes* pudieron ser subdivididas fue la variación en las propiedades antigénicas de diversas subpoblaciones (Doumith y Col., 2004). El esquema comúnmente aceptado fue elaborado por Paterson (1940), este esquema fue refinado y extendido por Donker-Voet (1972), Seeliger (1975, 1976) y Seeliger y Höhne (1979) (Seeliger y Jones, 1986; Seeliger y Langer, 1989). Este esquema permite tipificar a *L. monocytogenes* de acuerdo a la variación de antígenos que dan lugar a 13 serovariedades; el antígeno somático-O otorga 13 clases de antígenos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, y el antígeno flagelar-H otorga 4 clases de antígenos: A, B, C, D. En suma, la designación de serotipo para *L. monocytogenes* se obtiene en base a la combinación de estos antígenos somáticos y flagelares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Serovariedades de la especie *Listeria monocytogenes*.

Designación		Antígenos O				Antígenos H		
Seeliger	Donker-Voet							
1/2a	I II (III)*					A B		
1/2b	I II (III)					A B C		
1/2c	I II (III)					B D		
3a	II (III) IV					A B		
3b	II (III) IV					(XII XIII)	A B C	
3c	II (III) IV					(XII XIII)	B D	
4a	(III) (V) V II IX					A B C		
4ab	(III) V VI V II IX X					A B C		
4b	(III) V VI					A B C		
4c	(III) V V II					A B C		
4d	(III) (V) VI V III					A B C		
4e	(III) V VI (V III) (IX)					A B C		
7?	(III)					XII XIII	A B C	

Fuente: Genus *Listeria* Pirie, H.P.R. Seeliger and Dorothy Jones. In: *Bergey's Analytical Manual*. ()*, no siempre presente.

De ésta forma en relación a los componentes somáticos de *L. monocytogenes* se relacionan estructuralmente dos tipos de ácidos tectoicos existentes entre los serotipos de *Listeria*. En el primero, residuos de ribitol están covalentemente unidos por enlaces fosfodiéster entre C-1 y C-5 y a veces se encuentra N- acetylglucosamina sustituida por C-2; este tipo es encontrado asociado con serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c, 3a, 3b y 3c, y 7. En el segundo N- acetylglucosamina es integrada dentro de la cadena; éste tipo es encontrado

asociado con serotipos 4a, 4b y 4d (Farber y Peterkin, 1991). Por lo tanto, en *L. monocytogenes*, los sustituyentes de azúcares de ácidos tectoicos muestran servir como receptores para fago serotipo específico y han demostrado ser fuertes inmunógenos (Clark y Col., 2000).

Una técnica serológica usada para la tipificación de *L. monocytogenes*, utilizando estos antígenos somáticos y flagelares, es la aglutinación, un inmunoensayo que se utiliza habitualmente para detectar anticuerpos específicos frente a antígenos particulados (Gershwin, 1994). Cuando el antisuero reacciona directamente con los componentes antigénicos somáticos o flagelares de las células se produce un agregado visible de bacterias, denominada reacción antígeno-anticuerpo y que da lugar a la reacción que se denomina *aglutinación directa* (Folch y Col., 2002) y es por la cual se determina la serovariedad de *L. monocytogenes*. El principio de medición se observa cuando el reactivo es mezclado con las cepas de *L. monocytogenes*, por lo tanto, cuando está el antígeno correspondiente para el reactivo se produce la aglutinación, macroscópicamente observada para determinar cada serotipo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

Caracterizar serológicamente cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas desde alimentos distribuidos en la ciudad de Temuco, IX Región.

3.2 Objetivos Específicos:

- Determinar serovariedad de cepas de *Listeria monocytogenes*, aisladas desde alimentos elaborados y comercializados en la ciudad de Temuco, mediante aglutinación en placa de vidrio y en tubo.
- Aportar información sobre seroprevalencia de aislamientos chilenos de *Listeria monocytogenes*.
- Relacionar aspectos serológicos de cepas con características ecológicas de la bacteria estableciendo posible relación con las rutas de contaminación de los alimentos.
- Determinar si el producto comercial usado para serotipificación permite discriminar serovariedades en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas en Chile (IX región).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Los procedimientos efectuados para cumplir con los objetivos del proyecto mencionados anteriormente fueron:

1. Cepas:

Se replicaron 53 cepas de los cultivos originales de *Listeria monocytogenes*, de las cuales 44 correspondían a cepas que habían sido aisladas en agar Palcam y Oxford desde longanizas procesadas y elaboradas en fábricas autorizadas para este fin en la ciudad de Temuco, y 9 aisladas desde hortalizas comercializadas en distintos puntos de la ciudad. Éstas se sembraron cada una en placas en agar T.S.A. para su mantención (Figura 2).

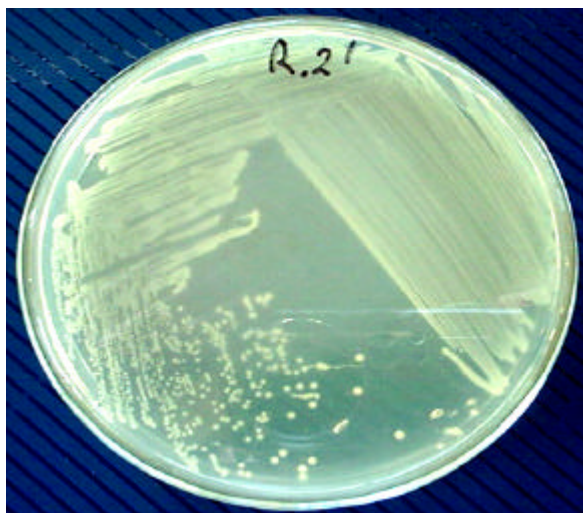


Fig. 2. Cepas replicadas y rotuladas de *L. monocytogenes*, sembradas en agar T.S.A.

2. Productos:

Se utilizó un antisuero comercial para listeria producido desde conejos y que contiene 0.08% de sodio ácido como un preservativo (Denka Seiken Co., Ltd). Los siguientes tipos de suero estaban provistos de 2mL de antisuero-O o 5mL de antisuero- H volúmenes en frascos con un gotario adherido y listo para usar.

El set completo consistía de 12 frascos individuales del antisuero.

Antisuero-O (III, I, IV, V/VI, VI, VII, VIII Y IX) 8 tipos (Figura 3).

Antisuero- H (A, AB, C y D) 4 tipos (Figura 4).



Fig. 3. Set de antisuero. Antisuero-O: 8 tipos.



Fig. 4. Set de antisuero. Antisuero-H: 4 tipos.

3. Principios de medición:

Cuando el reactivo fue mezclado con las cepas de *L. monocytogenes* y poseía antígenos correspondientes al reactivo, la reacción antígeno anticuerpo ocurrió y se produjo la aglutinación. Esta reacción se observó a simple vista para determinar cada serotipo.

4. Procedimientos:

Estos se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante del antisuero comercial (Denka Seiken Co., Ltd.).

- a. Material requerido: Vidrio deslizante, lápiz para vidrio, tubos pequeños de pruebas bioquímicas, pipeta y micropipeta, suero fisiológico con formalina al 1%, Baño maría (50° C), Autoclave (121° C).
- b. Preparación de reactivos: el antisuero estaba listo para usar.
- c. Especímenes: Cultivos derivados de cepas identificadas como *L. monocytogenes*.

~~4.1~~ **Determinación del antígeno- O**

La determinación del antígeno-O se llevó a cabo con bacterias inactivadas con suero fisiológico y formalina al 1% usando el método de aglutinación en una lámina de vidrio. Se preparó una suspensión densa de antígeno bacterial a partir de cultivo en agar T.S.A de las cuales se obtuvo un inóculo de colonias que se trasladaron a tubos de vidrio adicionándoles 2 ml de cloruro de sodio al 0.9% más formalina al 1% para ajustar la concentración de células a 10 mg/ml y atenuar la virulencia (Figura 5).



Fig. 5. Suspensión de antígeno bacterial atenuado.

- 1) Para comenzar, se colocó una gota de cada antisuero I/II, antisuero V/VI, y solución fisiológica salina (30?L) como control negativo, sobre una placa de vidrio cuadrada (Figura 6).
- 2) Se colocó una suspensión de antígeno para grupo O (5-10?L) con el antisuero y solución fisiológica en la placa de vidrio (Figura 7).
- 3) Se mezclaron los reactivos sobre la placa de vidrio ladeándola hacia atrás y hacia adelante por 1 minuto hasta observar la aglutinación típica.
- 4) Al encontrar un espécimen positivo a los test con antisuero I/II, se realizaron los pasos anteriores 1-3 usando antisuero I y IV. Del mismo modo a los especímenes positivos con antisuero V/VI se aplicaron los antisueros VI,VII,VIII y IX.

