

LISTERIA y LISTERIOSIS

BRUNO GONZÁLEZ ZORN, MÓNICA SUÁREZ RODRÍGUEZ

**Profesores Titulares de Universidad
Departamento de Sanidad Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria**

Introducción

La listeriosis es una patología producida por bacterias del género *Listeria*. Después de los recientes brotes producidos por sandwiches contaminados en hospitales y colegios en el Reino Unido, así como después del informe de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en el que se indica el incremento de la listeriosis humana en la Unión Europea, estimamos que la profesión veterinaria representa el principal pilar para la detección y control de esta patología. La identificación precoz de los casos de listeriosis animal, así como la detección de *Listeria* como agente de infección primario y secundario en los alimentos de muy diversos orígenes, son los dos elementos clave para que la lucha contra estas bacterias sea efectiva.

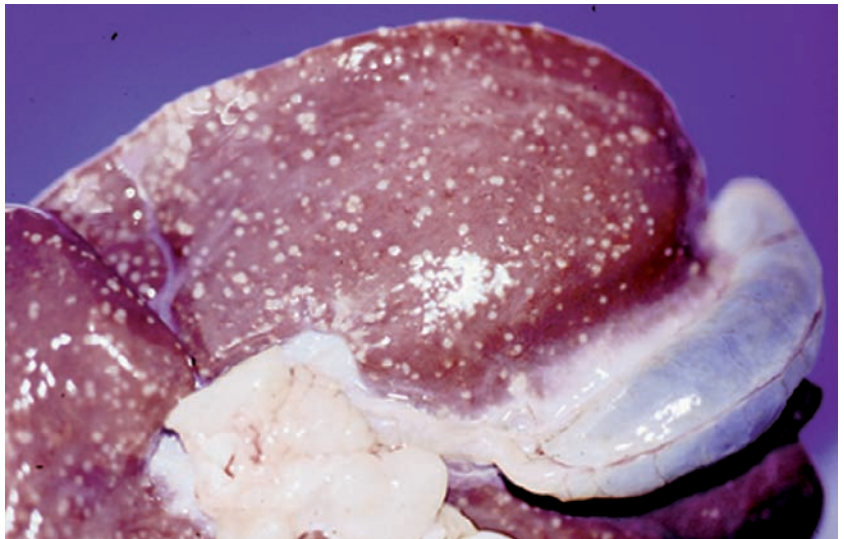
Durante muchos años, el aislamiento de *Listeria* fue muy infrecuente, y la epidemiología de la enfermedad una auténtica incógnita. Sin embargo, a partir finales de los años setenta, el número de aislamientos comenzó a incrementarse, y a partir de los años ochenta la presentación de brotes epidémicos humanos en Europa y los Estados Unidos permitió asociarlos por primera vez directamente con el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Los alimentos implicados con mayor frecuencia en los brotes de listeriosis en el hombre son los productos elaborados que no necesitan cocción antes de su consumo, como patés, pescado ahumado, quesos frescos y ensaladas.

El agravante es que *Listeria* sobrevive, como hemos señalado anteriormente, a los procesos de elaboración de la industria alimentaria, siendo además capaz de proliferar en condiciones de refrigeración. De esta forma, *Listeria* puede alcanzar en poco tiempo una elevada carga en los alimentos y producir casos de listeriosis en los individuos que los consumen. La mortalidad de la listeriosis da lugar a unos

índices que llegan a ser de hasta el 30% en algunos brotes en la población humana. Éstos afectan principalmente a aquellos individuos que presentan inmunodepresión, ya sea fisiológica (por edad muy temprana o avanzada), infecciosa (virus inmunodepresores y patologías sistémicas avanzadas) o iatrogénica (p. ej. inmunodepresión pretransplante o quimioterapia). *Listeria* es, por tanto, origen de gran preocupación por parte de la Industria Alimentaria y las Administraciones de Salud Pública y Sanidad Animal.

Mucho antes del reconocimiento de *Listeria* como contaminante alimentario, esta bacteria era utilizada como modelo de parásito intracelular por los inmunólogos. Desde los trabajos realizados por Mackaness en los años sesenta *Listeria* ha sido esencial para la comprensión de los mecanismos celulares del sistema inmune, y ha servido como base para compren-

“Los alimentos implicados con mayor frecuencia en los brotes de listeriosis en el hombre son los productos elaborados que no necesitan cocción antes de su consumo, como patés, pescado ahumado, quesos frescos y ensaladas”



Hepatitis piogranulomatosa extensa en un cordero infectado experimentalmente con *L. ivanovii* (Clin. Microbiol. Rev. 2001)

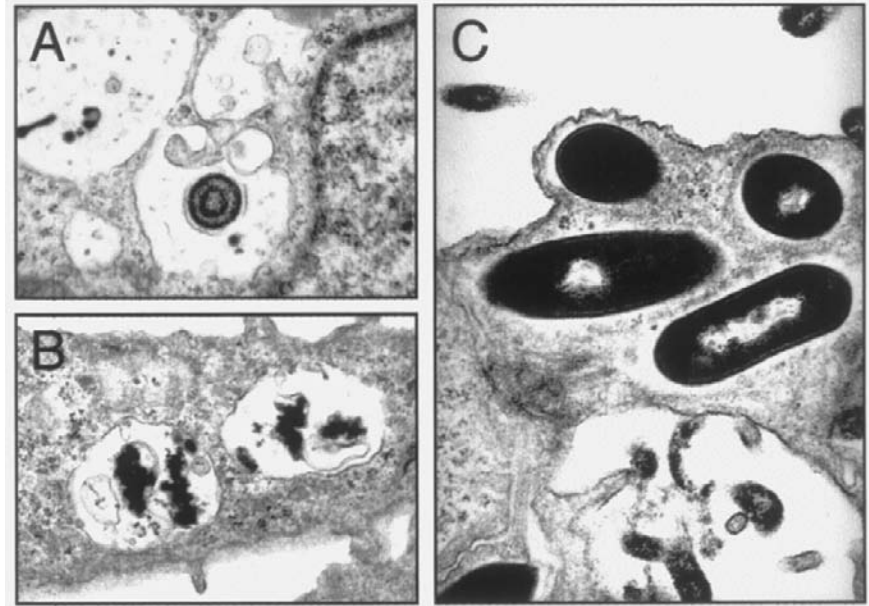
der conceptos básicos de su funcionamiento. Sirva como ejemplo que la utilización de *Listeria* en el modelo de infección murino ha servido para desvelar la importancia de los macrófagos activados para la defensa frente a parásitos intracelulares o la función del linfocito T en la activación del macrófago y la inmunidad celular.

