

159



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE
LABORATORIO DE LOS
PADECIMIENTOS OCASIONADOS POR
*Listeria monocytogenes***

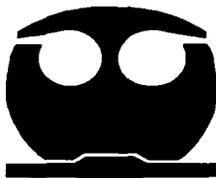
**TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

TERESA SILVA MONZUAZO



MÉXICO, D. F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

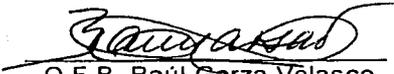
JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Raúl Garza Velasco
Vocal	Prof. Fernando García Tamayo
Secretario	Prof. Luciano Hernández Gómez
1er Suplente	Prof. María del Carmen Urzua Hernández
2do Suplente	Prof. María del Rocío López Álvarez

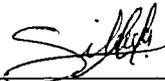
Sitio donde se desarrolló el tema:

Bibliotecas de la Facultad de Química, Medicina y del Sector Salud.

Asesor


Q.F.B. Raúl Garza Velasco

Sustentante


Teresa Silva Monzuazo

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química** por el apoyo y las oportunidades que me brindaron, en mi formación profesional.

A mi Asesor el **QFB Raúl Garza Velasco**, le agradezco sus enseñanzas, apoyo y amistad, durante la elaboración de este trabajo y a lo largo de toda la carrera.

A los sinodales:

Prof. Raúl Garza Velasco

Prof. Fernando García Tamayo

Prof. Luciano Hernández Gómez

Por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo de tesis y por sus sugerencias que mejoraron substancialmente en contenido del mismo.

DEDICATORIA

A mis padres **Cristina y Alejandro**
por el apoyo y la confianza que siempre
tuvieron en mí, pero sobre todo por su
amor y comprensión.

A mis hermanas **Adri y Vale**
por alentarme en todo momento
a seguir adelante, creer siempre en mí
y hacerme sentir tan especial.

A mis grandes amigas **Eli, Ira, Oli y Sofi**
por brindarme su amistad y consejos,
por ayudarme y alentarme cuando más lo necesitaba
y por compartirme un poco de su afecto.

A **Eloy** por ser parte de mi vida.

Al profesor **Raúl Garza Velasco**
que es un gran ejemplo a seguir,
por su dedicación, apoyo y paciencia
en la realización de este trabajo.

A todos mis amigos y familiares que
han estado conmigo en diferentes momentos,
de los cuales he aprendido cosas valiosas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS de <i>L. monocytogenes</i>	
i. Taxonomía	5
ii. Características microscópicas	7
iii. Propiedades culturales	8
iv. Características bioquímicas	15
v. Estructura antigénica	17
II. IMPORTANCIA CLÍNICA de <i>L. monocytogenes</i>	
i. Epidemiología	22
ii. Manifestaciones clínicas	31
iii. Tratamiento	41
iv. Prevención	45
III. FACTORES DE VIRULENCIA de <i>L. monocytogenes</i>	
i. Entrada a las células de mamíferos	51
ii. Escape del fagosoma y desarrollo intracelular	60
iii. Desplazamiento Intracitoplásmico	64
iv. Diseminación célula a célula	76
v. Organización y regulación de los genes de virulencia	79
IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO de <i>L. monocytogenes</i>	
i. Diagnóstico directo	
a) Recolección transporte y almacenamiento de las muestras clínicas	81
b) Aislamiento y cultivo	81
c) Identificación	89
d) Determinación de patogenicidad	100
ii. Diagnóstico indirecto	
a) Técnica de PCR	101
b) Ensayo Inmunoenzimático	104
c) Hibridación de ácidos nucleicos	106
CONCLUSIONES	109
ANEXO	113
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es el agente causal de la listeriosis, una enfermedad grave y de variada sintomatología que afecta al ser humano y a numerosas especies animales.

Esta bacteria fue señalada inicialmente por Pirie como la causa de una epizootia en roedores de Sudáfrica (enfermedad del Río Tiger) y, en 1926, Murray, Webb y Swann la aislaron y caracterizaron en la Universidad de Cambridge, a partir de una enfermedad séptica en conejos y cobayos de laboratorio, los cuales manifestaban monocitosis periférica, razón por la cual el microorganismo fue denominado *Bacterium monocytogenes* (1).

En 1927, Pirie sugirió el nombre genérico de *Listerella*, en honor de Sir Spencer Lister, director del Instituto de Investigación Médica de Johannesburgo, Sudáfrica, como reconocimiento a sus trabajos sobre dicha enfermedad. Sin embargo, como el nombre de *Listerella* ya se había asignado a otros organismos, en 1940, el propio Pirie propuso el nombre de *Listeria monocytogenes* (30)

El primer caso de infección humana por este patógeno fue detectado por Nyfeldt en 1929. Desde tal fecha, la única especie del género a la

que se ha comprobado algún papel etiológico en padecimientos humanos es precisamente *L. monocytogenes*; ésta se ha aislado a partir de desechos de los mataderos, ensilados, aguas residuales, alimentos frescos y procesados, e inclusive, del tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos (30, 69).

Debido a su amplia distribución, este microorganismo puede contaminar los alimentos en los distintos pasos de la producción alimenticia; por esta razón, la vía más frecuente mediante la cual el hombre adquiere la listeriosis es la ingestión de alimentos contaminados, hecho que determina la posibilidad de que ocurran peligrosas epidemias; además, dicha enfermedad se presenta debido al contacto directo con animales contaminados y por infección transplacentaria (69).

Por su parte, en los animales, un síndrome característico corresponde a la infección de los genitales de las hembras grávidas y la consecuente diseminación perinatal entre su descendencia. Por esta razón, la listeriosis origina grandes pérdidas económicas y representa un serio riesgo para la salud pública (41).

En el caso de la listeriosis humana, *L. monocytogenes* actúa como patógeno oportunista que afecta con mayor frecuencia a mujeres

embarazadas, recién nacidos y adultos inmunodeprimidos, a quienes ocasiona principalmente infecciones del sistema nervioso central y fatales septicemias. Adicionalmente, puesto que el microorganismo puede atravesar placenta, es causa de abortos, muerte y partos prematuros asociados a neonatos con granulomatosis infantiséptica y/o meningitis (69).

Como ocurre con otras infecciones oportunistas humanas, la listeriosis se detecta cada vez con mayor frecuencia, debido al aumento de la población inmunocomprometida; en EUA, la morbilidad y la mortalidad son máximos en lactantes de menos de cuatro semanas de edad (en proporción de 9/100,000) y en los adultos mayores de 40 años (a razón de 1/100,000) (64).

El presente trabajo describe los principales aspectos asociados a la patogenia, patología y diagnóstico de laboratorio de las entidades clínicas originadas por *L. monocytogenes*, haciendo especial énfasis en los factores de virulencia bacteriana y en las vías de transmisión, componentes en los que se basa o se fundamentará el actual y futuro establecimiento de las adecuadas medidas de prevención y control.

OBJETIVOS

- Señalar las principales enfermedades causadas por *L. monocytogenes* en el ser humano, subrayando su importancia clínica y epidemiológica.
- Enumerar los diversos factores de virulencia del microorganismo y describir sus respectivos papeles en el origen de las diferentes entidades clínicas asociadas a la listeriosis.
- Describir los fundamentos de los métodos más relevantes que permiten diagnosticar la listeriosis en el laboratorio.
- Mencionar los regímenes terapéuticos más eficaces para tratar las diversas entidades clínicas asociadas a la listeriosis humana, así como las medidas en las que se basa la prevención de dichas patologías.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

i. Taxonomía

Si bien *L. monocytogenes* evidencia un gran parecido con las corinebacterias, genéticamente muestra una mayor relación con el género *Lactobacillus*. Es decir, *Listeria* frecuentemente se ha asociado a la familia *Corynebacteriaceae*, aún cuando la taxonomía numérica, serológica y química, así como las propiedades de su ácido nucleico, indican que se trata de un género distinto ajeno a las bacterias corineformes (35).

Los datos implicados en la composición del peptidoglicano de la pared celular, en su contenido en citocromo y menaquinona y en su composición en ácidos grasos muestran que este microorganismo es muy similar al género *Brochothrix*: ambos son catalasa positiva y tienden asociarse entre sí y con los lactobacilos en la naturaleza. De hecho, los tres géneros producen ácido láctico a partir de la glucosa y de otros azúcares fermentables, aunque *Lactobacillus* es catalasa negativa (35).

Estudios comparativos en la homología de la secuencia oligonucleotídica asociada a la proteína 16S-rRNA manifestaron que *Listeria* tiene un lugar cerca de *Brochothrix* y, ambos, junto con

Staphylococcus y *Kurthia*, ocupan una posición localizada entre el grupo *Bacillus* y el *Lactobacillus/Streptococcus*, dentro de la afiliación *Clostridium-Lactobacillus-Bacillus*, en donde todas las bacterias poseen un contenido G+C menor de 50% mol (35).

Además, *Listeria* contiene ácidos teicoicos y lipoteicoicos, tal como ocurre en los estafilococos, estreptococos y lactobacilos aunque, a diferencia de ellos, sus colonias evidencian un brillo azul-verdoso cuando se observan bajo oblicua (Técnica de Henry, figura 14) (39).

En la actualidad, según la novena edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, el género *Listeria* pertenece al grupo de bacilos regulares, Gram positivos, no esporulados el cual comprende ocho géneros: *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Listeria*, *Kurthia*, *Caryophanon*, *Carnobacterium* y *Renibacterium* (Tabla 1)(35).

Tabla 1. Propiedades que distinguen a los bacilos Gram positivos no esporulados (41).

Rasgo	<i>Lister</i> ^a	<i>Erysipel</i> ^b	<i>Lactobac</i> ^c	<i>Corynebac</i> ^d
Hemólisis β	+	-	-	±
Catalasa	+	-	-	+
Movilidad	+	-	-	-
Ácido a partir de:				
* Glucosa	+	+	+	±
* Manitol	-	-	±	±
H ₂ S	-	+	-	-
% G+C	37-39	36-40	32-53	51-60

CLAVES: a=*Listeria monocytogenes*; b=*Erysipelothrix rhusiopathiae*; c=*Lactobacillus* sp; d=*Corynebacterium* sp

El género *Listeria* está más cercanamente asociado con el género *Bacillus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

De acuerdo con el Bergey's Manual, el género *Listeria* incluye 7 especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. murrayi*. De ellas, sólo a las dos primeras se les reconoce alguna importancia clínica: *L. monocytogenes* es patógena tanto para humanos como para animales y *L. ivanovii* lo es principalmente patógena para ovejas. Por otra parte, estudios fenotípicos y genotípicos han cuestionado la inclusión de *L. grayi* y *L. murrayi* como *Listeria*, sugiriéndose que deben colocarse en un nuevo género, denominado *Muralla*, considerándoseles como una sola especie (*M. grayi*) (4).

ii. Características microscópicas

Cuando se le observa en preparaciones provenientes de productos patológicos o de cultivos recientes, *L. monocytogenes* se manifiesta como un bacilo corto de 0.4 a 0.5 μm de ancho por 2 μm de largo, Gram positivo, recto o ligeramente curvo, de bordes redondeados, aislado o agrupados en pequeñas cadenas de 2 a 5 miembros que simulan pares unidos en los extremos (L o V) y las empalizadas características de los bacilos diftérico y difteroides. No obstante, en

cultivos viejos de 3 a 5 días de antigüedad pueden aparecer filamentos largos de 6 a más de 20 μm (18).

A temperaturas de 20 a 25°C, cada bacilo presenta cuatro flagelos en disposición peritrica o subterminal, los cuales le permiten desplazarse activamente, pero a 37°C sólo se detecta un flagelo polar único y la movilidad es mínima o nula. Finalmente, *Listeria* no es una bacteria capsulada ni esporulada, y da lugar a formas L cuando se le cultiva en medios que contienen penicilina o glicina (75).

Cabe señalar que estos bacilos no presentan gránulos metacromáticos intracitoplásmicos y que se tiñen fácilmente con colorantes derivados de la anilina, por lo que toman el colorante de Gram uniformemente. Sin embargo, cuando se fuerza su decoloración o se trata de cultivos viejos, pueden manifestarse como Gram negativos (75).

iii. Propiedades culturales

▪ Medios de cultivo

L. monocytogenes no es un microorganismo exigente y crece abundantemente en agar-sangre o en medios sencillos, y su aislamiento se puede facilitar cuando el material clínico se mantiene a 4°C, durante algunos días previos a la inoculación, quizá debido a que ello provoca la liberación de los bacilos intracelulares (75).

Por otro lado, la tabla 2 incluye ciertos componentes selectivos que ayudan a inhibir el desarrollo de la microflora y a llevar a cabo la detección de *Listeria* en el laboratorio.

Tabla 2. Agentes antimicrobianos más utilizados para efectuar el aislamiento de *Listeria* (4).

Agente antimicrobiano	mg/L	Bacterias inhibidas
Acriflavina	5-25	Gram positivas en general, incluyendo a <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
Ceftazidima	50	Amplio espectro
Cicloheximida	50	Hongos y levaduras
Cloruro de litio	0.5	Gram negativas, excepto <i>Pseudomonas</i>
Moxalactam	20	Amplio espectro
Ácido nalidíxico	20-40	Gram negativas, excepto <i>Pseudomonas</i> y <i>Proteus</i>

Algunos de los medios utilizados para el aislamiento y detección de *Listeria monocytogenes* se mencionan a continuación (3, 68):

- Caldo soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (CSTEL)
- Caldo de enriquecimiento (EB) pH=7.3
- Medio de Cloruro de litio feniletanol – moxolactam (LMP).
- Medio Oxford.
- Agar soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (ASTEL)
- Agar PALCAM (polimixina acriflavina LiCl ceftazidima esculina manitol).

- Emulsión de yema de huevo
- Agar Sangre de Carnero.
- Caldo nitratos.
- Medios Para la Prueba De Movilidad:
 - o Medio de sulfhídrico-indol-movilidad (SIM).
 - o Medio para la prueba de movilidad y mantenimiento (MTM)
- Caldo púrpura para fermentación de carbohidratos.

La preparación completa de estos medios se encuentra en el anexo.

▪ **Condiciones de incubación**

Listeria es aerobio o microaerófilo y, aunque su temperatura óptima es entre 30-37°C, pero puede proliferar en un amplio espectro de temperaturas (3-43°C); de hecho, crece lentamente a 4°C, propiedad que se aplica con fines selectivos. Su pH óptimo fluctúa entre 7.2 y 7.4, si bien desarrolla entre 5.6 y 9.6; desarrolla sin problemas en los medios ordinarios aunque, lógicamente, lo hace más rápido y abundantemente en los enriquecidos, sobre todo cuando se le incuba en atmósferas de 5 a 10 % de CO₂ (6, 41, 75).

Es importante considerar que los cultivos suelen permanecer viables y virulentos durante varios meses a la temperatura del laboratorio y por varios años en agar-sangre a 4°C. Sin embargo, el microorganismo no se mantiene en medios glucosados y, aunque resiste las exposiciones a

56°C durante media hora, es sensible a los agentes químicos habituales (75).

- **Características macroscópicas**

Estructura colonial

L. monocytogenes manifiesta diferentes tipos de colonias, dependiendo de la edad del cultivo; los cultivos jóvenes dan lugar a colonias circulares lisas, las cuales después de 3 días de incubación pueden tornarse opacas y blanquecinas; su consistencia es butirácea se emulsifican fácilmente en solución salina. Las colonias lisas "S" en agar sangre, ocasionalmente alcanzan diámetros de 6 mm, cuando se incuban adecuadamente y se protegen de la desecación. Después de algunos días, su superficie, inicialmente lisa, evidencia modificaciones: primero, los bordes de la colonia se empiezan a elevar, el centro sufre una depresión y el nodo central se hace visible. Esta colonia lisa, típica, produce doble halo de hemólisis en gelosa sangre: parcial externa y total interna (18).

Además de las colonias lisas "S", con cierta frecuencia se encuentran colonias que presentan una débil hemólisis después de 2 a 3 días y que, a diferencia de las "S" blanco opacas, aparecen grises y traslúcidas. A menudo, la siembra de las muestras de laboratorio origina colonias que difieren de las "S" por su mayor diámetro, una

textura más pronunciada, bordes ligeramente ondulados y la depresión y el nodo centrales son más visibles. Este tipo de colonias se conoce como Barber o intermedias "L", se considera como una variante cultural de la forma "S", muestra tendencia a la aglutinación espontánea, es de consistencia butíracea y su comportamiento en experimentos de aglutinación y absorción es similar al de la forma "S" (18).

Evidentemente, *L. monocytogenes* también produce colonias rugosas "R", con hemólisis total, las cuales también son fácilmente emulsificables y casi siempre se autoaglutinan. Los cultivos líquidos forman una película en la superficie y rápidamente generan un frágil sedimento. Además de las formas predominantes de crecimiento ("S", "L" y "R"), existen variantes culturales que suelen denominarse formas intermedias (30).

Crecimiento en medios de cultivo

Agar nutritivo; a las 24 horas y a 37°C, las colonias lisas presentan crecimiento moderado o pobre. Son circulares, convexas o amorfas, de 0.2 a 0.8 milímetros de diámetro; superficie lisa que refleja la luz, bordes completos y algunas veces transparentes, amarillo grisáceas por reflejo de la luz, fácilmente emulsificables; son colonias parecidas a gotas de rocío (75).

Agar- triptosa; (medio idóneo por su transparencia y claridad) a las 24 horas da lugar a colonias pequeñas de 0.5 a 1 mm de diámetro, redondas, convexas, lisas y translúcidas, que después se vuelven grisáceas y opacas. Observadas con lupa binocular y luz oblicua (técnica de Henry; figura 14) presentan una coloración azul verdosa. En fase R son más anchas, aplanadas y rugosas (75).

Agar-sangre; da lugar a pequeñas colonias hemolíticas, grises y en gota de rocío. Esta hemólisis es evidente en las cepas recientemente aisladas, pero puede atenuarse o desaparecer en sucesivas resiembras. Debido a que en agar sangre, las colonias se hallan generalmente rodeadas por una estrecha zona de hemólisis β y, si no se examina cuidadosamente en las extensiones teñidas y no se verifica su movilidad a 20-25°C, *L. monocytogenes* puede ser confundida con un estreptococo hemolítico (75).

Agar - sangre – telurito de potasio; las colonias son negras, al igual que en la mayoría de las corinebacterias (75).

Agar selectivo y específico para *Listeria*; las colonias quizá aparezcan como un verde olivo rodeado por un halo negro debido a la hidrólisis de la esculina (75).

Existen medios sintéticos con riboflavina, biotina, tiamina, ácido nicotínico, aminoácidos, sales y glucosa, y medios selectivos con ácido nalidixico y acetato de talio, o con 40µg/ml de ácido oxolinico, que proporciona mejores resultados que el anterior. También son selectivos los medios con cera de abejas incorporada, los medios con polimixina B y medio de McBride (75).

Agar LMP (cloruro de litio feniletanol-monoxalam); fue desarrollado con una alta selectividad, pero no como un medio diferencial para el aislamiento de especies de *Listeria*. Las colonias en Agar LMP son examinadas bajo el microscopio de un sólo objetivo (aumento, X15 a X25), con luz blanca en un ángulo de 45° (iluminación de Henry, figura 14). Las colonias de *Listeria* aparecen de color azul, mientras que las colonias de otras bacterias aparecen amarillo o naranja (63).

Agar Oxford o Agar Oxford modificado (Agar selectivo para *Listeria*); contiene diferentes químicos selectivos, que eliminan la necesidad de examinar bajo luz oblicua. Las colonias de *Listeria* aparecen negras, de 1 a 3 mm de diámetro y están rodeadas de un halo negro después de 24 a 48 horas de incubación a 37°C; la formación del color es debido a la hidrólisis de la esculina por *Listeria spp.* y la formación de compuestos de hierro-fenol negros en el medio (63).

Agar PALCAM (polimixina acriflavina LiCl Ceftazidima Esculina Manitol); las colonias de *Listeria* aparecen gris-verdoso, de aproximadamente 2 mm de diámetro, y hundido en el centro presentan una coloración negra; la esculina, el hierro férrico, el D - manitol y el rojo de fenol contribuyen a la formación de este color (63).

iv. Características bioquímicas

Todas las especies del género *Listeria* producen catalasa, dan positivas las pruebas de rojo de metilo y la reacción de Voges-Proskauer, son indol y oxidasa negativas, H₂S negativo, no hidrolizan la urea, no reducen los nitratos ni licúan la gelatina. Dos especies son claramente β-hemolíticas en agar sangre: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, característica que se ha relacionado con su patogenicidad. La tabla 3 incluye reacciones útiles para identificar y diferenciar a las diversas especies de *Listeria* (4).

