

7. Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria

MANUEL DOMÍNGUEZ CARMONA

*Académico de Numero de la Real Academia Nacional de Farmacia.
Catedrático Emérito de la Universidad San Pablo*

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas tres décadas la listeriosis se ha convertido en los países desarrollados en una de las principales zoonosis emergentes de transmisión alimentaria. Los casos y brotes humanos de esta enfermedad se han asociado a la ingestión de alimentos muy diversos, como leche, queso, fiambres, patés, salchichas de tipo Francfort, mortadelas y similares, filetes empanados, pechugas rebozadas, gelatinas de recubrimiento y alimentos vegetales crudos y aderezados con distintas clases de salsas.

El primer caso humano descrito lo presentó un soldado en la I Guerra Mundial, si bien Gray y Killinger (1) en su ya clásica revisión sobre *Listeria monocytogenes* señalan que se conocen descripciones de esta bacteria desde finales del siglo XIX. Desde el caso citado y hasta 1950, se declararon esporádicamente algunos casos más, pero actualmente llegan a los 2.500-3.000 casos con una tasa de muertes de 500 personas/año (2).

La listeriosis es una enfermedad atípica, de origen alimentario, cuyo interés en salud pública deriva de alta letalidad (20-30% casos) que corrientemente afecta a inmunodeprimidos, con enfermedades subyacentes (SIDA, por ejemplo) que causan un deterioro manifiesto en la inmunidad mediada por linfocitos T.

Las listerias son microorganismos ubicuos que sobreviven mucho tiempo en los alimentos, suelo arable, excretas animales, cultivos de huerta y en el agua,

de aquí que constituyan una gran preocupación para la industria agroalimentaria. La gravedad y alta letalidad de la listeriosis humana exigen un control higiénico estricto, pero las características de su agente etiológico son tales que resulta irreal pretender que absolutamente todos los alimentos estén exentos de *L. monocytogenes* (3). Esta situación ha originado un vivo debate y afortunadamente también ha estimulado e impulsado las investigaciones sobre la listeriosis y su agente causal.

2. HISTORIA

El primer aislamiento y descripción del agente responsable de una infección listeriosa, que causó muchas muertes en conejos y cobayas, se realizó hace 83 años. Se trataba de un bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, que infectaba los monocitos sanguíneos, por lo que se denominó *Bacterium monocytogenes* (4). A finales del siglo XIX ya se habían descrito microorganismos (1) que afectaron a personas y animales. En 1930 se aisló una bacteria parecida del hígado de unos jerbos enfermos, que se llamó *Listerella hepatolytica*, en recuerdo homenaje del médico británico Sir Joseph Lister (1827-1912), quien en 1867 estableció las bases de la antisepsia en Cirugía, lo que permitió intervenciones quirúrgicas “limpias”. Sin embargo, como el nombre del género *Listerella* ya se había aplicado a un género de mohos productor de mucílago se cambió, lo mismo que el de la especie, por *Listeria monocytogenes* (5).

De las seis especies que comprende este género, solo son patógenas la *L. monocytogenes* y la *L. ivanovii*, que afecta principalmente a los animales. Las otras cuatro, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi* (sin. *murrayi*) son inocuas para la especie humana y para los animales (3). Hasta ahora se han descrito infecciones debidas a *L. monocytogenes* en una gran variedad de especies animales (vacas, ovejas, cobayas, conejos, jerbos y otros roedores, aves y peces), y también en la especie humana. Desde 1980 se han declarado y estudiado en Europa y América del Norte al menos cinco brotes de listeriosis debidos a la ingestión de alimentos (6). El primero ocurrió en Canadá y afectó a 34 recién nacidos y a 7 adultos, con una letalidad mayor del 28%. Pruebas epidemiológicas y cultivos bacterianos demostraron que en los adultos se debía a la ingestión de coles cultivadas en un campo abonado con estiércol de un rebaño de ovejas, varias de las cuales habían muerto de listeriosis.

En 1979 tuvo lugar un brote en Boston (EE.UU.) que afectó a 20 pacientes adultos de 8 hospitales (7). Aunque el alimento implicado no se estableció

analíticamente, todos los enfermos habían ingerido hortalizas crudas. En un brote posterior (Massachussetts, 1983) se vieron implicados 42 adultos y 2 bebés. Hubo 14 fallecimientos y la infección se atribuyó a la ingestión de leche pasteurizada de una granja, algunas de cuyas vacas padecían listeriosis. Aunque no se demostró fallo alguno en el proceso de pasteurización, quedó la duda de si *L. monocytogenes* resistió las temperaturas y tiempos de la pasteurización comercial de la leche.

Por último, el brote de California de 1985, que afectó a 93 bebés y a 49 adultos, muriendo 48 enfermos, alertó al mundo científico que se dispuso a investigar el rol que desempeñaban los alimentos en la difusión de la listeriosis. La cepa de *L. monocytogenes* responsable de este brote se aisló, en un queso blanco mejicano y en la fábrica donde se elaboró. El brote cesó cuando se retiró del mercado todo el lote de queso al que pertenecía el queso causante (8). En Europa un brote que duró de 1983 a 1987, afectó a 122 personas, la mitad de ellas eran bebés; se produjeron 31 fallecimientos se debió a un queso blando, del tipo del vacherin francés, cuya retirada del mercado terminó con el brote (9). De marzo a diciembre de 1992 se produjeron 279 casos de listeriosis humana en casi toda Francia, falleciendo 63 pacientes y abortando 32 mujeres embarazadas. El alimento responsable fue una conserva de lengua de cerdo recubierta de gelatina, de la que se aisló *L. monocytogenes* del serotipo 4b (10).

3. MICROBIOLOGÍA

3.1. Datos básicos

Las listerias son bacilos cortos, Gram positivos, catalasa positivos, anaerobios facultativos o microaerófilos. En ciertas ocasiones, poco frecuentes, originan formas cocoides separadas entre sí. Son móviles a 25 °C e inmóviles a temperaturas de 35 °C o mayores. Se mueven por flagelos cuyo componente principal es la proteína flagelina; los antígenos flagelares se conocen como antígenos H y los codifica el gen *fla A* cuya expresión es dosis-dependiente respecto de los factores medioambientales, generalmente alimentos, que contienen represores de la expresión del gen *fla A*. En algunas cepas los flagelos influyen en la adhesividad de las listerias al poliestireno, propiedad de gran interés práctico en la industria alimentaria (14). Las especies de *Listeria* se identifican basándose en sus características bioquímicas (producción de ácido a partir de D-xilosa, L-ramnosa, α -metil-D-manósido y D-manitol) y en las culturales (2, 3, 11). En la Tabla

TABLA 1. *Límites de crecimiento de Listeria monocytogenes (ICMSF, 1996).*

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura (°C)	-0,4	37	45
pH	4,39	7,0	9,4
Actividad de agua (aw)	0,92	—	—

Referencia 11: ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).

1 se muestran los límites de crecimiento de *L. monocytogenes* y en la Tabla 2 sus diferencias con otras especies. Otro detalle diferencial que distingue entre las especies no patógenas y *L. monocytogenes* es la capacidad de esta última de lisar los glóbulos rojos sanguíneos (3).

3.2. Identificación y tipificación

Cuando se investigan los brotes de listeriosis, los aislamientos de *L. monocytogenes* suelen caracterizarse más allá del nivel de especie, lo mismo que para ayudar a identificar las fuentes comunes de microorganismos, lo que se realiza con técnicas de huellas genéticas y de serotipificación molecular, incluida la electroforesis de las enzimas multiloculares (12, 13). El 95% de los aislamientos de víctimas de listeriosis pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Los CDC (Centros de Control y Prevención de Enfermedades de los EE.UU.) han establecido una red de laboratorios (los *PulseNet*) para subtipificar las bacterias patógenas usando métodos estandarizados de electroforesis en gel en campos pulsados (PFGE), que emplean corrientes eléctricas alternas para aumentar la resolución de las huellas genéticas. Comparando en Internet, los patrones de PFGE de los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos y procedentes de localidades distintas se pueden identificar los brotes que tienen un mismo origen.

La delección y las mutaciones del *flaA*, suprimen la movilidad bacteriana. La guanina y la citosina constituyen el 36 al 42% de sus nucleótidos. Con *microarrays* (microherramientas) se han identificado 126 genes reguladores de la fase exponencial del crecimiento y 670 que lo hacen en la fase estacionaria. Lo más relevante del genoma, es la familia de genes codificadores de peptidilarginina desiminasa, que se expresan mejor en anaerobiosis y a pH bajo, lo que permite a la bacteria tolerar los ácidos orgánicos y un pH bajo.

TABLA 2. Diferencias entre *L. monocytogenes* y otras especies del género *Listeria* (ICMSF, 1996).

Especie de <i>Listeria</i>	Fermentación de carbohidratos			Prueba de CAMP		Hemólisis β
	Manitol	L-Ramnosa	D-xilosa	SA	RE	
<i>monocytogenes</i>	-	+	-	+	-	+
<i>innocua</i>	-	+/-	-	-	-	-
<i>welshimeri</i>	-	+/-	+	-	-	-
<i>seeligeri</i>	-	-	+	+	-	+
<i>ivanovii</i>	-	-	+	-	+	+
<i>grayi</i> (<i>murrayi</i>)	+	+/-	-	-	-	-

Notas: 1. La prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) consiste en la aparición de una zona β -hemolítica típica en placas de agar sangre al sembrarlas en estría con *L. monocytogenes*, junto con *Staphylococcus aureus* (SA) y/o *Rhodococcus equi* (RE) e incubarlas 36-48 horas a 37 °C.

Las especies se identifican por hibridación de los ADN, por las secuencias del ARNr de 16S, por los enzimas multiloculares y por PCR multiplex. Como ya se ha dicho las especies patógenas son la *L. monocytogenes* hemolítica y la *L. ivanovii*. Ésta se adhiere e invade específicamente a las células WISH, derivadas de células amnióticas humanas, lisa la membrana del fagosoma, polimeriza la actina de la célula huésped, y puede extenderse de célula a célula con más eficiencia, siendo capaz de infectar al hombre y a los animales, aunque su supervivencia en las células WISH es menor que la de la *L. monocytogenes*; como la subespecie *londoniensis* pertenecen a la estirpe I. En la estirpe II se incluyen las poco invasoras o apatógenas *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi* (*L. murrayi*). En la estirpe III no hay especies patógenas. De las seis especies, solo *L. monocytogenes* constituye un problema sanitario, aunque es posible que otras especies consideradas apatógenas, como la muy extendida *L. innocua* no hemolítica, puedan infectar a organismos muy susceptibles; la misma *L. monocytogenes* es, en cierta medida, oportunística.