La aparición de los brotes de listeriosis en los años ochenta y su incidencia en la Sociedad y Autoridades Sanitarias coincidió en el tiempo con la primeras investigaciones acerca de los determinantes moleculares implicados en la patogénesis de *Listeria*. Lo primero que llamó la atención a los investigadores fue que *L. monocytogenes* presentaba actividad hemolítica

mientras que las especies no patógenas del género (exceptuando *L. seeligeri*) no eran hemolíticas. Los estudios llevaron al clonaje del gen de la hemolisina, *hly*, el primer factor de virulencia bacteriano al que se le pudo atribuir una función específica en la patogénesis de la infección: la ruptura de la membrana vacuolar tras la entrada de la bacteria en la célula eucariota. Este paso es trascendental para la virulencia de *Listeria*, ya que solamente es capaz de multiplicarse una vez que alcanza el citoplasma de la célula infectada, como veremos más adelante. Por tanto, *Hly* de *Listeria* fue, además, el primer factor al que se le asignó una función crítica en la proliferación de un parásito intracelular en el interior de la célula eucariota.

A partir de entonces, *Listeria* ha sido ampliamente estudiada como modelo de patógeno intracelular hasta el punto de que, hoy en día, ocupa un puesto privilegiado dentro de la investigación biomédica que va más allá de la microbiología o las enfermedades infecciosas. *Listeria* ha contribuido de forma determinante a la comprensión de los mecanismos más básicos de la biología fundamental. No olvidemos que el concepto actual del control y la dinámica del citoesqueleto de actina de las células eucariotas, imprescindible para comprender fenómenos como la migración linfocitaria, metastatización tumoral o embriogénesis, se debe en gran medida a los trabajos realizados con ActA de *Listeria*.

Como fruto de esta investigación básica, el estudio de este patógeno ha revelado su aplicación biomédica y ha permitido la utilización de *Listeria* como vector vacunal frente a diversas patologías. Así, esta bacteria ya ha mostrado ser efectiva en modelos experimentales frente a otros agentes bacterianos (*Salmonella*, *Legionella*), víricos (HIV, CDV) e incluso patologías de origen *a priori* no infeccioso como el carcinoma colorectal y carcinoma renal.



Multiplicación intracelular de *L. monocytogenes*. A y B. Las bacterias son destruidas por la célula huésped. Se observan restos bacterianos en el compartimento intracelular. C. *L. monocytogenes* ha escapado del compartimento vacuolar, y se multiplica en el citoplasma de la célula parasitada (B. González Zorn)

El género *Listeria*

En 1926, Murray *et al.* describen por primera vez a *Bacillus monocytogenes* como el agente causal de un brote que afectó a las cobayas y conejos de su laboratorio en la Universidad de Cambridge. El proceso se caracterizaba por la presencia de lesiones necróticas en hígado, acompañadas de leucocitosis mononuclear (monocitosis). Coincidiendo en el tiempo, Pirie aislaba en 1927 durante sus estudios sobre la Tiger River Disease en África del Sur, una bacteria a partir de focos necróticos del gerbo que denominó *Listerella hepatolytica*. No fue hasta 1940 que el propio Pirie designó a este agente con su nombre actual, *Listeria monocytogenes*.

L. monocytogenes ha sido durante mucho tiempo (1926-1974) la única especie reconocida dentro del género *Listeria*. La octava edición del Manual de Bergey (1974) amplió oficialmente el género a cuatro especies, añadiendo tres no patógenas: *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi* (descritas en 1963, 1966 y 1971, respectivamente). Sin embargo, la especie *L. monocytogenes* seguía definida como *sensu lato* e incluía cepas hemolíticas patógenas y no hemolíticas apatógenas, lo que implicaba la imposibilidad de diferenciar taxonómicamente cepas de origen epidémico de las apatógenas aisladas del medio ambiente. *L. monocytogenes sensu lato* fue dividida en 1982 como consecuencia de un análisis fenotípico y epidemiológico detallado y el desarrollo de técnicas de hibridación ADN-ADN, en 5 especies: *L. monocytogenes sensu stricto*, débilmente hemolítica y patógena, *L. seeligeri*, débilmente hemolítica y apatógena; *L. innocua* y *L. welshimeri*, no hemolíticas y apatógenas; y un grupo que incluía las cepas de *L. monocytogenes* serovar 5, fuertemente hemolíticas y patógenas.

En 1962, el búlgaro Ivan Ivanov había aislado a partir de infecciones perinatales y abortos ovinos, una

bacteria que bautizó con el nombre de *Listeria bulgarica*. En 1975 Ivanov sugirió que estas bacterias debían formar oficialmente una nueva especie dentro del género *Listeria*. Sin embargo, en 1982, pasaron a constituir el serovar 5 de *L. monocytogenes*. El reconocimiento oficial de una nueva especie denominada *L. ivanovii* para estas cepas del serovar 5 se realizó en 1984 bajo propuesta de Seeliger *et al.* (1982; 1984). En 1992, Boerlin *et al.* demuestran que *L. ivanovii* contiene dos subespecies: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, ambas patógenas y fuertemente hemolíticas, pero con alguna característica bioquímica diferencial, como la

producción de ácido a partir de N-acetil-"-manosamina y la incapacidad de producir ácido a partir de la ribosa por parte de la subsp. *londoniensis*.

Actualmente el género *Listeria* está compuesto por dos especies potencialmente patógenas, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, y cuatro apatógenas, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Los análisis de 16S rRNA muestran una relación filogenética de *Listeria* con *Streptococcus*, mientras que los estudios que utilizaron la secuencia de 23S rRNA agrupan al género junto a los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus*.