La prueba de CAMP es considerada entre las más importantes para confirmar la presencia de las especies patógenas. La interpretación de esta prueba es la siguiente: en placas de agar sangre, la hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se agudiza cerca de la estria de *Staphylococcus aureus*, en tanto que, la de *L. ivanovii*, aumenta en el área cercana a la estria de *Rhodococcus equi*. Las especies restantes no se manifiestan como hemolíticas en esta prueba (4).

Tabla 3. Identificación bioquímica y caracterización diferencial del género *Listeria* (35).

P r u e b a	1	2	3	4	5	6	7
Hemólisis β	+ ^d	+ ^c	-	-	+	-	-
CAMP (<i>S. aureus</i>)	+	-	-	-	+	-	-
CAMP (<i>R. equi</i>)	-	+	-	-	-	-	-
Acido de:							
Manitol	-	-	-	-	-	+	+
α -metil-D-manósido	+	-	+	+	-	ND	ND
L-Ramnosa	+	-	d	d	-	-	d
Almidón soluble	-	-	-	ND	ND	+	+
D-xilosa	-	+	-	+	+	-	-
Hidrólisis del hipurato	+	+	+	ND	ND	-	-
Reducción de nitrato	-	-	-	ND	ND	-	+
Patogenicidad en ratones	+	+	-	-	-	-	-

CLAVES: 1 = *L. monocytogenes*; 2 = *L. Ivanovii*; 3 = *L. Innocua*; 4 = *L. welshimeri*; 5 = *L. seeligeri*; 6 = *L. grayi*; 7 = *L. murrayi*; ND = no determinado; d = pocas cepas son negativas; c = presenta una zona amplia de hemólisis o múltiples zonas.

L. monocytogenes fermenta los hidratos de carbono produciendo principalmente ácido láctico y sin formación de gas (tabla 3); además, hidroliza esculina, produce catalasa y acetoina (prueba de Voges-Proskauer), pero no indol ni nitritos. Su instilación en la conjuntiva de conejo provoca, después de 3 a 6 días, una conjuntivitis purulenta que se traduce en queratitis (prueba de Anton). Las pruebas de hibridación del ADN no revelan alguna relación significativa con los miembros de otras familias Gram positivas (4).

v. Estructura antigénica

Puesto que *L. monocytogenes* es móvil, posee antígenos flagelares (H), los cuales pueden ser termolábiles y somáticos (O) termoestables, características antigénicas que han permitido separar a las cepas en serotipos, serovars o grupos serológicos (consultar la tabla 4).

Tabla 4. Serotipos de *L. monocytogenes* (64).

Serotipos (Seelinger-Donker-Voet)	Antígeno O	Antígeno H
1/2a	1,2 y (3)	ab
1/2b	1,2 y (3)	abc
1/2c	1,2 y (3)	bd
3a	2, (3), 4	ab
3b	2, (3), 4	abc
3c	2, (3), 4	bd
4a	(3), (5), 7,9	abc
4ab	(3),5,6,7,9	abc
4b	(3),5,6	abc
4c	(3),5,7	abc
4d	(3), (5),6,8	abc
4e	(3),5,6,(8),(9)	abc
7	(3),12,13	abc

() = Antígeno irregularmente presente

El esquema de Seelinger/Donker-Voet es comúnmente muy aceptado e incluye 16 serotipos para el género *Listeria*, definidos por 15 antígenos somáticos (O) y 5 antígenos flagelares (H). *L. monocytogenes* presenta 13 serotipos, algunos de los cuales comparte con *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* (consultar la tabla 5). Sin embargo, es

conveniente consignar que el 90 % de los aislamientos clínicos de *L. monocytogenes* corresponde a sólo 3 serotipos: 1/2a, 1/2b, y 4 b.

Tabla 5. Serotipos de algunas especies de *Listeria* (4).

Espece	Serotipos
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. innocua</i>	3, 6a, 6b, 6ab, U/S
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. seeligeri</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4c, 4d, 6b, U/S*
<i>L. welshimeri</i>	1/2a, 4c, 6a, 6b, U/S

II. IMPORTANCIA CLÍNICA

La afinidad de *L. monocytogenes* por el sistema nervioso central (SNC) conduce a la presencia de severas enfermedades en adultos inmunocomprometidos, con una importante tasa de mortalidad de 20 a 50% o con secuelas neurológicas en los sobrevivientes (42,63).

En las personas adultas, la listeriosis se manifiesta como bacteriemia, e inclusive, como meningoencefalitis posterior a aquélla, predominantemente en los individuos que experimentan depresión de la inmunidad mediada por células; es decir, las personas más afectadas son las de la tercera edad, las que padecen del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, diabetes, cirrosis, drogadicción o alcoholismo y, desde luego, los pacientes que reciben medicamentos inmunosupresores o que han sido sometidos a transplantes. A tal respecto, el aumento del tiempo de vida en quienes padecen enfermedades crónicas, el creciente número de pacientes inmunocomprometidos y la reciente epidemia de SIDA, han venido incrementando el riesgo de que la población contraiga listeriosis (63).

Un estudio realizado por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EUA mostró que *L. monocytogenes* provoca anualmente 2,500 casos de enfermedades graves y 500 defunciones (54).

Por su parte, las mujeres embarazadas también manifiestan propensión a adquirir bacteriemias por este microorganismo; de hecho, representan hasta la tercera parte de los casos reportados y la patología suele presentarse en el tercer trimestre del embarazo, cursando como un cuadro pseudogripal de evolución favorable. El desenlace fatal es muy poco frecuente en la madre, pero en ausencia del tratamiento adecuado ocurren la amnionitis y la infección fetal; ésta llega a ocasionar abortos, o partos prematuros de neonatos con un cuadro clínico denominado granulomatosis infantiséptica. Los cuadros se asocian a infecciones adquiridas intraútero, a través de la placenta, y tienen muy mal pronóstico, con una mortalidad cercana al 100%, lo cual subraya la importancia del diagnóstico y el tratamiento rápidos y apropiados en las mujeres embarazadas (69).

Adicionalmente, otro tipo de listeriosis que afecta a los neonatos pasa por desapercibido en el nacimiento y durante los primeros días de vida pero, 3 a 4 días después, surge con un cuadro febril y signos pseudogripales que acompañan a la bacteriemia misma que, a su vez, puede conducir a una meningoencefalitis o a cerebritis. Al parecer, esta clase de cuadros los adquiere el producto a partir de la madre, aunque no intraútero sino durante o después del nacimiento (69).

Las infecciones focales ocurren en muy raras ocasiones; por lo regular, ello tiene lugar después de la bacteriemia o de la granulomatosis infantiséptica, destacando los casos de conjuntivitis purulenta, endoftalmitis, linfadenitis, endocarditis, artritis, osteomielitis, abscesos cerebrales o intraabdominales, cuadros cutáneos e infecciones pleuropulmonares (69).

Cabe señalar que la listeriosis cutánea puede o no relacionarse con previas bacteriemias ya que, tanto los veterinarios como quienes laboran en los rastros, adquieren la enfermedad a través del contacto directo con tejidos animales infectados, o bien, mediante inoculaciones directas accidentales (44).

La dosis infectiva no se ha logrado establecer con certeza y el periodo de incubación del padecimiento fluctúa entre algunos días y 2 a 3 meses. La listeriosis se puede presentar esporádicamente o en forma epidémica pero, en ambos casos, los alimentos contaminados representan el vehículo primario de transmisión. Además, se han reportado algunos brotes originados en nosocomios y en guarderías (63).

Una vez ingerido el alimento contaminado con *L. monocytogenes*, el desarrollo del padecimiento depende de varios factores, los cuales

incluyen a los siguientes: a) la susceptibilidad del individuo; b) la acidez gástrica (el microorganismo no es destruido en el estómago cuando el pH es mayor que el normal); c) el tamaño del inóculo; y d) los factores de virulencia del microorganismo (44, 63).

i. Epidemiología

Si bien la incidencia de la listeriosis es relativamente baja, diversas publicaciones demuestran la capacidad de *L. monocytogenes* para provocar graves epidemias asociadas a alimentos contaminados; la distribución del microorganismo es mundial y se ha logrado aislar a partir de muestras de tierra, polvo, materia vegetal en descomposición, comida para consumo humano –tanto fresca como procesada– como carnes y vegetales, alimentos para animales, aguas residuales, desechos de los mataderos, productos lácteos y de numerosos animales y humanos asintomáticos (51).

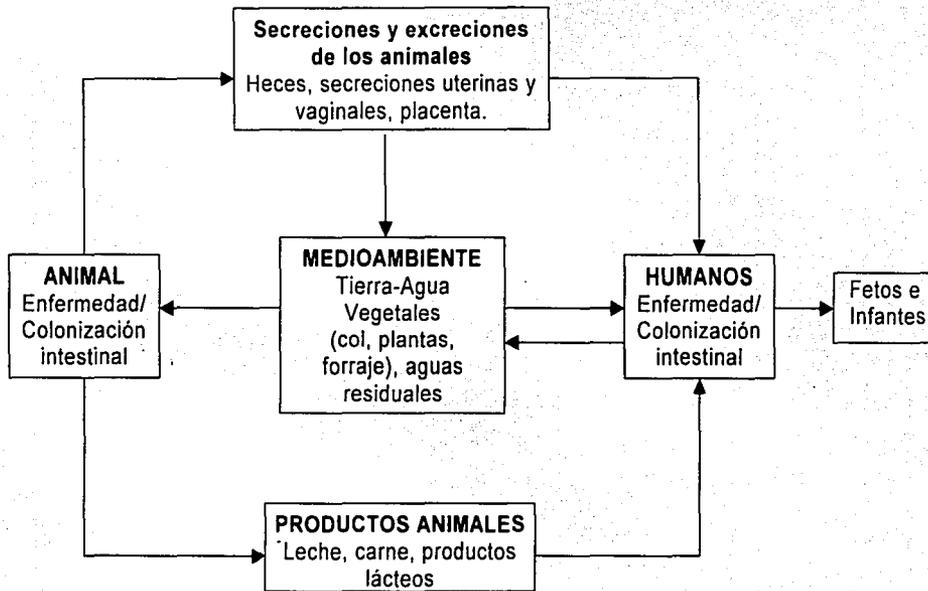
Los animales en los cuales el microorganismo se ha detectado incluyen 42 especies domésticas, mamíferos silvestres y 22 especies de aves, peces, garrapatas, moscas y crustáceos. Ello comprueba la muy extensa distribución de *L. monocytogenes* en la naturaleza (41).

Al parecer, esta especie bacteriana es una saprofita cuyo hábitat principal es la tierra y la materia vegetal en descomposición, elementos

que funcionan como uno de sus principales reservorios; además, el humano y los animales pueden contactarla a partir de diversas fuentes, destacando la materia fecal y los alimentos, etc. (consultar el diagrama 1) (4, 41).

Aún cuando existe la lógica transmisión directa a veterinarios y granjeros, llama la atención el hecho de que la mayor parte de las infecciones ocurre en personas ciudadinas sin antecedentes de contacto con animales o materiales potencialmente infectados. En la actualidad, los datos epidemiológicos más recientes señalan a los alimentos como el vehículo más común para la transmisión de la listeriosis humana, tanto en los adultos como en los neonatos. Los alimentos más involucrados abarcan a la ensalada de col, quesos suaves, carne de aves, salchicha de pavo, champiñones, leche y lengua de cerdo en jalea; en todos los anteriores se ha detectado una gran cantidad de microorganismos ($>10^3$ UFC/g), con base en análisis cuantitativos clásicos (41, 63).

Diagrama 1. Posibles rutas de transmisión de *L. monocytogenes* a humanos (4,35)



La información correspondiente se ha obtenido estudiando diversos brotes relacionados con *L. monocytogenes*; uno de ellos, surgido en Nova Scotia, Canadá (1981), comprendió 41 casos asociados a una ensalada de coles; la granja productora había estado implicada en varios casos de listeriosis que afectaban a un rebaño de ovejas, cuyo estiércol se empleó para fertilizar la col; dicho brote fue el primero en apuntar a la listeriosis como un padecimiento de origen alimentario (consultar tabla 6) (31, 92).

En 1983, un brote de listeriosis en Massachussets involucró a una particular marca de leche pasteurizada y los estudios condujeron a concluir que la pasteurización es adecuada para eliminar a *L. monocytogenes*, pero los productos pueden contaminarse después del proceso. Por último, en 1985, tuvo lugar un gran brote de 142 casos en Los Ángeles, que dejó 45 defunciones; aquél fue el resultado de consumir una marca de queso estilo mexicano, elaborado a partir de una leche contaminada cuya pasteurización se realizó inadecuadamente (consultar tabla 6) (31).

Además, en EUA, las salchichas vienas crudas y el pollo mal cocido explican la mayor parte de los casos asociados a alimentos (consultar tabla 6) (41).

Tabla 6. Brotes 1980-1999 debidos a *Listeria monocytogenes* (1).

Año(s)	Localización	No. de casos	Casos perinatales (%)	Tasa de mortalidad (%)	Fuente (s)
1980-1981	Provincias marítimas	41	83	34	Ensalada
1983	Nueva Inglaterra	49	14	29	Leche pasteurizada
1983-1984	Switzerland	57	9	32	Queso blando
1985	Oeste de EUA	142	65	34	Queso estilo mexicano
1986-1987	Pennsylvania	36	11	44	Desconocido
1989	Connecticut	10	20	10	Camarón
1992	Francia	38	82	32	Carne de cerdo
1993	Italia	39			Ensalada de arroz
1994	Illinois	45			Leche con chocolate
1997	Italia	1566			Ensalada de maíz
1998-1999	EUA	101	12	21	Hot dogs, carne de fiambres
1999	Francia	32	28	31	Lengua de cerdo

Actualmente, continúan reportándose casos de listeriosis humana debidos a la ingestión de vegetales crudos, productos lácteos y diversas carnes. En Finlandia, entre 1998 y 1999 se presentaron 25 casos con 6 defunciones; 20 pacientes padecieron de sepsis, 4 de meningoencefalitis y 1 de abscesos en el hígado; en todos ellos, la manteca representó el alimento contaminado. En Francia, durante el año 2000, 26 personas fueron afectadas, 7 de las cuales murieron; al parecer, la fuente de la infección fue la carne de cerdo, pero no se logró aislar a *L. monocytogenes* de las muestras, lo que originó que se pensara en una contaminación cruzada causada por cuchillos empleados previamente para cortar otro tipo de productos probablemente contaminados. Este tipo de contaminación cruzada también se describió para explicar otra epidemia francesa en 1992; en aquel entonces fueron infectadas 279 personas, ocurriendo 63 defunciones y 20 abortos (consultar tabla 6) (50, 59).

La relevancia del portador asintomático es aún desconocida; en especial, se sabe que aproximadamente el 1% de los adultos saludables excreta *L. monocytogenes* en la materia fecal, cifra que contrasta con la de 26 % que se ha detectado en los pacientes sintomáticos; así mismo, los individuos que laboran en los rastros y mataderos llegan a manifestar índices de 4.8 %. Aparentemente, la

duración de la excreción en las personas recuperadas se extiende por otros 30 días (51).

Cabe destacar que, muy probablemente, la verdadera incidencia de portadores y la duración de la excreción listeriana sean mayores de las estimadas, debido a la gran dificultad que representa el aislamiento del microorganismo a partir de la materia fecal (51).

De hecho, la única vía plenamente comprobada de transmisión interhumana es la transplacentaria, la cual conduce a que el feto adquiera septicemia a través de la vena umbilical. No obstante, la infección también se puede adquirir durante el parto, cuando el producto entra en contacto con secreciones cérvico-vaginales que contienen al microorganismo (41).

La incidencia de listeriosis se ha estimado entre 2 y 8 casos anuales por cada 100.000 habitantes. Reconocida en el pasado como una enfermedad propia de mujeres embarazadas y neonatos, las publicaciones de los últimos 30 años han subrayado el papel de *L. monocytogenes* como agente etiológico de sepsis y meningitis en pacientes inmunocomprometidos, en los que padecen de enfermedades crónicas debilitantes y en los ancianos. También ha llamado la atención el aumento de la frecuencia de listeriosis en personas sanas, en las que se presenta generalmente como una gastroenteritis febril, ya que,

aunque en el último decenio no se ha observado un aumento en la incidencia de la enfermedad, es claro que ésta se ha incrementado en pacientes sin enfermedades subyacentes y en pacientes de edad avanzada (1, 42, 57).

La cirrosis hepática, la diabetes mellitus, las enfermedades hematológicas malignas, el alcoholismo, los tumores sólidos, la insuficiencia renal crónica y la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VHI) son las enfermedades de riesgo más frecuentes. En un estudio de 74 casos, el 22 % de los pacientes presentaban alguna malignidad hematológica, el 8 % otro tipo de cánceres, el 15 % padecía de diabetes mellitus, el 14 % correspondió a recién nacidos, el 8 % a mujeres embarazadas, el 7% experimentaba una enfermedad vascular del colágeno y sólo el 14 % eran adultos previamente saludables. Es importante mencionar que algunos pacientes estaban afectados por más de un padecimiento (1, 42).

La terapia con corticoesteroides, no así la neutropenia, parece representar otro factor predisponente; por otra parte, en ocasiones llega a sorprender la baja incidencia de casos en personas con SIDA, pero es probable que el uso rutinario del cotrimoxazol en individuos afectados por el VIH disminuya los índices de listeriosis; de cualquier manera, la frecuencia de esta enfermedad en pacientes con SIDA es 65

a 145 veces más alta que en la población general. Lo contrario ocurre en los pacientes con leucemia tratados con fludarabina, fármaco que parece aumentar el riesgo de adquirir listeriosis, debido al efecto específico de aquél sobre la inmunidad mediada por células (1, 42).

No obstante lo anterior, la listeriosis continúa siendo una enfermedad poco frecuente, más común en los infantes¹ (10 casos por cada 100,000 personas) que en los ancianos (1.4 casos por cada 100,000 personas), predominando mayoritariamente en los varones. Las mujeres embarazadas con bacteremia debida a *L. monocytogenes* representan un tercio de los casos reportados y, aunque la muerte es poco común en la madre, la transmisión al feto conduce a partos prematuros y usualmente a muerte fetal (1).

Tanto los neonatos de cinco a treinta días de vida, como los adultos inmunosuprimidos mayores de 40 años de edad, son susceptibles de contraer meningitis, bacteremia o ambas: de 722 casos recopilados entre 1967 y 1985 en Gran Bretaña, 34 % se asociaban a embarazos, 50. % a adultos con enfermedades subyacentes severas y 14 % a adultos previamente sanos; además, sólo alrededor del 3 % no correspondían a bacteremia ni meningitis, esta última no resultó más

¹ Inclusive, en una guardería se detectó que el foco infeccioso se localizaba en el aceite mineral que se empleaba para bañar a los neonatos, era la fuente de contaminación.

frecuente que la primera y, en los adultos sanos, ambas se relacionaron con muy baja mortalidad (51).

Finalmente, las infecciones por *Listeria* también se han venido presentando dentro de los hospitales, sin que se haya logrado establecer la fuente de contagio; de hecho, el común entre las personas afectadas es la inmunosupresión (1, 27, 51).

ii. Manifestaciones clínicas

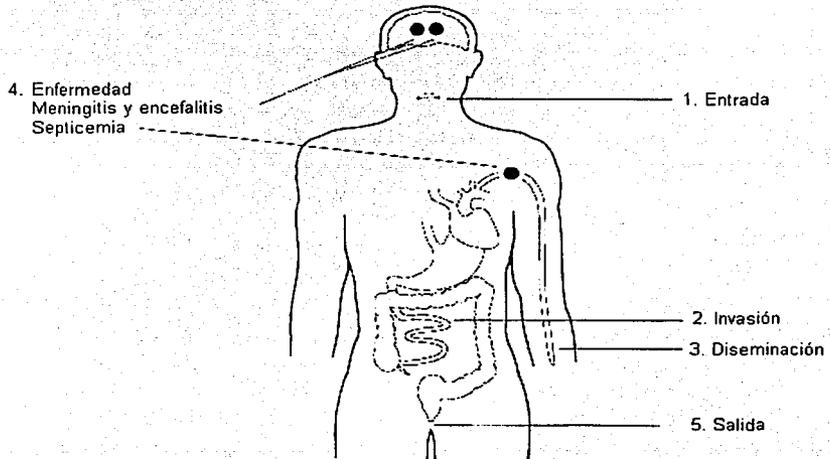
L. monocytogenes ocasiona una amplia variedad de síndromes (consultar tabla 7), los cuales van desde una enfermedad leve similar a la influenza -como en el caso de las mujeres embarazadas- hasta la listeriosis neonatal fulminante asociada a tasas de mortalidad de 54 a 90%. En el adulto, las principales entidades clínicas son la meningitis (55 %), bacteriemia primaria (25 %), endocarditis (7 %) y las infecciones no meníngeas del sistema nervioso central (6%) (figura 1). En tal contexto, más de la mitad de este tipo de pacientes padecen de otras enfermedades (procesos malignos, alcoholismo, cirrosis, diabetes o vasculitis), o bien, se encuentran recibiendo fármacos inmunosupresores (41).