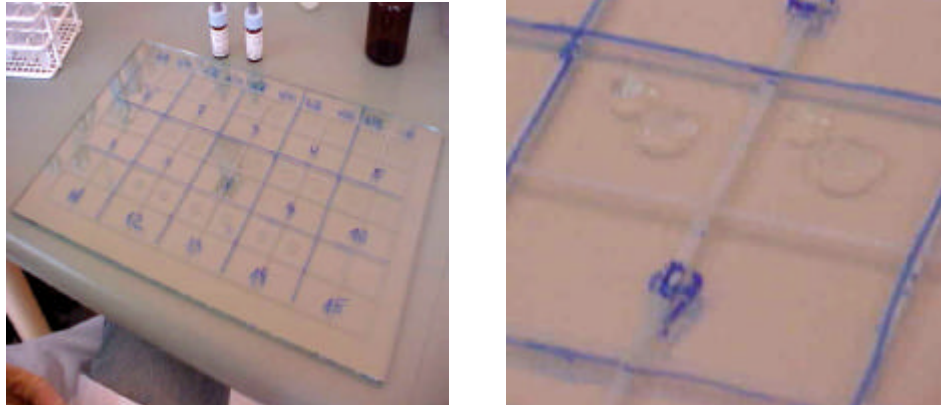


Fig. 6 y 7. Placa de vidrio cuadrículada con antisuero-O y antígeno bacterial.

~~D~~eterminación del antígeno H.

La determinación del antígeno H se llevó a cabo en tubos usando la prueba de aglutinación en medio líquido, observando una floculación típica. Se usaron las cepas que resultaron positivas a los factores antigénicos O somáticos.

1) Se preparó agar T.S.A en tubos, se sembró un inóculo de colonias de cada cepa en “pico de flauta”, se incubó a 30°C por toda la noche para su replicación y, a las cepas que crecieron en los tubos se les adicionaron 3 ml de solución fisiológica conteniendo formalina al 1% (Figura 8).



Fig. 8. Siembra en tubo de colonias de *L. monocytogenes* en agar T.S.A. más solución fisiológica con formalina al 1%.

2) Se colocó 1 ml de esta suspensión dentro de 4 tubos de pruebas bioquímicas, de cada cepa, y se adicionaron dos gotas de cada antisuero-H (A, AB, C, D) en los 4 tubos respectivamente, usando la jeringa adicionada en los contenedores (Figura 9).



Fig. 9. Suspensión bacteriana, tubos de pruebas bioquímicas y antisuero-H.

3) Después de mezclar completamente, se pusieron los tubos a baño maría (50°C) por 1 hora (Figura 11), y se observó con claridad si ocurrió floculación o no. Se tuvo cuidado de no agitar los tubos durante la observación vigilando la aglutinación ya que tendía a desvanecerse fácilmente. El nombre del antisuero que produjo aglutinación positiva fue tomado como el nombre del antígeno-H puesto por el test para *L. monocytogenes*.



Fig. 10. Tubos con antisuero-H y antígeno bacteriano incubados a baño maría a 50°C.

e. Interpretación de los resultados: El serotipo de *Listeria monocytogenes* fue interpretado de acuerdo a la combinación de factores -O antígenicos y factores- H antígenicos indicada por el fabricante (Tabla 1).

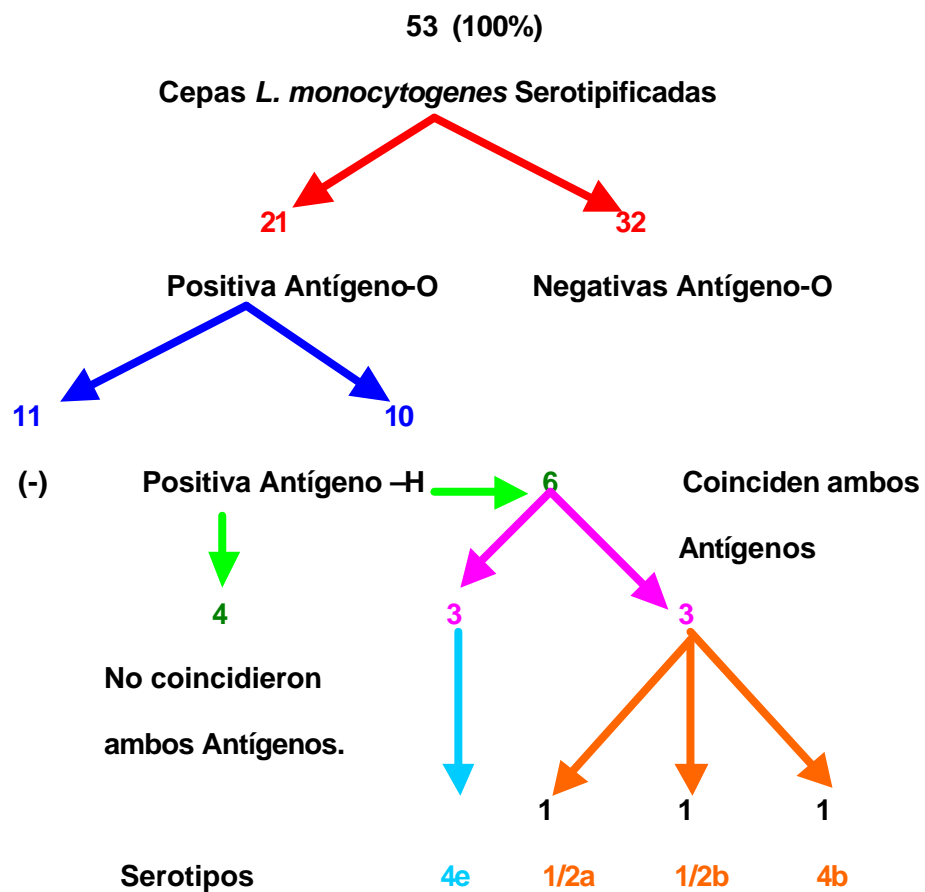
Tabla 1. Estructura antigénica para cada serotipo de *L. monocytogenes*.

Serotipo	Antígeno- O	Antígeno- H
1/2 a	I, II (III)	AB
1/2b	I, II (III)	ABC
1/2c	I, II (III)	BD
3a	II,(III),IV	AB
3b	II,(III),IV,(XII,XIII)	ABC
3c	II,(III),IV,(XII,XIII)	BD
4a	(III),(V),VII,IX	ABC
4ab	(III), V,VI,VII,IX,X	ABC
4b	(III), V,VI	ABC
4c	(III), V,VII	ABC
4d	(III),(V),VI,VIII	ABC
4e	(III), V,VI,(VIII),(IX)	ABC
7	(III),XII,XIII	ABC

Denka Seiken Co., Ltda. Tokio, Japan.

5. RESULTADOS

De 53 cepas serotipificadas de *Listeria monocytogenes*, 26 cepas resultaron negativas al antígeno somático-O y 21 cepas fueron positivas (Fig. 12), de las cuales 11 fueron negativas para algún antígeno flagelar- H y 10 fueron positivas. De estas últimas, 4 no coincidieron con ambos antígenos y las 6 restantes correspondieron al serotipo 4e, 1/2a y 1/2b en longanizas y una al 4b en hortalizas (Figura 13).



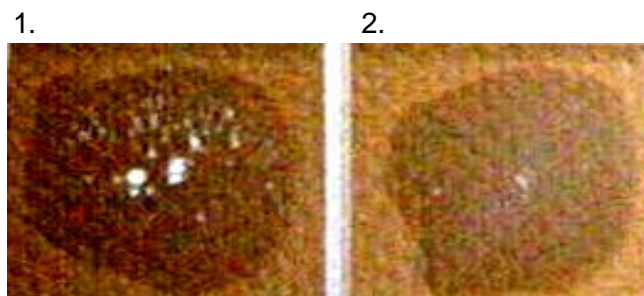


Fig. 11. 1). Aglutinación positiva.
2). Aglutinación negativa.

En cuanto al género *Listeria spp.*, sólo una cepa fue clasificada como *Listeria innocua* de acuerdo a pruebas bioquímicas realizadas y a la cual también se le aplicó la serotipificación y resultó ser positiva sólo al antígeno somático- O.