L. monocytogenes se puede clasificar en 13 serotipos diferentes y algunos métodos genéticos diferencian más de 100 subtipos de esta especie. Los 13 serotipos están basados en las variaciones de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) detectadas mediante anticuerpos.

Los primeros casos de listeriosis humana fueron descritos por Nyfeldt en 1929 a partir de pacientes con septicemia generalizada, mientras que Schultz *et al.* realizaron el primer aislamiento a partir de lesiones petequiales en rombencéfalo de pacientes con meningoencefalitis. Burn fue el primero en describir en 1935 la "granulomatosis infantiseptica", la presentación más característica de la infección neonatal por *Listeria*. Los primeros casos de listeriosis en rumiantes se describieron por Gill en 1933 y 1937, aislando un microorganismo a partir del encéfalo de ganado ovino al que denominó *Listerella ovis*. Los animales cursaban con una sintomatología nerviosa caracterizada por incoordinación y torneo, lo que le llevó



Manifestación clínica típica de meningoencefalitis causada por *L. monocytogenes* en oveja. En una primera etapa se observa torticolis involuntaria y marcha en círculos (Clin. Microbiol. Rev. 2001)

a denominar a la enfermedad *circling disease*, que es la presentación más característica de la listeriosis en rumiantes.

Desde el punto de vista microbiológico el género *Listeria* está compuesto por bacilos Gram-positivos cortos regulares y de extremos redondeados con una longitud entre 0,5-2 μm y un diámetro entre 0,4-0,5 μm . Son bacterias anaerobias facultativas y no tienen capacidad de formar cápsula ni esporas. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 1 y 43°C, pudiendo crecer, por lo tanto, a temperaturas de refrigeración. El rango de pH permisivo para *Listeria* se encuentra definido entre 5 y 9, pudiendo tolerar medios con una concentración de 10% de cloruro sódico. Su movilidad depende de la temperatura, con un rango óptimo entre 5 y 20°C, expresando flagelos peritricos en toda su superficie entre 20 y 22°C y siendo inmóvil a 37°C.

En medios de cultivo sólidos ricos en nutrientes, y tras una incubación de 24-48 horas a 37°C, forman colonias redondas, translúcidas y ligeramente convexas, con un diámetro entre 0,5-1,5 μm . *Listeria* puede cultivarse bien en agar-sangre, BHI o en medios selectivos como LSAM o ALOA.

Las bacterias del género *Listeria* se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, siendo algunas de ellas patógenas para los animales. Debido a su ubicuidad, *Listeria* se puede incorporar fácilmente a la cadena alimentaria a través de las materias primas utilizadas en la elaboración de alimentos. La listeriosis es una zoonosis

"Después del informe de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], en el que se indica el incremento de las listeriosis humanas en la Unión Europea, estimamos que la profesión veterinaria representa el principal pilar para la detección y control de esta patología"



En una fase posterior a la imagen anterior, observamos postración, incoordinación y pedaleo. El pronóstico en estos casos es fatal (Clin. Microbiol. Rev. 2001)

que afecta a más de 50 especies animales, incluyendo los principales animales domésticos y el hombre. Entre los hospedadores naturales de *Listeria* se encuentran una amplia variedad de vertebrados, incluyendo aves silvestres y mamíferos, entre los que destacan los rumiantes domésticos.

La listeriosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria con mayor tasa de mortalidad, entre 20 y 30%, lo que hace que sea considerada una enfermedad prioritaria tanto en Salud Pública como en Sanidad Animal. Como hemos mencionado anteriormente, la infección que produce *Listeria* es de carácter oportunista y afecta principalmente a mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y adultos inmunodeprimidos, incluyendo afectados de SIDA. La bacteria penetra vía oral en el hombre a través de alimentos, o en animales a través del ensilado, contaminados con carga bacteriana infecciosa. *Listeria* atraviesa la barrera intestinal y puede colonizar órganos interaccionando con el sistema inmune del hospedador. El ciclo infeccioso fecal-oral se cierra con la eliminación de *Listeria* a través de las heces al medio natural.

Patogénesis y Ciclo infeccioso

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que penetra en el hospedador a través del sistema digestivo, tanto del hombre como de los animales. En los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*. El ciclo de infección consta de cuatro etapas: introducción en la célula eucariota, evasión de la vacuola intracelular, polimerización de filamentos de actina y diseminación a la célula adyacente.

La unión covalente de las proteínas de superficie de la pared celular de bacterias Gram-positivas a la

célula eucariota requiere proteínas con una secuencia conservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, donde X es cualquier aminoácido). Por ello, en el proceso de entrada al interior de las células del hospedador participan dos proteínas de superficie de *Listeria* codificadas por el operón *inlAB*, denominadas internalina A (o InlA) e InlB, que llevan esta secuencia. La primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas como las intestinales, mientras que InlB lo hace en el caso de células epiteliales no polarizadas como los hepatocitos. Posteriormente se han descrito numerosos genes que codifican para proteínas del tipo de la internalina (*inlC*, *inlC2*, *inlD*,

etc.). Existen otras muchas moléculas necesarias para la invasión y/o entrada de *L. monocytogenes* en la célula eucariota, entre las que se encuentran varias autolisinas (Ami, p60, Auto), una proteína fijadora de fibronectina (FbpA) y proteínas que también intervienen en fases posteriores del ciclo intracelular como ActA.

Una vez internalizada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de una proteína citolítica activa a bajo pH, la toxina tiol-activada listeriolisina O (LLO) codificada por el monocistrón *hly*. Además de esta toxina, *L. monocytogenes* secreta al medio extracelular dos fosfolipasas C asociadas con la virulencia que pueden contribuir a dañar las membranas y a la correspondiente citolisis. Una de ellas, PI-PLC, tiene como sustrato específico al fosfatidilinositol (PI), está codificada por *plcA* y es capaz de romper los anclajes glicosil-PI. La otra, PC-PLC, es una lecitinasa codificada por *plcB*, que tiene un rango más amplio de sustrato, hidrolizando fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Aún no se ha podido determinar si estas fosfolipasas C se comportan sólo como factores alterantes de las membranas o si están involucradas en los fenómenos de transducción de señales mediante la liberación de segundos mensajeros lipídicos. La lecitinasa es activada y atraviesa la pared bacteriana gracias a una metaloproteasa específica (Mpl) codificada por el gen *mpl*. La multiplicación intracelular precisa un transportador de hexosa-fosfato (Hpt) que es homólogo del transportador de glucosa-6-fosfato (G6P) de la célula eucariota, responsable de la entrada de G6P en el retículo endoplásmico desde el citosol.