Tabla 7. Principales síndromes debidos a *Listeria monocytogenes* (51).

Síndrome clínico	Hospedero/enfermedad
a. Infecciones en el embarazo	Mujeres embarazadas/enfermedad febril a enfermedad severa
b. Granulomatosis infantiséptica	Neonato, infección intraútero/grave enfermedad temprana
c. Septicemia	Neonato o adulto/enfermedad moderada a severa
d. Meningoencefalitis, cerebritis, romboencefalitis	Neonato o adulto/enfermedad moderada a severa
e. Infecciones focales*	Adulto o niño/por contacto directo o bacteriemia.

(*)= Incluye infecciones cutáneas, oculares, endocarditis, osteomielitis, absesos cerebrales y hepáticos, peritonitis, gastroenteritis febril y hepatitis.

Figura 1. Patogénesis de la Listeriosis



a. Infecciones en el embarazo

Las infecciones adquiridas durante el embarazo son más frecuentes en el tercer trimestre (coincidiendo con el mayor decline de la inmunidad celular) y, en general, las pacientes presentan síntomas transitorios, inespecíficos, leves a moderados, que incluyen fiebre, cefalea, dorsalgia y trastornos gastrointestinales tales como náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea. En tal sentido, es común que la paciente no acuda a consulta médica (diagrama 2) (10, 44).

Cuando la infección tiene lugar al inicio del embarazo, suele ocurrir el aborto durante el quinto o sexto mes; sin embargo, si ocurre más tarde la gestación puede llegar a su término, a pesar de que lo habitual es que sea prematuro. En todo caso, el producto suele salir sin vida o con granulomatosis generalizada, aunque algunos reportes hacen referencia a niños saludables provenientes de algunas madres infectadas que no recibieron tratamiento alguno. Así mismo, se han publicado trabajos en los que se alude a la persistencia del microorganismo (después de la terapéutica) en los genitales de la mujer, situación que puede conducir a abortos reiterados (75).

En resumen, la madre puede presentar listeriosis en forma de vaginitis, cistitis, pielonefritis (a menudo crónicas no graves), infecciones generalizadas (en general de tipo pseudogripal, más rara vez bajo

forma de meningitis aguda y excepcionalmente con septicemia) e infecciones inaparentes que también desencadenan infección del feto (75).

b. Granulomatosis infantiséptica

En los neonatos, *L. monocytogenes* es causa de sepsis en 2 modalidades clínicas bien definidas: la primera tiene un periodo de incubación de 1.5 días y la infección ocurre presumiblemente en el útero; además, se asocia a aborto, al alumbramiento de un niño muerto o al parto prematuro de un neonato que padece del cuadro clínico denominado granulomatosis infantiséptica, entidad clínica ocasionada exclusivamente por *L. monocytogenes* (diagrama 2)(70).

Por su lado, la segunda modalidad clínica se presenta después de la primera semana de vida del niño y casi siempre se manifiesta como una meningitis sin características clínicas específicas; al parecer, se adquiere a partir de la madre, durante o después del nacimiento, y no intraútero (70).

En la granulomatosis infantiséptica el infante sufre de abscesos diseminados y/o granulomas en múltiples órganos internos, incluido el hígado, bazo, pulmones, riñón y cerebro; además, el niño nace en estado de muerte aparente, con rinitis purulenta, erupción cutánea de

tipo petequeal y máculo-pápulo-vesiculosa, y a veces muestra nódulos faríngeos. Este tipo de infección se observa dentro de los primeros cuatro días de vida, suele asociarse a meningitis y su pronóstico es malo, con una elevada tasa de mortalidad de casi 100 %, si bien algunos infantes han logrado sobrevivir merced a un tratamiento adecuado y oportuno (69).

c. Septicemia

La septicemia primaria causada por *L. monocytogenes* afecta principalmente a neonatos y adultos, quienes manifiestan notables episodios de escalofrío y fiebre. En los adultos, la mayoría de los casos se relaciona con personas inmunocomprometidas, en quienes a menudo cursa en forma fulminante y a veces hasta un 40 % de los enfermos experimentan shock y otras manifestaciones de sepsis grave; por su parte, los neonatos empiezan a manifestar la enfermedad después de los 3 días de edad e inicialmente el cuadro es inespecífico, por lo cual se corre el riesgo de tratarlo empíricamente sin eficacia terapéutica alguna. Es muy probable que, durante la bacteremia, la infección también logre alcanzar meninges y cerebro (diagrama 2) (41).

d. Meningoencefalitis, cerebritis y romboencefalitis

El papel de *L. monocytogenes* en la meningoencefalitis es quizá el mejor conocido, e inclusive, en los últimos años este microorganismo

se ha convertido en una de las principales causas de meningitis adquirida en la comunidad, afectando sobre todo a neonatos y adultos inmunocomprometidos. Después de la listeriosis neonatal, la meningitis es el cuadro de listeriosis más frecuente y se trata de una patología supurativa aguda, en la que la citología del LCR (con predominancia de linfocitos) y los signos clínicos llegan a sugerir una meningitis tuberculosa. La enfermedad con frecuencia cursa como meningoencefalitis y rara vez como encefalitis (diagrama 2) (42).

Clinicamente, la meningoencefalitis por *L. monocytogenes* se presenta con un cuadro febril, cefalea y alteraciones de la conciencia, tal como ocurre en otras infecciones bacterianas. La aparición de los síntomas suele ser abrupta, aunque se han detectado formas subagudas de la enfermedad y la rigidez de nuca no se presenta en cerca de la mitad de los pacientes, particularmente cuando se trata de personas muy ancianas o inmunocomprometidas. Con frecuencia se observan convulsiones, mioclonías y otros signos tales como ataxia, hemiparesia y parálisis de los pares craneales, manifestaciones que tienen lugar en el 39% de los enfermos y que reflejan una romboencefalitis; ésta corresponde a una afectación del tronco cerebral, característica de la infección por *L. monocytogenes* y que usualmente coexiste con la inflamación meníngea (42).

La meningoencefalitis incide por igual en el adulto joven y en el anciano, aunque la edad promedio es de 50 a 60 años; el pronóstico es variable dependiendo de la edad y, si bien la mortalidad global es cercana al 40 %, esta cifra disminuye a 10% en menores de 20 años y se incrementa hasta 55% en quienes sobrepasan los 60 años. Tal como ocurre en cualquier meningitis infecciosa, el enfermo puede manifestar secuelas neurológicas graves (75, 58).

Listeriosis neonatal meningea. Como se mencionó anteriormente, ésta representa la segunda forma clínica de la listeriosis neonatal, sus síntomas aparecen entre la primera y la cuarta semana de vida. El pronóstico es menos malo que el de la granulomatosis infantiséptica, pero los cuadros pulmonares son frecuentes, con granulomatosis, pulmonía y bronconeumonía (debida a la aspiración de líquido o de secreciones vaginales infectadas) o neumopatía intersticial por sustancias tóxicas liberadas por la bacteria. El cuadro se asocia a peso normal al nacer y a ausencia de complicaciones maternas, e inclusive, se han reportado formas atenuadas (ganglionares u oculares) y hasta inaparentes (75).

Cerebritis y romboencefalitis. La inflamación del cerebro debido a la infección (cerebritis), puede evolucionar a un absceso cerebral, que tiende a crecer de forma progresiva, por lo que el tratamiento debe ser

oportuno. Estos pacientes experimentan cefalea, fiebre y quizá algún grado de parálisis, como si hubieran padecido de accidentes cerebrovasculares. Por su parte, en la romboencefalitis (afectación del tronco cerebral), además de los síntomas anteriores, destaca un vómito continuo durante varios días, debido a la parálisis progresiva; cabe señalar que la mayoría de los pacientes son individuos inmunocomprometidos y que la mortalidad del padecimiento es muy elevada (diagrama 2) (51).

e. Infecciones focales

Las infecciones cutáneas debidas a *L. monocytogenes* parecen relacionarse más frecuentemente con la granulomatosis infantil antiséptica y con los veterinarios, en este último caso, como resultado del contacto directo con animales infectados. Las lesiones ulcerativas no se distinguen de las de otros orígenes, por lo cual son necesarios las preparaciones teñidas al Gram y el cultivo de las muestras para establecer el diagnóstico (diagrama 2) (69).

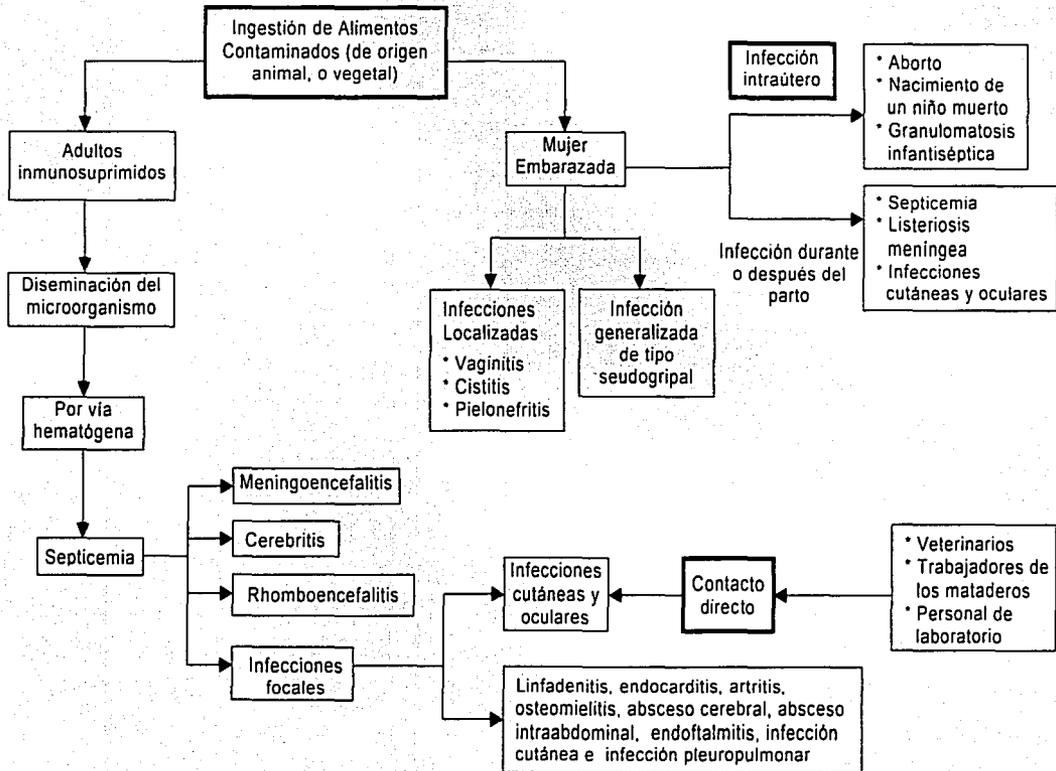
Por su parte, las infecciones oculares pueden ser parte de la granulomatosis infantiséptica, o derivada de la presencia del microorganismo en la vagina de la madre o en el líquido amniótico, o cuadros únicos originados por inoculación directa y cursan como

conjuntivitis purulentas, por lo que el microorganismo puede aislarse a partir del material purulento (75).

Las afecciones oculares no son excepcionales, ya que las listerias evidencian una particular afinidad por el ojo, tal como lo demuestra la prueba de Antón en el conejo (75).

La peritonitis bacteriana espontánea (PBE) corresponde a una complicación infecciosa grave por *L. monocytogenes* que afecta a los pacientes con descompensación hidrópica asociada a cirrosis hepáticas de diferentes etiologías. Por fortuna, la PBE es muy rara y sólo afecta a los pacientes inmunocomprometidos que presentan enfermedades subyacentes (12).

Diagrama 2. Patogenia de la infección por *Listeria monocytogenes*



iii. Tratamiento

L. monocytogenes es susceptible a la acción de múltiples antimicrobianos y su resistencia a los antibióticos es muy ocasional, excepto en lo tocante a las tetraciclinas. No obstante, se ha comprobado ampliamente que el microorganismo puede adquirir genes de resistencia procedentes de *Enterococcus spp.*, *Streptococcus* y otras fuentes, lo cual le aporta tolerancia a múltiples fármacos incluidos la gentamicina, estreptomina, eritromicina y sulfametoxazol (42).

Por lo general, las penicilinas, glucopéptidos, aminoglucósidos, macrólidos, el trimetoprim-sulfametoxazol y algunas quinolonas son efectivas contra *L. monocytogenes*. Por el contrario, las cefalosporinas de tercera generación son poco activas porque no se unen eficazmente a la PBP3, "blanco" principal de los antibióticos betalactámicos en *L. monocytogenes*. Es importante señalar que algunas publicaciones subrayan la resistencia del microorganismo a la penicilina, pero dichas opiniones están basados en fracasos terapéuticos y otros datos clínicos sin sustento microbiológico (14, 42).

De hecho, los fármacos utilizados más frecuentemente para tratar la listeriosis son las penicilinas y la ampicilina, a pesar de que *L. monocytogenes* muestra cierto grado de tolerancia a la acción bactericida de las primeras: las concentraciones mínimas inhibitorias

(CMI) de las penicilinas son menores de 1 mg/L, pero las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) a menudo exceden en 10 o más veces esa cifra la cual, además, es prácticamente imposible de alcanzar en el espacio subaracnoideo. Sin embargo, la combinación de las penicilinas con gentamicina logra efectos sinérgicos contra *L. monocytogenes*, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo cual aquella representa el tratamiento estándar de la listeriosis humana (consultar la tabla 8) (33, 34, 42).

La fórmula trimetoprim-sulfametoxazol, utilizada comúnmente en pacientes alérgicos a la penicilina, ejerce una acción bactericida contra el microorganismo, *in vitro* e *in vivo*, y las concentraciones que alcanza en el espacio subaracnoideo exceden entre 4 y 10 veces su CMI. En uno de los modelos experimentales de meningoencefalitis listeriana, constituido por ratas, dicha combinación evidenció una eficacia similar a la de ampicilina-gentamicina, para disminuir el número de microorganismos en el LCR; no obstante, esta última resultó mejor en el tratamiento de la infección del parénquima cerebral. Finalmente, diversos autores recomiendan la asociación ampicilina-cotrimoxazol, subrayando que ésta es superior a la clásica (ampicilina-gentamicina), ya que reduce la mortalidad y las secuelas cerebrales (consultar la tabla 8) (34, 42, 69).

En las situaciones clínicas más comunes, *L. monocytogenes* se comporta principalmente como patógeno extracelular, lo cual hace esperar que los antibióticos activos *in vitro* desencadenen una importante reducción en la cantidad de células microbianas, inclusive en el LCR. Sin embargo, la virulencia del microorganismo le permite llegar y sobrevivir en el interior de diversos tipos celulares, lo que también resulta relevante desde el punto de vista terapéutico; de hecho, se ha estudiado la acción antilisteriana de varios antibióticos, solos y en combinación, en el ambiente intracelular, encontrándose que la rifampicina, quinolonas, cotrimoxazol y ampicilina en liposomas, ejercen eficazmente su papel antimicrobiano. Es oportuno comentar que la rifampicina es muy activa en el citoplasma celular y que parece representar un antibiótico idóneo, pero contrarresta la acción bactericida de la ampicilina sobre las listerias que desarrollan extracelularmente (42, 61).

Dado que la listeriosis es una enfermedad relativamente rara en humanos, no se han reportado estudios prospectivos y controlados que permitan determinar cuál es realmente el antibiótico óptimo. En todo caso, el régimen terapéutico seleccionado debe incluir dosis altas y la duración adecuada, condiciones que deben establecerse para cada paciente (42, 69).

Tabla 8. Diagnóstico diferencial y tratamiento de las infecciones ocasionadas por *L. monocytogenes* (51)

Síndrome clínico	Diagnóstico diferencial	Tratamiento	
		Primera elección	Segunda elección
Infecciones en el embarazo	-Influenza -Pielonefritis -Aborto séptico	ampicilina o penicilina	TMP-SMX, eritromicina
Granulomatosis infantiséptica	-Sepsis neonatal -Meningitis neonatal debida a bacilos entéricos o <i>Streptococcus</i> del grupo B	ampicilina y gentamicina	TMP-SMX, eritromicina
Septicemia	-Sepsis de origen desconocido, debida a una gran variedad de microorganismos	ampicilina o penicilina	TMP-SMX, eritromicina
Meningoencefalitis	-Encefalopatía metabólica -Enfermedad psiquiátrica -Infección debida a <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	ampicilina o penicilina posiblemente con gentamicina	TMP-SMX, eritromicina y/o cloranfenicol
Cerebritis	-Abseso cerebral -Tumor -Ataque de apoplejía	ampicilina o penicilina	TMP-SMX, eritromicina
Infecciones Focales	Varía según la región anatómica	ampicilina o penicilina	TMP-SMX, eritromicina y /o tetraciclina

En tal contexto, la duración apropiada del tratamiento tampoco se ha logrado aclarar: tras dos semanas de terapia, diversos pacientes inmunocomprometidos han experimentado recurrencias, situación que ha conducido a recomendar regímenes de 3 a 6 meses para esos casos. Por su parte, dos semanas parecen resultar suficientes para las bacteriemias, mientras que las meningitis requieren de lapsos más prolongados (69).

iv. Prevención

L. monocytogenes se encuentra muy ampliamente distribuida en la naturaleza y, por lo tanto, ha venido representando un problema cada vez mayor en los ambientes de producción y procesamiento de los alimentos. Sin embargo, las buenas prácticas industriales en todas las fases de la cadena de producción alimentaria: procesamiento, empaquetamiento y almacenamiento, suelen disminuir los riesgos de salud asociados a este patógeno(40).

En virtud de que no existe alguna vacuna que proteja contra la listeriosis, las medidas de prevención y control corresponden a precauciones simples aplicables a cualquier enfermedad de origen alimentario. Es decir, la higiene personal y la buena higienización de los alimentos, su adecuada cocción y su apropiado almacenamiento pueden reducir el riesgo de listeriosis (41).

Los principios específicos incluyen:

- Evitar la contaminación cruzada

Antes de preparar alimentos, la persona debe lavarse bien las manos y limpiar los utensilios y las superficies destinados a picar y preparar los alimentos; es conveniente emplear un utensilio para cada alimento.

La carne cruda de res, cerdo, aves, pescados, mariscos y verduras, no deben prepararse, cortarse, ni colocarse en los sitios utilizados para alimentos cocinados u otros.

Los jugos de productos crudos no deben dejarse gotear hacia otros alimentos, durante su almacenamiento o manipulación.

Las superficies de trabajo, utensilios y platos, deben lavarse con agua jabonosa caliente y desinfectarse inmediatamente después de su uso.

La congelación de los alimentos no destruye bacterias, sólo previene que éstas se multipliquen. Los alimentos deben guardarse en refrigeración, para retrasar el crecimiento bacteriano; los tiempos muy prolongados, aún en refrigeración, se asocian a infecciones alimentarias.

- Destruir las bacterias potencialmente dañinas

Carne roja, aves y mariscos deben cocerse completamente para destruir a la mayor parte de los microorganismos contenidos.

Las verduras deben lavarse bien y desinfectarse, ya que también pueden encontrarse contaminados con *Listeria monocytogenes*.

- Recomendaciones generales

No se deben ingerir leche bronca ni productos lácteos preparados a partir de aquélla.

Es preciso lavarse las manos y limpiar perfectamente los utensilios de cocina y las tablas y otras superficies asociados a la preparación y manejo de los alimentos crudos.

III. FACTORES DE VIRULENCIA

L. monocytogenes se caracteriza por su capacidad para penetrar en una amplia variedad de tipos celulares, tanto en *vivo* como *in vitro*, lo que ha permitido desarrollar diversas pruebas para estudiar sus mecanismos de patogenicidad. En dichos experimentos se utilizan cultivos de tejidos de mamíferos o animales de laboratorio, destacando predominantemente los ratones (21).

Este patógeno intracelular ingresa al tracto gastrointestinal al ingerirse alimentos contaminados tales como queso y vegetales; una vez en el intestino, alcanza la circulación sanguínea y se disemina por vía hematológica. La patogenia correspondiente se ha estudiado *in vitro*, observándose que *L. monocytogenes* se adhiere e invade con facilidad a los macrófagos y a las células intestinales indiferenciadas cultivadas en el laboratorio (38).