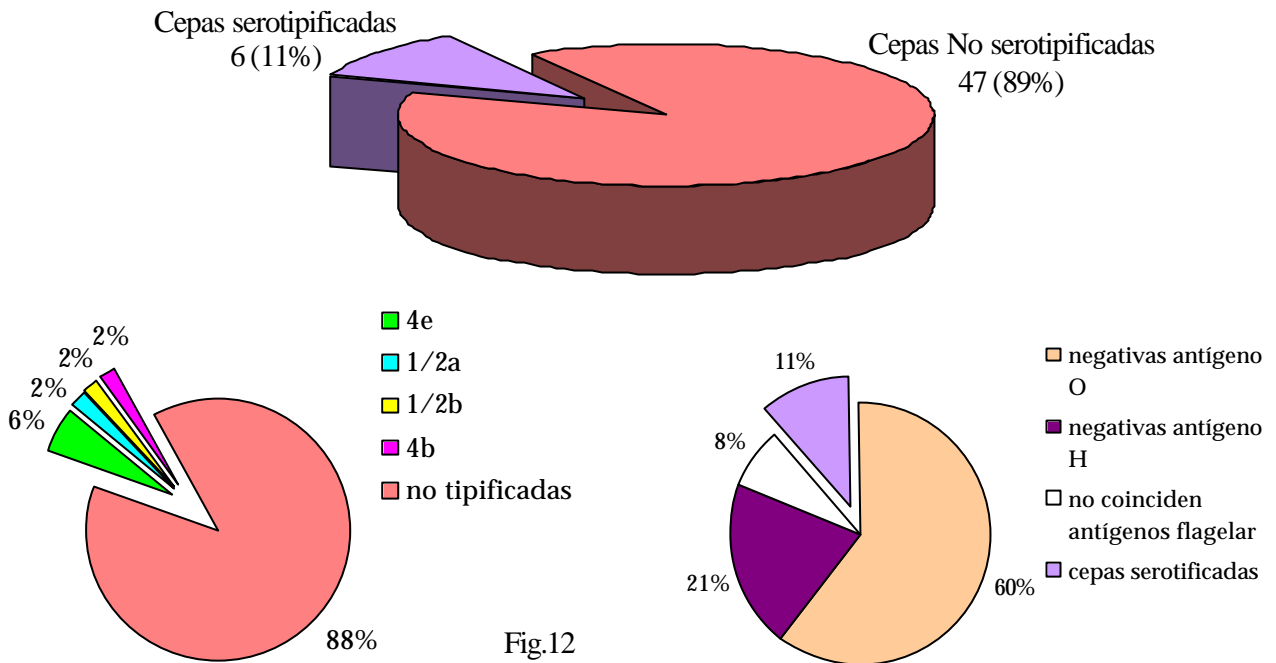
No obstante, ya que los resultados obtenidos no coincidieron en su totalidad con los serotipos de *Listeria monocytogenes* generalmente aislados de alimentos que se mencionan en la literatura, se corroboró la correspondencia de cepas de *L. monocytogenes* a través de la β - hemólisis y de ésta forma también se relacionaron las cepas β - hemolíticas más virulentas con un determinado serotipo.

Tabla 2. Serotipos de *L. monocytogenes* presentes en alimentos con resultado de hemólisis correspondiente.

<i>Cepa</i>	<i>Alimento</i>	<i>Serotipo</i>	β - Hemólisis
H1	Longaniza	4e	NEGATIVA
M2	Longaniza	4e	NEGATIVA
R3'	Longaniza	4e	NEGATIVA
B2	Longaniza	1/2a	POSITIVA
R1	Longaniza	1/2b	NEGATIVA
LG	Hortaliza	4b	NEGATIVA

Se pudo observar que en las placas de agar sangre hubo β - hemólisis con variantes en su expresión (fuerte ó débil) lo que concuerda con la descripción de las características de la bacteria. Sin embargo, algunas cepas tuvieron resultado negativo. De las cepas recuperadas y que coincidían con los serotipos encontrados, la cepa B2 aislada desde longaniza y serotificada como 1/2a, presentó una fuerte β -hemólisis (Tabla 2).

Total de Cepas Estudiadas



La figura 12 muestra los gráficos de torta que representan los resultados obtenidos de acuerdo al total de cepas estudiadas (53), de las cuales 6 (11%) fueron serotipificadas y 47 (89%) no pudieron serlo. Específicamente del 11% de cepas serotipificadas un 6% correspondieron a cepas serotipo 4e y 2% a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Del gráfico que representa específicamente un 89% de cepas no serotipificadas, estas correspondieron a un 60% de cepas negativas al antígeno-O, 21% positivas al antígeno-O y negativas al antígeno- H y un 8% positivas al antígeno- O pero no coincidieron con la totalidad de antígenos flagelares-H.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de éste estudio demuestran la presencia y prevalencia del serotipo 4e de *L. monocytogenes* en muestras de longanizas, y también de los serotipos más comunes y virulentos 1/2a y 1/2b causantes de brotes de listeriosis esporádica o epidemias alrededor del mundo mencionados en la literatura (Farber y Peterkin, 1991; Jay, 2000) en muestras de longanizas y el serotipo 4b muy patógeno para humanos, aislado desde hortalizas de la ciudad de Temuco.

Es así como en estudios internacionales, Lei y col., (1997), mencionan que raramente se ha aislado el serotipo 4e desde alimentos y casi nunca desde pacientes, lo que nos indicaría que el serotipo 4e no sería potencialmente patógeno. Sin embargo, entre la listeriosis asociada a serovariedades, las cepas serotipo 4b causan sobre el 50% de casos de listeriosis en el mundo, pero las cepas del grupo antigénico 1/2 (1/2a, 1/2b y 1/2c) predominan en aislamientos de alimentos. Vázquez-Boland y col. (2001), sugieren que la serovariedad 4b estaría más adaptada a tejidos mamíferos que las cepas del serogrupo 1/2. En cuanto a la distribución epidemiológica de los serotipos responsables de listeriosis humana y la estructura genética de las especies de *L. monocytogenes*, Mereghetti y col. (2004) sugieren que los serotipos 1/2b y 4b son una subpoblación genéticamente homogénea con un nivel similar de patogenicidad, y los serotipos 1/2a y 1/2c son genéticamente más heterogéneos son cepas compuestas con diferentes niveles de patogenicidad siendo menos patogénicas para humanos. En cuanto al serotipo 4e Lei y col. (1997), señalan que este es bastante raro y debido a la falta de disponibilidad de cepas no existe información acerca de la heterogenicidad genética

de este serotipo. Por lo tanto, ésta y otras referencias al respecto sugieren que la predilección de ciertos serotipos por tejidos mamíferos puede ser debida a diferencias en el tropismo patogénico entre cepas de *L. monocytogenes*, por lo que la presencia de los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b serían importantes indicadores de riesgo de contraer listeriosis a través del consumo de longanizas y hortalizas.

En cuanto a la distribución de los serotipos de *L. monocytogenes*, estos varían con la locación geográfica (Johnson y Col., 1990), por lo que los datos de prevalencia de serotipos recolectados desde países industrializados como Norte América y Europa, unido a la relativa escasez de datos de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* en nuestro país, hacen pensar que el origen geográfico de los datos no son un criterio viable de discriminación para la seroprevalencia de *L. monocytogenes* y que las generalizaciones sobre serotipos encontrados en otras áreas geográficas no son correlaciones confiables (Hitchins y Whiting, 2001). No obstante, la geografía y los modelos de temporalidad de distribución de las cepas de *L. monocytogenes* fueron estudiados por ribotipificación por Gendel y Ulaszek (2000), y los datos obtenidos sugerían que la población total de *L. monocytogenes* consistía de un número de cepas persistentes ampliamente distribuidas que frecuentemente coexistían en el medio ambiente. Es posible entonces que los modelos de distribución de las cepas en el medio ambiente sea dinámica variando con la geografía y temporalidad siendo de este modo una distribución muy importante desde el punto de vista epidemiológico, pero no para generalizaciones de seroprevalencia de *L. monocytogenes* en todo el mundo. Por esta razón nuestros resultados de seroprevalencia de serotipos 4e, 1/2a, 1/2b y 4b corresponderían a

nuestra realidad, coincidiendo algunos con los más reportados en la literatura en el resto del mundo, por su fuerte virulencia.