3.3. Subtipado, genómica y serovares

El subtipado molecular de la *L. monocytogenes* puso de manifiesto cuatro líneas a las que preferimos llamar estirpes, clones epidémicos o complejos clonales; son los llamados, EC I a IV, que más tarde se ampliaron a siete. En la

mayoría de las áreas geográficas, el 65% de las cepas son de la estirpe ECII, distinguible fácilmente de los otros EC. El 95% de las listeriosis humanas, esporádicas o de brotes se deben a los serovares, 1/2, 1/2a, 1/2b, 3b y sobre todo el 4b; solo el 5% corresponde a los serovares 1/2a, 1/2c, 4d, 3a y una fracción indiciaria a los otros 8 serovares de los cuales un 35% son ECI. El serovar 4b causa casi la mitad de las listeriosis humanas, siendo relativamente escaso su aislamiento en los alimentos.

Orsi *et al.* (16) secuenciaron los genomas de cuatro cepas de *L. monocytogenes* que correspondían a la estirpe I y a una cepa de *L. innocua* como patrón de la estirpe II. Entre los muchos tipos de ARN del operón de la *L. monocytogenes*, al menos 2 de los 50 con menos de 500 nucleótidos, intervienen en la virulencia para el ratón. Analizando la transcripción del genoma de *L. monocytogenes* se obtuvo un mapa completo del operón de la listeria y se descubrieron varios ARN anti sentido.

Las cepas de la especie *L. monocytogenes* se pueden identificar por su biotipo, tipo molecular y sobre todo por su serotipo, determinado por el método de Seeliger en el que se identifican 13 serovares o serovarietades y seguramente otros aún desconocidos. Hay serovares atípicos como el 4b que aislaron Vasconcelos y colaboradores (17) en el líquido cefalorraquídeo de un prematuro, que solo daba una banda de 691 pb con la técnica de la PCR-Multiplex. El 54%, de los 150 casos declarados en Austria entre 1997 y 2007 eran serovares 4b; el 31,3% pertenecían al 1/2; el 10% al 1/2b; el 2,7% al 1/2c; el 1,3% al 4d y el 0,7% al 4d (17).

3.4. Diferenciación de cepas

Dentro de cada serovar, se pueden diferenciar las cepas por fagotipado, por electroforesis de proteínas, o por la técnica de los enzimas multiloculares, que separa la *L. monocytogenes* en dos grupos, uno que comprende los serovares 4b y los 1/2b de origen humano, y el otro con los serovares 1/2, procedentes de los alimentos y del ambiente (13, 18), o la electroforesis en gel del ADN en campo pulsado, para subtipar cepas (PFGE), que separa las grandes moléculas de AND por medio de un campo eléctrico alterno, más resolutivo que la electroforesis en gel de agarosa. El pulsotipado permitió a Garrido *et al.* (19) adscribir 33 cepas aisladas de 40 enfermos hospitalizados en Navarra a 20 pulsotipos, técnica que en tres ocasiones permitió integrar casos esporádicos en un brote, aunque no pudieron incriminar al alimento responsable.

También son importantes el método del perfil de micro y macrorrestricción, con enzimas de incisión y la ampliación del ADN polimórfico (13). La huella genética por PCR y el polimorfismo del gen *actA* permitieron a Bania *et al.* (20) incluir al 61% de 36 cepas aisladas de alimentos y a 13 procedentes de enfermos, en la estirpe I, y al 3,1% en la estirpe II. La técnica de la huella genética por PCR discrimina más que el polimorfismo del gen *actA*.

En un estudio italiano realizado entre 2002 y 2005, se obtuvieron 674 aislamientos de *L. monocytogenes* a partir de enfermos humanos, 558 de alimentos diversos y 59 de muestras del ambiente. Se comprobó que había 11 serotipos que aparecían en los aislamientos de los tres orígenes (21). Los serotipos predominantes fueron los siguientes: 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b.

Incorporando sondas a PCR multiplex se han establecido, los genes *inlA*, *inlC* e *inlJ* que permiten determinar rápidamente la especie y la virulencia de las listerias. Liu *et al.* (22) identificaron con sondas *inlA*, a 36 cepas de *L. monocytogenes*, amplificando un fragmento de 800 pb y establecieron la virulencia en un fragmento de 517 pb y con sondas *inlC* e *inlJ* en fragmentos de 238 pb detectaron a las cepas patógenas de *L. monocytogenes*, con virulencia relativa de 30-100%, capaces de matar a ratones A/J inoculados intraperitonealmente mientras que daban resultados negativos con las cepas naturalmente apatógenas, con una virulencia relativa del 0%. No se emplean sondas con el gen *inlB* que permitirían reconocer características de especie, ya que no reconocen a las cepas de los serotipos 4a-e.

3.5. Filogenia

Las listerias proceden de un ancestro común, dotado del gen PAIs, se trata, probablemente de un saprofito con excepcionales aptitudes para supervivir. Probablemente las estirpes II y I proceden de la III, sin descartar que simultáneamente ocurra lo contrario y que algunas listeriosis saprofitas procedan de las patógenas. Así las listerias *innocua* y *welshimeri* surgieron al perderse o alterarse su LIPI-1. Curiosamente, la especie apatógena *Listeria innocua* exhibe los mismos patrones de genes relacionados con la virulencia, mientras que carece de varios ARN no codificadores.

La distribución filogenética de los serotipos indica que el serotipo 4b evolucionó a partir del 1/2b, el antepasado probable de la estirpe I. El serotipo 1/2c derivó del 1/2a, siendo un paso intermedio la cepa EGDe (1/2a). El factor de virulencia *internalinaA* (*InlA*) evolucionó por recombinación localizada produ-

ciendo un mosaico con evolución convergente, lo que indica una selección natural hacia una InlA truncada.

3.6. Cultivos e inoculaciones

Al ser un parásito celular, *L. monocytogenes* crece en muchos tipos de células en cultivo primario o de serie, como los fibroblastos, los hepatocitos Caco-2 y HepG2, las HBMEC procedentes de las células endoteliales de los capilares del cerebro humano y en las células epiteliales del intestino humano. Para que se desarrollen en medios sin células le deben enriquecer, como la infusión de corazón y cerebro o el medio de Omarova de aislamiento de listerias de muestras muy contaminadas como las obstétricas.

La inoculación de bacterias a diversas especies animales es un método microbiológico clásico. En el caso de *L. monocytogenes* se emplean casi siempre roedores, como el cobaya, el jerbilo o rata del desierto (*Gerbillus gerbillus*) y sobre todo ratones silvestres o modificados genéticamente por técnicas *knock-out* y *knock-in*, ya que los factores que median la invasión celular son específicos de especie. La *L. monocytogenes* se desarrolla en la membrana corioalantoidea y en saco vitelino del embrión de pollo. El pez cebra, *Danio rerio*, es un modelo útil y cómodo para estudiar muchas bacterias, entre ellas las listerias, ya que en los fagocitos de sus formas embrionaria y larvaria, pueden vivir y multiplicarse, siendo ópticamente accesibles, cuando el sistema inmune innato es ya efectivo. La inyección intravenosa de *L. monocytogenes* en las larvas causa una progresiva y letal infección, en la que las listerias son fagocitadas por los macrófagos y por los granulocitos (29). La inoculación de la *L. monocytogenes* puede hacerse por vía oral o digestiva (mimetizando la infección natural), por las vías respiratorias (con aerosoles o por sonda traqueal), peritoneal e intravenosa con lo que se soslaya la barrera gastrointestinal, que requiere la interacción de la InlA-E-caderina.

En Bélgica hay un Centro de referencia de Listerias, que identifica las cepas que se les envía.

4. INCIDENCIA

La listeriosis es una enfermedad rara, de la que se declaran anualmente en el mundo varios miles de casos, que solo representan una fracción de los

diagnosticados, que, a su vez, son una mínima parte de los casos reales. La incidencia, referida al millón de habitantes es en Europa, y en América del Norte es de 2 a 7. En España se han efectuado pocos estudios epidemiológicos, no obstante, Garrido *et al.* (19) registraron los datos de 40 enfermos hospitalizados en Navarra entre 1995 y 2005 (13 eran mujeres gestantes); su incidencia anual fue de 1,8 a 11,8 (media 6,8), aumentando en los tres últimos años.

La incidencia depende mucho de cómo y dónde se hizo la declaración, ya que difiere si se hace en la comunidad o en los hospitales, así como de la cultura sanitaria del país y su población, de la gravedad de cada caso, del criterio diagnóstico, de si se hace por vigilancia o por médicos centinela, etc. La baja incidencia de casos reales que al parecer tienen los países subdesarrollados se achaca al escaso desarrollo de la industria del frío y probablemente a no disponer de técnicas de diagnóstico etiológico.

La incidencia real depende fundamentalmente de la cantidad de alimentos conservados y listos para el consumo que se ingieran, de las técnicas y modo de procesar los alimentos y de las medidas de higiene tomadas en la industria alimentaria. Son muchos los factores que influyen en el aumento de casos de listeriosis y de otras enfermedades emergentes de transmisión alimentaria, entre los cuales tenemos:

- La inhibición y destrucción de los microorganismos alterantes de los alimentos bajo la acción de las tecnologías de conservación alimentaria. *L. monocytogenes*, que es un mal competidor, crece bien, sin embargo, a temperaturas de refrigeración, condición en la que no se desarrolla la flora bacteriana antagonista.
- La tendencia a fusionarse de las empresas agroalimentarias ha dado lugar a grandes plantas industriales centralizadas que deben extremar la vigilancia y control sanitario ya que cualquier fallo en seguridad y la calidad higiénica alcanza a un número de poblaciones y consumidores mucho mayor que antes de la fusión industrial.
- Los cambios demográficos de los países industrializados —que cuentan con un buen aporte alimentario y una medicina avanzada— han propiciado, un aumento de los grupos de riesgo (ancianos, inmunodeprimidos, enfermos de SIDA, pacientes de transplantes, de tratamientos anticancerígenos, etc.). *L. monocytogenes*, al ser un buen oportunista, ataca preferentemente a estos grupos de riesgo (sujetos débiles y con bajas defensas).

- La gran importancia de la refrigeración en la conservación, transporte y distribución de alimentos, favorece a *L. monocytogenes* por crecer mejor a temperaturas frías que son letales para sus microorganismos competidores.
- La tendencia creciente al consumo de alimentos mínimamente procesados y sin conservantes obliga igualmente a mantener una higiene óptima, meta ocasionalmente difícil de alcanzar.
- Las demandas de asociaciones de consumidores que exigen disponer de alimentos microbiológicamente seguros y de gran calidad, contar con métodos sensibles y fiables para la detección de brotes esporádicos y la disponibilidad de bases de datos computerizadas, huellas genéticas e Internet han permitido poner de manifiesto brotes y casos que hace algunos años habrían pasado desapercibidos.

El sistema de “cáterin” que centraliza la compra, preparación y distribución de alimentos fríos o precocinados, para atender a los pasajeros de aviones, barcos, autobuses, hospitales, centros escolares, comedores de empresas, etc., facilita y abarata los alimentos, pero puede extender las infecciones alimentarias incluso en personas muy alejadas entre sí territorialmente. En Mayo de 2003, dos pacientes adultos de un Servicio Oncológico de un Hospital inglés padecieron listeriosis causada por la misma cepa de *L. monocytogenes*, que había contaminado también a unos sandwiches preparados en un cáterin, que suministraba alimentos a otros hospitales en los que causó pequeños brotes (24).