El ciclo infectivo de *L. monocytogenes* inicia con la entrada de este microorganismo a la célula, ya sea por fagocitosis –en el caso de los macrófagos– o por fagocitosis inducida (invasión) en fagocitos no profesionales (16).

En todo caso, el microorganismo induce su internalización en las células hospederas y queda encerrado en un fagosoma del cual escapa posteriormente; una vez en el citoplasma *L. monocytogenes* prolifera e induce la polimerización de la actina de la célula hospedera, sobre la superficie bacteriana reacción que apoya el desplazamiento bacilar hacia la membrana celular. A continuación, las listerias "empujan" la membrana celular y forman prolongaciones alargadas, llamadas filópodos o protrusiones, los cuales son incorporados por las células epiteliales adyacentes, macrófagos o hepatocitos; después, los bacilos se liberan de las dos membranas celulares que los rodean, y el ciclo inicia nuevamente (consultar las figuras 2 y 3).

De esta manera, *L. monocytogenes* se desplaza de una célula a otra sin exponerse a la interacción con anticuerpos, complemento ni leucocitos polimorfonucleares (PMNs) (7, 21, 38).

A continuación se describen dichos fenómenos, asociándolos a los cuatro principales eventos del proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* (16, 22):

- i. Entrada a las células de mamíferos.
- ii. Escape del fagosoma y desarrollo intracelular.
- iii. Desplazamiento intracitoplásmico
- iv. Diseminación célula a célula.

Figura 2. Ciclo infeccioso de *L. monocytogenes* (36).

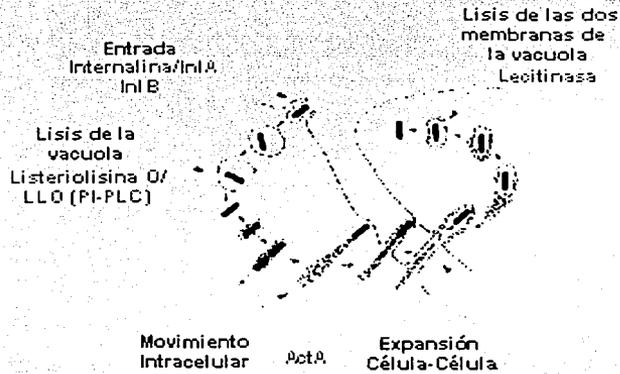
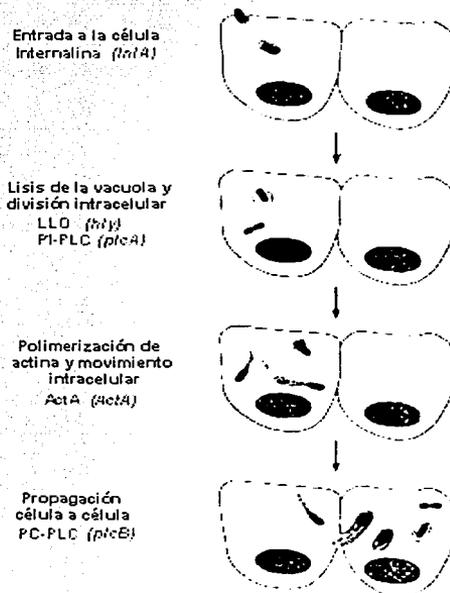


Figura 3. Pasos sucesivos en el proceso infeccioso de *L. monocytogenes* (21).



i. Entrada a las células de mamíferos

La infección por *L. monocytogenes* involucra la internalización bacteriana en células fagocíticas y no fagocíticas, destacando entre estas últimas las del epitelio intestinal y los hepatocitos (36).

Evidentemente, el ingreso del microorganismo a las células no fagocíticas es similar a la fagocitosis, ya que implica la interacción del ligando del primero con el receptor de las segundas, evento al que sucede un cierre que emula a un *zipper* (consultar la figura 4); otro mecanismo utilizado por ciertas bacterias patógenas para inducir su fagocitosis consiste en el modelo denominado *trigger*, observado en *Salmonella* y *Shigella*, el cual es resultado del remodelamiento de la superficie celular de la célula hospedera para culminar en una macropinocitosis (figura 4) (22).

Figura 4. Mecanismos de fagocitosis inducida por bacterias patógenas (22).



Mecanismo "TRIGGER"

Salmonella typhimurium



Mecanismo "ZIPPER"

Listeria monocytogenes

En el intestino, *L. monocytogenes* se adhiere a la mucosa intestinal, a la cual posteriormente invade. Los enterocitos o las células M ubicadas en las Placas de Peyer representan probablemente el primer sitio de invasión; después, el microorganismo es fagocitado por los macrófagos residentes, dentro de los cuales puede sobrevivir y replicarse, y se disemina vía la linfa y la sangre hacia el hígado y el bazo, en donde la gran mayoría de las bacterias son eliminadas. No obstante, algunas listerias sobreviven e infectan las células adyacentes, dando lugar a infecciones sistémicas. De cualquier manera, después de la invasión de la barrera intestinal, los dos tipos de células hospederas que resultan críticas en el proceso infectivo son los macrófagos y los hepatocitos (21, 25).

Proteínas bacterianas que participan en la internalización

Las internalinas A y B y otros miembros de la familia InI. La entrada de *L. monocytogenes* a las células epiteliales se ha estudiado ampliamente, lo que ha permitido la identificación de la InIA, proteína de 80 kDa, necesaria para la entrada en células del epitelio intestinal de humanos línea Caco-2 y en algunas otras células epiteliales. InIA es codificada por el gen *InIA*; éste, a su vez, forma parte de una familia de multigenes llamada *InI*, a la cual también pertenece el gen de la InIB, molécula proteica de 67 kDa que media el ingreso bacteriano a los hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y en algunas líneas celulares

epiteliales o de fibroblastos, incluyendo HeLa, HEP-2, CHO, L2 y Vero (21, 36, 49).

La familia *Inl* incluye en total siete genes: *InIA*, *InIB*, *InIC*, *InIC2*, *InID*, *InIE*, *InIF*, que codifican para proteínas de superficie, exceptuando al *InIC*, cuyo producto corresponde a una proteína soluble que es excretada al medio (66).

La estructura primaria de la *InIA* consta de los siguientes segmentos (36, 52, 55, 74):

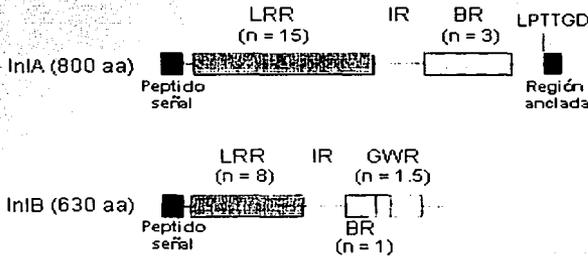
- Una secuencia (péptido) señal.
- Dos regiones de repetición, LRR y BR, la primera de las cuales está caracterizada por "repeticiones ricas en leucina" (LRRs), cuyo papel es crítico en la interacción con las células de mamíferos; de hecho, son necesarias para la invasión y se les ha encontrado formando parte de moléculas bacterianas y células eucariontes que manifiestan interacciones proteínas a proteína.
- Una región hidrofóbica carboxi-terminal, que es precedida por el pentapéptido LPTTG, secuencia fundamental para que la internalina quede anclada al peptidoglicano de la pared celular, por enlace covalente, vía el residuo de treonina (consultar la figura 5). Este tipo de región C-terminal es encontrada en más del

50 % de las proteínas superficiales de las bacterias Gram-positivas.

Por su parte, la estructura primaria de la InIB presenta las siguientes características(16, 33, 52):

- Presenta una secuencia señal.
- Incluye una región con LRRs, análoga a la de InIA, muy necesaria para la activación de la 3-cinasa fosfatidil-inositol y para la reestructuración de la actina del citoesqueleto.
- No contiene el motif LPXTG o alguna región hidrofóbica en la parte C-terminal, lo cual indica un posible dominio transmembranal; empero, los últimos 231 aminoácidos de la región C-terminal son necesarios para que la InIB quede anclada a la superficie bacterial. Esta región contiene repeticiones en tándem de aproximadamente 80 aminoácidos, empezando con la secuencia GW (consultar la figura 5). Repeticiones similares se encuentran en una bacteriolisina de superficie de *L. monocytogenes*, recientemente identificada, llamada Ami y en la lisostafina secretada por *Staphylococcus simulans* y asociada a la pared celular de *Staphylococcus aureus*.

Figura 5. Dominios funcionales de InIA e InIB (36).



Proteína p60. Esta proteína de 60 kDa se localiza en la superficie bacteriana y resulta esencial para el crecimiento celular y para la invasión intestinal por *L. monocytogenes*; se trata de una mureín hidrolasa, transcrita independientemente del regulador central de virulencia *prfA*, presente en todas las cepas virulentas. Cuando el gen para p60 se ve afectado, las mutantes con bajos niveles de la proteína son filamentosas y manifiestan una pequeña o nula capacidad para invadir a las células hospederas(36, 66, 80).

ClpC ATPasa. Ésta pertenece a la familia de proteínas Clp, de 100 kDa, de shock térmico, implicadas en la tolerancia al estrés de varios microorganismos procarióticos y eucarióticos. También participa en la virulencia de *L. monocytogenes*, promoviendo el escape bacteriano temprano del compartimiento fagosómico de los macrófagos y, además,

favoreciendo la invasión de los hepatocitos *in vivo*, junto con InIA, InIB y ActA (65).

Vías de internalización de *L. monocytogenes*

Ingreso mediado por InIA. Tal como se mencionó anteriormente, *L. monocytogenes* puede entrar en las células epiteliales de mamíferos por al menos dos vías, una de las cuales involucra al receptor de InIA y la caderina-E. Ésta corresponde a una glicoproteína transmembranal de 110 kDa, dependiente de Ca^{2+} y responsable de la adhesión célula-célula a través de interacciones homofílicas entre dominios extracelulares; además, se expresa principalmente en tejidos epiteliales, incluido el del tracto digestivo, y desempeña un papel crítico en la diferenciación de las células -durante el desarrollo- y en el mantenimiento de la cohesión del tejido y de su arquitectura -durante la vida adulta-(22).

Aparte de InIA, el único ligando heterofílico de dicha caderina es la integrina $\alpha_E\beta_7$, que media la adhesión entre linfocitos intra-epiteliales y los enterocitos. En las células epiteliales polarizadas, la caderina-E se localiza principalmente en la membrana basolateral y se concentra en las uniones adherentes. De acuerdo con esta distribución, el ingreso bacteriano mediado por InIA ocurre fundamentalmente a través de la cara basolateral de las células epiteliales(16, 22, 36).

La región extracelular de la caderina-E consta de 5 módulos y, en el primero de ellos, se encuentra la secuencia HAV, necesaria en las interacciones homofílicas. En cuanto al dominio citoplásmico de la proteína, su integridad es esencial, debido a que sustenta la adhesión con las células epiteliales adyacentes, a través de interacciones homofílicas célula-célula(16, 22, 36).

Estudios recientes indican que la adhesión de *L. monocytogenes* a las células epiteliales se debe a las LRRs de la InIA, las cuales reaccionan con el dominio extracelular de la caderina-E; adicionalmente, el dominio citoplásmico de esta última se asocia a las cateninas, las cuales interactúan con la actina del citoesqueleto para que los cambios inducidos por ésta propicien la entrada de *L. monocytogenes*. Es decir, la región citoplásmica caderina-E no es requerida para la adhesión mediada por InIA, pero sí para la internalización bacilar, en donde resultan determinantes la actina del citoesqueleto, las cateninas y otras proteínas (consultar la figura 6)(16, 22, 36, 55).

Internalización mediada por InIB. Otra forma mediante la cual *L. monocytogenes* puede ingresar a las células eucariontes consiste en la vía InIB/gC1q-R; de hecho, la entrada de esta bacteria a la mayoría de las líneas celulares no es promovida por la InIA, sino precisamente por la InIB (7).

En este último caso, la internalización en fagocitos no profesionales se lleva a cabo vía la fosforilación de la tirosina hospedera, la activación de la 3-cinasa fosfatidil-inositol (3-cinasa PI) y la reestructuración de la actina del citoesqueleto. La activación de dicha cinasa parece ocurrir a través de la fosforilación de la tirosina (Tyr-P) ubicada en tres proteínas del hospedero: Gab1, Cb1 y Shc, las cuales quizá ayuden al reclutamiento de la propia cinasa al receptor de la InIB (gC1q-R) (7, 37).

El receptor gC1q-R, también llamado p32, corresponde a una proteína ubicua muy ácida de 33 kDa, a la que originalmente se le identificaba como una molécula de membrana que se enlazaba a las cabezas globulares del componente sérico C1q del complemento. Hoy en día, este receptor se considera una proteína multifuncional con afinidad a múltiples ligandos (consultar la figura 6). El enlace de la InIB al gC1q-R es dependiente de la presencia de cationes divalentes y, si bien gC1q-R no es miembro de alguna gran familia (tal como sí lo es la caderina-E), se expresa en un amplio rango de tipos celulares, incluidos los linfocitos, neutrófilos, hepatocitos y las células endoteliales (7).

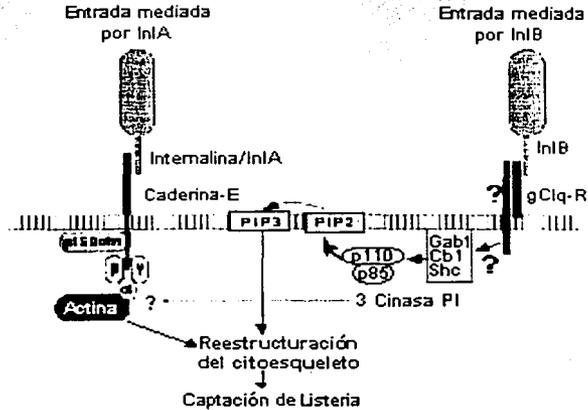
En cuanto a las regiones de gC1q-R y de InIB involucradas en la interacción, aquéllas aún permanecen desconocidas. No obstante, en diversos trabajos se ha observado que la parte N-terminal altamente

ácida de gC1q-R contiene un sitio de enlace para C1q, el cual probablemente también funja como el lugar de enlace para InIB (7, 37).

En cuanto al papel de la 3-cinasa fosfatidil-inositol, ésta representa una de las proteínas de señalización que controla la internalización bacteriana y está constituida por una subunidad regulatoria de 85kDa y una subunidad catalítica de 110 kDa, las cuales se activan en respuesta a la reacción ocurrida entre un receptor de la superficie celular y algunas citocinas o ciertos factores de crecimiento. La activación de p85-p110 es promovida frecuentemente vía la interacción del dominio SH₂ de p85 con las proteínas tirosín-fosforiladas y se caracteriza por el rápido y transitorio incremento en los niveles de fosfatidilinositol 3,4-difosfato (PIP2) y de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) (16).

Dichas fosfoinositidinas parecen actuar como segundos mensajeros, para regular la localización celular y/o la actividad de varias proteínas de señalización, e inclusive, es posible que su elevada concentración afecte la curvatura local de la bicapa lipídica, facilitando la internalización bacteriana. Las p85-p110 controlan varios procesos fundamentales de las células de mamíferos, incluido el crecimiento celular, el tránsito vesicular, la apoptosis y la organización de la actina del citoesqueleto (7, 37).

Figura 6. Vías de entrada de *L. monocytogenes* a las células del hospedero (7).



ii. Escape del fagosoma y desarrollo intracelular

Una vez que *L. monocytogenes* ha ingresado a la célula hospedera, lleva a cabo la lisis de la membrana vacuolar; probablemente, el principal factor involucrado en dicho evento corresponde a una potente toxina formadora de poros: la listeriolisina O (LLO), la cual promueve el escape del microorganismo antes de que ocurra la fusión fagolisosomal (24).

Sin embargo, otros factores que participan en el proceso, son: la fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC) y la ClpC ATPasa -un

interesante miembro de la familia Clp-ATPasa de proteínas de estrés que promueve el escape del fagosoma en los macrófagos. Adicionalmente, *L. monocytogenes* produce catalasa y superóxido dismutasa, dos enzimas que la protegen de la oxidación en el fagolisosoma (81).

Una vez que se concreta la lisis del fagosoma o el fagolisosoma, el microorganismo ingresa rápidamente al citosol, en donde se multiplica evidenciando un tiempo de generación de 50 minutos, lo que se considera una alta velocidad de crecimiento para un patógeno intracelular (16, 21)

Listeriolisina O (LLO). La LLO es una proteína extracelular antigénica de 60 kDa, codificada por el gen *hly* (por "hemolisina") y perteneciente a una gran familia de citolisinas formadoras de poros activadas por grupos sulfhidrilo, cuyo prototipo es la estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus pyogenes*. Esta clase de sustancias es producida por diversas bacterias Gram positivas, incluidas *Clostridium* y *Bacillus*, y muestra similares secuencias de aminoácidos y un mecanismo de acción compartido: se enlazan al colesterol de la membrana celular e insertan y oligomerizan entre 20-80 monómeros, los cuales inducen la formación del poro (21, 25).

Sin embargo, la LLO es, entre las citolisinas, la única producida por una bacteria intracelular y la única activa a bajo pH, tal como el que impera dentro del fagolisosoma (28, 81).

La capacidad de la LLO para generar la formación de poros se puede determinar por su actividad lítica sobre los eritrocitos, razón por la cual también es conocida como hemolisina. De hecho, la LLO es la responsable de la β -hemólisis que caracteriza a *L. monocytogenes* cuando se le cultiva en agar sangre. Diversos trabajos han demostrado que las escasas cepas no hemolíticas de este patógeno suelen ser avirulentas debido a que, aunque llegan a ser invasivas, son incapaces de escapar de la vacuola fagocítica (25).

La actividad hemolítica de la LLO es dependiente del pH, por lo que puede ser bloqueada mediante oxidación o con pequeñas cantidades de colesterol, lo cual es revertible al agregarse agentes reductores. A diferencia de otras citolisinas, la LLO presenta una actividad máxima a pH=5 y es inactiva a pH=7; ello resulta particularmente importante en el ambiente ácido que se origina por la fusión fagosoma-lisosoma, aunque también es relevante la muy baja actividad de la LLO a pH básico o neutro, lo cual se traduce en escasos efectos dañinos sobre la membrana celular cuando la bacteria se encuentra libre en el citosol (21, 60, 88).

La inactividad de la LLO en el citosol también parece residir en la secuencia PEST (prolina, ácido glutámico, serina y treonina): la LLO tiene una vida media muy breve en el citosol, pues es degradada al realizarse la fosforilación en tres sitios de la secuencia PEST, situación que no ocurre dentro de la vacuola fagocítica (19,73).

Además de su trascendental papel en el escape bacteriano de la vacuola, la LLO induce la apoptosis, estimula a las cinasas MAP y promueve la expresión de moléculas de adhesión y la generación de mediadores lipídicos en las células endoteliales infectadas. De acuerdo con ello, la LLO representa un clásico factor multifuncional (16,78).

Fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC). A diferencia del mecanismo lítico utilizado por la LLO, la PI-PLC afecta a la membrana celular del hospedero hidrolizando al lípido de membrana PI (fosfatidilinositol). La PI-PLC es una molécula proteica de 33 kDa, codificada por *plcA*, uno de los seis genes (*hly*, *actA*, *mpl*, *plcA*, *plcB*, *prfA*) regulados positivamente por la proteína PrfA. Si bien se le considera altamente específica para PI, también se puede adherir al glicerol-P que se encuentre enlazado al soporte PI-glicosil (soporte GPI); no obstante, es inactivo sobre el fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4-P) o el fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PI-4,5-P₂). Al parecer, desempeña un papel determinante en el escape de las vacuolas secundarias de

doble-membrana y su actividad catalítica es requerida en todas las funciones intracelulares de *L. monocytogenes* (5, 81, 84).

iii. Desplazamiento intracitoplásmico

La fagocitosis inducida, el escape del fagosoma y la reproducción intracelular representan pasos esenciales para que ocurra la invasión individual de las células, aunque no son suficientes para que *L. monocytogenes* pueda extender su crecimiento a otras células del tejido implicado. De hecho, para que el microorganismo alcance otras células del tejido implicado, también resultan determinantes los siguientes factores: a) el desplazamiento intracelular de *L. monocytogenes*, el cual es mediado por la proteína bacteriana ActA, necesaria y suficiente para que se efectúe la polimerización de la actina; además de esta última, otras proteínas del hospedero relacionadas con el desplazamiento intracelular del microorganismo son la profilina, la fosfoproteína estimuladora de la vasodilatación (VASP), el complejo Arp2/Arp3, la cofilina, la fibrina y la α -actinina; b) la formación de la protusión, que es fagocitada por la célula vecina, si bien los factores implicados aún son desconocidos; c) la formación de un fagosoma de doble membrana y la posterior lisis de éste, para que la bacteria se libere hacia el citosol; dicha lisis fagosómica de doble membrana es llevada a cabo por la fosfolipasa C fosfatidilcolina-específica (PC-PLC) o lecitinasa (16, 21, 36).