Una vez libre en el citoplasma de la célula, la bacteria se multiplica activamente. A pesar de que se tienen algunas evidencias sobre la expresión diferencial de algunos genes metabólicos bacterianos dentro de la célula hospedadora, los mecanismos involucrados en la obtención de sustratos para el crecimiento de



Ciclo infeccioso. El ciclo infeccioso de la listeriosis es un ciclo oro-fecal, en que la vehiculación a través de los alimentos juega un papel fundamental, tanto en la listeriosis animal como en la humana.

la bacteria en el citosol no han sido determinados. Una vez alcanzado el citoplasma, la bacteria utiliza el citoesqueleto de la célula hospedadora para desplazarse en el interior de la misma. El movimiento intracelular tiene lugar como consecuencia de un ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedadora en uno de los polos de la bacteria, fenómeno aparentemente dirigido por la proteína de superficie ActA. Hasta el momento, los mecanismos moleculares íntimos por los que la proteína ActA induce la polimerización de actina no han sido determinados.

La polimerización polar de actina propulsa a *L. monocytogenes* por el citoplasma en un movimiento aleatorio que hace que finalmente algunas bacterias alcancen la periferia de la célula infectada. Allí éstas entran en contacto con la membrana celular, haciendo protrusión hacia la célula colindante en evaginaciones citoplásmicas que contiene en su extremo una bacteria. Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, en cuya disrupción parece jugar un principal papel la lecitinasasa. Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, este fenómeno es crucial en la patogénesis de la infección por *Listeria*.

Los genes de virulencia del patógeno intracelular facultativo *Listeria monocytogenes* se expresan coor-

dinadamente bajo el control del activador transcripcional PrfA. Esta proteína reguladora es absolutamente indispensable para la expresión de la virulencia en las listerias patógenas. Cualquier mutación que afecte a su funcionalidad da lugar a una cepa totalmente apatógena. PrfA presenta un motivo HTH en la región C-terminal que interacciona con secuencias palindrómicas de 14 pb, denominadas "cajas PrfA", situadas en posición -41 respecto del punto de iniciación de la transcripción de los factores de virulencia controlados por esta proteína. Su gen codificante, *prfA*, se encuentra en un operón bicistrónico precedido por *plcA*, que codifica una fosfolipasa específica del fosfatidil inositol también implicada en la virulencia. Este operón *plcA-prfA* se encuentra en el locus *hly*, una isla cromosómica organizada alrededor del gen de la hemolisina que aporta funciones esenciales para la vida intracelular. *prfA* se expresa a bajos niveles de forma constitutiva, o bien de forma auto-regulada a partir de un promotor PrfA-dependiente que se encuentra delante de *plcA*.

En el año 2001, se secuenció el genoma completo de *L. monocytogenes* y se comparó con el genoma de *L. innocua*, que resultó ser de mayor tamaño, determinándose que un 10% de los genes son diferentes en la especie patógena respecto de la no patógena. Posteriormente se han comparado los genomas completos de otras tres cepas de *L. monocytogenes*, una de serotipo 1/2a y dos de serotipo 4b, asociadas con infeccio-

nes alimentarias en Estados Unidos. Con ello, se han llegado a identificar genes específicos de serotipo. Además, a partir de la secuenciación del genoma de *L. monocytogenes* se han descubierto nuevos factores de virulencia, entre los que destacan nuevas proteínas de superficie del tipo de las internalinas, las sortasas SrtA y SrtB que son transpeptidasas que unen a la pared celular diferentes proteínas de superficie como la internalina o una hidrolasa de sales biliares (BSH) que permite a la bacteria sobrevivir en el intestino y que no se encuentra en *L. innocua*, entre otros muchos.

Formas clínicas

Como hemos visto, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenos oportunistas y parásitos intracelulares facultativos, aunque poseen características biológicas y patogénicas diferenciales. Mientras que *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en el medio ambiente y afecta al hombre, mamíferos y aves, *L. ivanovii* se aísla raramente de la naturaleza y, aunque se ha descrito algún caso en humanos, afecta casi exclusivamente a rumiantes, especialmente al ganado ovino. En sus hospedadores susceptibles induce abortos, septicemia neonatal o enteritis, pero nunca encefalitis, la manifestación clínica más típica de la listeriosis ovina causada por *L. monocytogenes*.

Las presentaciones clínicas más características de la listeriosis son:

a.) **Meningoencefalitis** (sólo *L. monocytogenes*): se trata de la presentación más frecuente de la liste-

“Afecta principalmente a aquellos individuos que presentan inmunodepresión, ya sea fisiológica, infecciosa o iatrogénica”

riosis en humanos adultos y ganado ovino. En el hombre se instaura en forma de meningitis o meningoencefalitis, cursando con fiebre, ataxia, depresión y estado mental alterado, y que puede llegar al coma y la muerte si no se instaura tratamiento. En ganado ovino la infección del sistema nervioso central suele afectar primariamente al rombencéfalo con afectación meníngea secundaria a la invasión del tejido nervioso, y cursa con nistagmo, ataxia, y tortícolis. Los animales presentan marcha en círculos que evoluciona a postración y pedaleo, movimiento

paroxístico de las extremidades y muerte.

b.) **Forma perinatal:** la infección del feto es transplacentaria y se establece durante el último tercio de la gestación, siendo la consecuencia más frecuente el aborto. Cuando la infección se adquiere próxima al término, el feto nace con una septicemia neonatal generalizada, que en el caso de niños se describe como *granulomatosis infantiseptica* y cursa con lesiones granulomatosas diseminadas de forma miliar en la superficie corporal y especialmente en el hígado. En otros casos de presentación más tardía el recién nacido presenta como única manifestación una meningitis neonatal por *L. monocytogenes*. En vacuno y ovino, la enfermedad se presenta de forma similar, produciéndose generalmente aborto o nacimiento de animales prematuros no viables.

c.) **Septicemia:** es poco frecuente en rumiantes adultos. En humanos se desarrolla principalmente en individuos adultos inmunodeprimidos, en los que la antibioterapia por vía endovenosa es exitosa, si se establece antes de la afectación irreversible de órganos vitales.

d.) **Presentaciones locales:** se han descrito multitud de presentaciones localizadas con infección circunscrita a un determinado órgano, como mastitis, endocarditis, enteritis, queratoconjuntivitis, miocarditis e iritis.