5. RESERVORIOS Y FUENTES

Son numerosas las especies animales domésticas y silvestres que sirven de reservorio y sus heces de fuente de infección de listerias.

La repercusión clínica, así como la carga de listerias en los animales, varía mucho entre las diferentes especies y dentro de cada una hay diferencias individuales atribuibles a la inmunidad antibacteriana. Al igual que en la especie humana la afectación del SNC en los animales es muy relevante y como en el hombre puede causar romboencefalitis. Se ha visto, basándose en más de 200 casos de listeriosis en bovinos, ovinos y caprinos que la *L. monocytogenes* llega al SNC migrando por los axones del trigémino y de otros pares craneales. La consiguiente encefalitis se extiende a las regiones del cerebro rostral verosímilmente por migración axonal intracerebral.

Esteban *et al.* (25) aislaron en Vascongadas, una región con numerosos rebaños y granjas de rumiantes, *L. monocytogenes* en el 46,3% de las vacas lecheras, en el 30,6% de los vacunos de carne y en el 14,2% de los rebaños de ovejas, sin encontrar las listerias en ninguna de las 17 explotaciones porcinas estudiadas. El examen individual de los animales demostró que el 1,50% de 197 ovejas albergaba *L. monocytogenes*, lo mismo que el 21,3% de 221 bovinos. Al serotipar 114 cepas se demostró que el 84,2%, eran del complejo 4b, seguido por el 13,2% del 1/2.

En los rumiantes domésticos enfermos la *L. monocytogenes* se transmite, lo mismo que en las llamas y alpacas, por portadores intestinales. En los piensos, incluidos los ensilados, se han encontrado hasta 10^5 ufc por g.

La *L. monocytogenes* puede permanecer mucho tiempo viable acantonada en focos dispersos especialmente en la médula ósea. Hardy *et al.* (26) usando la bioluminiscencia encontraron en ratones inoculados, muchos focos listeriósicos pequeños, que no llegaban a formar granulomas ni infiltrados. Incluso las mutantes hly, altamente atenuadas, y con defectos de replicación intracelular pueden hacerlo durante varias semanas en los focos medulares. Skovgaard *et al.* (27) encontraron que el 24% de las muestras de carne de cerdo y de ganglios retrofaríngeos de bóvinos tenían *L. monocytogenes*.

En cuanto a otros animales se sabe que en Yugoslavia, el 45% de los cerdos sacrificados tenía *Listeria monocytogenes* en sus tonsilas. Los pollos de tipo broiler también estaban contaminados en el 60% de las muestras. Dutta *et al.* (28) atribuyeron a pavos infectados la probable contaminación de locales. Los pavos estresados por el frío padecen una infección transitoria, con colonización del hígado y de los tejidos sinoviales de la rodilla, la inoculación oral o respiratoria de la cepa Scott A tienen menor letalidad.

Fuentes humanas. Los enfermos con gastroenteritis listeriósica rara vez sirven de fuente aunque el 21%, de las excretas de los enfermos tengan 10^4 ufc/g, y el 18% de las personas que conviven con los enfermos excreten el mismo serovar de *L. monocytogenes* y del mismo perfil isoenzimático. Se han presentado algunos casos en convivientes, incluso en hospitalizados, que podrían deberse al mismo alimento. En todo caso es difícil o imposible señalar el caso índice (28). En España Gómez Mampaso en 1993 atribuyó a los adultos el 18%, para los varones y el 31% para las mujeres embarazadas, que llegó al 75% en las madres de niños listeriósicos.

Los enfermos y los portadores pueden contaminar el ambiente y a su vez contaminarse de éste.

El líquido amniótico puede contener unas 10^8 ufc/ml, que pueden contaminar paritorios, maternidades y todo el material, si no se limpia y desinfecta a fondo. Mascola *et al.* (28) demostraron en California que un brote, se habría debido a portadores fecales. *L. monocytogenes* se ha aislado de las secreciones cervicovaginales de puérperas, pero su papel transmisor es mínimo y, hasta ahora, no se ha encontrado *L. monocytogenes* en las secreciones orofaríngeas de personas sanas.

En los veterinarios y ganaderos se producen listeriosis cutáneas al atender el parto de vacas preñadas infectadas, por ello debiera reconocerse como una enfermedad profesional.

6. LISTERIOSIS Y ALIMENTOS

6.1. Alimentos listos para comer

Los alimentos que no requieren tratamiento culinario alguno antes de ingerirse (quesos, salami, salchichas Frankfurt, patés, etc.) constituyen un alto riesgo de contaminación listeriósica para ciertas industrias alimentarias y para los productos que fabrican (2, 29, 30). Dada su naturaleza estos productos deben mantenerse siempre bajo condiciones de frío (2-4 °C) hasta el momento de su consumo. Se ha visto en varias ocasiones que el 20-25% de los frigoríficos domésticos presentan temperaturas \geq de 10 °C, con lo que los alimentos que contienen no alcanzan temperaturas de refrigeración en su punto de enfriamiento más tardío. Por tanto, la refrigeración doméstica proporciona un ambiente donde *L. monocytogenes* compite, con éxito, contra los microorganismos mesófilos antagonistas (31).

6.2. Productos lácteos

La leche cruda es una fuente de *L. monocytogenes* a juzgar por el 2.5% de muestras de tanques de refrigeración que contienen esta bacteria (29). La pasteurización de la leche es el mejor método de higienización de la misma, junto con el procesado UHT, el más utilizado en la actualidad. Sin embargo, como la leche pasteurizada constituye un buen sustrato para el crecimiento de *L. monocytogenes* y dado que para conservarla debe mantenerse a temperaturas de refrigeración, según hemos señalado, si ocurriera algún fallo en el proceso (por

ejemplo, cierres defectuosos, tapas desplazadas, fisuras, etc.) podría contaminarse con listerias del ambiente, lo que acarrearía un gran aumento de su recuento que, solo en una semana de conservada a 6-7 °C, alcanzaría las 10⁸ ufc/ml (32).

En los quesos elaborados con leche con listerias viables, la *L. monocytogenes* sobrevive al proceso de elaboración por su resistencia al calor (hasta 40-45 °C), al frío (4-6 °C) y por su tolerancia a la sal. Durante la coagulación de la leche, las bacterias se concentran en la cuajada y dependiendo del tipo de queso, unas veces crecen (queso feta), otras se destruyen (queso cottage), en ocasiones desaparecen poco a poco (queso cheddar), otras crecen bien (camembert) y ocasionalmente su número disminuye rápidamente al madurar y luego se estabiliza (quesos azules). Las razones de este comportamiento se desconocen todavía (34). En las personas susceptibles a *L. monocytogenes* la ingestión de algunos quesos blandos es un factor de riesgo de padecer listeriosis.

6.3. Productos cárnicos

La contaminación de la carne y sus productos con *L. monocytogenes* se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones (27, 33) tanto en canales enteras, como despiezadas y lo mismo en las de rumiantes que en las de cerdos y aves. Entre los productos cárnicos más frecuentemente contaminados con *L. monocytogenes* destacan los siguientes: carne picada, pasta de salami, salchichas de pavo, mortadelas y otros fiambres. La contaminación más frecuente es la superficial, especialmente a nivel de matadero. La carne cruda picada y el paté figuran entre los productos cárnicos con mayor porcentaje de contaminación, que va desde menos del 1% hasta el 70%.

El desarrollo de *L. monocytogenes* en los productos cárnicos depende del pH, tipo de carne (magra o grasa), tipo y cantidad de microflora originaria, temperatura a la que han estado expuestas y presencia o ausencia de conservantes (35).

Las canales de aves (pollo tipo *broiler*, listo para comer, precocinado y refrigerado o congelado) suelen estar contaminadas y en ocasiones hasta el 60% de las muestras han resultado positivas (36). De todos modos los recuentos de *L. monocytogenes* de los productos cárnicos del comercio suelen ser bajos. El 80 al 90% de las muestras analizadas mostraban, desde menos de 10, hasta 100 ufc/ml. No obstante, en algunos productos cárnicos, listos para comer, e implicados en brotes de listeriosis se han señalado recuentos de listerias mucho mayores, hasta 10⁹ ufc/ml.

6.4. Pescados y mariscos

Listeria monocytogenes ha sido aislada de muchos productos marinos, incluidos crustáceos, moluscos y peces, tanto frescos, como congelados o procesados culinariamente y después refrigerados o congelados. La presencia de *L. monocytogenes* en los productos de pescado ahumado se ha detectado en el 25% de las muestras analizadas (37), porcentajes similares se han encontrado en mariscos listos para el consumo.

En langostas, bogavantes y camarones listos para comer se han encontrado cargas bacterianas bajas (desde 0,2 hasta 2 ufc/g) y en los filetes de pescado empanados y congelados, listos para el consumo, también (menos de 100 ufc/g), pero en el pescado ahumado han alcanzado cifras mucho más altas, hasta 10^4 ufc/g (3, 37). Durante la elaboración y almacenamiento de salmón ahumado se comprobó que el recuento de *L. monocytogenes* no variaba durante el marinado y el ahumado, pero durante su almacenamiento a 4-10 °C alcanzaba cargas microbianas mucho mayores (37).

6.5. Alimentos vegetales

De la mayoría de las hortalizas frescas (rábanos, pepinos, col, patatas, etc.) se han aislado cantidades generalmente bajas de *L. monocytogenes*. A diferencia de las hortalizas de acidez baja (lechuga, escarola, col), que son ingredientes corrientes de ensaladas, los tomates y zanahorias no son un buen sustrato para el crecimiento y multiplicación de *L. monocytogenes* (2, 3, 38, 39). La contaminación de estos alimentos acaece a partir del suelo, el agua, el estiércol animal, la vegetación en descomposición y los efluentes de las aguas residuales de plantas de tratamiento y potabilización del agua.

6.6. Otros productos

Investigando carnes envasadas al vacío se comprobó que el 53% de ellas estaban contaminadas con *L. monocytogenes* (35) y que un 4% contenía más de 1000 ufc/g (una cantidad excesiva para alimentos listos para el consumo). Esto confirmaba, de nuevo, que el crecimiento de este anaerobio facultativo no se afectaba por su envasado a vacío. Otros trabajos con jugo de carne, pollo crudo y pollo empanado precocinado también demostraron que las atmósferas modificadas protegían contra el desarrollo de *L. monocytogenes* (33, 35, 36).

Son muchas las células supervivientes de *L. monocytogenes* que se lesionan o dañan por calentamiento, congelación u otros tratamientos. Las *L. monocytogenes* expuestas al estrés calórico son menos patógenas que las no estresadas, debido a que la energía que normalmente se dedica a la patogénesis se dirige a contrarrestar a los agentes estresantes. En agar no selectivo (o en un alimento) las células dañadas pueden reparar sus lesiones producidas por el estrés y crecen de nuevo. Si estas células se someten a un estrés adicional en agar selectivo o en el alimento, probablemente no se recuperen.