Movilidad bacteriana basada en actina. Un importante factor de virulencia de *L. monocytogenes* reside en su capacidad para utilizar los elementos del citoesqueleto de la célula hospedera y, de esa manera, adquirir movilidad intracelular e intercelular. Esta particular forma de locomoción ha recibido gran atención de la comunidad científica, debido a su similitud con diferentes eventos celulares, tales como la migración de los neutrófilos hacia los sitios de infección o la metástasis de las células cancerígenas (16, 76).

La movilidad de *L. monocytogenes* inicia con la incorporación de filamentos cortos de actina sobre la superficie de la bacteria, los cuales posteriormente son interconectados por otras proteínas del citoesqueleto hospedero, tales como la α -actinina. Dicha incorporación de la actina es posible merced a la proteína bacteriana conocida como ActA; está presenta una distribución polar sobre el bacilo y adsorbe a la actina originando que el microorganismo presente estructuras semejantes a la cola de un cometa. La polimerización de la actina aporta la fuerza locomotora del bacilo en el ambiente intracelular y la velocidad del microorganismo alcanza aproximadamente 0.05 a 0.3 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (43, 46, 71).

Es decir, las colas propulsoras están constituidas por pequeños filamentos de 0.2 μm , integrados por 73 monómeros de actina

interconectados entre sí. De hecho, es la rápida polimerización de dicha proteína la que provee la fuerza de desplazamiento bacteriano; evidentemente, la velocidad de incorporación de los monómeros de actina -para formar las colas- se encuentra estrechamente relacionada con la rapidez del movimiento bacilar (16).

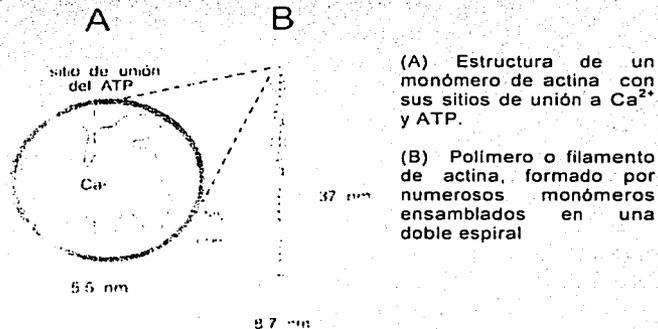
Lo corto de algunos filamentos de actina puede obedecer a la competencia existente entre la bacteria y los factores propios de la célula hospedera tendientes a no polimerizar; en otras palabras, los filamentos se despolimerizan con base en los mecanismos normales de renovación de la actina en la célula hospedera, por lo que las colas desaparecen gradualmente durante el movimiento de la bacteria (16, 22, 89).

La actina uno de los componentes proteicos más abundantes del citoesqueleto (figura 7), es una proteína globular que se asocia a Ca^{2+} y a una molécula de ATP cuyo fosfato terminal se hidroliza cuando cada molécula se suma a otra durante la polimerización (origen de la actina filamentososa) (56).

Cada filamento contiene dos cadenas de monómeros de actina enrollados en espiral y sólo crece en el extremo (+), dependiendo de la localización de la molécula de ATP asociada al monómero de más

reciente incorporación; por su parte, la despolimerización de los filamentos puede ocurrir en el extremo (+) ó (-). Cabe señalar que dicha polaridad de la molécula es muy importante en la interacción actínica con otras proteínas y que la despolimerización ocurre al aumentar los niveles de Ca^{2+} y por el efecto de algunas drogas tales como la citocalasina (figura 7) (56).

Figura 7. Estructura de la actina (56).



ActA. Ésta es una proteína superficial de 90 kDa, constituida por 610 aminoácidos, la cual resulta necesaria y suficiente para inducir la polimerización de la actina del hospedero; la ActA, codificada por el gen *ActA*, se divide en tres dominios (16, 22, 25, 46):

- El dominio N-terminal (de 1 a 234 aminoácidos), es fundamental para la polimerización de la actina en el citosol de la célula

hospedera; además, contiene dos regiones, de las cuales, la primera (T) es de 117-121 aminoácidos y resulta crítica en la formación de la cola de actina, en tanto que, la segunda (C), es de 21-27 aminoácidos y aparentemente está involucrada en el mantenimiento de la continuidad de la cola de actina.

- Un dominio central (de 235 a 395 aminoácidos), que no es indispensable, pero actúa como estimulador de la movilidad, debido a que contiene una región con 4 pequeñas repeticiones ricas en prolina, las cuales actúan como sitios de enlace para la proteína VASP que, a su vez, se enlaza a otra molécula proteica del hospedero llamada profilina; ambas proteínas influyen en la velocidad de polimerización de la actina.
- El dominio C-terminal hidrofóbico (de 396 a 610 aminoácidos), con el cual la actina se fija a la superficie bacteriana, pero no se asocia a la función de la ActA (consultar figura 8).

Figura 8. Representación esquemática de la proteína ActA (16)



La ActA aparenta ser una proteína compuesta, debido a que comparte similitudes con los dominios de algunas proteínas eucarióticas relacionadas con la actina del citoesqueleto. Su dominio N-terminal presenta una secuencia homóloga (25% de identidad) a la región C-terminal (que se enlaza a la actina) de la proteína humana conocida como vinculina (de 879 a 1066 aminoácidos); ésta se asocia a las fibras de tensión y a adherencias focales. Además, la región de la ActA que evidencia repeticiones ricas en prolina también muestra similitudes con un dominio que manifiesta repeticiones de dicho aminoácido en la vinculina(15, 26).

Por otra parte, ambas regiones de la ActA: la que presenta segmentos ricos en prolina y el dominio C-terminal, muestran un gran parecido (24% de identidad) con la zyxina, proteína de 83 kDa asociada a los contactos focales y a las fibras de tensión de la actina en las células eucariontes (figura 8) (16, 36).

Por último, el dominio N-terminal de la ActA forma homodímeros, lo cual también representa un paso crítico en la polimerización de la actina. Existen dos hipótesis respecto a la función del dímero de ActA: la primera establece que cada monómero de ActA es capaz de unirse a uno de actina y que, gracias a ello, la cercanía que se logra entre los monómeros actínicos estimula el proceso de polimerización; la segunda

plantea que un monómero de ActA participa en el proceso de polimerización de la actina, mientras que el otro protege el extremo (+) del primero –para que no reaccione con otras proteínas- y continúa la elongación del filamento (62).

La ActA se localiza en la superficie bacteriana, permanece durante el desplazamiento y presenta una clásica distribución polar; es decir, se le encuentra en altas concentraciones en uno de los polos de la bacteria y en muy escasa proporción en la zona opuesta, situación que está estrechamente relacionada con la dirección del movimiento (9, 32, 86).

Factores celulares implicados en la movilidad basada en actina.

Para promover la movilidad, la ActA se asocia a múltiples proteínas del citoesqueleto hospedero (tabla 9), entre las cuales destacan la fosfoproteína estimuladora de la vasodilatación (VASP) y la profilina, ambas localizadas en el inicio de la cola de actina, muy cerca de la superficie de la bacteria (22, 36).

La VASP es la única molécula del hospedero capaz de unirse directamente a la ActA y corresponde a un tetrámero de subunidades idénticas de 46 a 50 kDa, con secuencias ricas en prolina, localizada en contactos focales a lo largo de las fibras de estrés y en las regiones dinámicas de reestructuración de la actina (47, 87).

La VASP fue el primer ligando identificado para la profilina pero, además de unirse eficazmente a esta proteína y a la ActA, también lo puede hacer con la zyxina y la vinculina. La VASP se une a la región central de la ActA (que contiene repeticiones ricas en prolina) y, al mismo tiempo, lo hace a la profilina, con lo cual ayuda a una adecuada polimerización (67).

La profilina es una proteína de 15 kDa que se une a los monómeros de actina, por lo que puede regular positiva o negativamente el ensamble de los filamentos actínicos; es decir, puede actuar como secuestrador de los monómeros de actina, inhibiendo el ensamble de los filamentos, o bien, promueve la polimerización de la actina, lo cual depende de la presencia de otras proteínas unidas a la actina tales como la timosina $\beta 4$ y de algunos otros factores aún desconocidos; además, es capaz de actuar sinérgicamente con la ADF/Cofilina para incrementar la producción de los filamentos, e inclusive, parece influir positivamente en la velocidad del cambio ADP a ATP al enlazarse a los monómeros de actina (Figura 10) (29, 85, 90).

La activación de la actina sobre la superficie de *L. monocytogenes* está mediada por el dominio N-terminal de la ActA y por Arp2/Arp3, un complejo proteico del hospedero que se compone por tres proteínas relacionadas con la actina, (Arp)¹, Arp2 y Arp3 y otras cinco subunidades; este complejo se ha localizado cerca de la superficie bacteriana y a lo largo de la cola de actina y, al parecer, Arp2 (43 kDa) y Arp3 (50 kDa) llevan a cabo la interconexión de los filamentos por medio de pequeñas ramificaciones (72, 83).

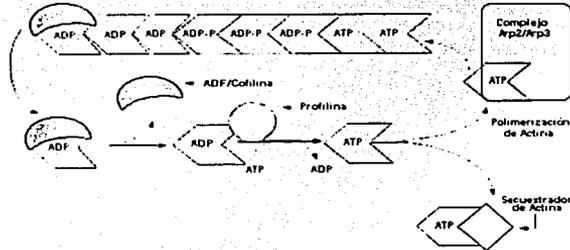
Lógicamente, la continuidad de la polimerización durante el movimiento intracelular de *L. monocytogenes* requiere de que la actina sea despolimerizada y del reciclaje de las subunidades. En tal contexto, varias proteínas celulares están implicadas en la despolarización de la actina, destacando dos familias proteicas: la de la gelsolina y la de pequeñas proteínas de desligamiento; estas últimas incluyen al factor despolimerizador de actina (ADF) y a la cofilina. Las de la primera familia abarcan isoformas específicas de tejido tales como la villina, scinderina y adseverina, así como formas específicas de especie (fragmina y severina) (figura 9); a ésta familia también pertenece la proteína CapG (11).

La gelsolina se adhiere a los extremos (+) de los filamentos de actina y los corta en pequeños fragmentos y monómeros, lo que resulta en el

incremento de la velocidad de ensamble de las colas actina y en la migración intracelular de la bacteria; ello sugiere que dicha proteína de desunión aumenta la movilidad basada en actina, debido probablemente a que incrementa la velocidad de reciclaje de los monómeros de actina. Las proteínas de la familia de la gelsolina son reguladas positivamente mediante su unión al Ca^{2+} y son inhibidas por la interacción con los fosfoinositósidos (PIPs) (45).

Así mismo, con respecto a la familia de pequeñas proteínas que desunen a la actina, la ADF y la cofilina presentan secuencias 70% idénticas y comparten aquella función; a pH de 6.8 ambas pueden unirse a los filamentos de actina F y actina G, particularmente en los extremos (-), para llevar a cabo su despolimerización. La actividad de la cofilina puede ser inhibida por la tropomyosina y por los PIPs. Por otra parte, las proteínas ADF/cofilina pueden estar fosforiladas o desfosforiladas en las células; en el primer caso, se reduce su actividad de unión a la actina y la despolimerización de esta última. De hecho, diversas vías de transducción de señales que originan la reorganización de la actina del citoesqueleto también provocan la rápida desfosforilación de la ADF y de la cofilina, lo que sugiere que ello participa en la regulación de la despolimerización de la actina celular (figura 10) (17, 79).

Figura 10. Modelo del reciclaje de actina por las proteínas ADF/cofilina (61).

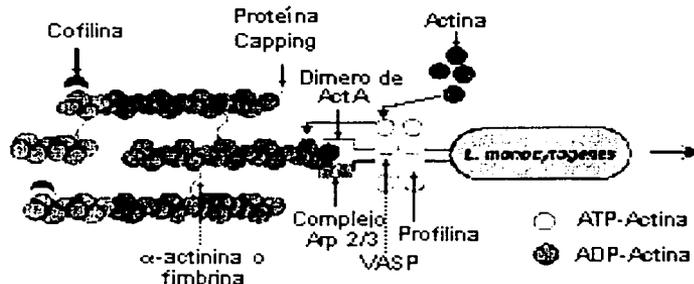


La actina unida al ATP, es inducida a la polimerización por el complejo Arp2/Arp3. El ATP es hidrolizado y el fosfato es lentamente liberado. La subunidad resultante contiene ADP y tiene una débil interacción con las subunidades que contienen ATP. Esta subunidad ahora está disponible para la familia de proteínas ADF/Cofilina, que despolimerizan la subunidad de actina, una vez realizado esto, se disocian de la actina. La actina libre intercambia ADP por ATP, catalizado por la profilina. Entonces la Actina unida al ATP es repolimerizada o sequestrada para un uso posterior.

Adicionalmente, la α -actinina hospedera es regulatoria, ya que interconecta a los filamentos de actina (actina-F), además de intervenir en la formación del filópodo y la cola de actina (Figura 9) (22).

El papel de las principales proteínas del citoesqueleto de la célula hospedera involucradas en la movilidad basada en actina se muestra en la figura 11.

Figura 11. Modelo del ensamblaje de la actina inducido por *Listeria monocytogenes* (16).



○ ATP-Actina
● ADP-Actina

iv. Diseminación célula a célula

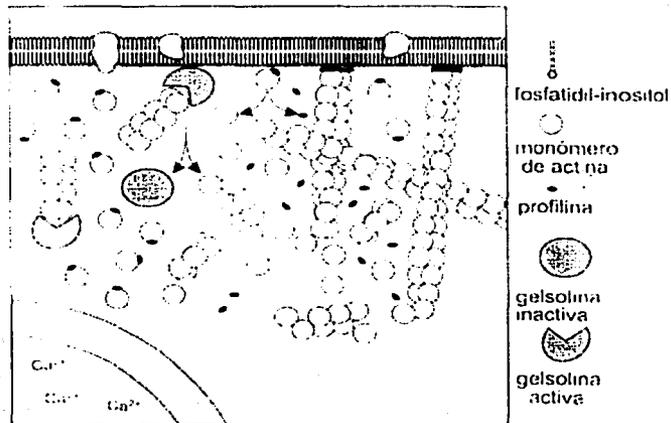
La ActA representa un factor determinante en la patogénesis de *L. monocytogenes*, ya que también facilita la propagación bacteriana célula a célula. No obstante, aunque se conoce cuáles moléculas del hospedero unen las colas de actina a la membrana plasmática, no se sabe si la ActA interactúa directamente con esta última.

Recientemente, se ha demostrado que la repetición de los ciclos de polimerización-despolimerización de la actina en la región cortical le permite a la célula formar pseudópodos durante la movilidad de *L. monocytogenes*; para la iniciación de cada uno de los ciclos se requiere de ayuda adicional —otras proteínas— que facilitan la polimerización y despolimerización de la actina en los momentos necesarios (56).

La coordinación del proceso de polimerización y despolimerización está bajo el control de señales que llegan a la membrana de la célula. Al pasar la señal al interior de la célula se producen varios efectos, uno de los más frecuentes consiste en la salida de iones de Ca^{2+} desde el interior de las vesículas en donde estos se encuentran almacenados. El Ca^{2+} actúa como activador de la gelsolina, a la cual se une para que ésta se fije a los extremos (+) de los filamentos de actina y los escinda en pequeños fragmentos y en monómeros de la proteína, a fin de que queden listos para volver a participar en la polimerización actínica.

Además, dado que se requiere que los productos de la escisión permanezcan despolimerizados en el citoplasma, por una parte, la gelsolina persiste unida a ellos, e inclusive, la profilina también se incorpora al complejo. De esta manera, los fragmentos y monómeros unidos a gelsolina y/o a profilina se difunden hacia la membrana celular, en donde se ponen en contacto con lípidos de la clase del fosfoinositol; dichos fosfolípidos separan a la gelsolina y a la profilina, con lo cual los monómeros de actina se pueden volver a reunir para formar otros núcleos de polimerización y nuevos filamentos de actina. Así, se recupera el arreglo reticular que estabiliza al pseudópodo (56).

Figura 12. Proceso de polimerización y despolimerización de la actina en la región cortical de una célula en movimiento. Este fenómeno sustenta la expansión del citoplasma para formar pseudópodos (56).



Cabe señalar que aún no se ha logrado establecer qué moléculas de superficie median la interacción célula hospedera a célula hospedera ni si ésta es promovida por algún proceso activo o pasivo dependiente de la célula receptora de listerías.

Contrario a ello, ya se conocen los factores bacterianos implicados en la lisis de la vacuola de doble membrana, entre los cuales destacan: dos fosfolipasas (la PC-PLC y, en menor grado, la PI-PLC), así como la metaloproteasa (Mpl). Por obvio, las tres enzimas mencionadas se consideran importantes participantes en el proceso de propagación célula a célula (25).

Fosfolipasa C fosfatidilcolina-especifica (PC-PLC). La PC-PLC o lecitinasa es una exoproteína, codificada por el gen *plcB* que, en su forma activa, provoca la lisis de la vacuola de doble membrana, vía la hidrólisis de los lípidos de membrana tales como la fosfatidilcolina (PC). Además, su actividad óptima se manifiesta a pH de 5.5 a 7, actúa sobre un amplio rango de sustratos, particularmente sobre la fosfatidilcolina, y se puede ligar a una gran variedad de fosfolípidos, incluidos la esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y los liposomas (84).

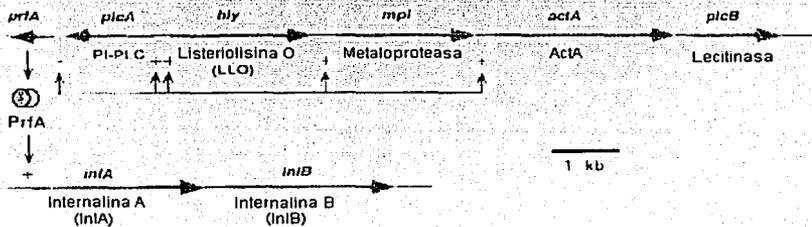
La PC-PLC es secretada como un precursor inactivo (proPC-PLC) de 33 kDa, a partir del cual una escisión proteolítica en la región N-terminal genera la forma activa. Su activación intracelular está mediada por dos vías proteolíticas: la primera depende de la proteína bacteriana conocida como metaloproteasa (Mpl), dependiente de zinc, en tanto que, la segunda, depende de la proteasa de cisteína producida por la célula hospedera. De cualquier manera, la actividad de la PC-PLC, activada por cualquiera de las proteínas antes señaladas, es prácticamente la misma, aunque ello depende de la acidificación del fagosoma. Cabe mencionar que debido a su participación como activadora de la PC-PLC, a la metaloproteasa dependiente de zinc se le reconoce una contribución indirecta en la virulencia de *L. monocytogenes* (25, 53, 82).

v. Organización y regulación de los genes de virulencia

Los genes que codifican para la síntesis de los factores de virulencia de *L. monocytogenes* se encuentran agrupados en dos regiones del cromosoma: una de 10 kb, ausente en las especies no patógenas y denominada operón *prfA*, que agrupa a los genes *hly*, *actA*, *mpl*, *plcA*, *plcB*, *prfA* y, la segunda, en donde se localiza al operón *inlAB* (consultar la figura 13) (16).

En general, la expresión de los genes implicados es regulada por las condiciones del medio ambiente, siendo aquéllos reprimidos a bajas temperaturas y activados al máximo a 37°C. Además, los genes de virulencia están bajo el control parcial o absoluto de la PrfA, una proteína pleiotrópica de 27 kDa, miembro de la familia CAP/FnR de activadores transcripcionales. Cabe señalar que, bajo ciertas condiciones de cultivo, la PrfA está presente pero en estado inactivo, lo que sugiere que requiere de algún cofactor o de sufrir cierta modificación transcripcional para ser activada (16; 91).

Figura 13. Organización y regulación de los genes de virulencia (16).



V. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

i. Diagnóstico directo

a) **Recolección, transporte y almacenamiento de las muestras clínicas**

L. monocytogenes se aísla fácilmente a partir de muestras clínicas provenientes de regiones anatómicas normalmente estériles, tales como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), fluido amniótico, placenta y tejido fetal. Dichos especímenes deben remitirse al laboratorio y ser procesadas tan pronto como sea posible o, en su defecto, conservarse a 4°C durante un máximo de 48 h.