Además, existen factores involucrados en la habilidad de una cepa para causar brotes de enfermedad alimentaria, incluyendo la diferente habilidad a persistir en el medio ambiente que permite la contaminación de productos alimenticios. *L. monocytogenes* ha sido aislada de vegetales crudos y embutidos fermentados de carne cruda, encontrándose también en alimentos cocidos debido a la contaminación después de su procesamiento por resistir a altas temperaturas y a la refrigeración (F.D.A, 1999). A la vez, tiene la capacidad de adherirse y colonizar superficies produciendo una matriz tridimensional de sustancias extracelulares poliméricas (EPS) llamada biofilm que le permite resistir en el medioambiente, resistir desecación, rayos U.V y tratamientos con agentes antimicrobianos y sanitizantes (Borucki y Col., 2003). En lo concerniente a nuestro estudio, la posible formación de biofilm en utensilios y superficies utilizadas en el procesamiento en la fabricación de longanizas puede estar asociada a la contaminación de este alimento con los serotipos encontrados. Borucki y col. (2003), señalan que la formación de biofilms esta relacionada con una división filogenética pero no con cada serotipo y que existirían cepas persistentes mejores formadoras de biofilm que cepas no persistentes (Figura14). Por lo tanto, en el caso del hallazgo del serotipo 4e en muestras de longanizas puede que esta cepa sea más persistente y posea más afinidad a formar biofilms y resistir a condiciones de este alimento al igual que el serotipo 1/2a y 1/2b.

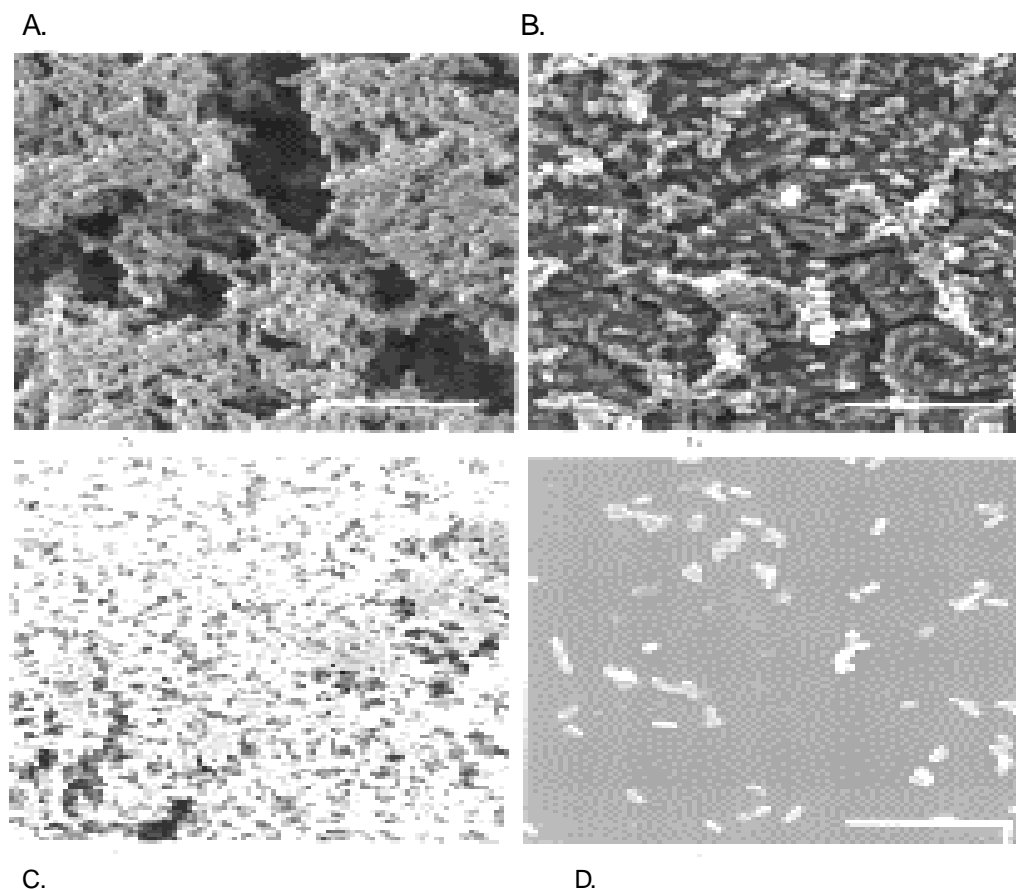


Fig 13. Imágenes de cepas (alta formadora de biofilm) en acero inoxidable (A) y PVC (C) y cepa (baja formadora de biofilm) en acero inoxidable (B) y PVC (D). Las grietas visibles bajo las células en panel B son artefactos en la superficie del acero inoxidable. Escala, 8.6 μm . Borucki y Col., (2003).

Aguado y col., (2001), establecen que la similaridad entre cepas de *L. monocytogenes* tienen un origen común, el cual en este estudio explicaría la presencia del serotipo 4e en distintas cepas del mismo alimento así como también la presencia de los serotipos 1/2a y 1/2b en longanizas. Este origen podría explicarse en base a distintos estudios que señalan que las manipulaciones post procesamiento son un importante factor que contribuye a la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos, especialmente en el caso del serotipo 1/2a que pudo

haberse transmitido por los manipuladores ya que este serotipo se encuentra presente en el humano. Junto a inadecuadas condiciones de almacenamiento que aumentan el nivel de riesgo. Estos estudios han confirmado la presencia de *L. monocytogenes* en zonas de producción y la carencia de estrictas prácticas durante el procesamiento en las industrias de alimentos resultan en brotes de la enfermedad (Aguado y Col., 2001). La limpieza del equipo usado es de especial atención cuando varios productos son procesados en la misma máquina y es bien reconocido que existe un alto riesgo de contaminación cruzada de un alimento durante su procesamiento y empaque (Lyytikäinen y Col., 2000). Por esta razón, otra ruta de contaminación cruzada con estos serotipos puede haber sido la carne usada en la fabricación de las longanizas donde el grupo antigénico 1/2 es más prevalente. Por lo tanto, la falta de higiene en las fábricas de longanizas, ya sea de maquinaria, manipulación o inadecuadas condiciones de almacenamiento, puede haber sido el vehículo para contaminar estos alimentos con estos serotipos.

El serotipo 4b, con gran afinidad y muy patógeno para el hombre, presente en nuestras hortalizas pudo haber llegado por contaminación directa del hombre a través de la manipulación o por contaminación cruzada desde otros alimentos durante el manejo, además los vegetales crecen en una variedad de climas y áreas geográficas, variando con respecto al pH, tipo de superficies, áreas, y presencia de colores naturales (Shearer y col., 2001), por lo que la presencia de estos serotipos puede considerarse una fotografía del momento en nuestros alimentos, pero aún así su presencia es un indicador muy importante de riesgo de listeriosis. La presencia de *L. monocytogenes* se considera como un indicador de pobre higiene en nuestros alimentos, lo que plantea un importante punto de prevención de enfermedad como

lo es la higiene de manipuladores, plantas procesadoras y de procedimientos de higiene en alimentos propiamente tal. Por lo tanto, la carencia de estos factores podría ser causa de la presencia de *L. monocytogenes* y, en particular de estos serotipos en los alimentos analizados. Sin embargo, para corroborar el origen de la contaminación y el porqué de la presencia de los serotipos, sería necesario comparar el serotipo de muestras aisladas desde pacientes con listeriosis.

El mayor problema en entender la listeriosis de origen alimentario desde las bases de la ciencia y las perspectivas regulatorias, gira en torno al rol jugado por los factores de virulencia de *L. monocytogenes* y cómo éste interactúa con la susceptibilidad del huésped para dar origen a la enfermedad (Raybourne, 2002). Existen evidencias que sugieren que la variación de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas desde alimentos y la variación de la susceptibilidad de la población huésped expuesta, juegan un gran rol en la incidencia observada y distribución de la listeriosis.

Doumith y col. (2004), considerando la evolución y los genes de virulencia de *L. monocytogenes* muestran que las cepas de *L. monocytogenes* difieren sustancialmente en el contenido de genes. Ello está relacionado con la habilidad de sobrevivir o desarrollarse equitativamente bajo severas condiciones de estrés y distintos ecosistemas y esto ha sido relacionado a la adaptación, por medio de la síntesis de un nuevo set de proteínas, composiciones de ácidos grasos, y principalmente resultado de algunas inusuales morfologías y modificaciones en la composición de las proteínas de superficie (Bereksi y Col, 2002). Específicamente la

habilidad de *Listeria* para colonizar y crecer en un amplio rango de ecosistemas se correlaciona con la presencia de 331 genes codificando diferentes transportes de proteínas, expresando 4 diferentes clases de proteínas de estrés (HrcA o sigmaB-dependiente, la familia Clp y los genes clase IV) (Glaser y Col., 2001).