Además de la diferencia que presentan *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* en infecciones naturales, también tienen un comportamiento distinto en el modelo experimental murino. *L. ivanovii* posee una DL⁵⁰ mayor que *L. monocytogenes* (10⁶-10⁷ frente a 10⁴-10⁵ en *L. monocytogenes*), y coloniza el hígado, pero no el bazo, mientras que *L. monocytogenes* prolifera de la misma forma en ambos órganos.

L. monocytogenes y *L. ivanovii* también se diferencian en sus características hemolíticas in

Adherencia e invasión

InIA: Entrada en células epiteliales

InIB: Entrada en células hepáticas

p60

ActA

Escape del fagosoma

Hly (LLO), listeriolisina, hemolisina

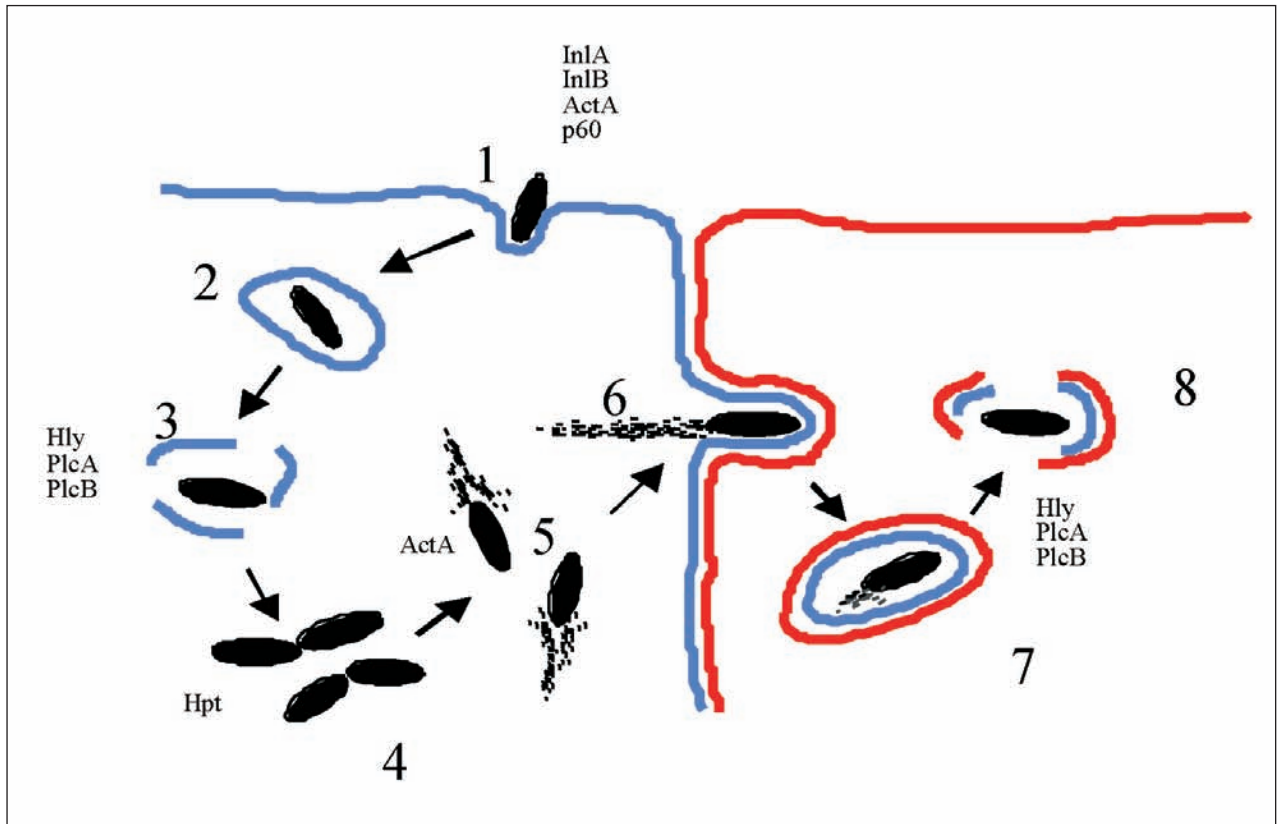
PlcA, fosfolipasa. Fosfatidilinositol

PlcB, fosfolipasa. Fosfatidilcolina o lecitina

Mpl, metaloproteasa

Movimiento intracelular: ActA. Nucleador de actina

Proliferación intracelular: Hpt. Permeasa



Ciclo intracelular. Representación esquemática del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*. La bacteria penetra en el interior de la célula induciendo su propia fagocitosis (1), queda englobada en un fagosoma (2) del que escapa rápidamente por la acción de la hemolisina y dos fosfolipasas (3); una vez en el citoplasma inicia su multiplicación y el fenómeno de motilidad intra- (4) e intercelular por polimerización de actina (5); la bacteria pasa así a las células contiguas, donde reinicia un nuevo ciclo de escape del fagosoma (7), multiplicación intracelular y motilidad por polimerización de actina.

vitro. *L. monocytogenes* presenta una hemólisis muy débil, que muchas veces sólo puede llegar a detectarse levantando las colonias del medio de cultivo. Sin embargo, *L. ivanovii* produce un amplio halo de doble hemólisis en agar sangre de cordero, que la hace inconfundible del resto de las especies del género.