Quando se llevan a cabo estudios epidemiológicos tendientes a establecer índices de portadores, las muestras de material fecal resultan más confiables que los raspados rectales. Cualquiera de ellas puede conservarse a 4°C durante 24 a 48 h y, en caso de períodos más prolongados, es conveniente congelarlas a -20°C, para evitar el sobrecrecimiento de la microflora acompañante (63).

b) **Aislamiento y cultivo**

Aislamiento a partir de muestras procedentes de sitios normalmente estériles

Esta clase de especímenes pueden inocularse directamente en medios

habituales tales como el agar sangre aunque, desde luego, la sangre venosa se deposita en cualquier sistema convencional para hemocultivos (Consultar diagrama 3 y 4) (70).

Diagrama 3. Detección de *Listeria* en muestras clínicas de sitios normalmente estériles (70).

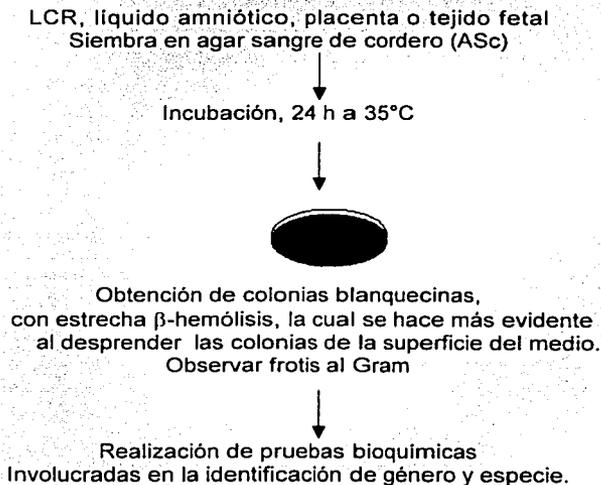
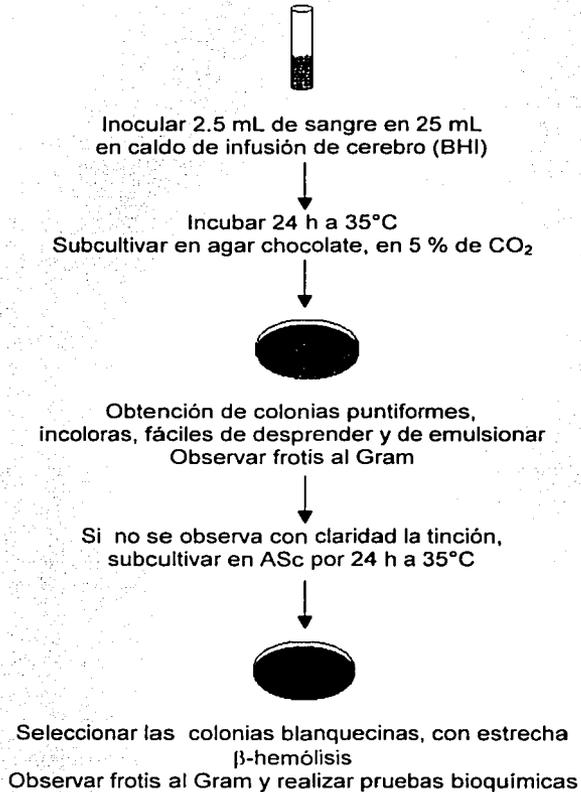


Diagrama 4. Detección de *Listeria* mediante hemocultivos (70).



Aislamiento a partir de muestras provenientes de tejidos no estériles

Las muestras de materia fecal y las obtenidas a partir de alimentos o del medio ambiente deben ser enriquecidas en medios selectivos líquidos para *Listeria spp.*, previo a su inoculación en placas. Durante aproximadamente 40 años, el enriquecimiento se ha realizado colocando la muestra en caldos simples y procediendo a almacenarlos a 4°C, durante 2 meses ó más (63).

Recientemente, los estudios efectuados durante los brotes de listeriosis en los 1980s, han establecido que los alimentos representan la principal fuente de transmisión de *L. monocytogenes*, lo que también condujo a desarrollar métodos rápidos de enriquecimiento selectivo; si bien ninguno de ellos parece ser 100 % efectivo, los métodos de USDA (U. S. Department of Agriculture) y NGFIS (Netherlands Government Food Inspection Service), son usados con éxito en los centros de control y prevención de enfermedades, para aislar a *L. monocytogenes* a partir de comida y de muestras clínicas no estériles. Individualmente, ambos evidencian cerca del 75 % de sensibilidad pero, cuando se emplean junto con algún otro, dicha cifra aumenta hasta 90% (63).

En México, la detección de *Listeria* a partir de materia fecal y de muestras alimentarias, se realiza según la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, la cual se basa en el método propuesto por la FDA (68).

El método USDA implica la siembra de la muestra en el caldo de enriquecimiento selectivo primario Universidad de Vermont (en proporción de 1:10) y su incubación a 30°C. Después de 24 h, se inoculan 0.1 mL del cultivo de enriquecimiento en 10 mL de caldo de enriquecimiento selectivo secundario Universidad de Vermont, el cual se incuba otras 24 h y, paralelamente, otras alícuotas iguales se siembran en placas de agar cloruro de litio feniletanol-moxolactam (LMP) y agar Oxford (modificado o no). Estas placas y las inoculadas 24 h después a partir del caldo selectivo secundario son examinadas una vez que transcurrida su respectiva incubación por 24-48 h a 35°C (63).

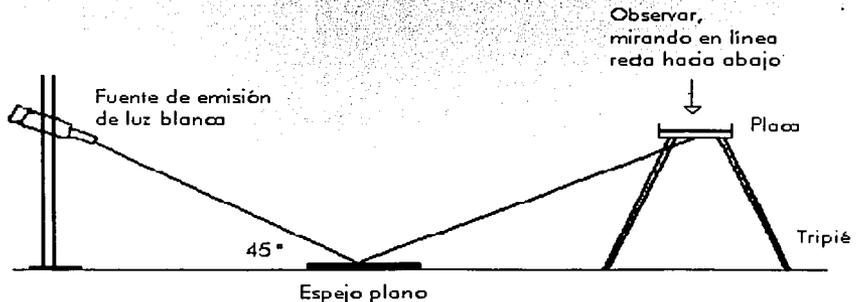
El método NGFIS incluye el enriquecimiento de la muestra en el caldo PALCAM (polimixina-acriflavina-cloruro de litio-Ceftazidima-esculina-manitol), adicionado de yema de huevo. Una vez realizada la incubación a 30°C durante 24 a 48 h, se procede a sembrar en agar PALCAM, se incuba a 30°C por 48 h bajo condiciones de microaerofilia (5 % oxígeno, 7.5 % dióxido de carbono, 7.5 % hidrógeno y 80% nitrógeno) (63).

En cualquiera de ambos métodos (USDA y NGFIS), se seleccionan 3 a 10 colonias sospechosas por placa y se propagan en agar soya tripticaseína con 5% sangre de cordero, durante 18 h a 35°C, antes de

someter el crecimiento obtenido a pruebas bioquímicas de identificación de género y especie (63).

De acuerdo con el método propuesto por la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, se depositan 25 g de la muestra en un caldo de enriquecimiento (EB), se homogeneiza y se incuba a 30°C durante 24-48 h, antes de efectuar resiembras en los medios LMP y OXA (medio Oxford). Ambas placas se incuban (la primera a 30°C y la segunda a 35°C) y, 24-48 h después, se observa el desarrollo de las de LMP con luz blanca, en un ángulo de 45° (iluminación de Henry), a simple vista o con un objetivo seco débil: generalmente, las colonias de *Listeria* son de color blanco o azul iridiscentes, mientras las de otras bacterias aparecen amarillas o naranjas (consultar la figura 14) (68).

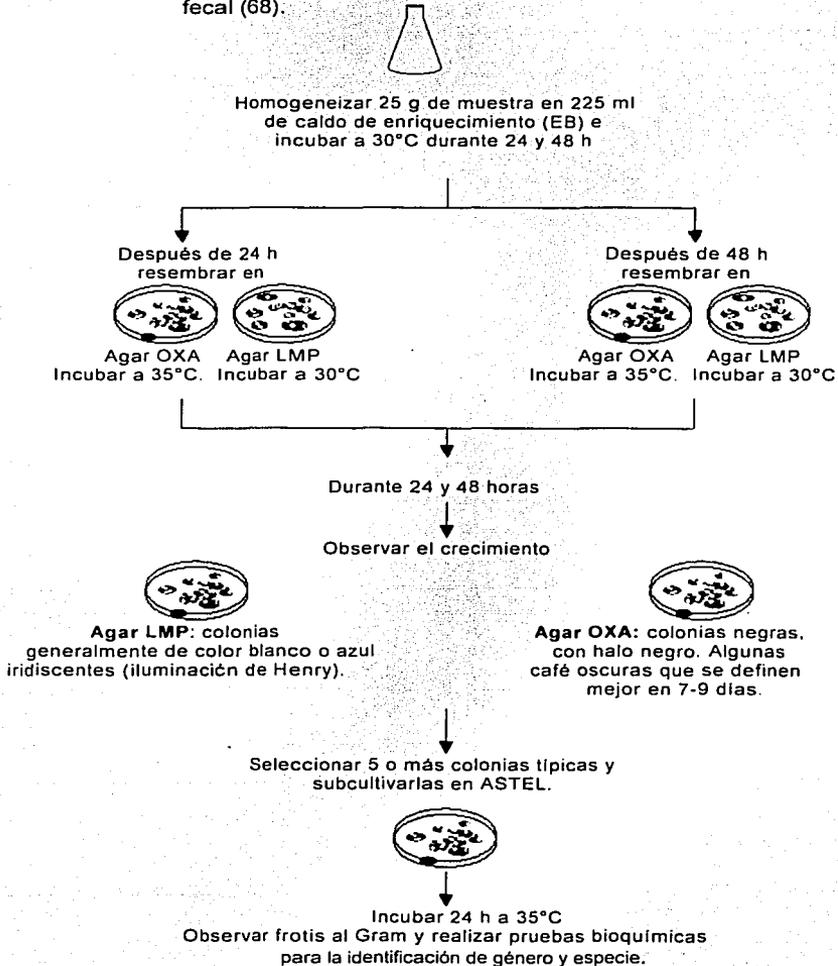
Figura 14. Observación de placas bajo la iluminación de Henry, para diferenciar colonias de *Listeria* (68).



En el medio OXA, las colonias de *Listeria* son negras, con halo negro, aunque algunas pueden manifestar un tono café oscuro que se define mejor después de siete días de incubación (68).

Posteriormente, se seleccionan cinco o más colonias típicas del medio OXA o LMP y se resiembran en placas de ASTEL (agar soya tripticaseína con 0.6 % de extracto de levadura). Esta acción es importante, debido a que las colonias aparentemente puras del OXA y LMP pueden encontrarse contaminadas con flora competitiva. Previendo la posibilidad de que se hayan aislado más de una especie de *Listeria*, debe llevarse a cabo la identificación de cinco colonias o más. Es decir, los cultivos correspondientes pueden mantenerse a 4°C y utilizarse como inóculo para realizar las pruebas bioquímicas de identificación de género y especie (consultar diagrama 5) (68).

Diagrama 5. Detección de *Listeria* en muestras alimenticias y de materia fecal (68).



c) Identificación

Identificación de género

Una técnica simplificada de identificación del género *Listeria*, se basa en los siguientes parámetros: observación de frotis al Gram, comprobación de movilidad en medio húmedo, catalasa positiva, producción de ácido a partir de la D-glucosa, hidrólisis de la esculina, y las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas (63).

Identificación de especie

La determinación de la especie de *Listeria* es crucial, debido a que todas pueden contaminar alimentos, pero sólo *L. monocytogenes* constituye un problema en salud pública. La diferenciación se basa en un determinado número de marcadores bioquímicos, entre los cuales el de hemólisis resulta esencial para distinguir entre *L. monocytogenes* y *L. innocua*; ésta es la especie no patógena más frecuente (consultar tabla 11) (63).

Para llevar a cabo las pruebas implicadas, es conveniente utilizar cultivos puros y contar con cepas de referencia (positivas y negativas) (68).

Observación de frotis teñidos al Gram

Las extensiones deben prepararse a partir de cultivos de 16 a 24 h. Si

bien todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos Gram positivos, los cultivos viejos pueden manifestar formas cocoides. En los frotis delgados llega a observarse una coloración pálida que llega a sugerir erróneamente que el microorganismo es negativo, confundiéndose con la presencia de *Bacteroides spp* (68).

Prueba de movilidad en fresco

Se realizan preparaciones en fresco (en gota suspendida o entre portaobjetos y cubreobjetos), utilizando solución salina al 0.85 %. La suspensiones deben ser densas y lo más homogéneas posible, la observación se efectúa con el objetivo de 100X en un microscopio de contraste de fase o microscopio de campo oscuro.

La prueba se considera positiva cuando se observan bacilos cortos con movilidad rotatoria o tal como si brincaran. Es decir, destaca una movilidad tambaleante o de tipo "head ever heels" (68).

Prueba de la catalasa

Se prepara una suspensión de un cultivo puro en una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 %. La prueba se lee como positiva si ocurre la formación inmediata de burbujas. Todas las especies de *Listeria* son catalasa positiva; además, la emulsión debe realizarse con asa de plástico o un palillo de madera estéril, para evitar contactos

entre metal y reactivo. Lógicamente, las colonias provenientes de medios con sangre pueden dar lugar a reacciones falsas positivas (68).

Prueba de hemólisis

Cuando es necesario probar varias colonias, se acostumbra dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de una placa de agar sangre de carnero al 5 %. Posteriormente, se inocula, por picadura, un cuadro por cada colonia o cepa, y la caja Petri se somete a una incubación de 48 h a 35°C. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura y las reacciones dudosas se confirman mediante la prueba de CAMP (68).

Prueba de reducción de nitratos

Se siembran tubos con caldo nitrato y se incuban 5 días a 35°C. Para llevar a cabo la lectura, se agregan 0.2 mL de reactivo A y 0.2 mL de reactivo B (consultar tabla 10): la aparición de un color rojo indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si no se observa dicha coloración, es conveniente adicionar zinc en polvo; cuando el color rojo aparece después de una hora se confirma que la prueba es negativa (presencia de nitratos).

En forma alternativa, se pueden adicionar al cultivo (en caldo nitrato) 0.2 mL de reactivo B y 0.2 mL de reactivo C (consultar tabla 10). Una

coloración naranja indica que la prueba es positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, se adicionan 0.2 ml de reactivo de cadmio; un color naranja confirma que la prueba es negativa (presencia de nitratos). Este procedimiento alternativo elimina el uso del α -naftilamina, la cual es carcinogénica (68).

TABLA 10. Reactivos para la prueba de nitratos (68).

Reactivo	Ingredientes	Cantidad
A	α -naftilamina	0.5 g
	Ácido Acético(5 N)	100 mL
B	Ácido sulfanílico	1.0 g
	Ácido Acético(5 N)	125 mL
C	α -naftol	1.0 g
	Ác. Acético (5 N)	200 mL

Prueba de movilidad en agar

Se inocula el medio SIM (sulfhídrico-indol-movilidad) o el MTM (Prueba de movilidad y mantenimiento) y se incuban durante siete días a temperatura ambiente (20-25°C), observándolos cada 24 h. Las especies de *Listeria* son móviles, lo que genera un crecimiento típico en forma de paraguas de 2 a 5 mm por debajo de la superficie del agar. Es importante destacar que, cuando los cultivos se incuban a 35°C, la movilidad es tardía o ausente (68).

Utilización de carbohidratos

Se siembran diversos tubos que contienen caldo púrpura y alguno de los siguientes carbohidratos al 0.5 %: dextrosa, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa. Posteriormente, se procede a incubar durante 7 días a 35°C y, si ocurre el vire del indicador hacia amarillo, la prueba se considera positiva. Todas las especies de *Listeria* son dextrosa, esculina y maltosa positivas (consultar la tabla 11) (68).

Prueba de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson)

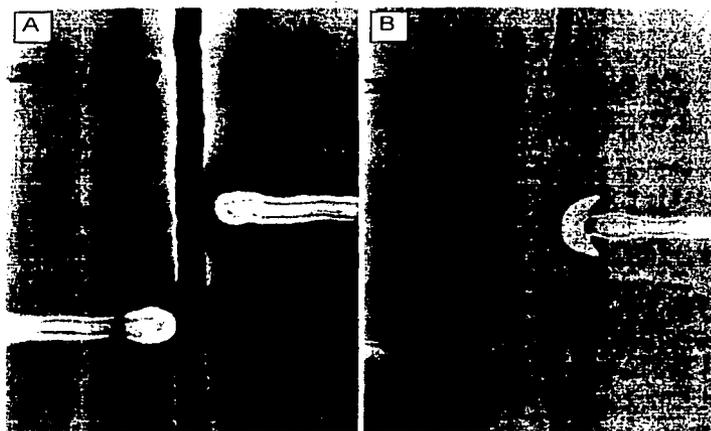
Dentro del género *Listeria*, solamente tres especies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii* son hemolíticas. Estudios recientes indican que la hemolisina representa el principal factor de virulencia de *L. monocytogenes* aunque, dicho rasgo –en forma aislada- no debe considerarse como indicador de virulencia, ya que *L. seeligeri* no es patógena (4, 63).

L. monocytogenes y *L. seeligeri* producen una estrecha zona de hemólisis, la cual frecuentemente no se extiende lejos del borde de las colonias; por su lado, *L. ivanovii* exhibe amplias zonas de hemólisis, (consultar figura 15) (63).

La prueba de CAMP se realiza en placas de agar sangre de carnero, en las cuales primero se siembra una estría recta de la cepa de

Staphylococcus aureus y, paralelamente, una de *Rhodococcus equi*, separadas suficientemente una de otra para que, entre ambas, se puedan practicar perpendicularmente varias estrias rectas correspondientes a cepas sospechosas de *Listeria*, dejando un espacio cercano a los 5 mm. Una vez transcurridas 24 a 48 h a 35°C, se observa un claro sinergismo entre las hemolisinas de *Listeria* y las de los 2 microorganismos antes mencionados.

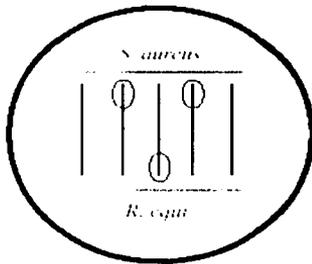
Figura 15. Prueba de CAMP (63).



Prueba de CAMP con *S. aureus* (A) y *R. equi* (B) después de 24 h. de incubación.
 (A): parte superior, lado izq. *L. innocua*; parte inferior, lado izq. *L. monocytogenes*;
 parte central lado der. *L. seeligeri*
 (B): parte central, lado der. *L. ivanovii*

La figura 16 esquematiza la disposición de las estrias rectas practicadas sobre la placa de agar sangre de carnero; además, muestra las zonas en las que se potencia el fenómeno hemolítico, de acuerdo con la especie sembrada: la hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* resulta más intensa cerca de la estria de *S. aureus*, en tanto que, la relacionada con *L. ivanovii* aumenta en las proximidades del crecimiento de *R. equi*. Las especies restantes del género *Listeria* no son positivas para esta prueba (68).

Figura 16. Prueba de CAMP para *Listeria* (4).



- ★ Las líneas horizontales representan las estrias de *S. aureus* y *R. equi*, respectivamente.
- ★ Las líneas verticales representan las estrias de inoculación de cinco especies de *Listeria*.
- ★ Las áreas marcadas con un óvalo señalan las zonas de hemólisis más intensas para *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri*, respectivamente.

Tabla 11. Patrones de diferenciación de las especies de *Listeria* (68).

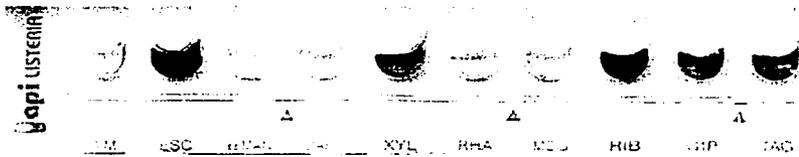
Especie	β -hemólisis (a)	Reducción de nitratos	Producción de ácido de:			CAMP	
			Manitol	Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	(V)	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	(V)	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	+1	-
<i>L. grayi</i>	-	(V)	+	(V)	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	(V)	-	-	-

CLAVES: (a) = sangre de carnero desfibrinada; (V) = variable

Pruebas bioquímicas miniaturizadas

Entre los sistemas de pruebas bioquímicas miniaturizadas destaca principalmente el API *Listeria* (bioMérieux, Francia), el cual corresponde a una galería específicamente creada para el género *Listeria* (figura 17). Dicho sistema incluye 10 pruebas de diferenciación en un formato de microtubo, que incluye la prueba patentada "DIM", muy útil para distinguir entre las hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. innocua*. Además contiene la prueba de la hidrólisis de la esculina y la producción de ácido a partir de α -manitol, xilosa, ramnosa (2,63).