7. AMBIENTE Y LISTERIA MONOCYTOGENES

La *L. monocytogenes* es muy ubicua, como ya se ha dicho. Sobrevive 500 días en tierra húmeda. En heces o en aguas residuales a temperatura ambiental resiste más de un año y a 0-4 °C, más de 6 (a pH 6 las tasas de multiplicación son más altas que a pH 5). La *L. monocytogenes* se multiplica a pH de 5 a 9, aunque sus valores límites de multiplicación son de 4'4 a 9'5 (véase Tabla 1).

La *L. monocytogenes* se ha encontrado a menudo en mataderos, en las plantas de elaboración y conservación de alimentos, establecimientos de cáterin, etc., incluso cuando se aplican medidas de higiene correctas. La distribución de muchos productos alimenticios es muy extensa, incluso intercontinental. Por ejemplo, en Toledo se confeccionan hamburguesas que se consumen en media Europa y los preparados cárnicos de aves atraviesan a diario muchas fronteras. *L. monocytogenes* sobrevive mucho tiempo en el medio ambiente. Chiarini *et al.* (40) analizaron 851 muestras de diferentes orígenes: alimentos, agua, manipuladores de alimentos y fómites de dos mataderos de aves con igual esquema de trabajo, salvo la evisceración. Hallaron *L. monocytogenes* en el 20,1% de los mataderos que evisceraban automáticamente y en el 16,4% de los que lo hacían de forma manual. Los serovares más prevalentes en la planta automática eran el 4b, 4d, y el 4e y en la manual el 1/2a y el 3.

La *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir y crecer en la tierra y en el agua. Estas bacterias han sido detectadas en varios medios acuáticos: agua superficial de canales y lagos, de zanjas y terrenos ganados al mar en Holanda, de efluentes de agua dulce que desaguan en una bahía de California, y en aguas residuales (41). Las plantas de alfalfa y otras cosechas cultivadas en tierra tratada con lodos de aguas residuales están contaminadas con listerias (42). En la mitad de las muestras de rábanos cultivados en tierra inoculada con *Listeria monocytogenes* se encontraron listerias tres meses después de la siembra. También

se ha comprobado la presencia de *Listeria monocytogenes* en pastizales y en ensilados de hierba.

En la mayoría de los países, el 65% de las cepas son de la estirpe II (serotipos 1/2a y 1/2c), que se asocian con brotes esporádicos humanos y el 35% de la estirpe I, serotipos 1/2b, 3b y 4b y de los grupos clonales DUP-ID 1038 y 1042, responsables de varios brotes de listeriosis humana, no se encontraron cepas atípicas ni tampoco de la estirpe III.

8. ECOLOGÍA

Las listerias, como las demás bacterias patógenas, además de afectar directamente a la salud humana y animal, lo hacen también indirectamente, vía sus reservorios, y sus nichos naturales (y los de las granjas, rediles, establos e industrias alimentarias). Las cepas de *L. monocytogenes* que predominan en cada nicho ecológico pertenecen a unos pocos serovares, forman parte de su ecología, modifican su ambiente y reciben de éste, además de nutrientes, múltiples influencias, entre ellas transferencia de genes con sus respectivas funciones.

En el conocimiento de las listerias y su impacto en la salud humana debe tenerse en cuenta que las bacterias son un resultado evolutivo en el que se pueden transmitir propiedades no solo de una estirpe o de un serovar a otro, sino de una especie bacteriana a otra. Así Bigot *et al.* (43) demostraron que el gen o1272 codifica una proteína muy similar a las Y1qF de *Bacillus subtilis* y que el gen o1273, puede completar a *Escherichia coli rnhA-rnhB*, cuyo crecimiento termosensible sugiere que codifica a una ARNasa funcional.

Guglieetti *et al.* (44) transfirieron por electroporación y conjugación un gran plásmido obtenido de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* KYA-7, del intestino de peces a bacterias patógenas del hombre y de otros peces. Ese plásmido alberga el gen tet(S) de resistencia a la tetraciclina y es un potente antagonista de los receptores de *Lactococcus garvieae* y de *Listeria monocytogenes*, impidiendo la conjugación.

Kim y Kathariou (45) encontraron fagos que actúan sobre diversos huéspedes, entre ellos especies de listerias aisladas de las plantas de procesamiento de alimentos; cuando se cultivan en placa a 37 °C se observa que *L. monocytogenes* es susceptible al fago. Pero si la listeria diana se cultiva a cualquier temperatura inferior a 31 °C, no se forman placas. Como contraste, las otras cepas testadas del serotipo 4b (incluidos el clon epidémico I y las cepas de otras especies y serotipos de listerias) no se ven influidas por la temperatura a la que crecieron.

La susceptibilidad, dependiente de la temperatura, al fago de las cepas ECII la presentan todas las cepas aisladas de brotes y plantas de tratamiento independientemente de la presencia o ausencia de plásmidos resistentes al cadmio.

La *L. monocytogenes* del ambiente, especialmente de alimentos, tienen baja patogenicidad y causan infecciones discretas o inaparentes que una vez superadas sirven para proteger la listeria contra ulteriores enfrentamientos.

En la leche cruda, los fagos de *S. aureus* transfieren e intercambian los islotes de patogenicidad con *L. monocytogenes*. Los fagos participan en el tras-paso y expansión de genes de unas bacterias a otras de diferentes especies. Bacteriófagos, transposones y plásmidos, intervinieron en la adquisición, pérdida, recombinaciones y hasta en las mutaciones de los genes, ocurridas durante la evolución, hasta llegar a las cepas actuales. Por ejemplo Bigot *et al.* (43) encontraron que la proteína codificada por el gen *Listeria monocytogenes o1272*, es muy similar a las proteínas YlqF de *B. subtilis* y que la codificada por el gen *Listeria monocytogenes o1273* es similar a la proteína RnhB de *B. subtilis*.

9. CICLO CELULAR

La infección pasa por las siguientes fases:

Cuando las listerias penetran con los alimentos por vía oral son captadas por células fagocíticas, como presentadoras de antígenos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, células todas ellas muy importantes en la inmunidad innata y en la adquirida que constituyen una primera línea defensiva frente a las listerias. Al fagocitarse, forman un fagosoma, que se aproxima a uno o a varios lisosomas con los que contactan y uniéndose sus membranas forman un fagolisosoma, donde sus enzimas y la acidez digieren a muchas bacterias (incluida la membrana celular), enzimas que pueden pasar al medio y destruir desde fuera a células no infectadas. Esta especie de digestión no afecta a las listerias, que son resistentes a los pHs bajos y que están protegidas por su arginina desiminasa, cuya síntesis codifican varios genes de *L. monocytogenes* que se expresan mejor en un pH bajo como el de los fagolisosomas. Las listerias salen del fagosoma por un mecanismo listeriolisínico, crítico para la patogenicidad; las bacterias listeriolisina-deficientes son apatógenas.

Si las células diana son los hematíes, las hemolisinas destruyen su pared, liberándose su hemoglobina, con lo que cambia el aspecto opaco y turbio de la suspensión de glóbulos rojos, del líquido en el que tiene lugar la reacción, y

pasa a rojo transparente. Es la la hemolisis. La actividad de los agentes lisantes se suele determinar por la hemolisis, por ello se les denomina hemolisinas. En agar sangre las colonias de las bacterias que producen estas toxinas originan placas amarillentas.

En las células no fagocíticas (Figura 1) la *L. monocytogenes* se adhiere a ellas primero y luego de forma activa penetra en su interior. Además *L. monocytogenes* tiene una gran capacidad de adhesión a las superficies abióticas, como las usadas en la industria alimentaria y especialmente a las láminas de poliestireno y a las de acero inoxidable. También lo hace a las superficies bióticas como las membranas celulares de enterocitos y hepatocitos sin que influyan el pH, la temperatura, ni las características físico-químicas de la pared bacteriana, adquiridas evolutivamente, ni el flagelo ya que las cepas aflageladas como la *L. monocytogenes* EGD-e tienen la misma adhesividad que las flageladas (14). En la adhesividad debe intervenir algún factor de la pared bacteriana, pues las mutantes rugosas de *L. monocytogenes* no se pueden adherir a los fibroblastos, por lo que no penetran en ellos.

La *L. monocytogenes* se une a receptores superficiales de las células diana, activando vías de señales específicas del huésped, de las que forma parte la IspC, proteína inmunógena, de 86 kDa, cuyos dominios C-terminales son ligandos anclados en la pared, de *L. monocytogenes*, con actividad péptidoglicano hidrolasa, que degrada al péptidoglicano bacteriano, siendo pues una autolisina aunque *in vitro*, no es importante para la división de la listeria ni para su separación, pero sí es esencial para desarrollar toda su virulencia *in vivo* (46).

Las listerias adheridas a la membrana celular inducen a la membrana plasmática, a emitir a su alrededor unas protrusiones, que rodean progresivamente a la listeria formando una bolsa en la que llega a encerrarse rodeada de una vacuola, semejante a un fagosoma con doble membrana (Figura 1).

La actina A o ActA, codificada por el gen *actA* (47), es una proteína de membrana de 610 aminoácidos con una región hidrófoba C-terminal anclada en la membrana de uno de los polos bacterianos que se polimeriza continuamente formando microfilamentos que se unen a uno de los extremos de la listeria, a la que recubren, como una especie de nube de microfilamentos, cuya densidad va disminuyendo hasta ser casi inaparente en el polo opuesto. El acúmulo de clatrina, reordena la actina. La polimerización proporciona energía necesaria para que la *L. monocytogenes* se desplace (57) en el citoplasma celular y posteriormente para que pase a una célula contigua, propagando la infección ya que la *L. monocytogenes* no puede ser atacada por los factores séricos y celulares in-

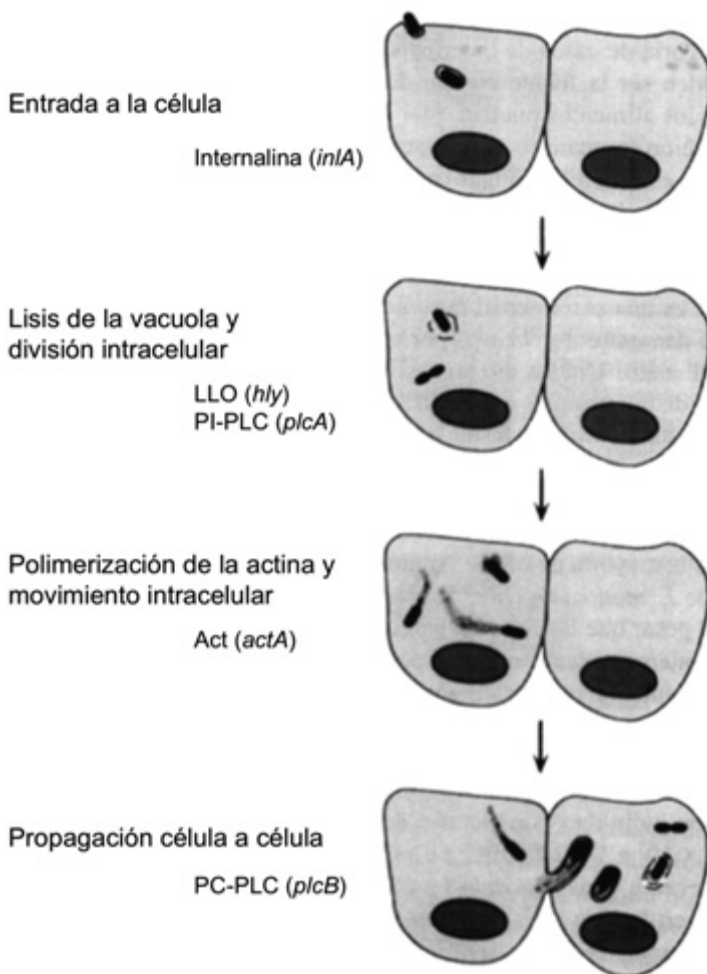


FIGURA 1. Representación esquemática de la propagación célula a célula de *L. monocytogenes*. (Reproducido de Swaminathan, B. p. 383-409. En Doyle, M. P.; Beuchat, L. R. & Montville, R. J. [ed.], *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed.).

munitarios. Sorprendentemente, la *E. coli* enteropatógeno, que es extracelular, no utiliza la clatrina para intervenir en la endocitosis sino para formar pedestales ricos en actina.