Para evidenciar la actividad hemolítica de *L. monocytogenes* y como criterio de identificación se utiliza comúnmente una reacción de hemólisis sinérgica con *Staphylococcus aureus*, toxina positivos, también llamada reacción de CAMP (acrónimo de Christie, Atkins y Muench- Petersen, primeros en describir este fenómeno entre *S. aureus* y *Streptococcus agalactiae*). Esta reacción se basa en el incremento de la actividad hemolítica de *L. monocytogenes* cuando crece en la proximidad de *S. aureus*, reacción que no se produce con *L. ivanovii*. Paralelamente se ha desarrollado una reacción tipo CAMP en la que se ha sustituido a *S. aureus* por *Rhodococcus equi* como bacteria marcadora. Bajo el efecto de las exosustancias que secreta esta bacteria se obtiene un incremento de la actividad hemolítica característica de *L. ivanovii*, en el que el halo externo de hemólisis parcial se lisa completamente, dando lugar a una hemólisis en forma de pala que se utiliza como criterio diferenciador de *L. ivanovii* frente al resto de Listerias.

L. monocytogenes también produce una reacción tipo CAMP con *R. equi*, pero ésta adquiere una forma redondeada, de raqueta o cerilla, en lugar de la característica forma de pala, siendo por tanto claramente distinguible de la de *L. ivanovii*. Las propiedades hemolíticas características de *L. ivanovii* se deben a que secreta una potente esfingomielinasa C (SMasa), producida exclusivamente por esta especie dentro del género *Listeria*.

Listeriosis en animales

Al igual que en el hombre, la listeriosis en los animales está vehiculada por los alimentos elaborados. Cualquier mamífero, además de las aves, puede estar afectado cuando consume alimento contaminado con *Listeria*. Sin embargo, debemos destacar que, con gran diferencia, el alimento más implicado en las listeriosis animales es el ensilado. Consecuentemente, los animales que más consumen este tipo de alimento son aquellos que más sufren listeriosis, los rumiantes, en nuestro país principalmente el ganado ovino, seguido del bovino y caprino. Su preparación defectuosa hace que alcance un pH próximo al neutro, en lugar del pH ácido necesario para su conservación, permitiendo la rápida proliferación de *Listeria*. Es a partir de las

materias primas obtenidas de los animales que consumen estos alimentos, donde se origina gran parte de las contaminaciones de productos destinados al consumo humano. A diferencia de lo que ocurre en el hombre, son dos las bacterias del género *Listeria* que puedes producir listeriosis en animales: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*. Los animales afectados han consumido siempre, en las semanas anteriores a la aparición de los síntomas característicos, alimento altamente contaminado con *Listeria*. Por lo tanto, un análisis del ensilado, en el caso de los rumiantes, y la destrucción del mismo en el caso de que sea positivo, controlarán el proceso en la población afectada. Es muy recomendable realizar el análisis del ensilado, debido que la carga bacteriana del mismo, en el caso de tratarse de *Listeria*, es muy elevada (hasta 10^9 u.f.c./gramo), por lo que su detección en el laboratorio no es complicada. Cabe recordar que *L. ivanovii* no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, y que afecta exclusivamente a rumiantes, por lo que los síntomas en brotes provocados por este microorganismo nunca serán de tipo meningoencefálico, y sus brotes se caracterizarán, casi siempre, por la aparición repentina de abortos. *L. monocytogenes* cursa con abortos y sintomatología nerviosa, caracterizada por torneo, incoordinación, tortícolis, postración con pedaleo y finalmente muerte. En el caso de que exista sintomatología nerviosa, el diagnóstico laboratorio debe realizarse a partir de las lesiones petequiales características que se pueden detectar en la base del rombencéfalo. Por ello, el envío del animal completo o de la cabeza es recomendable para un rápido y certero diagnóstico.

Listeria en alimentos

La listeriosis humana está causada por *L. monocytogenes*, siendo originada por consumo de alimentos contaminados. *L. monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente y está presente en bajo número en algunos alimentos que no necesitan ser cocinados antes de su consumo

La listeriosis es también un problema emergente para la industria alimentaria como consecuencia del aumento de la incidencia, en los países desarrollados, de epidemias asociadas al consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Este microorganismo supone un problema grave para las empresas alimentarias, ya que su control en las plantas de procesado conlleva una gran dificultad. Su ubicuidad y la alta tasa de mortalidad hacen que *L. monocytogenes* cobre una especial importancia desde el punto de vista de la higiene y la salud alimentaria y que sea un microorga-

nismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) que se llevan a cabo en las industrias alimentarias.

Para avanzar en el estudio de la diferenciación de las cepas de *L. monocytogenes* que se pueden encontrar en distintos ambientes en las plantas de procesamiento de alimentos, se suele realizar el serotipado, a pesar de que posee una baja capacidad y que existen cepas no serotipables.

La dosis infectiva de *L. monocytogenes* es de, al menos, 10^2 células viables en el caso de los grupos de riesgo, aumentando esta cifra hasta 10^4 en el caso de la población sana. Sin embargo, sería importante estudiar la relación dosis-respuesta de la listeriosis humana y el papel que desempeña la virulencia de la cepa involucrada, así como su interacción con el hospedador. Por esta razón, en la actualidad se sigue considerando que todos los aislados de *L. monocytogenes* son igual de patogénicos, aunque existe cada vez más inquietud para conocer si la virulencia varía de unas cepas a otras. Una de la línea más importantes en la actualidad, es la que investiga la gran capacidad de *Listeria* de formar biopelículas o *biofilms*, que le permite acantonarse en las maquinaria industrial y resistir a procesos físicos y químicos de eliminación rutinarios.

Por lo tanto, y debido a la importancia de nuestro país en la producción de alimentos, es necesario contar con técnicas adecuadas de control y calidad en los alimentos, ya que esto contribuirá a proteger la salud de los consumidores, a la vez que fortalecerá la presencia internacional de nuestros productos en el mercado.