A modo de ejemplo, Nelson y col., (2004) compararon el genoma total de una cepa de serotipo 1/2a (aislada de queso frankfurter) y dos cepas 4b (una aislada de queso y la otra de carne) de *L. monocytogenes*. Revelaron que el serotipo 1/2a posee un gen específico que incluye un operón que codifica ramnosa biosintética que es asociada con la biosíntesis de ácido tectoico, además de operones para cinco glicosil transferasas y una metiltransferasa adenina específica de DNA. También se encontró un nucleótido polimórfico de alta calidad (SNPs) en la secuencia corriente del genoma de cepas 4b (aislada de carne) y cepa 1/2a, al compararlas con la cepa 4b (aislada de queso). Los análisis comparativos del genoma total revelaron que los genomas de *L. monocytogenes* poseen todo el loci en el mismo cromosoma, con la mayoría de las diferencias genómicas consistentes en inserciones de fago, elementos cambiantes y SNPs. Por lo tanto, probablemente los genes específicos de los serotipos y el hecho que diferentes subgrupos de cepas de *L. monocytogenes* contengan diferentes set de proteínas de superficie contribuye a observar diferencias en patogenicidad y habilidad de los organismos a sobrevivir y crecer en diferentes hábitat. Por lo tanto, la presencia de los serotipos 4e, 1/2a, 1/2b y 4b presentes en las muestras analizadas de alimentos en nuestra región, sea debido a su capacidad de expresar diferentes proteínas de superficie y proteínas para el metabolismo de los azúcares que les permiten adaptarse y sobrevivir en nuestro hábitat, específicamente tomando en cuenta la presencia del serotipo 4e o

capacidad para llegar a causar enfermedad en el caso de los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b, lo que plantea un potencial riesgo para los consumidores de éstos alimentos en ésta ciudad.

Además del factor de genético que pudo haber o influido en los resultados de serotipos encontrados en la IX región, habría otro punto a considerar en esta variabilidad, debido a que múltiples cepas pueden estar en un solo alimento, y la eficacia de varias técnicas de aislamiento varían por cepa (Gendel y Ulaszek, 2000; Palumbo y Col., 2003). Por esta razón puede ser difícil establecer procedimientos de testeo que puedan medir este nivel de *L. monocytogenes* en alimentos complejos con apropiada precisión. La sensibilidad podría haber sido asegurada por el uso de múltiples protocolos de aislamiento, pero es difícil obtener una medida segura del número de células (Palumbo y col., 2003). Por lo tanto, la variabilidad en la identificación de serotipo pudo haberse originado porque los cultivos de *L. monocytogenes* analizados no hayan incluido todos los serotipos presentes en la muestra original debido a la variable sensibilidad de protocolos de aislamiento, y también por haberse obtenido más de una cepa de un serotipo en particular debido a haber seleccionado una o un pequeño número de colonias en el protocolo de aislamiento previos a la serotipificación.

Dentro de los factores que pudieron haber influido en no encontrar otros serotipos en las muestras analizadas estarían.

- Error en determinar si las cepas analizadas correspondieran a *L. monocytogenes* por hemólisis. De nuestros resultados sólo 1 cepa (B2), aislada desde longanizas

tuvo una fuerte capacidad β - hemolítica correspondiendo al serotipo 1/2a. El resto tuvo una β - hemólisis moderada o negativa dentro de las cuales se encontró que las cepas serotipo 4e, 1/2b y 4b fueron negativas a la hemólisis. Roche y col. (2003) proponen tres niveles de virulencia establecidos en cepas de *L. monocytogenes*: Virulentas, Hipovirulentas, y Avirulentas. Por lo tanto, estas cepas de *L. monocytogenes* podrían corresponder a hipovirulentas o avirulentas. Estas cepas también podrían corresponder a la especie *L. innocua*, que presenta una β -hemólisis mas débil que *L. monocytogenes*. A la vez cabe mencionar, que sólo 1 cepa fue clasificada como *Listeria innocua* de acuerdo a pruebas bioquímicas y de aislamiento hechas anteriormente, y a la cual también se le aplicó la serotipificación y resultó ser positiva sólo al antígeno somático-O. Esto último se podría explicar por reactividad cruzada de *L. innocua* con el antisuero para *L. monocytogenes* y, también según Doumith y col., (2004), por una estrecha relación filogenética entre ellas evolucionando desde un ancestro común por la identificación secuencias genéticas idénticas entre estas dos especies. A su vez, la posible presencia de *L. innocua* en las cepas testeadas es un buen indicador de la presencia de *L. monocytogenes* (LuisJuan-Morales y Col., 1995) ya que la fisiología y hábitat de las diferentes especies de *Listeria* son muy similares. Por ello cabe destacar que ciertos antígenos asociados a un serotipo en particular y las características genéticas de un grupo de cepas de *L. monocytogenes* (serotipos 4b, 4d y 4e) están presentes en ciertas cepas de *L. innocua*, no así otros serotipos (1/2a, 1/2b, 3a, etc.) (Lei y Col., 1997), por lo que en los resultados de serotipo 4e y 4b, estos podrían corresponder a cepas de *L. innocua*.

Otros aspectos que podrían explicar la ausencia de hemólisis en otras cepas es debido a la expresión para el gen *hlyA* ya que esta es altamente diversa entre diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Todas las cepas tienen un fenotipo hemolítico, pero cualquier evento resulta en la pérdida de este fenotipo o en una expresión no regulada y sólo una alteración de la proteína hace a listeriolisina más estable y, estudios en actividad enzimática, la cantidad de proteína producida y la expresión genética condicionan al gen *hlyA* β- hemolítico bajo diferentes condiciones ambientales. Por último, también es probable que exista una baja correlación entre la expresión del gen *hlyA* y el genotipo expresado por cada serovariedad y que esto pueda deberse a alteraciones genéticas (ej. mutaciones) adaptándose primero a la selección para estos caracteres, que son importantes para la sobrevivencia del organismo frente a cambios medioambientales (Rudi y Col., 2003).

Por lo tanto, desde este punto de vista, los resultados indicarían que podría haber un efecto del medio de crecimiento o cambios de temperatura que alterarían la expresión del nivel del gen *hlyA*, lo que se traduciría en una pérdida de la capacidad hemolítica de *L. monocytogenes* en estas cepas serotipos (4e, 1/2b y 4b) y por lo tanto, una pérdida o atenuación de su virulencia. Distintos estudios conducen a una correlación entre la cantidad y actividad hemolítica de listeriolisina O y virulencia (Rudi y Col., 2003), por lo tanto, claramente la cepa (B2) serotipo 1/2a que presentó una fuerte β- hemólisis es muy virulenta y está presente en alimentos como las longanizas lo que representa un riesgo al consumir estos productos.

- No expresión de las proteínas del flagelo (flagelina). El flagelo y la motilidad contribuyen a la virulencia de *L. monocytogenes* y la expresión de los genes de virulencia es termoregulada, con una alta expresión a 37°C más que a 20°C. La transcripción in vitro del gen *flaA*, (que codifica la flagelina), los genes quimiotácticos *cheY* y *cheA* y el ensamblaje de la flagelina a la superficie celular, se incrementan entre 20-25°C, mientras que su producción es marcadamente reducida a 37°C (Dons y Col., 2004), produciéndose por ello una supresión de la producción de flagelos de *L. monocytogenes* (Kathariari y Col., 1995). Por esta razón, existiría la posibilidad de una mutación estructural del flagelo por sensibilidad a cambios medio ambientales, es decir, el cambio en una base en el DNA del gen (*flaA*) que codifica a la proteína flagelina y probablemente envuelto también en el gatillamiento de la respuesta inmune (Dons y Col., 2004), lo que traería como consecuencia, por ejemplo, que la proteína a sintetizar en este caso flagelina no esté completa, debido a que en el procedimiento del test de serotipificación se trabajó con las cepas a una temperatura de incubación de 30°C y 50°C a baño María para ver la floculación correspondiente. Esta temperatura pudo haber sido perjudicial para la no producción de flagelos, por lo tanto, sería coherente también pensar que debido a esta supresión de motilidad flagelar por altas temperaturas, en las 6 cepas que sí se pudo detectar su antigenicidad flagelar como en los serotipos 1/2a, 1/2b, 4b y 4e, éstas serían más virulentas que las otras 15 cepas que no se serotipificaron por ausencia de antígeno flagelar, ya que sus flagelos estarían presentes por lo que conservarían la capacidad de movilizarse dentro de la célula infectada.