El genoma de la *L. monocytogenes* dispone de una familia de al menos 11 genes, los *inl*, que varían según el serovar. Estos genes *inl* codifican unas pro-

teínas de membrana específicas de especie, llamadas internalinas (InI). Fueron descubiertas al observar que las cepas virulentas tenían genes que faltaban en las avirulentas. Las InI, que tienen una parte externa de secuencias repetidas, ricas en leucina (LRR), que va seguida de otra secuencia inmunoglobulínica, de una porción intramembrana, con varios dominios, que es esencial para su función de internar la vacuola y de una parte interna, que conecta con una vía de señales, cuyos efectores abrirán poros en el fagosoma. El fragmento externo se puede desprender, y disolver en el medio extracelular. Las fracciones interna y la transmembranaria más importante, se sintetizan en la fase exponencial del crecimiento. Hay mutantes, que solo expresan la parte soluble de la internalina.

Para que las internalinas actúen se deben unir a receptores, “zippering”, específicos de especie. La internalina A, (InIA), de 600 aminoácidos, está codificada por el gen *inIA*, (48). Es un factor de virulencia, que facilita la entrada de *L. monocytogenes* en las células epiteliales que expresan la isoforma humana de la molécula de adhesión E-caderina, específica de especie a la que se adhiere, induciendo el internamiento de la vacuola en el enterocito, esencial en la infección. Es termodependiente, expresándose más a 37 °C que a 20 °C.

La internalina B, (InIB), tiene 630 aminoácidos con una secuencia de señales y una región de repeticiones ricas en leucina con la misma cadena de aminoácidos que la InIA, pero sin la secuencia de anclaje en la membrana. Actúa uniéndose a su receptor Met, factor de crecimiento del hepatocito; activa la fosforilación.

Una vez que penetra en las células, *L. monocytogenes* escapa de la vacuola pasando al citosol, por la acción de la listeriolisina O (LLO), que se segrega mientras se encuentra en el interior de la vacuola.

La *L. monocytogenes* dispone de numerosos factores de virulencia que le permiten no solo sobrevivir, sino también multiplicarse, tanto en células fagocíticas como no fagocíticas. En este sentido, la listeriolisina O, principal responsable de la hemólisis y que actúa rompiendo las membranas de los fagolisosomas y de las vacuolas permite, en menos de 30 minutos, la salida al citosol de *L. monocytogenes* donde se multiplica. Es una enzima de 60 kDa, tóxica, con actividad lisogénica, una citolisina que desde el interior de la vacuola abre poros en la doble membrana vacuolar, permitiendo salir a la listeria y pasar de célula a célula.

Las cepas no hemolíticas no producen listeriolisinas por lo que no pasan al citosol. La listeriolisina debe activarse por reducción de tiol-enzimas, entre ellas la tiol-reductasa GILT o Ifi30, del lisosoma inducible por el INF- γ (54). La GILT

es soluble, pesa 30 kDa y pertenece a la familia de las tio-redoxinas. Una vez purificada activa a la listeriolisina, facilitando así la permeabilización de la membrana y la lisis de los hematíes. La listeriolisina se expresa constitutivamente en los lisosomas de las células presentadores de antígenos acumulándose en los macrófagos a medida que se forman los fagolisosomas. El locus activo de la GILT contiene dos moléculas de cisteína. Los ratones que han perdido la GILT son deficientes en la producción de células T CD4(+) del complejo mayor de histocompatibilidad de la clase II y son resistentes a las listerias. *L. monocytogenes* en los macrófagos GILT-negativos y en los mutantes que expresan GILT inactivo salen tarde del fagosoma lo que altera su replicación.

En la lisis de la membrana de las vacuolas o fagosomas también intervienen la lecitinasa y la fosfolipasa C, codificada por el gen *plcB*, situado inmediatamente detrás del *actA* (57). La fosfolipasa C procede de la escisión de su precursora, pre-fosfolipasa C, originada por efecto del gen *plcB*. La fosfolipasa C escinde a la fosfatidilcolina (en cuyo caso se denomina PC-PLC), a la fosfatidilserina y a la fosfatidiletanolamina. También intervienen en la virulencia otras sustancias, incluidas una segunda fosfolipasa, una Zn-metaloproteasa, una proteína de superficie. El gen *mpl* es el primero del operón codificador de una proteasa. La proteasa no ha sido codificada pero los resultados obtenidos con una mutante de *mpl* indican que el producto del gen *plcB* y la proteína *ActA* pueden ser sus sustratos. En cultivos de células monocapa las mutantes de *plcB* producen placas pequeñas. La microscopía electrónica ha puesto de manifiesto que se producen numerosas mutantes en el interior de los fagosomas de doble membrana. Se desconoce si la LLO coadyuva a la lisis de la vacuola de doble membrana. La listeriolisina y las fosfolipasas, PI-PLC y PC-PLC, están codificadas por genes que se agrupan en dos regiones del cromosoma bacteriano (59), es expresan termodependientemente con un máximo a 37 °C (60).

10. BIOLOGÍA DE LA LISTERIA EN EL CITOSOL

Se creía que el citosol de las células eucarióticas no era propicio para el desarrollo intracelular de bacterias, dado que los patógenos intracelulares para sobrevivir tienen que inducir la expresión de genes cuyos productos proporcionan un medio adecuado. Los macrófagos infectados con cepas de *Bacillus subtilis* que expresan el gen *hly* permiten que, al menos se desarrolle esta bacteria. En el citosol de la célula huésped (y en la fase exponencial del crecimiento en caldo enriquecido) la *L. monocytogenes* expresa intensamente genes cuyas proteínas,

activan vías de señales específicas del huésped que intervienen en su metabolismo, inducen la síntesis de la pared celular, median la síntesis de proteínas, adaptan el metabolismo bacteriano a los agentes estresantes, especialmente al oxidativo, inducen la síntesis de su pared, modifican sus péptidoglicanos, liberan péptidos neuramínicos y activan a sus genes de virulencia superficiales y a los mecanismos que anulan las defensas del hospedador, incluyendo la resistencia a los péptidos catiónicos.

En el citosol las listerias se dividen cada 60 minutos, de modo que se multiplica rápidamente. En los enterocitos se produce una extensa transcripción que remodela y activa a los genes de virulencia mediados por la SigB (mientras que en los macrófagos son las PrfA las proteínas que controlan a los genes de virulencia). En el citosol, *L. monocytogenes* se multiplica activamente regulada por los promotores listerianos P(actA) y P(hly) (49), habiéndose definido el core y las variables exoproteómicas de *L. monocytogenes*. De las muy diversas proteínas el 65,4% se segregan por la vía de translocación “Sec”, relacionando a las bacterias con su medio, y siendo muchos factores de virulencia como los que intervienen en la biogénesis de la pared, según demuestra el análisis exoproteómico.

La *L. monocytogenes*, como otras bacterias, sintetiza isoprenoides, esenciales, para la producción de isopentil difosfato, básico para su desarrollo en medios artificiales, continuando la síntesis por la vía clásica del mevalonato o por la alternativa del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) que requiere los genes *gcpE* y *lytB*.

La expresión diferencial del genoma de *L. monocytogenes*, *in vivo* está coordinada por una compleja red reguladora. Al escanear el genoma Crimmins *et al.* (50) identificaron, el transposón Tn917 del gen *L. monocytogenes* 0558 cuyas mutantes alteran los niveles de expresión del IFN-beta; una de ellas induce elevadas cantidades de IFN-beta y alberga un gen codificador de 6-fosfogluconolactonasa (*pgl*), segunda enzima de la vía del fosfato pentosa, hecho que relaciona por primera vez la vía bacteriana del fosfato pentosa con la activación de la expresión del IFN-beta por el huésped. Una mutante del *pgl* acumula y segrega grandes cantidades de gluconato, probablemente procedente de la 6-fosfogluconolactona sustrato lábil de la *Pgl*.

La inhibición farmacológica de la PKC-beta reduce significativamente la permeabilización del fagosoma y la llegada de bacterias al citosol. Las cepas virulentas de *L. monocytogenes* como otras procariontes y eucariontes sometidas al estrés térmico, inducen la síntesis de proteínas específicas del estrés térmico (51, 52).

El pirofosfato de tiamina (vitamina B1) es un cofactor esencial que participa en el metabolismo y en la biosíntesis de los aminoácidos derivados de la tiamina. Schauer *et al.* (55), en el caldo mínimo de Welshimer modificado (mMWB), suplementado con tiamina o con su precursor la hidroximetilpirimidina, comprobaron que *L. monocytogenes* puede sintetizar la tiamina solo en presencia del precursor, debido a la pérdida de ThiC, que interviene en la síntesis de aquel. El gen *Lmm0317*, carente de thiD, que probablemente cataliza la fosforilación de la hidroximetilpirimidina, inhibe el crecimiento en el medio de mMWB incluso si se suplementa con hidroximetilpirimidina y se reduce la tasa de replicación de *L. monocytogenes* en las células epiteliales. La mutación del gen *Lmm1429*, transportador de tiamina, reduce la proliferación en el mMWB con tiamina o con fosfatos de tiamina y también en las células epiteliales, pero no interviene en la expresión de los factores de virulencia, Hly y Ac. El análogo tóxico de la tiamina, la piritiamina inhibe el crecimiento de la cepa silvestre EGD.

11. PROPAGACIÓN INTERCELULAR

El ciclo total de la infección celular desde la adhesión de la bacteria a la membrana hasta su salida, dura unos siete días. Las listerias libres (54) se multiplican activamente y pasan a células contiguas por un mecanismo no lítico diseminándose por los órganos diana. Algunas células infectadas son fagocitadas por células con capacidad autofágica, degradándose en el compartimento autolisómico. Este es un mecanismo defensivo intrínseco del hospedador contra las bacterias intracelulares como *Streptococcus A*, *Sh. flexneri* y *L. monocytogenes* que evita la autofagia, soslayando el reconocimiento autofágico, sobreviviendo y multiplicándose en el citosol, habiéndose encontrado colas de cometa y la formación de protrusiones sin sufrir la defensa inmunitaria (55). *L. monocytogenes* puede pasar del citosol al compartimento extracelular y de éste a la sangre, que la difunde por los órganos, especialmente hígado, bazo y médula, en los que puede formar focos infecciosos.

12. CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

Listeria monocytogenes ataca a grupos de riesgo bien definidos: mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos inmunodeprimidos (Tabla 3). En ocasiones también se dan casos en adultos, en los que causa septicemia, meningitis y

meningoencefalitis. Su letalidad es de 20 al 25%. Las situaciones clínicas que predisponen a la listeriosis —como ya hemos señalado— comprenden el cáncer, transplante de órganos, la terapia inmunosupresora, la infección por VIH y la ancianidad avanzada. Las mujeres embarazadas, especialmente en su tercer trimestre, pueden presentar únicamente una sintomatología gripal acompañada de abortos o nacimientos a término muertos (Tabla 4).

Aunque los brotes de listeriosis son muy llamativos, la mayoría de los casos humanos son esporádicos, algunos de ellos son la fuente común y desconocida de ciertos brotes. Si bien en algunos casos pueden estar implicados alimentos, en la mayoría se desconoce el modo de infección. Muchos casos esporádicos no se han asociado con alimentos porque es muy difícil conocer el modo de infección. De otra parte, el tiempo de incubación (5 semanas y más) dificulta el conseguir historiales alimentarios precisos y muestras de los alimentos sospechosos. Se sabe poco de la listeriosis humana y aunque la exposición a *L. monocytogenes* sea bastante común la listeriosis como tal enfermedad es rara. Se

TABLA 3. *Riesgo de listeriosis en diversas poblaciones humanas (Ref. 3).*

Grupo poblacional	Riesgo relativo
Población total	1 ^a
Mayores de 70 años	3
Embarazadas	17
VIH ^b positivo	200

^a Riesgo absoluto, 7 casos/millón.

^b VIH, virus de la inmunodeficiencia humana.

TABLA 4. *Síntomas de la listeriosis sistémica (puede presentarse como).*

- Infección ligera de tipo gripal; no es grave salvo en mujeres embarazadas (abortan).
- Cefalea, somnolencia, coma.
- Infección perinatal.
- Encefalitis.
- Psicosis.
- Mononucleosis infecciosa.
- Septicemia.

desconoce si esto se debe a la resistencia humana o a la baja patogenicidad de la mayoría de las cepas; algunos individuos sanos y asintomáticos eliminan *L. monocytogenes* con las heces. Aunque las listerias tienen como diana las mujeres embarazadas, algunas son portadoras asintomáticas, que llegan a término felizmente dando a luz hijos sanos. Debe hacerse énfasis en que las mujeres infectadas en un embarazo no necesariamente sufren el mismo problema en los siguientes.

En las personas adultas, salvo en las embarazadas, *L. monocytogenes* muestra un tropismo específico por el SNC, con meningitis y meningoencefalitis frecuentes. En ocasiones raras se observan infecciones, precedidas de septicemia, en pacientes listeriosicos sin enfermedades subyacentes, por ejemplo, endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, peritonitis, hepatitis, etc. (56). También se han publicado casos de listeriosis gastrointestinal benigna (57).

La listeriosis sistémica o invasora es grave, sobre todo si está afectado el SNC o hay enfermedades subyacentes. Su letalidad es del 20-30% y mayor en individuos inmunodeprimidos, ancianos y embarazadas. La letalidad de los 136 casos declarados en Austria (9) entre los años 1997-2007 fue del 28,7% en los no relacionados con la gestación y del 14% en los ocurridos en mujeres embarazadas. Como se dice en otro lugar, generalmente transcurre bastante tiempo entre la ingestión del alimento que contiene las listerias y la aparición de los síntomas de la enfermedad. *L. monocytogenes* es muy diferente de otros microorganismos transmitidos por los alimentos: es de distribución ubicua, resiste mucho a las condiciones adversas, es psicótrofo y crece en los fagocitos humanos. En los alimentos conserva mucho tiempo su vitalidad, lo mismo que en el suelo, materia en descomposición (vegetales) y en excretas y estiércol. Estas características la convierten en una de las grandes preocupaciones de la industria alimentaria. Todavía no hay acuerdo sobre el modo de tratar con *L. monocytogenes*: si bien la gravedad de la infección que origina y la mortalidad de los casos estudiados requiere un control estricto, sus particularidades biológicas convierten esta opción en poco realista, dado que difícilmente puede asegurarse que todos los alimentos estén libres de esta bacteria.

Además de la listeriosis sistémica antes descrita, hay otra forma gastrointestinal (56), parecida a la toxiinfección salmonelósica. Como ella tiene un periodo de incubación corto (7-18 horas), al principio causa una diarrea discreta que va seguida de gastroenteritis febril. Se conoce como listeriosis gastroentérica o digestiva. Se ha visto (56) que en pacientes ancianos inmunodeprimidos, con el paso del tiempo, a veces da lugar a gastritis purulenta.

13. PATOGENIA Y VIRULENCIA

La patogenicidad de la *L. monocytogenes* para el hombre depende, en gran parte, de la cepa siendo elevada para la mayoría aunque algunas la tienen escasa e incluso se han descrito raras cepas apatógenas, sin que haya relación entre la virulencia con la serovariedad, fagovariedad, ribovariedad (modelo de macro-restricción del ADN), ni si la cepa procede de enfermos esporádicos o de un brote, o de animales, de alimentos o del ambiente.

La mayoría de las listerias que ingresan con los alimentos resisten a la digestión gástrica, gracias a la fugacidad de su paso y a la actividad de su arginina desiminasa, cuyos genes se expresan mejor en anaerobiosis y en pH bajo. Desde el intestino y por vía hemolinfática accede a órganos, esencialmente al bazo y al hígado, de donde por la bilis puede llegar al intestino.

La patogenicidad se valora determinando la dosis infectante mínima en animales de experimentación y en los enfermos calculando, aproximadamente, el número de *L. monocytogenes* que debió haber ingerido con la cantidad de alimento consumido y las ufc encontradas en el mismo. Los recuentos pueden hacerse en agar triptosa soja con 0,6% de extracto de levadura o en el medio PALCAM. Las técnicas de recuento no son enteramente fiables y el tiempo transcurrido entre el consumo y el análisis del alimento contaminado pudiera aumentar o disminuir su número. La patogenicidad se relaciona indirectamente con las dosis letales, especialmente la DL_{50} que en el ratón es inferior a 10^6 , siendo de 10^{8-9} en el caso de las listerias avirulentas o en la membrana corioalantoidea o saco vitelino del embrión de pollo, en la que la DL_{50} de las cepas virulentas es de unos 10^2 .

En el hombre y en los animales, la *L. monocytogenes* vehiculada por los alimentos penetra en células no fagocíticas como los enterocitos. Las pruebas de patogenicidad de *L. monocytogenes* se han realizado en cultivos de tejidos y en ratones tanto inmunocompetentes como inmunocomprometidos. Para ello, los ratones se infectan por las vías intraperitoneal, intravenosa o intragástrica y su virulencia se evalúa comparando las dosis letal 50 de los ratones, o bien contando las bacterias del bazo o del hígado. La virulencia de las cepas varía mucho de *L. monocytogenes*; algunas son muy virulentas, otras poco o muy poco y en algunos casos raros no manifiestan virulencia alguna. No se ha observado correlación entre la virulencia y su origen (humano, animal, alimentario o ambiental) ni entre las características de las cepas y la virulencia (9). Si bien se han conseguido y descrito aislamientos raros, apatógenos o débilmente patógenos, se considera que todas las cepas de *L. monocytogenes* son potencialmente patógenas para la especie humana.

14. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA LISTERIOSIS DE ORIGEN ALIMENTARIO

De las páginas precedentes se deduce que *Listeria monocytogenes* se desenvuelve bien en una gran diversidad de hábitats, entre los que se incluyen el suelo, alimentos ensilados del ganado, aguas y lodos residuales, ambientes en los que se obtienen y elaboran alimentos (plantas lactológicas, queserías, mataderos, industrias charcuteras, etc.) y en las heces de personas y animales sanos. Los porcentajes de vehiculización de listerias, estimadas en personas, varían mucho dependiendo de la fuente contaminante (11). Como se indica más atrás, *L. monocytogenes* infecta a muchas especies animales, además de a la especie humana.

Se ha comprobado que el aborto séptico y la meningitis del ganado ovino y del vacuno puede ocasionarlos el ensilado elaborado incorrectamente en el que se multiplican las listerias.

En ocasiones *L. monocytogenes* ha sido excretada con la leche. En la carne cruda del ganado de abasto, tanto de mamíferos como de aves, se encuentran a veces altos porcentajes de canales contaminadas. En las superficies húmedas de las plantas elaboradoras de alimentos se han encontrado listerias, lo que unido a la capacidad de *L. monocytogenes* de crecer a temperaturas bajas, explica su presencia en frigoríficos industriales y domésticos (véase Tabla 1, los límites de crecimiento de *L. monocytogenes*).

La prevención de la listeriosis humana empieza en las explotaciones ganaderas y en las tierras de cultivo, continúa durante la recolección de las cosechas y sacrificio de los animales en el matadero, sigue durante su acondicionamiento y transporte a las fábricas de productos alimenticios, continúa durante el procesado, almacenamiento, distribución y venta y acaba en la mesa del comedor de los consumidores. Por todo esto, es prácticamente imposible conseguir una dieta normal y variada que esté totalmente exenta de *L. monocytogenes*. Sin embargo, la aplicación de controles higiénicos reduce el riesgo de padecer listeriosis transmitida por los alimentos. Se trata de un caso clásico en el que debe aplicarse el sistema HACCP, desde el campo y la granja hasta el comedor, para reducir al mínimo el riesgo de la listeriosis humana por consumo de alimentos.

14.1. Campos de cultivo

Con frecuencia los suelos agrícolas se hallan contaminados con listerias que proceden del agua de riego estancada y rica en materia orgánica en la que *L. mo-*

nocytogenes se desarrolla bien. Lo mismo puede decirse del estiércol usado como fertilizante, de los restos vegetales en descomposición y de los lodos procedentes de efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento y potabilización de agua.

Solo deben usarse como aguas de riego las de acequias, canalizaciones, hileras y regachos, cuyo curso discurre sin impedimentos y por tanto, sin peligro de estancamiento persistente. Se evitarán todas las procedentes de efluentes urbanos que no hayan sufrido antes un eficaz tratamiento de depuración y no se usarán nunca estiércoles ni lodos que no hayan llegado a la fase de pre-mineralización por un proceso de fermentación conveniente. En otro caso, los productos hortícolas producidos tendrán siempre una considerable carga listeriósica (5, 38, 39).

Listeria monocytogenes se halla a menudo en hortalizas frescas de baja acidez (rábanos, pepinos, col, patatas, etc.), pero en escaso número; por el contrario, en los de acidez alta (tomates y zanahorias) se desarrollan mal (5, 6).