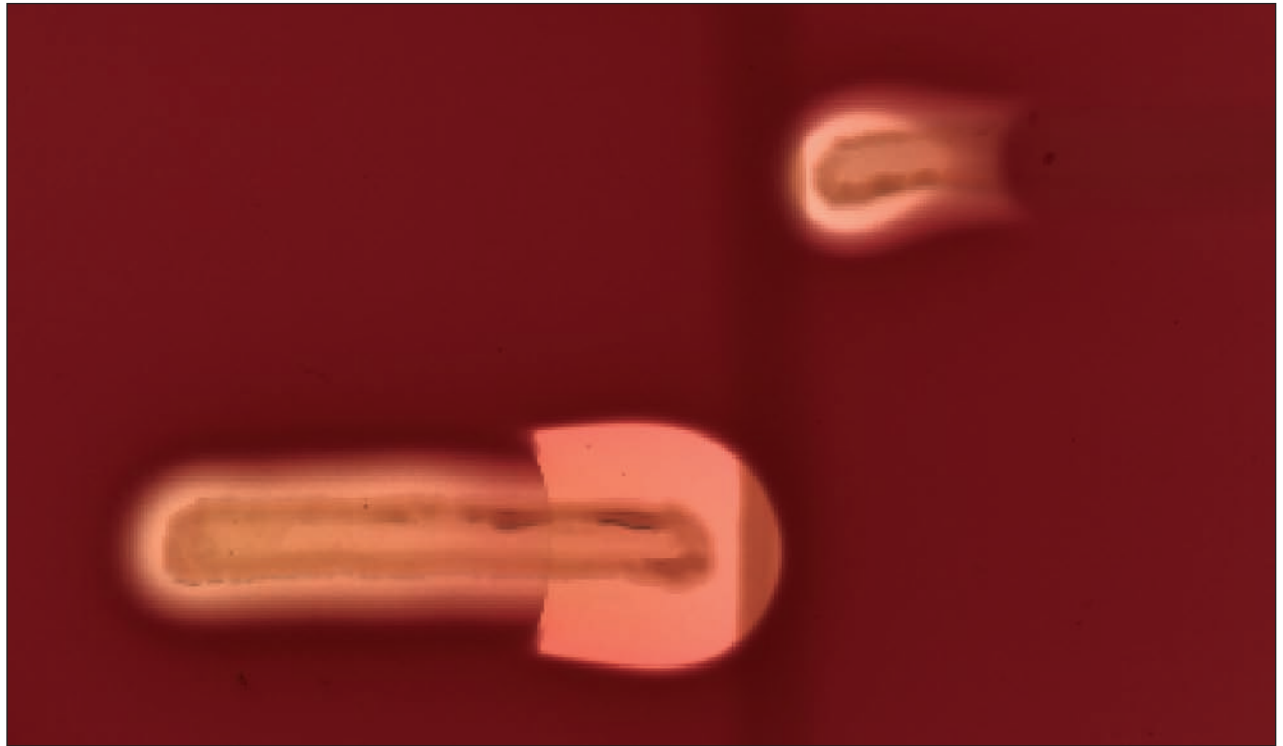
Detección

La presencia de *L. monocytogenes* ha sido ampliamente estudiada en alimentos, en ensilados destinados al consumo animal, en el ambiente y en muestras clínicas. Las técnicas de detección de *Listeria* en alimentos no constituyen sólo herramientas valiosas para identificar brotes epidémicos, sino también para prevenirlos, controlando las contaminaciones durante la producción y distribución de los alimentos.

La detección de *Listeria* en alimentos se ha ido desarrollando en los últimos años y podemos encontrar una gran variedad de métodos que van desde el aislamiento e identificación de la bacteria mediante técnicas microbiológicas convencionales hasta los más sofisticados métodos genéticos basados en *microarrays*, sin olvidar la amplificación de ácidos nucleicos, detección de anticuerpos y ELISA.

Los métodos bacteriológicos convencionales son más lentos pero muy eficaces, y continúan siendo el método de referencia comparado

“El agravante es que *Listeria* sobrevive a los procesos de elaboración de la industria alimentaria, siendo además capaz de proliferar en condiciones de refrigeración”



CAMP. Reacción de CAMP de *L. monocytogenes* (arriba), también denominado “efecto cerilla” y *L. ivanovii* (abajo), “efecto pala”, frente a *Rhodococcus equi* en agar sangre de cordero.

con otros métodos más modernos. De acuerdo con la mayoría de los Organismos que legislan la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos, los métodos de aislamiento deben ser lo suficientemente precisos para detectar un microorganismo en 25 gramos de alimento. Esta sensibilidad sólo puede lograrse mediante el uso de medios de enriquecimiento. Los agentes selectivos comúnmente usados en el enriquecimiento de caldos de cultivo son acriflavina, que inhibe el crecimiento de otras bacterias Gram-positivas; ácido nalidíxico, que inhibe bacterias Gram-negativas y cicloheximida, que inhibe hongos. Otros antimicrobianos utilizados a menudo incluyen el amplio espectro de agentes ceftazidima y moxalactam, así como el cloruro de litio. Otra característica importante del aislamiento de *Listeria* en los medios de cultivo es la utilización de esculina. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan esculina y junto con el hierro férrico da lugar a la aparición de un intenso color negro.

Las muestras sospechosas de contener *Listeria*, por lo tanto, se pueden sembrar en medios de enriquecimiento como LSAM o ALOA, que permite el crecimiento selectivo de esta bacteria. Además de analizar la morfología de la colonia en estos medios es interesante analizar las propiedades hemolíticas de la misma en placas de agar-sangre, la actividad lecitinasas empleando placas de agar-yema de huevo, o incluso la utilización de G-6-P. Todos estos análisis nos ayudarán a caracterizar la cepa de *Listeria* que estamos aislando.

Una vez que hemos aislado colonias de presuntas *Listeria*, podemos determinar la especie fácilmente mediante la utilización de una corta batería de

pruebas bioquímicas llamada API *Listeria*, comercializada por Biomérieux, o MicroID. Además, existe una prueba que discrimina con rapidez las bacterias patógenas de las apatógenas denominada la prueba de CAMP, que no es más que la potenciación del carácter hemolítico de *Listeria* frente a *Rhodococcus equi*. Como hemos mencionado anteriormente, esta prueba permite diferenciar rápidamente *L. innocua*, de *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*.