Por último, otra razón que podría explicar la carencia del antígeno flagelar en las 15 cepas restantes, corresponde a una alternativa en el modelo de evolución de la estructura de este antígeno dentro de la rama de *L. monocytogenes* y *L. innocua*.

En esta evolución, las serovariedades van perdiendo o adquiriendo genes, que le confieren la expresión de serogrupo específico asociado a antígenos serotipo específico (Doumith y Col., 2004) y estos cambios estructurales del flagelo cambiarían también los epítopes del antígeno que se unen a los respectivos anticuerpos para *L. monocytogenes*, y en este caso cambiando los epítopes para los anticuerpos estandarizados que se usaron en el test de antisuero comercial utilizado causando la no detección de otros posibles serotipos presentes en las cepas.

- Reacciones cruzadas del antisuero comercial con otros microorganismos. Los antisueros convencionales utilizados en la serotipificación son antisueros animales policlonales (Haliwell y Gorman, 1992) y por lo tanto, pueden reconocer muchos epítopes de un antígeno. En consecuencia cuando se emplea un antisuero policlonal, en un inmunoensayo como la serología y utilizado en este estudio, existe una probabilidad elevada de que se produzcan reacciones cruzadas no deseadas con otros microorganismos, obteniendo resultados falsos positivos desde la reactividad cruzada con otros géneros o *Listeria spp.* que si bien es cierto es una desventaja de la serotipificación.

Además el antisuero comercial utilizado poseía sólo 8 tipos de antígenos somáticos careciendo de los antígenos III, X, XII y XIII, por lo tanto faltarían otras combinaciones de esos antígenos con los antígenos flagelares para determinar otros serotipos. Por lo tanto, las reacciones de serotipo dependen entonces de la calidad del antisuero usado que dependen de las cepas estandarizadas y métodos de preparación de antígenos elegidos, por lo que la probabilidad de asignación insegura o inconsistente de serotipo aumenta cuando los laboratorios preparan su

propio antisuero, no especialmente para aislamientos clínicos (ej. no aquellos de serotipo 1/2a, 1/2b o 4b) (Palumbo y Col., 2003).

En cuanto al método de serotipificación utilizado, existiría la desventaja del tiempo que demora en realizarse, sumando el tiempo requerido para medio de enriquecimiento selectivo y aislamiento más una batería de más de 10 test morfológicos y bioquímicos que pueden tomar más de una semana (Chen y Chang, 1996). Además para el desarrollo del ensayo es necesario contar con personal experto y adiestrado en la técnica (Borucki y Call, 2003). Sin embargo, es una herramienta muy útil para determinar el predominio de serotipos específicos de *L. monocytogenes* en estudios epidemiológicos en alimentos y para un seguimiento de su localización ambiental.

Dentro de la técnica para serotipificar, un factor que pudo haber influido en los resultados es el método estándar de aglutinación en vidrio y en tubo, que debe ser realizado con agudeza visual y juicio para obtener datos seguros (Palumbo y Col., 2003); esta subjetividad puede ser una sustancial fuente de variabilidad al comparar datos entre individuos y un laboratorio y entre distintos laboratorios. Recientemente Palumbo y col., (2003), describieron un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas, un formato de serotipificación usado en conjunto con el kit comercial disponible, que hace a la serotipificación mucho menos cara, más eficiente y, por lo tanto, más accesible a la investigación y laboratorios clínicos.

En la actualidad, el comercio internacional de alimentos representa una actividad cada vez más importante en la provisión de regímenes alimentarios inocuos y nutritivos para las poblaciones del mundo, generando además una mayor variedad de productos en la oferta alimentaria y también proporcionando divisas a los países exportadores. Sin embargo según López y Avendaño (2000), ésta situación ha aumentado las posibilidades de transmisión de agentes infecciosos a raíz del aumento explosivo de la población y sus comportamientos o hábitos, los cambios tecnológicos a nivel de industrias de alimentos, el aumento considerable en el transporte de la población y de los alimentos, la adaptación de algunos microorganismos al ambiente y el desarrollo de resistencia a antimicrobianos han contribuido a producir cambios significativos en la epidemiología de las ETA, como por ejemplo la aparición de patógenos emergentes como es el caso de *L. monocytogenes*. No se trata entonces de agentes microbianos nuevos o recientemente descubiertos, si no que no se había demostrado su participación como patógenos que pudieran ser transmitidos por alimentos. Por ello es muy importante valorar los informes reportados por los distintos centros de salud en nuestro país y en nuestra región con respecto a los posibles casos de Listeria.

Lo más probable es que exista una subnotificación de casos de enfermedad alimentaria producidos por *L. monocytogenes* en nuestro país. Según el departamento de epidemiología del Servicio Nacional de Salud y Servicio de salud del Ambiente (SESMA), en el año 2000 fueron reportados en la región Metropolitana 260 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, de las cuales 176 no tuvieron diagnóstico, representando un 67%, según lo reportado por hospitales públicos (Prado y Col., 2002), porcentaje en el cual puede haber estado involucrada

L. monocytogenes como agente etiológico. Seguramente la gran mayoría de las personas no busca atención médica y no denuncia un brote de gastroenteritis, aún sabiendo que hay un grupo de personas afectadas, cuando la sintomatología no es severa. Por su parte los profesionales de los servicios de salud, especialmente en los servicios de urgencia no se sienten motivados a efectuar la notificación, restándole prioridad dentro de sus tareas asistenciales (Prado y Col., 2002). Por lo tanto, las falencias en la notificación de brotes dificulta realizar el estudio etiológico, ya que en muchas ocasiones la notificación es tardía y no es posible recolectar muestras de alimentos o de los pacientes involucrados. Por ello se deben duplicar los esfuerzos y así mejorar esta situación en nuestro país y en nuestra región, con el fin de obtener un diagnóstico más realista de ésta, y reforzar una vigilancia epidemiológica de los serotipos presentes, incorporando el estudio etiológico en los pacientes involucrados en brotes de toxi- infección alimentaria además de un estudio microbiológico de los alimentos.

Además del ámbito de la salud, en el ámbito económico los países en desarrollo como el nuestro, para acceder a los mercados internacionales debemos satisfacer los requisitos reglamentarios de los países importadores, ya que los productos que no reúnen estos requisitos son objeto de rechazos con perjuicio para la economía nacional. Más del 50% de los rechazos de los alimentos importados por EE.UU. son debidos a la falta de condiciones de higiene alimentaria básica y al incumplimiento en el etiquetado (F.A.O., 2001). Por ello, el gobierno ha de tomar todas las medidas necesarias para desarrollar una estrategia nacional de control de alimentos, de tal manera que las consideraciones de calidad e inocuidad de alimentos formen parte integrante del sistema de seguridad alimentaria dentro de las políticas de desarrollo

del país. Es necesario por lo tanto, establecer una estrecha colaboración entre Autoridades sanitarias, Universidades e Industrias de alimentos, para enfrentar eficazmente el desafío que significa la producción de alimentos seguros.

De éste estudio se puede concluir que están presentes en muestras de alimentos de la IX región, en hortalizas y longanizas artesanales, los serotipos 1/2a, 1/2b, 4b y 4e de *L. monocytogenes*.

Es probable que la IX región, una región con alto consumo de estos productos alimenticios y analizados en este estudio, con una importante seroprevalencia para estos agentes, pueda presentar algún brote de origen alimentario especialmente en individuos susceptibles. Por lo tanto, este trabajo aporta información epidemiológica en cuanto a la seroprevalencia de *L. monocytogenes* en estos alimentos, dejando en evidencia que las posibles rutas de contaminación estarían en la carencia de higiene tanto en la manufactura como en los procesos productivos en las fábricas de longanizas y carencia de procedimientos de higiene en alimentos propiamente tal, que llevarían a la contaminación cruzada entre alimentos o la contaminación por directa manipulación en este caso de hortalizas a través del ser humano. Esto plantea un comienzo para investigaciones epidemiológicas más acabadas, para corroborar las rutas de contaminación con *L. monocytogenes* en alimentos, a la vez que pone en evidencia a la comunidad y a las autoridades sanitarias del riesgo que significa la presencia de estos serotipos de *L. monocytogenes* al consumir hortalizas y longanizas artesanales en la IX región.