Figura 17. API *Listeria* (bioMérieux, Francia) (77)



Sondas de DNA para confirmar el origen de las colonias

Entre las técnicas moleculares se cuenta el empleo de una sonda de DNA que permite identificar rápidamente a *L. monocytogenes*, a partir de colonias, con ayuda de la quimioluminiscencia.

En tan sólo 30 minutos, la sonda quimioluminiscente de DNA (Gen-Probe, San Diego, California) permite diferenciar las colonias de *L. monocytogenes* en las placas correspondientes al primoaislamiento (63).

Diferenciación del género *Listeria*

En virtud de que *Listeria sp* comparte algunas características con otros géneros bacterianos Gram-positivos, la diferenciación requiere de ciertos cuidados (consultar tabla 12).

Listeria se distingue del género *Streptococcus sp*, con base en sus características microscópicas y las pruebas de movilidad, catalasa y sensibilidad a gentamicina, las cuales resultan positivas para el primero y negativas para el segundo.

En cuanto a *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria* puede diferenciarse por su crecimiento a 4°C y por dar positivas las pruebas de la catalasa, movilidad y sensibilidad a vancomicina.

De las corinebacterias, porque *Listeria* no hidroliza la urea y da positivas la prueba de Voges-Proskauer y la de producción de ácido a partir de D-glucosa en condiciones aerobias. De *Lactobacillus sp*, porque éste es inmóvil y catalasa negativa (63, 68).

Tabla 12. Principales características que diferencian a *Listeria sp* de otros géneros Gram positivos (18).

Característica	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Corynebacterium sp</i>	<i>Lactobacillus</i>
Morfología	bacilo	bacilo	coco	coco	bacilo	bacilo
B-hemólisis	+	-	+	-/+	-/+	-
Catalasa	+	-	-	-/+	-	-
Movilidad	+	-	-	-/+	-	-
Reducción del nitrato	-	-	-	-	-/+	-
Hidrólisis de esculina	+	-	-	+	-	-
Ácido* a partir de:						
- Glucosa	+	+	+	+	+/-	+
- Salicina	+	-	+	+	-	+/-
- Manitol	-	-	-	+	+/-	+/-
Querato-conjuntivitis	+	-**	-	-	-	-

CLAVES:

* = Sólo ácido, no gas; algunas especies de *Lactobacillus* producen gas.

** = Conjuntivitis, pero no queratitis.

d) Determinación de patogenicidad

Si bien existen métodos basados en el empleo de animales de laboratorio para evaluar la virulencia de los aislamientos de *Listeria*, lo cierto es que hoy en día no se utilizan rutinariamente, debido a que la gran mayoría de las cepas clínicas de *L. monocytogenes* son patógenas (63).

Tales pruebas incluyen la inoculación intraperitoneal del ratón o de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, e inclusive, la de la conjuntiva de ratones (prueba de Anton). En modelos de ratones inmunocomprometidos, una pequeña dosis de alguna cepa virulenta de *Listeria* ocasiona la muerte del animal en 3 días.

Por su parte, las pruebas de citotoxicidad en cultivos celulares generalmente utilizan células humanas de epitelio intestinal de la línea Caco-2, las cuales resultan muy adecuadas para determinar *in vitro* la virulencia de los aislamientos de *Listeria* (63).

Cabe mencionar que mientras las pruebas en animales resultan muy precisas —a través de la DL_{50} —, las de citotoxicidad suelen no ser tan representativas. De hecho, algunas cepas asociadas a brotes epidémicos por *L.*

monocytogenes han manifestado una baja toxicidad en las células Caco-2 (63).

La antigua prueba de Anton constituye una de las herramientas para establecer la patogenicidad de las especies de *Listeria* en los laboratorios de consulta. Aquella consiste en la instilación de una gota del cultivo de 24 h del microorganismo analizado, en el saco conjuntival de conejos o cobayos jóvenes. El saco conjuntival del ojo no inoculado se utiliza como control y el resultado se considera positivo cuando ocurre una severa conjuntivitis purulenta 24 a 36 h después de la inoculación, signo clínico que comúnmente antecede a la queratitis (44).

ii. Diagnóstico indirecto

Actualmente, la rápida determinación de la ausencia o presencia de especies de *Listeria*, puede basarse en pruebas con anticuerpos monoclonales, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos y PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

a) Técnica de PCR

Las moléculas de DNA de *L. monocytogenes* que se encuentran en LCR y en tejidos frescos o seccionados con parafina, pueden ser detectadas específicamente mediante la técnica de PCR. Uno de los

"blancos" más usados es el gen que codifica para la listeriolisina, si bien otros genes de virulencia resultan potencialmente útiles. La técnica de PCR es altamente sensible y específica, además de ser particularmente interesante después de que se han administrado agentes antimicrobianos que dificultan el cultivo (63).

Esta técnica, conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se desarrolló en 1985 y permite efectuar la amplificación de una región particular del DNA. En tal sentido, la secuencia seleccionada es delimitada en ambos extremos por un par de oligonucleótidos sintéticos complementarios, denominados cebadores o *primers*, que actúan como iniciadores de la síntesis de DNA, esta última, a través de la acción catalítica de una DNA polimerasa (13).

El proceso consiste de ciclos consecutivos que comprenden tres pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión. En el primero, el DNA de doble cadena es transformado en cadenas sencillas, mediante calentamiento. Posteriormente, la temperatura se reduce para inducir el alineamiento de los *primers* con sus respectivas secuencias complementarias y, finalmente, ocurre la extensión de las cadenas con base en la acción de una DNA polimerasa. Cada ciclo se repite 20 a 30 veces, redituando una amplificación de 10^5 a 10^7 veces del fragmento "blanco". La automatización del método resultó posible merced al

descubrimiento y aislamiento de una enzima termoestable, la *Taq* DNA polimerasa, original de la bacteria termodúrica *Thermus aquaticus* (13).

Actualmente, se cuenta con una gran diversidad de termocicladores, los cuales controlan automáticamente los ciclos de temperatura, con gran precisión. Los productos resultantes de la PCR se pueden analizar directamente mediante electroforesis en gel, o bien, a través de la digestión con enzimas de restricción o de hibridación con sondas específicas (13).

La gran sensibilidad de la PCR se demuestra con el hecho de que, basta con una sola copia del fragmento de DNA a amplificar, para obtener una cantidad de DNA más que suficiente para efectuar la identificación correspondiente. Además, el método es muy rápido, ya que permite obtener resultados confiables al cabo de algunas horas.

La PCR ya tiene diversas aplicaciones: puede utilizarse para el estudio de numerosos padecimientos hereditarios, incluyendo la detección presintomática de portadores y el diagnóstico prenatal; representa una herramienta especial para llevar a cabo el diagnóstico de enfermedades infecciosas (tales como tuberculosis, SIDA, etc.) y permite realizar estudios retrospectivos en muestras incluidas en parafina y aún en fósiles. Además, en la actualidad es ampliamente utilizada en medicina

forense, ya que es suficiente un cabello, o bien, una gota de sangre o de semen, para realizar la identificación de los individuos implicados en las averiguaciones (13).

b) Ensayo inmunoenzimático

Los recientes avances de las pruebas moleculares y de la inmunotecnología han permitido desarrollar métodos rápidos para detectar a *Listeria* en muestras fecales y alimenticias. Algunos de dichos métodos se encuentran disponibles con base en kits comerciales, los cuales permiten examinar un gran número de especímenes (4).

Las pruebas de ELISA representan los ensayos inmunológicos utilizados más ampliamente para detectar, en forma rápida, microorganismos y toxinas, ya sea en los alimentos o en las heces de los enfermos.

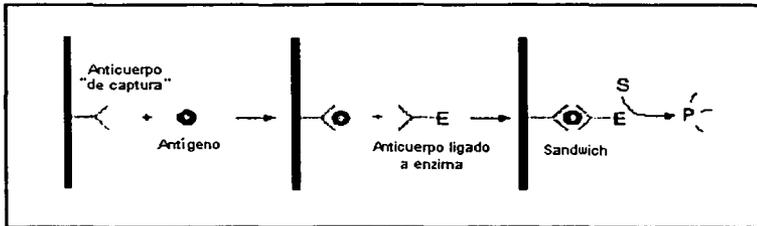
La excelente especificidad y sensibilidad de estas pruebas se basan principalmente en: a) la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo; b) la capacidad de un conjugado anticuerpo-enzima para no afectar la inmunoreactividad del primero; y c) el revelado de una reacción antígeno-anticuerpo a través de una reacción enzimática (4).

En general la mejor reacción de ELISA para detectar microorganismos en alimentos y muestras clínicas no estériles es la conocida como "no-competitiva" o "sándwich" (consultar la figura 18). Sus pasos principales, son (4):

- 1) La captura del antígeno "blanco" por un anticuerpo "de captura", el cual se encuentra inmovilizado (fijo) en una matriz sólida.
- 2) La realización de un lavado que elimina el material que no se une específicamente al anticuerpo "de captura".
- 3) La adición de un segundo anticuerpo, ligado a una enzima, para que se enlace a otro epitopo del antígeno; con ello se forma el "sandwich" (anticuerpo de captura/antígeno "blanco"/anticuerpo ligado a la enzima).
- 4) La realización de un segundo lavado, para eliminar al complejo anticuerpo-enzima que no ha reaccionado.
- 5) La adición del sustrato para la enzima, a fin de que ésta reaccione y se forme un compuesto colorido que ponga de manifiesto la presencia de antígeno en la muestra. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de dicho antígeno, por lo que éste se puede cuantificar espectrofotométricamente.

Evidentemente, cuando el antígeno "blanco" está ausente en la muestra, el "sándwich" no se forma y no ocurre el mencionado cambio de color.

Figura 18. Principales pasos del método ELISA tipo no – competitivo, sándwich (4).



CLAVES: S = sustrato; E = enzima; P = producto colorido

Por obvio, el éxito de cualquier tipo de ELISA es dependiente de la especificidad del anticuerpo y del número de sitios antigénicos a los cuales el anticuerpo puede enlazarse selectivamente.

c) Hibridación de ácidos nucleicos

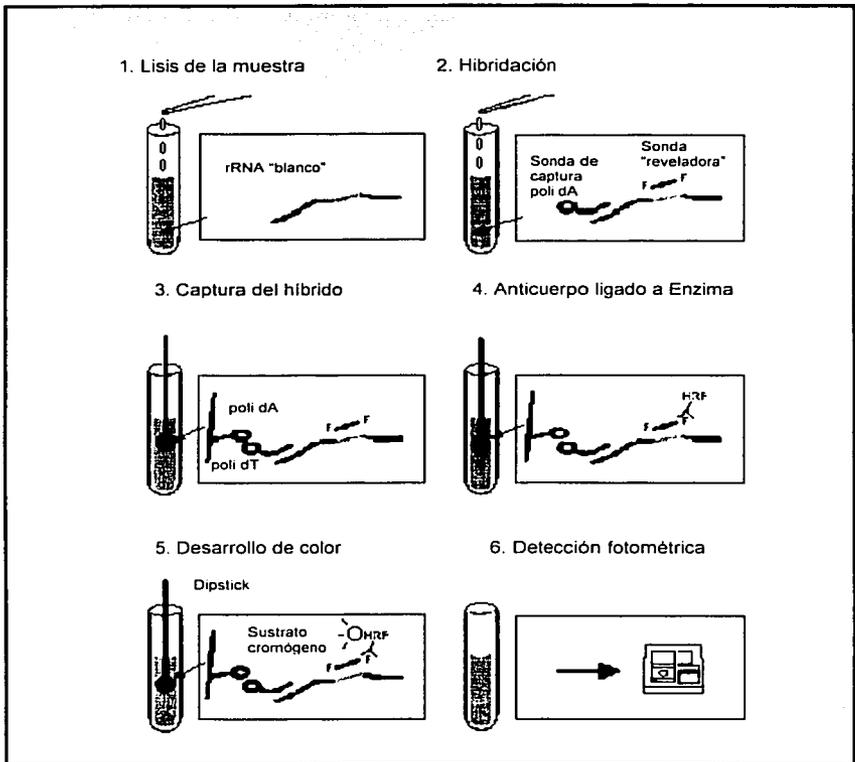
La hibridación consiste en el proceso mediante el cual una sola hebra de DNA se enlaza a otra hebra complementaria de DNA o de RNA. Esta clase de pruebas se ha aplicado, desde los 1970s, para llevar a cabo la identificación de microorganismos patógenos; no obstante, sólo

recientemente han estado disponibles para detectar rutinariamente la detección de *Listeria* (4).

El ensayo se puede dividir en seis pasos, los cuales suceden después de haberse obtenido el aislamiento de colonias sospechosas (consultar figura 19) (4):

1. La muestra se incuba en un tubo junto con la solución de lisis, la cual permite que se libere el rRNA "blanco".
2. Se adiciona la solución que contiene la sonda; ésta contiene: a) una sonda de DNA "de captura", que presenta un polímero de nucleótido de desoxiadenina (dA) en su extremo final 3'; b) una sonda "reveladora" la cual posee una molécula de isotiocianato de fluoresceína (F), asociada a cada extremo, 5' y 3'.
3. Se coloca una varilla cubierta con polidesoxitimidina (dT) dentro del tubo de reacción. Ello promueve que el híbrido "blanco"-sonda, quede sujeto a la varilla.
4. La varilla se lava y se introduce a otro tubo que contiene enzima conjugada a un anticuerpo.
5. La varilla se lava por segunda vez y se deposita en un tercer tubo, que contiene un sustrato-cromógeno.
6. Durante la incubación correspondiente ocurre el desarrollo de color; a continuación, se lee la absorbancia a 450 nm.

Figura 19. Ensayo de hibridación colorimétrico DNA-RNA (4).



CONCLUSIONES

- Las enfermedades que *L. monocytogenes* ocasiona al humano se asocian principalmente a la ingesta de alimentos contaminados y a infecciones transplacentarias, si bien ocurren algunos casos en los que el microorganismo se transmite por contacto directo con animales infectados.
- En los adultos inmunocomprometidos, las principales entidades clínicas de la listeriosis son la meningoencefalitis y la septicemia; en mujeres embarazadas, destacan patologías localizadas tales como la vaginitis, cistitis y pielonefritis, así como las infecciones generalizadas de tipo seudogripal. Finalmente, durante la etapa perinatal, las principales afectaciones incluyen aborto, muerte del producto detectada hasta el parto y nacimientos prematuros relacionados con granulomatosis infantiséptica, septicemia o meningitis.
- La incidencia de la listeriosis se ha incrementado en los últimos años, debido al incremento de pacientes inmunocomprometidos, incluidos los afectados por la actual epidemia del SIDA; ello determina la mayor trascendencia de un diagnóstico oportuno y confiable.

- Los métodos que se emplean actualmente para llevar a cabo el diagnóstico de laboratorio de la listeriosis son de índole microbiológico, inmunológico y molecular. Estos últimos son más rápidos, sensibles y específicos pero, desafortunadamente, aún no son accesibles para la mayor parte de los laboratorios.
- La importancia del estudio de los factores de virulencia de *L. monocytogenes* radica en la mayor posibilidad de desarrollar mejores pruebas diagnósticas y métodos terapéuticos y preventivos más eficaces.
- Las proteínas superficiales InIA e InIB promueven los procesos de adherencia e invasión de *L. monocytogenes*; la primera, es necesaria para la entrada en células del epitelio intestinal de humanos, línea Caco-2, y en algunas otras células epiteliales; la segunda induce el ingreso bacteriano a los hepatocitos, a algunas líneas celulares epiteliales y a fibroblastos, incluidas HeLa, HEP-2, CHO, L2.
- La caderina E, receptor de la InIA, se expresa principalmente en tejidos epiteliales, incluido el tracto digestivo, localizándose principalmente en la membrana basolateral, concentrada ésta en las uniones adherentes. De acuerdo con esta distribución, el ingreso

bacteriano mediado por InIA ocurre fundamentalmente a través de la cara basolateral de las células epiteliales.

- La entrada de *L. monocytogenes* a la mayoría de las líneas celulares no es promovida por la InIA, sino por la InIB, cuyo receptor gC1q-R, corresponde a una proteína que se expresa en un amplio rango de tipos celulares, incluidos los linfocitos, neutrófilos, hepatocitos y las células endoteliales.
- Una vez que *L. monocytogenes* ha ingresado a la célula hospedera, el principal factor involucrado en la lisis de la membrana vacuolar, es una potente toxina formadora de poros: la LLO, la cual promueve el escape del microorganismo antes de que ocurra la fusión fagolisosomal.
- La actina de las células hospederas permite a *L. monocytogenes* adquirir movilidad intracelular e intercelular. Dicha movilidad es mediada por la proteína bacteriana ActA, necesaria y suficiente para que la bacteria pueda diseminarse a las células residentes del tejido implicado.
- El desplazamiento de *L. monocytogenes* hacia la membrana celular conduce a la formación de prolongaciones alargadas, llamadas

protrusiones, las cuales son incorporadas por las células adyacentes. A su vez, la PC-PLC ó lecitinasa representa el principal factor bacteriano implicado en la ruptura de los fagosomas de doble membrana.

- Los medicamentos de primera elección contra la listeriosis continúan siendo la penicilina y ampicilina, solas o combinadas con gentamicina; más recientemente se ha venido recomendando la asociación ampicilina-cotrimoxazol, ya que se ha demostrado que disminuye la mortalidad y las secuelas cerebrales. Los medicamentos de segunda elección incluyen al trimetoprim-sulfametoxazol, eritromicina, tetracilina y cloranfenicol.
- La prevención de la listeriosis se basa en el control del microorganismo en los alimentos y en la observación de medidas sencillas aplicables a cualquier enfermedad de origen alimentario: la adecuada sanitización de los alimentos y la apropiada higiene personal, así como la completa cocción y el correcto almacenamiento alimentarios.

ANEXO

Composición de los medios de cultivo empleados para el análisis microbiológico de *L. monocytogenes*.

Caldo soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (CSTEL)(68).

Ingredientes	Cantidad
Caldo de soya tripticaseína	30.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua	1000.0 mL

Agitar hasta disolver los ingredientes. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. El pH final de la solución debe ser 7.3 ± 0.2 .

Caldo de enriquecimiento (EB) pH=7.3 (68).

Un litro de caldo de soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) debe mantener los siguientes suplementos:

Suplementos	Cantidad
Clorhidrato de acriflavina	15.0 mg
Ácido nalidixico (sal sódica)	40.0 mg
Cicloheximida	50.0 mg
Solución al 10% (p/v)	11.1 mL

Preparar los suplementos de acriflavina y nalidixico a partir de una solución al 5% (p/v) con agua. El suplemento de cicloheximida

prepararlo como una solución al 1% (p/v) en una solución al 40% (v/v) de etanol agua. Esterilizar por filtración los suplementos. Agregar en condiciones asépticas los suplementos al medio CSTEL previamente esterilizado, justo antes de su uso.

Para la preparación de un litro del medio CSTEL se debe partir de las soluciones anteriores, agregando las siguientes cantidades:

Suplemento	Cantidad
Acriflavina	3.0 mL
Acido nalidixico	8.0 mL
Solución de cicloheximida	5.0 mL

Medio de cloruro de litio feniletanol – moxolactam (LMP) (68).

Ingredientes	Cantidad
Agar fenil etanol	35.5 g
Glicina anhidra	10.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Solución de moxolactam al 1% en amortiguador de fosfatos pH=6.0	2.0 mL
Agua	1000.0 mL

Esterilizar el medio (sin moxolactam) en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Enfriar de 48 a 50°C y agregar la solución de moxolactam previamente esterilizada por filtración.

Distribuir volúmenes de 12 a 15 mL del medio en cajas Petri estériles. Las placas delgadas facilitan la observación de las colonias.

Medio Oxford (68).**Medio base Oxford (OXA)**

Ingredientes	Cantidad
Base de agar Columbia	39.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Agua	1000.0 mL

Agregar los ingredientes a un litro de agua y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Enfriar a 50°C el medio base y en condiciones asépticas agregar los suplementos.