La mayoría de los métodos alternativos carecen aún de la sensibilidad y especificidad que presenta el aislamiento e identificación clásicos, y las muestras de alimentos deben ser enriquecidas antes de su análisis. Los métodos inmunológicos tienen relativamente una especificidad más alta en comparación con los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos que son mucho más sensibles. La desventaja de los métodos moleculares es que las enzimas son a menudo inhibidas por algún componente de los alimentos.

Hay varios métodos basados en el uso de anticuerpos específicos frente a *Listeria* disponible en kits comerciales que se han aplicado las pruebas en los alimentos durante muchos años. Sin embargo, sólo unos pocos están disponibles para la detección específica de *L. monocytogenes*. El inmunoensayo enzimático (ELISA) es el más común de este tipo de ensayos inmunológicos utilizado para la detección de patógenos en los alimentos. Es de fácil aplicación y es rápido, pero debe utilizarse para reconocer *L. monocytogenes* específicamente. Hay una prueba que utiliza anticuerpos monoclonales que reconocen la proteína p60 para la identificación de *L. monocytogenes*.

Además, el serotipado y los métodos moleculares empleados para estudiar los subtipos de esta especie han mejorado notablemente la caracterización de *L. monocytogenes*, permitiendo diferenciar cepas y clones. Los métodos moleculares basados en análisis de ácidos nucleicos más utilizados en la caracterización de *L. monocytogenes* son la secuenciación de ADN, hibridación de ADN, PCR, amplificación al azar de polimorfismos del ADN (*random amplification of polymorphic DNA*, RAPD), el estudio de polimorfismos en los genes de RNAs ribosómicas (*ribotyping*), y la electroforesis en gel en campo pulsante (*pulsed field gel electrophoresis*, PFGE).

Las pruebas de hibridación de ADN han sido ampliamente utilizadas para la diferenciación de *L. monocytogenes* de otras especies de *Listeria* por medio de sondas dirigidas contra determinados genes. Existen diferentes kits disponibles comercialmente para los ensayos en cultivos puros o a partir de alimentos y muestras ambientales.

Un método alternativo a los métodos convencionales muy empleado es la técnica de PCR ó PCR a tiempo real, ya que permite la identificación y la cuantificación de *Listeria* a través de las secuencias de sus ácidos nucleicos. Los métodos que utilizan la técnica de PCR tienen una sensibilidad superior si los comparamos con los inmunoensayos. Sin embargo, la compleja y minuciosa preparación de la muestra y el uso de geles de agarosa obstaculizan la adaptación de este método de investigación para el uso rutinario en los laboratorios de microbiología de alimentos.

La electroforesis en gel en campo pulsante es una técnica muy utilizada en estudios epidemiológicos por su alta capacidad discriminatoria, ya que puede diferenciar cepas que se hallen muy próximas genéticamente, y también porque posee una buena reproducibilidad. Sin embargo, se trata de una técnica manual, delicada y lenta, por lo que no se presta a al análisis microbiológico de los alimentos a tiempo real sino de forma retrospectiva. Para normalizar el método, el *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* de Estados Unidos ha creado la red *Pulsenet* que dispone de una base de datos de aislados de alimentos y muestras clínicas de *L. monocytogenes* y otros patógenos.

Existen otra serie de técnicas prometedoras y más modernas, como el uso de bolas inmunomagnéticas recubiertas con anticuerpos anti-*Listeria* para la captura de listerias de matrices de alimentos o de cultivos de enriquecimiento, el Test targeting RNA, basado en la amplificación de ARN, tecnología de *microarrays* o *biochips*, en los que muchas sondas se sitúan discretamente en un sustrato sólido o los biosensores, unas moléculas de origen biológico adjuntas a una señal de reconocimiento de *Listeria*.

Por lo tanto, los avances tecnológicos y el desarrollo de la genómica bacteriana permitirán en los próximos años llevar a cabo la detección y el estudio de los subtipos moleculares de *L. monocytogenes* de forma mucho más fiable, identificando diferentes genes que podrán ser utilizados en técnicas diversas como la comparación de secuencias de múltiples genes (*multilocus sequence typing*, MLST), o de

un único gen (*single locus sequence typing*, SLST) y mediante el uso de *microarrays*.

Perspectivas

La listeriosis es una importante enfermedad bacteriana de transmisión alimentaria. En contra de lo que se pueda pensar por el aumento de los controles y la tecnología alimentaria, la listeriosis no retrocede, sino que aumenta, por lo que la implicación de los profesionales veterinarios es crucial para que podamos controlar esta zoonosis, y limitar su devastadores efectos en la industria alimentaria, Sanidad Animal y la Salud Pública.

AGRADECIMIENTOS

MS quiere agradecer la financiación por parte de los Proyectos RTA2005-00202-C02 del Ministerio de Educación y Ciencia de España y 2007.0230 del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS).

REFERENCIAS

- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 584-640.
- Suárez M, González-Zorn B, Vega Y, Chico-Calero I, Vázquez-Boland JA. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol* 2001; 3: 853-864.
- Chico-Calero I, Suárez M, González-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, et al. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:431-436.
- Ripio MT, Domínguez-Bernal G, Lara M, Suárez M, Vázquez-Boland JA. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 1997; 179: 1533-1540.
- López, V., Suárez, M., Chico, I., Navas, J., Martínez-Suárez, J.V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología* 38: 46-56.
- Domínguez-Bernal G, Müller-Altrock S, González-Zorn B, Scotti M, Herrmann P, Monzó HJ, Lacharme L, Kreft J, Vázquez-Boland JA. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol Microbiol*. 2006 Jan;59(2):415-32.
- González-Zorn B, Domínguez-Bernal G, Suárez M, Ripio MT, Vega Y, Novella S, Vázquez-Boland JA. The *smcL* gene of *Listeria ivanovii* encodes a sphingomyelinase C that mediates bacterial escape from the phagocytic vacuole. *Mol Microbiol*. 1999 Aug;33(3):510-23.