Por lo tanto, estos resultados también sugieren promover hábitos de higiene entre la comunidad que expende y consume estos alimentos y las empresas productoras de alimentos en la región.

7. CONCLUSIONES

1. De acuerdo a este estudio, se encuentra presente el raro serotipo 4e en 3 cepas provenientes de longanizas fabricadas en la ciudad de Temuco, y una cepa de los serotipos virulentos 1/2a, 1/2b y 4b, los dos primeros aislados de longanizas y el último desde hortalizas.
2. Las posibles rutas de contaminación con estos serotipos de *L. monocytogenes* estarían en la carencia de higiene tanto en manufactura como procesos productivos en las fábricas de longanizas y carencia de procedimientos de higiene en alimentos propiamente tal en hortalizas, que llevarían a contaminación cruzada entre alimentos o contaminación directa a través del hombre.
3. El método de tipificación serológica aplicado al análisis de las muestras de alimentos, fue adecuado para determinar los serotipos encontrados, no obstante, es subjetivo en la interpretación de los resultados debido a que el set de antisuero utilizado es preparado de acuerdo a cada laboratorio y no con cepas chilenas pudiendo esto dar lugar a resultados falsos positivos.
4. La serotipificación es ambigua, a veces variable dentro y entre laboratorios, sin embargo, es una herramienta muy útil para determinar el predominio de serotipos específicos de *L. monocytogenes* en estudios epidemiológicos en alimentos y para un seguimiento de su localización ambiental, objetivo logrado en éste estudio, lo que representa un importante desafío de prevención y control para

las autoridades sanitarias ante un eventual brote originado por el consumo de éstos alimentos en nuestra región.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Acha P., B. Szyfres.** 1997. Publicación científica N° 503. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Segunda Edición. O.P.S. / O.M.S. Washington, D.C., U.E.A. Pág. 121-127; 989 pp.
2. **Aguado V., A. Vitas, I. García-Jalón.** 2001. Random Amplified Polymorphic DNA Typing Applied to the Study of Cross- Contamination by *Listeria monocytogenes* in Processed Food Products. Journal of Food Protection. 64 (5): 716-720.
3. **Bereksi N., F. Gavini, T. Bénézec, C. Faille.** 2002. Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. Journal of Applied Microbiology. (92): 556- 565.
4. **Boerlin P., F. Boerlin-Petzold, E. Bannerman, J. Bille, T. Jemmi.** 1997. Typing *Listeria monocytogenes* Isolates from Fish Products and Human Listeriosis Cases. Applied and Environmental Microbiology. 63(4): 1338- 1343.
5. **Borucki M., D. Call.** 2003. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. Journal of Clinical Microbiology. 41 (12): 5537-5540.
6. **Borucki M., J. Peppin, D. White, F. Loge, D. Call.** 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. 69 (12): 7336-7342.
7. **Brooks G.F., J. Butel, S. Morse.** 2002. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª Edición. Editorial El Manual Moderno, México, D.F. Santa fe de Bogotá.
8. **Chen S., T. Chang.** 1996. Identification of *Listeria monocytogenes* Based on the Detection of a 68-Kilodalton Cell-Surface Antigen. Journal of Food Protection. 59 (11): 1176-1181.
9. **Cisternas A., N. Lagos, J. Galstuch, C. González, C. García, J. Díaz.** 2002. Infección por *Listeria monocytogenes* y Embarazo con Buen Resultado Perinatal. Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología. 67 (3):237-241.

10. **Clark E., I. Wesley, F. Fiedler, N. Promadej, S. Kathariou .** 2000. Absence of Serotype-Specific Surface Antigen and Altered Teichoic Acid Glycosylation among Epidemic-Associated Strains of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (10): 3856-3859.
11. **Cordano A., J. Rocourt.** 2001. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *International Journal of Food Microbiology*. (70): 175-178.
12. **Cormac G., M. Gahan, C. Hill.** 2000. The use of listeriolysin to identify in vivo induced genes in the Gram-positive intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. 36 (2): 498-507.
13. **Dramsi S., P. Cossart.** 2002. Listeriolysin O : a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *The Journal of Cell Biology*. 156 (6): 943-946.
14. **Dons L., E. Eriksson, Y. Jin, M. Rottenberg, K. Kristensson, C. Larsen, J. Bresciani, J. Olsen.** 2004. Role of Flagellin and the Two-Component CheA/CheY System of *Listeria monocytogenes* in Host Cell Invasión and Virulence. *Infection and Immunity*. 72 (6): 3237-3244.
15. **Doumith M., C. Cazalet, N. Simoes, L. Frangeul, C. Jacquet, F. Kunst, P. Martin, P. Cossart, P. Glaser, C. Buchrieser.** 2004. New Aspects Regarding Evolution and Virulence of *Listeria monocytogenes* Revealed by Comparative Genomics and DNA Arrays. *Infection and Immunity*. 72 (2): 1072-1083.
16. **Erdenlig S., A. J. Ainsworth, F. Austin.** 1999. Production of Monoclonal Antibodies to *Listeria monocytogenes* and Their Application To Determine the Virulence of Isolates from Channel Catfish. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (7): 2827-2832.
17. **F.A.O.**2001.ProyectoTCP/RLA/0065.Fortalecimiento de los comités nacionales del codex y aplicación de las normas del codex alimentarius. Santo Domingo, República Dominicana.

18. **F.A.O. Martínez I., D. James, H. Loréal.** Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. Distributed as an advanced copy of a FAO fisheries technical paper.
19. **F.D.A.** 1999. Risk Assessment of the Public Health Impact of Foodborne *Listeria monocytogenes*; Request for Comments and for Scientific Data and Information. Federal Register. 64 (88): 24661-24663.
20. **Folch H., P. Esquivel, M.I. Astorquiza, V. Leyán.** 2002. Fundamentos Generales de la Inmunología. Segunda Edición. Universidad Austral de Chile.
21. **Farber J., P. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. Microbiological Reviews. 55 (3): 476-511.
22. **Gaillot O., S. Bregenholt, F. Jaubert, J. Di Santo, P. Berche.** 2001. Stress-Induced ClpP Serine Protease of *Listeria monocytogenes* Is Essential for Induction of Listeriolysin O-Dependent Protective Immunity. Infection and Immunity. 69 (8): 4938-4943.
23. **Gendel S. M., J. Ulaszek.** 2000. Ribotype Analysis of Strain Distribution in *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 63 (2): 179-185.
24. **Gershwin, L.** 1994. Capítulo 2: Bases fisicoquímicas y biológica de la inmunidad. (En: Tratado de Microbiología Veterinaria. Biberstein, E. y Chung Zee, Y. 1ª Edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España). Pág. 25-38.
25. **Gesche, E.** 1989. *Listeria monocytogenes* como causal de enfermedad transmitida por alimentos. Fleischwirtsch, español. (2): 41-44.
26. **Gesche E., J. Ferrer.** 1995. Detección de *Listeria monocytogenes* en agua de mar y pescado provenientes de áreas de recolección de productos marinos. Alimentos. 20 (3.4): 87-90.

27. **Gesche E., E. Soto.** 1991. Evaluación de un método de aislamiento de *Listeria monocytogenes* de pescado contaminado *in vitro*. Acta Microbiológica. (3): 43-48.
28. **Glaser P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Domínguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. García del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gómez-López, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueño, A. Maitournam, J. Mata Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.C. Pérez-Díaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vázquez- Boland, H. Voss, J. Wehland, P. Cossart.** 2001. Comparative Genomics of *Listeria* Species. Science. (294): 849-852.
29. **Haliwell R., N. Gorman.** 1992. Inmunología Clínica Veterinaria. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España.
30. **Hitchins, A.** 1995. Chapter 10: *Listeria monocytogenes*. (In: Bacteriological Analytical Manual. 8ª Edition. AOAC International. U.S.A) 13pp.
31. **Hitchins A. D., R. C. Whiting.** 2001. Food- Borne *Listeria monocytogenes* risk assessment. Food Additives and Contaminants. 18 (12): 1108-1117.
32. **Iida T, M. Kanzaki, A. Nakama, Y. Kokubo, T. Maruyama, C. Kaneuchi.** 1998. Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans, Animals and Foods. J. Vet. Med. Sci. 60 (12): 1341-1343.
33. **Jacquet C., E. Guoin, D. Jeannel, P. Cossart, J. Rocourt.** 2002. Expression of Act A, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of Human and Food Origin. Applied and Environmental Microbiology. 68 (2): 616-622.
34. **Jay J. M.** 2000. Modern Food Microbiology. Chapter 25. 6ª Edición. Editorial An Aspen Publication Inc. Gaithersburg, Maryland. Pág. 485-506.
35. **Johnson J., M. Doyle, R. Cassens.** 1990. *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. in Meat and Meat Products A Review. Journal of Food Protection 53 (1): 81-91.