Un litro de medio Oxford debe contener los siguientes suplementos:

Suplemento	Cantidad
Cicloheximida	400 mg
Sulfato de colistina	20 mg
Acriflavina	5 mg
Cefotetán	2 mg
Fosfomicina	10 mg

Disolver la cicloheximida, el sulfato de colistina, acriflavina, cefotetán y la fosfomicina en 10 mL de una mezcla 1:1 De etanol en agua. Esterilizar por filtración antes de agregar al medio base. Mezclar y vaciar en cajas Petri estériles. Las placas del medio Oxford se pueden almacenar como máximo dos semanas.

Agar soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (ASTEL) (68).

Ingredientes	Cantidad
Agar soya tripticaseína	40.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua	1000.0 mL

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. pH final 7.3 ± 0.2 .

Agar PALCAM (polimixina acriflavina LiCl ceftazidima esculina manitol) (3).

Composición por litro:

Ingredientes	Cantidad
Peptona	23.0 g
LiCl	15.0 g
Agar	10.0 g
Manitol	10.0 g
NaCl	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Almidón	1.0 g
Esculina	0.8 g
Citrato férrico de amonio	0.5 g
Glucosa	0.5 g
Rojo de fenol	0.08 g
Suplemento selectivo PALCAM	10.0 mL

pH= 7.2 ± 0.2 a 25°C

Suplemento selectivo PALCAM

Composición por 10.0 mL:

Ingredientes	Cantidad
Ceftazidima	20.0 mg
Polimixina B	10.0 mg
Acriflavina-HCl	5.0 mg

Preparación del suplemento selectivo PALCAM: Adicionar los componentes a agua destilada/desionizada y llevar a un volumen de 10.0 mL. Mezclar rigurosamente. Filtrar y esterilizar.

Emulsión de yema de huevo

Ingredientes	Cantidad
Yema de huevo (pollo)	11
Huevos completos (pollo)	1

Preparación de la emulsión de yema de huevo: Poner los huevos en una dilución 1:100 de una solución saturada de cloruro de mercurio durante 1 minuto. Romper los huevos, separando la yema de la clara. Mezclar la yema de huevo con un huevo entero.

Preparación del medio: Adicionar todos los componentes, excepto el suplemento selectivo PALCAM, a agua destilada/desionizada, llevar a un volumen de 990.0 mL. Mezclar rigurosamente. Calentar a fuego lento hasta ebullición. Llevar a la autoclave, y esterilizar en estas condiciones: 15 minutos a 15psi-121°C. Refrigerar a 45°-50°C. Adicionar aseptícamente, el suplemento selectivo PALCAM estéril. Mezclar rigurosamente. La adición de 25.0 mL de emulsión de yema de huevo puede ayudar en la recuperación de colonias de *Listeria* dañadas.

Agar sangre de carnero (68).

Ingredientes	Cantidad
Base de agar sangre	95.0 mL
Sangre de carnero desfibrinada	5.0 mL

Preparar el agar base de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Enfriar a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente ($20\text{-}25^\circ\text{C}$). Homogeneizar el medio y verter en las cajas Petri estériles de 12 a 15 mL para la prueba de CAMP y de 15 a 20 mL para la prueba de hemólisis.

Caldo nitratos (68).

Ingredientes	Cantidad
Nitrato de potasio	1.0 g
Cloruro de sodio	0.5 g
Peptona	2.0 g
Agua	1000.0 mL

Agregar los ingredientes a un litro de agua, agitar hasta disolución completa. Verter en tubos de 13X100 mm con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.

Medios Para la Prueba De Movilidad:

* Medio de sulfhídrico-indol-movilidad (SIM) (68).

Ingredientes	Cantidad
Peptona de caseína	20.0 g
Peptona de carne	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5 g
Agua	1000.0 mL

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 mL en tubos de 13X100 mm. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. pH final 7.3 ± 0.2 .

* Medio MTM (Prueba de movilidad y mantenimiento) (68).

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3.0 g
Peptona	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Agar	4.0 g
Agua	1000.0 mL

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 mL en tubos de 13X100 mm. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. pH final 7.4 ± 0.2 .

Caldo púrpura para fermentación de carbohidratos (68).

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona No. 3	10.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Extracto de carne	1.00 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua	1000.0 mL

Calentar si es necesario para disolver los ingredientes. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ pH final 6.8 ± 0.2 .

Agregar la solución del carbohidrato, previamente esterilizada por filtración en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0.5%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Acheson D.: Foodborne Listeriosis; Clin. Infec. Dis, 2000; 31:770-775.
- 2) Andrews W. H.: Committee on Microbiology and Extraneous Materials; J. AOAC Interna., 2001; 84:243-250.
- 3) Atlas R. M. y Parks L. C.:
HANDBOOK OF MICROBIOLOGICAL MEDIA.
USA. Segunda Edición, editorial CRC Press, 1997:1055.
- 4) Axelsson F. y Sorin M. L.:
TRANSIA PLATE *LISTERIA*, TECHNICAL HANDBOOK
USA. Diffchamb AB, 1998:1-49
- 5) Bannam T. y Goldfine H.: Mutagenesis of Active-Site Histidines of *Listeria monocytogenes* Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C: Effects on Enzyme Activity and Biological Function; Infec. Immun, 1999; 67:182-186.
- 6) Bernard Henry J.:
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO CLÍNICOS POR EL
LABORATORIO
España. Novena edición, ediciones Científicas y Técnicas Masson
Salvat, 1994:1078-1080.
- 7) Braun L., Ghebrehiwet B. y Cossart P.: gC1-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*; EMBO J., 2000; 19: 1458-1466.
- 8) Brundage R. A., Smith G. A., Camilli A., Theriot J. A. y Portnoy D. A.: Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90:11890-11894.
- 9) Cameron L. A., Footer M. J., Oudenaarden Van A., y Theriot J. A.: Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; 96:4908-4913.
- 10) Capdebila E. P.:
LISTERIOSIS MENÍNGEA

Uruguay. Centro de Tratamiento Intensivo. Hospital Maciel, 1998:1-5.

- 11) Carlier M. F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G. X., Hong J., Chua N. H. y Pantaloni D.: Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the rate of Filament Turnover: Implication in Actin-based Motility; *J. Cell Biol.*, 1997; 136:1307-1323.
- 12) Casado M., Torres M., Gálvez C., Rodríguez M., Sánchez W. y Vázquez J. A.: Peritonitis bacteriana espontánea por *Listeria monocytogenes*; *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2002. 20:43-44.
- 13) Cervantes P. A. y López L. M.: Aplicación de las técnicas de biología molecular en el estudio del genoma humano y en el diagnóstico de las enfermedades hereditarias; *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.*, 1997; 60:196-205.
- 14) Charpentier E. y Courvalin P.: Antibiotic Resistance in *Listeria spp*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999; 43:2103-2108.
- 15) Cicchetti G., Maurer P., Wagener P. y Kocks C.: Actin and Phosphoinositide Binding by the ActA Protein of the Bacterial Patogen *Listeria monocytogenes*; *J. Biol. Chemis.*, 1999; 274:33616-33626.
- 16) Cossart P. y Lecuit M.: Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling; *EMBO J.*, 1998; 17:3797-3806.
- 17) David V., Gouin E., Troys M. V., Grogan A., Segal A.W., Ampe C. y Cossart P.: Identification of cofilin, coronin, Rac and capZ in actin tails using a *Listeria* affinity approach; *J. Cell Sci.*, 1998; 111:2877-2884.
- 18) Davis B. D., Dulbecco R. Eisen H. N., Ginsberg H. S.: **TRATADO DE MICROBIOLOGÍA.** España. Tercera edición, editorial Salvat, 1984:649-650.
- 19) Decatur A. L. y Portnoy D. A.: A PEST-like Sequence in Listeriolysin O Essential for *Listeria monocytogenes* Pathogenicity; *Science*, 2000; 290:992-995.
- 20) Dorozynski A.: Seven die in French *Listeria* outbreak; *BMJ*, 2000; 320:601.

- 21) Doyle M. P., Beuchat L. R., y Montville T. J.:
FOOD MICROBIOLOGY. FUNDAMENTALS AND FRONTIERS.
USA. Editorial American Society for Microbiology, 1997:337-352.
- 22) Dramsi S. y Cossart P.: Intracellular Pathogens and the Actin Cytoskeleton; *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1998;14:137-166.
- 23) Dramsi S., Lévi S., Triller A. y Cossart P.: Entry of *Listeria monocytogenes* into Neurons Occurs by Cell-to-Cell Spread: an In Vitro Study; *Infec Immun.*, 1998; 66:4461-4468.
- 24) Dubail I., Berche P., The European *Listeria* Genome Consortium y Charbit A.: Listeriolysin O as a Reporter To identify Constitutive and In Vivo-Inducible Promoters in the Pathogen *Listeria monocytogenes*; *Infec. Immun.*, 2000; 68:3242-3250.
- 25) Fischetti V. A., Novick R. P., Fenelli J. J., Portnoy D. A. y Rood J.:
GRAM POSITIVE PATHOGENS
USA. Editorial ASM Press, 2000:472-515.
- 26) Friederich E., Gouin E., Hellio R., Kocks C., Cossart P y Louvard D.: Targeting of *Listeria monocytogenes* ActA protein to the plasma membrane as a tool to dissect both actin-based cell morphogenesis and ActA function; *EMBO J.*, 1995; 14:2731-2744.
- 27) García de Jalón J., Astier P., Polo M. E. y Escobar E.: Study of nosocomial outbreaks; *ANALES*, 2000; 23:49-68.
- 28) Gedde M. M., Higgings D. E., Tilney L. G., y Portnoy D. A.: Role of Listeriolysin O in Cell-to-Cell Spread of *Listeria monocytogenes*; *Infec. Immun.*, 2000; 68:999-1003.
- 29) Geese M., Schlüter K., Rothkegel M., Jockusch B. M., Wehland J. y Sechi A. S.: Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed; *J. Cell Sci.*, 2000;113:1415-1426.
- 30) Gómez C. J.:
LISTERIOSIS: PATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE CAUSAL. Tesis para obtener el título de Licenciatura.
UNAM. Facultad de Química, 1982:1-90.
- 31) Gorbach S. L., Bartlett J. G. y Blacklow N. R.:
INFECTIOUS DISEASES
USA. Editorial W.B. Saunders Company, 1992:1437-1440.

- 32) Gouin E., Gantelet H., Egile C., Lasa, Ohayon H., Villiers V., Gounon P y Sansonetti P. J.: A comparative study of the actin-based motilities of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Rickettsia conorii*; J. Cell Sci., 1999; 112:1697-1708.
- 33) Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Gilman - Gooman A.:
LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPÉUTICA
Novena Edición, editorial Mc-Graw-Hill Interamericana, 1996:Vol. I y II.
- 34) Hof H., Nichterlein T. y Kretschmar M.: Management of Listeriosis; Clin. Microbiol. Rev., 1997; 10:345-357.
- 35) Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Stanley J. T.:
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATE BACTERIOLOGY.
USA. Novena edición, editorial William y Wilkins, 1994: 566-570.
- 36) Ireton K. y Cossart P.: Host-Pathogen Interactions During Entry and Actin-Based movement of *Listeria monocytogenes*; Annu. Rev. Genet., 1997; 31:113-138.
- 37) Ireton K., Payrastré B. y Cossart P.: The *Listeria monocytogenes* Protein InlB Is an Agonist of Mammalian Phosphoinositide 3-Kinase; J Biol. Chemis., 1999; 274:17025-17032.
- 38) Jawetz E., Melnick J. L. y Adelberg E. A.:
MICROBIOLOGÍA MÉDICA.
México-Colombia. Dieciseisava edición en Español de la vigésima 1ª edición en Inglés, editorial el Manual Moderno, 1999:171,238-239.
- 39) Jay J. M.:
MODERN FOOD MICROBIOLOGY
USA. Quinta edición, editorial Chapman and Hall, 1996:478-502.
- 40) JAY, JAMES M.:
MICROBIOLOGÍA MODERNA DE LOS ALIMENTOS
México. Editorial ACRIBIA, 1992.
- 41) Joklik W. K., Willett H. P., Amos B. D., Wilfert C. M.:
ZINSSER MICROBIOLOGÍA.
Argentina. 20ª Edición, editorial Médica Panamericana, 1996:662-669.

- 42) Julián A., Jiménez A., Góngolas M., Fernández R. y Fernández M. L.: Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante; *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2001; 19:297-303.
- 43) Kocks C., Hellio R., Gounon P., Ohayon H. y Cossart P.: Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly; *J. Cell Sci.*, 1993; 105: 699-710.
- 44) Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R., Janda W. M., Sommers H. M., Winn W. C.: **DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO - TEXTO Y ATLAS COLOR.** México. Tercera edición, editorial Médica Panamericana, 1997:461-465.
- 45) Laine R. O., Phaneuf K. L., Cunningham C. C., Kwiatkowski D., Azuma T. y Southwick S.: Gelsolin, a protein that Caps the Barbed Ends and Servers Actin Filaments, Enhances the Actin-Based Motility of *Listeria monocytogenes* in Host Cells; *Infec. Immun.*, 1998; 66:3775-3782.
- 46) Lasa I. y Cossart P.: Actin-based bacterial motility: definition of the minimal requirements; *Trends Cell Biol.*, 1996; 6:109-114.
- 47) Laurent V., Loisel T.P., Harbeck, Wehman A., Gröbe L., Jockusch B. M., Wehland J., Gertler F. B. y Carlier M. F.: Role of Proteins of the Ena/VASP Family in Actin-based Motility of *Listeria monocytogenes*; *J. Cell Biol.*, 1999; 144:1245-1258.
- 48) Lecuit M., Dramsi S., Gottardi C., Fedor-Chaiken M., Gumbiner B. y Cossart P.: A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*; *EMBO J.*, 1999; 18:3956-3963.
- 49) Lecuit M., Ohayon H., Braun L., Mengaud J. y Cossart P.: Internalin of *Listeria monocytogenes* with an Intact Leucine-Rich Repeat Region Is Sufficient To Promote Internalization; *Infec. Immun.*, 1997; 65:5309-5319.
- 50) Lyytikäinen O., Autio T., Maijala R., Ruutu P., Honkanen B. T., Miettinen M., Hatakka M., Mikkola J., Anttila V. J., Johansson T., Rantala L., Aalto T., Korkeala H. y Siitonen A.: An Outbreak of *Listeria monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in Finland; *J. Infec. Dis.*, 2000; 181:1838-1841.
- 51) Mandell G. L., Douglas R. G., y Bennett's J. E.:

- PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES
España. Cuarta edición, editorial Churchill Livingstone, 1995:1880-1885.
- 52) Marino M., Braun L., Cossart P. y Ghosh P.: A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria* internalins; PNAS, 2000; 97:8784-8788.
- 53) Marquis H., Goldfine H. y Portnoy D. A.: Proteolytic Pathways of Activation and Degradation of Bacterial Phospholipase C during Intracellular Infection by *Listeria monocytogenes*; J. Cell Biol., 1997; 137:1381-1392.
- 54) McAvoy S.:
HHS AND USDA RELEASE LISTERIA RISK ASSESSMENT AND LISTERIA ACTION PLAN
USA. Department of Health and Human Services y Department of Agriculture, 2001:0020.01
- 55) Mengaud J., Ohayon H., Gounon P., Mege R. M., Cossart P.: E-Cadherin is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells; Cell, 1996; 84:923-932.
- 56) Meza I. y Frixione E.:
MÁQUINAS VIVIENTES ¿CÓMO SE MUEVEN LAS CÉLULAS?
México. Primera edición, editorial Fondo de Cultura Económica, 1996: Cap. II y III.
- 57) Miettinen M. K., Siitonen A., P. Heiskanen, Haajanen H., Björkroth K. J. Y Korkeala H.: Molecular Epidemiology of an Outbreak of febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout; J. Clin. Microbiol., 1999; 37:2358-2360.
- 58) Mirón M., Feraz S., Mellado J.M., Vidal F., Veloso S. y Richart C.: Coma vigil tras meningitis por *Listeria monocytogenes*; Enferm Infecc. Microbiol. Clin., 2002; 127-128.
- 59) Monge R. y Arias-Echandi M. L.: Presence of *Listeria monocytogenes* in fresh salad vegetables; Rev. Biomed, 1999; 10:29-31.
- 60) Moors M. A., Levitt B., Youngman y P., Portnoy D. A.: Expression of Listeriolysin O y ActA by Intracellular and Extracellular *Listeria monocytogenes*; Infec. Immun., 1999; 67:131-139.

- 61) Morse R., O'Hanlon K., Virji M., y Collins M. D.: Insolation of Rifampin-resistant Mutants of *Listeria monocytogenes* and their Characterization by *rpoB* Gene Sequencing, temperature Sensitivity for Growth, and Interaction with an Epithelial Cell Line; *J. Clin. Microbiol.*, 1999; 37:2913-2919.
- 62) Mourrain P., Lasa I., Gautreau A., Gouin E., Pugsley A. y Cossart P.: ActA is a dimmer; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977. 94:10034-10039.
- 63) Murray P. R., Jo Baron E., Pfaller M. A., Tenover F.C., Tenover R.H.:
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.
USA. Sexta edición, editorial ASM Press, 1995:341-348.
- 64) Myrvik Q. N. y Weiser R. S.:
BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA MÉDICAS.
México. Segunda edición, editorial Interamericana Mc Graw-Hill, 1991:502-509.
- 65) Nair S., Milohanic E. y Bérche P.: ClpC ATPase Is Required for Cell Adhesion and Invasion of *Listeria monocytogenes*; *Infec. Immun.*, 2000; 68: 7061-7068.
- 66) Navarre W. W. y Schneewind O.: Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999; 63: 174-229.
- 67) Niebuhr K., Ebel F., Frank R., Reinhard M., Domann E., Carl U. D. Walter U., Gertler F. B. Wehland J. y Chakraborty T.: A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, protein module present in the Ena/VASP family". *EMBO J.*, 1997. 16: 5433-5444.
- 68) Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes Y Servicios. Método De Prueba Microbiológico Para Alimentos. Determinación De *Listeria monocytogenes*.
- 69) Oteo J. y Alós J. I.:
LISTERIA Y LISTERIOSIS.
España. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles, 1998:1-4.
- 70) Payán A. y Astudillo M.: Listeriosis neonatal: ¿enfermedad poco frecuente o no diagnosticada? Enfoque Microbiológico; *Colombia Médica*, 1994; 25: 69-72.

- 71) Pistor S., Chakraborty T., Niebuhr K., Domann E. y Wehland J.: The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton; *EMBO J.*, 1994; 13:758-763.
- 72) Pistor S., Gröbe L., Sechi A. S., Domann E., Gerstel B., Machesky L.M., Chakraborty T. y Wehland J.: Mutations of arginine residues within the 146-KRRK-150 motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the recruitment of the Arp2/3 complex; *J. Cell Sci.*, 2000; 113:3277-3287.
- 73) Portnoy D. y Decatur A.: Increased Cytotoxicity of *Listeria monocytogenes* Producing a PFO+PEST Chimeric Protein; *Berkeley McNair Research J.*, 1999; 7:33-48.
- 74) Poyart C., Trieu-Cuot P. y Berche P.: The InlA gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*; *Microbiology*, 1996;142:173-180.
- 75) Pumarola A., Rodríguez T. A., García R. J. A., y Piedrola A. G.: MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA MÉDICA. España. Segunda Edición, editorial Masson-Salvat Medicina, 1992:376-380.
- 76) Robbins J. R., Barth A. I., Marquis H., Hostos E. L., Nelson W. J. y Theriot J. A.: *Listeria monocytogenes* Exploits Normal Host Cell Processes to Spread from Cell to Cell; *J. Cell Biol.*, 1999; 146:1333-1349.
- 77) Rocourt J. y Berche P.:
DIAGNÓSTICO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*
Francia. Colegio de Profesores de Bacteriología-Virología-Higiene, Instituto Luis Pasteur, 1999. <http://www.uvp5.univ-paris5.fr/MICROBES/Diagnostic/Listeria/Listeria.asp>
- 78) Rose F., Zeller S. A., Chakraborty T., Domann E., Machleidt T., Kronke M., Seeger W., Grimminger F. y Sibelius U.: Human Endothelial Cell Activation and Mediator Release in Response to *Listeria monocytogenes* Virulent Factors; *Infec. Immun.*, 2001. 69:897-905.
- 79) Rosenblatt J., Agnew B. J., Abe H., Bamberg J. R. y Mitchison T. J.: *Xenopus* Actin Depolymerizing Factor/Cofilin (XAC) Is Responsible for the Turnover of Actin Filaments in *Listeria monocytogenes* Tails; *J. Cell Biol.*, 1997; 136:1323-1332.