14.2. Explotaciones ganaderas

Cuanto mejor planificados estén los tiempos de limpieza de los animales productores (de leche y/o carne), de eliminación de sus excrementos, de distribución de los piensos —en las explotaciones de tipo intensivo— y de ordeño, tanto mejor será la calidad de la carne y de la leche que produzcan. A este respecto la disponibilidad en los establos de dispensadores automáticos de piensos concentrados y de agua, que permiten la alimentación *ad libitum* del ganado, ha sido un gran avance no solo desde el punto de vista económico (menor necesidad de mano de obra y menor gasto de pienso), sino también desde el higiénico (leche con menos impurezas y cargas bacterianas menores).

Es muy importante controlar la producción de ensilado para lograr su acidificación hasta un $\text{pH} \leq 4$, única forma de inhibir el desarrollo de grandes recuentos de *L. monocytogenes*. Este control es de gran importancia en el ensilado que consumen los animales productores de leche, ya que ésta, a veces, puede utilizarse, sin pasteurizar, en la elaboración de ciertos tipos de quesos.

Es muy conveniente que la leche se mantenga en las granjas a temperaturas ≤ 4 °C hasta su transporte a las plantas de elaboración de productos lácteos.

14.3. Transporte

Durante el transporte de los alimentos crudos, salvo que se protejan convenientemente con material impermeable al agua y al polvo, durante la carga y des-

carga de canales, semicanales y cuartos, cabe la posibilidad de contaminación de la carne, vía las manos (incluso con guantes) de los operarios que realizan este trabajo, que transfieren bacterias de las superficies de unas canales a otras.

En el caso de las hortalizas, especialmente las que se utilizan por sus hojas (lechugas, escarolas, acelgas, etc.), las más externas suelen estar contaminadas debido a la tierra y polvo que contienen, de aquí la necesidad de su eliminación para evitar que las bacterias pasen desde estas hojas a las más internas.

Si a todo lo expuesto sumamos que el transporte suele realizarse en vehículos frigorígenos, a temperaturas de 5 °C, o menores, este ambiente frío frenará el desarrollo de las bacterias mesófilas antagonistas de las listerias, pero no impedirá la multiplicación de *L. monocytogenes*, dada su psicofilia, en algunos productos vegetales.

14.4. Plantas de procesado

Listeria monocytogenes llega a las plantas de procesado alimentario con el polvo y la tierra que acompañan a los alimentos de origen vegetal, con los deshechos y restos de cajas y otros envases en los que se transportan y con el calzado y los vestidos de los operarios. Los alimentos de origen animal contaminados también pueden actuar de vectores, lo mismo que los portadores humanos y animales sanos. Señalemos a este respecto que *L. monocytogenes* ha sido aislada en muestras fecales de personas sanas (2-6% de las analizadas); en enfermos el 21% excretaban 10^4 ufc/g de heces (o más) y el 18% de las personas que convivían con ellos eliminaban también *L. monocytogenes*, de la misma serovariedad e igual perfil isoenzimático (59).

L. monocytogenes se adhiere a diversos tipos de superficies (por ejemplo, acero inoxidable, vidrio y caucho) habiéndose encontrado biopelículas en la carne y en los equipos de las fábricas de alimentos lácteos (60). Las listerias sobreviven en los dedos después de lavadas las manos.

En las plantas lactológicas la fuente principal de *L. monocytogenes* la constituyen los pavimentos, aguas de lavado de suelos y paredes y los vertidos de leche refrigerada. Por ello el control debe centrarse en promover buenos métodos de pasteurización y en la identificación y eliminación de las fuentes contaminantes después del tratamiento pasteurizante (61).

La presencia de *L. monocytogenes* en las canales animales se debe a su contaminación con materias fecales durante el sacrificio. Del 11 al 52% de los ani-

males que llegan a los mataderos para ser sacrificados son portadores sanos. En un matadero de cerdos se vió que el 45% albergaban *L. monocytogenes* en las tonsilas y en uno de vacunos que el 24% la presentaban en los ganglios retrofaríngeos (27, 33).

Tanto en las zonas sucias, como en las limpias de los mataderos se han aislados listerias. Las zonas de trabajo más contaminadas son las de desuello del ganado vacuno y aquéllas en las que se aturden e izan los cerdos.

En los mataderos de aves no se detectaron *L. monocytogenes* en muestras de plumas de pavos y pollos, ni en el agua del sobrado del tanque de escaldado, ni en la piel del cuello, ni en el hígado, corazón y ciego; en cambio si se encontraron en el agua de goteo de la desplumadora, en el sobrado del agua de enfriamiento y en la carne deshuesada mecánicamente. También se aislaron del agua de lavado de las canales recicladas. Estos hallazgos demuestran la importancia de la desplumadora, de los tanques de enfriamiento y del agua reciclada en la contaminación cruzada de las canales de aves (62).

14.5. Almacenamiento

Según se ha señalado en páginas anteriores, *L. monocytogenes* se ha puesto de manifiesto en una gran variedad de alimentos, tanto frescos como procesados. Durante el almacenamiento puede sobrevivir y multiplicarse en muchas materias primas alimenticias. El Servicio del Laboratorio de Salud Pública de Londres puso de manifiesto (63) que el 6% de 18.000 muestras de alimentos estaba contaminado con *L. monocytogenes* y que el 5% de las muestras positivas contenían más de 1.000 ufc/g.

La temperatura de almacenamiento de los alimentos es un factor importante que influye en el riesgo de multiplicación de *L. monocytogenes* en los alimentos perecederos. Su almacenamiento a 5 °C, e incluso a temperaturas inferiores a ésta, puede retrasar pero no impedir su multiplicación en algunos de estos alimentos.

14.6. Distribución y venta al por menor

Schuchat y colaboradores (64), señalaron en 1991 que los alimentos comprados en la sección de *delicatessen* de los grandes almacenes de productos ali-

menticios podrían estar implicados en casos esporádicos de listeriosis humanas. Aunque no se haya determinado la causa de su implicación deben aplicarse las siguientes normas higiénicas básicas: a) mantener siempre separados los alimentos crudos de origen animal de los alimentos listos para comer; b) utilizar periódicamente y a intervalos convenientes, un método eficaz de limpieza y desinfección del equipo y utillaje empleados para cortar, picar y triturar las materias primas. Ello puede requerir un desmantelamiento previo de la maquinaria (picadoras, mezcladoras, etc.); c) los frigoríficos, armarios expositores, etc., deben disponer de sistemas que indiquen su temperatura y humedad del interior, sin necesidad de abrirlos; d) periódicamente se revisarán las fechas de entrada de los alimentos en los locales de venta y solo se expondrán en los lineales de los autoservicios aquéllos que se encuentren dentro de su vida útil de almacén, esto es, los que estén dentro del periodo en que se garantiza la inocuidad de su consumo con indicaciones como “consumir antes de” o “venta hasta”, o similares.

14.7. Consumidores

La población fisiológicamente normal es, en general, resistente a la infección por la cepas de *L. monocytogenes* que se encuentran corrientemente en los alimentos; sin embargo, el riesgo de contraer listeriosis es mucho mayor en las personas cuya inmunidad es débil, por ejemplo, mujeres embarazadas, personas enfermas de SIDA, pacientes oncológicos, ancianos, y otros enfermos con ciertas patologías subyacentes (enfermos con cardiopatías, diabéticos, pacientes con insuficiencia renal, etc.).

Para evitar la listeriosis en las personas citadas deberían seguirse las normas siguientes:

1. No consumir alimentos de origen animal, crudos o poco hechos, esto es, a temperaturas \leq de 60 °C.
2. Evitar la contaminación cruzada entre los alimentos crudos y los cocinados y listos para el consumo.
3. Antes de servirlos en el comedor, los alimentos sobrantes de una comida anterior se calentarán hasta que “quemen” al tacto. Si se calientan con hornos de microondas se les concederá tiempo suficiente para que el calor sea el mismo en todas sus partes.

4. No comer patés, quesos blandos frescos (queso mejicano), ni quesos blandos madurados de tipo Camembert, Brie o similares elaborados con leche cruda. Pueden consumirse quesos madurados duros y quesos fundidos (los clásicos quesos en porciones).
5. Las hortalizas se lavarán bien y a fondo antes de ingerirlas.
6. Los frigoríficos de residencias de ancianos, hospitales, etc., se manipularán y prepararán de acuerdo con las más estrictas exigencias de las buenas prácticas de higiene (B.P.H.).
7. Todos los alimentos deben prepararse siguiendo las instrucciones recomendadas por sus fabricantes.
8. Los alimentos perecederos (carne, leche, huevos, pescados y sus derivados) se colocarán en la zona más fría del frigorífico ($\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$).
9. Los frigoríficos deben mantenerse en el más perfecto estado de limpieza.
10. No sobrecargar jamás las bandejas y espacios del frigorífico para que se mantenga siempre una temperatura uniforme y el aire circule libremente.

A los lectores que deseen profundizar en el control y prevención de las listeriosis transmitidas por los alimentos, especialmente por los de origen animal les recomendamos la revisión de Farber (65).

15. A MODO DE RESUMEN

En las últimas décadas se ha investigado mucho para profundizar en el conocimiento de esta zoonosis, para definir y delimitar la magnitud del problema de salud pública que representa y su impacto en la industria alimentaria, procurando identificar los factores de riesgo asociados a la infección por *Listeria monocytogenes* y estableciendo las estrategias de control más apropiadas.

Las industrias agroalimentarias han progresado mucho en reducción de la carga de *L. monocytogenes* en los ambientes de las fábricas alimentarias y en los alimentos de mayor riesgo. Se han ideado las medidas preventivas que deben implantarse en las personas con mayor riesgo de infección; según Tappero *et al.* (66) en los EE.UU. se ha reducido mucho la frecuencia de la enfermedad (un 44%) y el porcentaje de enfermos fallecidos (48%).

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Gray, M. L. & Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriology Reviews*. **30**: 309-382.
2. Rocourt, J. & Cossart, P. (1997) *Listeria monocytogenes*. En Doyle, M. P., Beuchet, L. R. & Montville, T. J. (eds.). *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. EE.UU.
3. Montville, T. J. & Matthews, K. R. (2005) *Food Microbiology. An Introduction*, 2nd Ed. ASM Press, Washington, D. C. EE.UU.
4. Murray, E. G. D., Webb, R. A. & Swarm, M. B. R. (1926) A disease of rabbits characterised by a large monoleucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *Journal of Pathological Bacteriology*. **29**: 407-439.
5. Pirie, J. H. H. (1940) *Listeria*: change of name for a genus of bacteria. *Nature*. **154**: 264.
6. Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolossi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. & Broome, C. V. (1983) Epidemic listeriosis-Evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*. **308**: 203-208.
7. Ho, H. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckind, P. & Fraser, D. W. (1986) An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives of Internal Medicine*. **146**: 520-524.
8. Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A. & Broome, C. V. (1988) Epidemic listeriosis associated with Mexican-style chesse. *New England Journal of Medicine*. **319**: 823-828.
9. Bille, J. (1990) Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. En Miller A. J., Smith, J. L. & Somkuti, G. A. (eds.). *Foodborne Listeriosis*. Amsterdam, Elsevier. Págs. 71-74.
10. Goulet, V., Leoutre, A., Rocourt, J., Cortieu, A. L., Dehaumont, P. & Veit, P. (1993) Epidémie de listériose en France: Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*. **4**: 13-14.
11. ICMSF (1996) Microorganisms in Food. 5 Characteristics of Microbial Pathogens. Blackie Academic and Professional, Aspen Publishers, Inc.
12. Buchrieser, C., Brosch, R., Catimel, B. & Rocourt, J. (1993) Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Canadian Journal of Microbiology*. **39**: 395-401.