36. **Jones D., N. Krieg.** 1986. Serology and Chemotaxonomy. (In: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Vol I. Editorial Williams & wilkins. Baltimore. U.S.A.). Pág. 979-982.
37. **Kathariai S.** 1995. Repression of Motility and Flagellin Production at 37°C Is Stonger in *Listeria monocytogenes* Than in the Non-Pathogenic *L. Innocua*. Canadian Journal of Microbiology. (41): 572-577.
38. **Lei X.-H., N. Promadej, S. Kathariou.** 1997. DNA Fragments from Regions Involved in Surface Antigen Expression Specifically Identify *Listeria monocytogenes* Serovar 4 and a subset Thereof: Cluster IIB (Serotypes 4b, 4d, and 4e). Applied and Environmental Microbiology. 63 (3): 1077-1082.
39. **López V., S. Avendaño.** 2000. La microbiología y los alimentos. Anales de la Universidad de Chile. VI serie: N°11.
40. **Lovett J., D. Francis, J. Hunt.** 1987. *Listeria monocytogenes* in Raw Milk: Detection, Incidence, a Pathogenity. Journal of Food Protection. 50 (3): 188-192.
41. **Luis-Juan Morales A., R. Alaniz de la O., M.E. Vázquez-Sandoval, B.T. Rosas-Barbosa.** 1995. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Raw Milk in Guadalajara, México. Journal of Food Protection. 58 (10): 1139-1141.
42. **Lukinmaa S., M. Miettinen, U.M. Nakari, H. Korkeala, A. Siitonen.** 2003. *Listeria monocytogenes* Isolates from Invasive Infections: Variation of Sero-and Genotypes during an 11-Year Period in Finland. Journal of Clinical Microbiology. 41 (4): 1694-1700.
43. **Lyytikäinen O. et al.** 2000. An Outbreak of *Listeria monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in Finland. The Journal of Infectious Diseases. 181: 1838-1841.
44. **Mereghetti L., S. M. Roche, P. Lanotte, S. Watt, N. Van der Mee-Marquet, P. Velge, R. Quentin.** 2004. Virulence and Cord Blood Mononuclear Cells Cytokine Production Induced by Perinatal *Listeria monocytigenes* Strains from Different Phylogenetic Lineages. Biology of the Neonate. 86 (1): 66-72.

45. **Murray P., K. Rosenthal , G. Kobayashi , M. Pfaller.** 2002. Microbiología Médica. 4ª Edición. Editorial Elsevier S.A. Madrid, España. Pág. 7-10, 164-169, 241-243.
46. **Nadon C., D. Woodward , C. Young , F. Rodgers , M. Wiedmann.** 2001. Correlations between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*. Journal of Clinical Microbiology. 39 (7): 2704-2707.
47. **Nelson K. E. et al.** 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. Nucleic Acids Research. 32 (8): 2386-2395.
48. **Norton, D.** 2002. Polymerase Chain Reaction- Based Methods for Detection of *Listeria monocytogenes* : Toward Real- Time Screening for Food and Environmental Samples. Journal of AOAC International. 85 (2): 505- 515.
49. **Organización Panamericana de la Salud (O.P.S.).** 1998. Prevención y Diagnóstico de enfermedades. Informe Anual del Director. O.P.S. Washington D.C., Pág. 65-79.
50. **Palumbo J. D., Borucki M, R. Mandrell, L. Gorski.** 2003. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Identification of Mixed- Serotype Cultures by Colony Immunoblotting. Journal of Clinical Microbiology. 41 (2): 564-571.
51. **Pigrau, C.** 2000. Capítulo 286: Infecciones causadas por *Listeria* y *Erysipelothrix*. (En: Medicina Interna. Farreras, P y Rozman, C. Vol. II. 14ª Edición. Ediciones Harcourt, S.A. Madrid, España). Pág. 2623-2625.
52. **Prado V., V. Solari, I. Álvarez, C. Arellano, R. Vidal, M. Carreño, N. Madani, D. Fuentes, M. O' Ryan, V. Muñoz.** 2002. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. Revista Médica de Chile. 130 (5):
53. **Raybourne R. B.** 2002. Virulence Testing of *Listeria monocytogenes*. Journal of AOAC International. 85 (2): 516-523.

54. **Roche S., P. Gracieux, I. Albert, M. Gouali, C. Jacquet, P. Martin, P. Velge.** 2003. Experimental Validation of Low Virulence in Field Strains of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 71(6): 3429-3436.
55. **Rudi K., H. K. Nogva, K. Naterstad, S.M. Dromtorp, Bredholt and A. Holck.** 2003. Subtyping *Listeria monocytogenes* through the combined analyses of genotype and expression of the *hlyA* virulence determinant. *Journal of Applied Microbiology*. (94): 720-732.
56. **Schlech, W.** 2000. Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*. (31): 770-775.
57. **Schuchat A., B. Swaminathan, C. Broome.** 1991. Epidemiology of Human Listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4 (2): 169- 183.
58. **Seeliger H., D.Jones.** 1986. Genus *Listeria*. (In: *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol II. Editorial Williams & Wilkins. Baltimore. U.S.A). Pág. 1235-1245.
59. **Seeliger H., B. Langer.** 1989. Serological Analysis of the genus *Listeria*. Its values and limitations. *International Journal of Food Microbiology*. 8: 245-248.
60. **Shearer A, C. Strapp, R. Joerger.** 2001. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-Based System for Detection of *Salmonella Enteritidis*, *Eschericcia coli* O157:H7, *Listeria spp.*, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Fruits and Vegetables. *Journal of Food Protection*. 64(6): 788-795.
61. **Sim J., D.Hood, L. Finnie, M. Wilson, C. Graham, C. Brett, J. Hudson** .2002. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non- invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology*. (35): 409-413.
62. **Taege, A.** 1999. Listeriosis: Recognizing it, treating it, preventing it. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 66 (6): 375-380.
63. **Tompkin R. B.** 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. *Journal of Food Protection*. 65 (4): 709-725.

64. **Unnerstad H., I. Nilsson , H. Ericsson , M. Danielsson-Tham , J. Bille , E. Bannerman , W. Tham.** 1999. Division of *Listeria monocytogenes* Serovar 1/2a Strains into Two Groups by PCR and Restriction Enzyme Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (5): 2054 - 2056.
65. **Vadillo S., S. Píriz, E. Mateos.** 2002. *Manual de Microbiología Veterinaria*. Editorial MC Graw-Hill. Interamericana de España, S.A.V. Madrid, España.
66. **Valk H., V. de Vaillant , C. Jacquet , J. Rocourt , F. Le Querrec , F. Stainer, N. Quelquejeu , O. Pierre , V. Pierre , J. Desenclos, V. Goulet .** 2001. Two consecutive nationwide outbreaks of Listeriosis in France, October 1999- February 2000. *American Journal of Epidemiology*. 154 (10): 944- 950.
67. **Vázquez-Boland J., M. Kuhn , P. Berche , T. Chakraborty , G. Dominguez-Bernal, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, J. Kreft.** 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (3): 584-64.
68. **Wiedmann, M.** 2002. Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*. 85 (2): 524-531.
69. **Zheng W., S. Kathariou.** 1995. Differentiation of Epidemia- Associated Strains of *Listeria monocytogenes* by Restriction Fragment Length Polymorphism in a Gene Region Essential for Growth at Low Temperaturas (4°C). *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (12): 4310-4314.

Páginas Web:

1. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>
2. <http://www.sesma.cl>
3. http://www2.anales.uchile.cl/CDA/an_complex/0,1279,SCID%253D3504%2526ISID%253D7%2526ACT%253D0%2526PRT%253D3499.00.html
4. <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/es/health/diseases-cards/cards/listeria.html#top>
5. <http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-11.html>