13. Graves, Swaminathan, B., Reeves, M. W., Hunter, S. B., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D. & Schuchat, A. (1994) Comparison of ribot_{ipar} and multilocus enzyme electrophoresis for subt_{ipar} of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **32**: 2936-2943.
14. Tresse, O., Lebret, V., Garmyn, D. & Dussurget, O. (2009) The impact of growth history and flagellation on the adhesion of various *Listeria monocytogenes* strains to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology*. **55**: 189-196.
15. Ammendolia, M. G., Superti, F., Bertuccini, L., Chiarini, F., Conte, M. P., Cipriani, D., Seganti, L. & Longhi, C. (2007) Invasor pathway of *Listeria ivanovii* in human amnion-derived WISH cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. **20**: 509-518.
16. Orsi, R. H., Borowsky, M. L., Lauer, P., Young, S. K., Nusbaum, C., Galagan, J. E., Birren, B. W., Ivy, R. A., Sun, Q., Graves, L. M., Swaminathan, B. & Wiedmann, M. (2008) Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment. *BMC Genomics*. **9**: 539.
17. Vasconcelos, R. M., Almeida, A. E., Hofer, E., Silva, N. M. & Marin, V. A. (2008) Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Memories of the Institute Oswaldo Cruz*. **103**: 836-838.
18. Borlin, J. C. & Piffaretti, J. C. (1991) Tipar of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*. **57**: 1624-1629.
19. Garrido, V., Torroba, L., García-Jalón, I. & Vitas, A. I. (2008) Surveillance of listeriosis in Navarre, Spain, 1995-2005—epidemiological patterns and characterisation of clinical and food isolates. *Euro Surveillance*. **13**: pii: 19058.
20. Bania, J., Zarczynska, A., Molenda, J., Dabrowska, A., Kosek-Paszowska, K., Wieckowska-Szakiel, M. & Rózalska, B. (2009) Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates by actA gene sequencing, PCR-fingerprinting, and cell-invasion assay. *Folia Microbiologica (Praga)*. **54**: 17-24.
21. Gianfranceschi, M. V., D'Ottavio, M. C., Gattuso, A., Bella, A. & Aureli, P. (2009) Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005). *Food Microbiology*. **26**: 520-526.
22. Liu, D., Lawrence, M. L., Austin, F. W. & Ainsworth, A. J. (2007) A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*. **71**: 133-140.
23. Levraud, J. P., Disson, O., Kissa, K., Bonne, I., Cossart, P., Herbomel, P. & Lecuit, M. (2009) Real-time observation of *Listeria*-phagocyte interactions in the living zebrafish larva. *Infectious Immunology*. **77**: 1458-1465.

24. Shetty, A., McLauchlin, J., Grant, K., O'Brien, D., Howard, T. & Davies, E. M. (2009) Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *Journal of Hospital Infections*. **4**: 580-589.
25. Esteban, J. I., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R. A. & Hurtado, A. (2009) Faecal shedding and cepa diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC. Vet. Res.* **5**: 2.
26. Hardy, J., Chu, P. & Contag, C. H. (2009) Foci of *Listeria monocytogenes* persist in the bone marrow. *Dis. Model Mech.* **2**: 39-46.
27. Skovgaard, N. & Norrung, B. (2009) The incidence of *Listeria sp.* in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *International Journal of Food Microbiology*. **8**: 59-63.
28. Mascola, L., Sorvillo, F., Goulet, V., Hall, B., Weaver, R. & Linnan, M. (1992) Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*-observations during a community wide, common-source outbreak. *Child Infections Diseases*. **15**: 557-558.
29. Husu, J. R., Seppänen, T. J., Sivelä, S. K. & Rauramaa, A. L. (1990) Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *Journal of Veterinary Medicine, B*. **37**: 309-314.
30. Schuchat, A., Deaver, K. A., Wenger, J. D., Plikaytis, B. D., Mascola, L., Pinner, R. W., Reingold, A. L. & Broome, C. V. (1992) Role of foods in sporadic listeriosis. Case-control study of dietary risk factors. *Journal of American Medical Association*. **267**: 2041-2045.
31. Meloni, D., Galluzzo, P., Mureddu, A., Piras, F., Griffiths, M. & Mazzette, R. (2009) *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated EcoRI ribotipar of the isolates. *International Journal of Food Microbiology*. **129**: 166-173.
32. Lovett, J. D., Francis, W. & Hunt, J. M. (1987) *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*. **50**: 188-192.
33. Buncić, S. (1991) The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *International Journal of Food Microbiology*. **12**: 173-180.
34. Genigeorgis, C. M., Carnicu, M., Dutulescu, D. & Farver, T. B. (1991) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30 °C. *Journal of Food Protection*. **54**: 662-668.
35. Grau, F. H. & Vanderlinde, P. B. (1992) Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *Journal of Food Protection*. **55**: 4-7.

36. Johanson, J. L., Doyle, M. P. & Cassens, R. G. (1990) *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in meat and meat products-a review. *Journal of Food Protection*. **51**: 81-91.
37. Guyer, S. & Jemmi, T. (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*. **57**: 1523-1527.
38. Beuchat, L. R. & Brackett, R. E. (1990) Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**: 1734-1742.
39. Zhang, G., Ma, L., Beuchat, L. R., Erickson, M. C., Phelan, V. H. & Doyle, M. P. (2009) Evaluation of treatments for elimination of foodborne pathogens on the surface of leaves and roots of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Protection*. **72**: 228-234.
40. Chiarini, E., Tyler, K., Farber, J. M., Pagotto, F. & Destro, M. T. (2009) *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: Manual and automatic evisceration. *Poultry Science*. **88**: 791-797.
41. Colburn, K. G., Kaser, C. A., Abeyta, C. Jr. & Weksil, M. (1990) *Listeria* species in a California estuarine environment. *Applied Environmental Microbiology*. **56**: 2007-2011.
42. Al-Ghazali, M. R. & Al-Azawi, S. K. (1990) *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *Journal of Applied Bacteriology*. **69**: 642-674.
43. Bigot, A., Raynaud, C., Dubail, I., Dupuis, M., Hossain, H., Hain, T., Chakraborty, T. & Charbit, A. (2009) *Listeria monocytogenes* o1273, a novel gene involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Microbiology*. **155**: 891-902.
44. Guglietti, E., Korhonen, J. M., Heikkinen, J., Morelli, L. & von Wright, A. (2009) Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS Microbiology Letters*. **293**: 28-34.
45. Kim, J. W. & Kathariou, S. (2009) Temperature-dependent phage resistance of *Listeria monocytogenes* epidemic clone II. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 2433-2438.
46. Wang, L. & Lin, M. (2008) A novel cell wall-anchored peptidoglycan hydrolase (autolysin), IspC, essential for *L. monocytogenes* virulence: genetic and proteomic analysis. *Microbiology*. **154(Pt 7)**: 1900-1913.
47. Kocks, C., Couin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1994) *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the ActA gene product, a surface protein. *Cell*. **68**: 521-531.

48. Gaillard, J., Buche, L. P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by inteARNlin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell*. **65**: 1127-1141.
49. Dumas, E., Desvaux, M., Chambon, C. & Hébraud, M. (2009) Insight into the core and variant exoproteomes of *Listeria monocytogenes* species by comparative subproteomic análisis. *Proteomics*. **9**: 3136-3155.
50. Crimmins, G. T., Schelle, M. W., Herskovits, A. A., Ni, P. P., Kline, B. C., Meyer-Morse, N., Lavarone, A. T. & Portnoy, D. A. (2009) *Listeria monocytogenes* 6-Phosphogluconolactonase mutants induce increased activation of a host cytosolic surveillance pathway. *Infectious Immunology*. **77**: 3014-3022.
51. Sokolovic, Z. & Goebel, W. (1989) Synthesis of bacteriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. *Infectious Immunology*. **57**: 295-329.
52. Sokolovic, Z., Fuchs, A. & Goebel, W. (1990) Synthesis of species specific stress proteins by virulent cepas of *Listeria monocytogenes*. *Infectious Immunology*. **58**: 3582-3587.
53. Schauer, K., Stolz, J., Scherer, S. & Fuchs, T. M. (2009) Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*. **191**: 2218-2227.
54. Singh, R., Jamieson, A. & Cresswell, P. (2008) GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature*. **455**: 1244-1247.
55. Portnoy, D., Chakraborty, A. T., Goebel, W. & Cossart, P. (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infectious Immunology*. **60**: 1263-1267.
56. Nieman, R. E. & Lorber, B. (1980) Listeriosis in adult: a changing pattern-report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Reviews of Infectious Diseases*. **2**: 207-227.
57. Cossart, P. (1995) Actin-based bacterial motility. *Current Topics of Cell Biology*. **7**: 94-101.
58. Riedo, F. X., Pinner, R. W., Tosca, M. D., Carter, M. L., Graves, L. M., Reeves, M. W., Weaver, R. C., Plykatis, B. D. & Broome, C. V. (1994) A point-source of foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *Journal of Infectious Diseases*. **170**: 693-696.
59. Schuchat, A., Deaver, K., Hayes, P. S., Graves, L., Mascola, L. & Wenger, J. D. (1993) Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *Journal of Infectious Diseases*. **167**: 1261-1262.
60. Jeong, D. K. & Frank, J. F. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 °C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal of Food Protection*. **57**: 576-586.

61. Walker, R. L., Jensen, L. H., Kinde, H., Alexander, A. V. & Owen, L. S. (1991) Environment survey for *Listeria* species in frozen milk plants in California. *Journal of Food Protection*. **54**: 178-182.
62. Genigeorgis, C. A., Dutulescu, D. & Fernández Garayzabal, J. (1989) Prevalence of *Listeria spp.* in poultry meal at the supermarket and slaughterhouse level. *Journal of Food Protection*. **52**: 618-624.
63. McLauchlin, J. & Gilbert, R. J. (1990) *Listeria* in food. *PHLS Microbiology Digest*. **7**: 54-55.
64. Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. (1991) Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. **4**: 169-183.
65. Farber, J. (1992) Prevention and control of foodborne listeriosis. *Dairy, Food and Environmental Sanitarian*. **12**: 334-340.
66. Tappero, J. W., Schuchat, A., Deaver, K. A., Mascola, L. & Wenger, J. D. (1995) Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts. *Journal of the American Medical Association*. **273**: 1118-1122.