



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

EL BROTE DE LISTERIOSIS DE 2019 EN ANDALUCÍA

CARMELO FERNÁNDEZ MESA



EL BROTE DE LISTERIOSIS DE 2019 EN ANDALUCÍA

Trabajo de Fin de Grado
Doble Grado en Farmacia
Y en Óptica y Optometría

Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla
Departamento de Microbiología y Parasitología

Alumno: Carmelo Fernández Mesa

Tutora: Eloísa Pajuelo Domínguez

Julio de 2020, Sevilla

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	4
El género <i>Listeria</i>	5
OBJETIVOS	7
METODOLOGÍA.....	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	7
2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	10
3. FISIOPATOLOGÍA DE LA LISTERIOSIS INVASIVA.....	11
Ciclo intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	12
4. EPIDEMIOLOGÍA DEL BROTE DE LISTERIOSIS DE 2019	17
Brote de 2019 en Andalucía.....	20
5. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	23
Control microbiológico de los alimentos	24
CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

En el año 2019, en Andalucía, se produjo uno de los brotes epidémicos causados por *Listeria monocytogenes* más importantes de los últimos años, el cual provocó el contagio de más de 200 personas y la muerte de 3 de ellas, además de 2 abortos y 3 muertes fetales. El brote se asoció a diversos productos cárnicos de una empresa indicando una contaminación y la formación de biofilms bacterianos persistentes en las instalaciones. Esto, unido a la capacidad de la bacteria de seguir multiplicándose a temperaturas de refrigeración, motivó los altos niveles de contaminación bacteriana de los productos.

La infección por este patógeno ocasiona la enfermedad denominada listeriosis, causada principalmente por el consumo de productos alimenticios contaminados. La listeriosis puede presentar una forma no invasiva (manifestándose básicamente como una gastroenteritis), pero su forma más letal es la invasiva. Esta última forma afecta a los grupos de población más vulnerables como mujeres embarazadas, niños en periodo neonatal, ancianos e inmunodeprimidos. La listeriosis se asocia a una elevada morbo-mortalidad, pudiendo causar meningitis, sepsis, infección fetal con consecuencias irreversibles y aborto. Pese a la baja incidencia de la listeriosis comparada con otras enfermedades transmitidas por alimentos su mortalidad es alta, con un promedio de 20-30 %.

En este sentido, y puesto que la principal causa de listeriosis es el consumo de alimentos contaminados, se ha desarrollado una metodología específica, denominada Listeria Defense, para prevenir la contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* en plantas de procesado. Esta metodología implementa una intervención integral para la detección, eliminación y prevención de la contaminación por *Listeria*, orientada a minimizar la posibilidad de contaminación de alimentos por este patógeno.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, brote epidémico, Andalucía, 2019, listeriosis, meningitis, aborto, alimentos, detección.

INTRODUCCIÓN

El género *Listeria*

Listeria monocytogenes pertenece a la familia Listeriaceae. El género *Listeria* comprende las siguientes especies reconocidas: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. costaricensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. goaensis*, *L. grandensis*, *L. grayi* (Rocourt et al., 1992), *L. innocua*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y *londoniensis* (Boerlin et al., 1992), *L. kieliensis*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. thailandensis*, *L. weihenstephanensis* y *L. welshimeri*. (NCBI, 2020).

Únicamente dos especies de este género son patógenas: *L. monocytogenes* en humanos y animales, y *L. ivanovii* en animales.

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas, y que tienen un tamaño de 0,5 – 2 x 0,5 micras. (Madigan et al., 2015).

Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C. En *Listeria monocytogenes* la movilidad se pierde a 37°C, característica que se utiliza para su identificación. Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60°, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, pero podría sobrevivir a diversas condiciones de temperaturas, incluso crecer a 4°C en pocos días. (Alós, 2009; Shamloo et al., 2018).

Listeria spp. son anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas. Las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas. Hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni SH. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares. El contenido de guanina-citosina de su ADN es bajo, entre el 36% y el 38% (Tabla 1).

Tabla 1. Características bioquímicas de *Listeria*.

Prueba	CAT	OX	VP	RM	ESC	UR	GEL	IND	SH
Resultado	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

Entre las diferentes especies incluidas en el género, *Listeria monocytogenes* (Figura 1) es la única implicada en patología humana y el objeto principal de esta revisión. (Alós,

2009). En particular el nombre *Listeria monocytogenes* obedece a la monocitosis que acompaña a la infección por este patógeno (Jones et al., 2017).

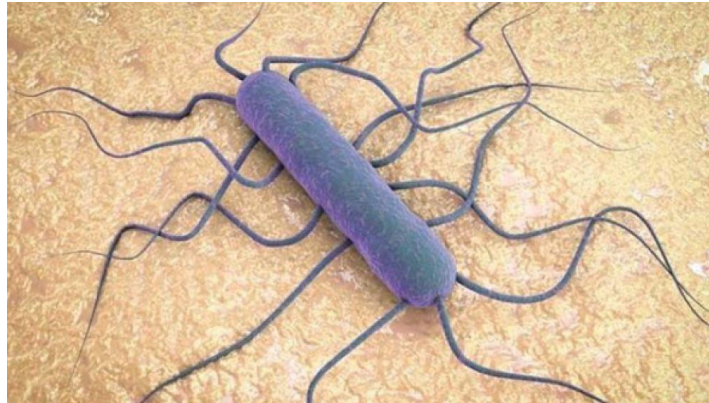


Fig. 1. Microscopía electrónica de barrido de *Listeria monocytogenes*, bacilos de entre 0,5 y 2 micras de longitud con flagelos peritricos.

Su hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, lo que hace que la forma más frecuente por la que llega al ser humano sea a partir de alimentos contaminados, principalmente carne cruda, leche sin pasteurizar y derivados y preparados mal conservados.

Su capacidad de supervivencia y multiplicación a temperaturas de refrigeración (hasta 4°C) (Alós, 2009) le permite mantener la viabilidad, en el interior o en las superficies de los alimentos listos para el consumo con una vida útil relativamente larga, como los productos de la pesca ahumados, los productos cárnicos tratados por calor y los quesos de pasta blanda. (Buchanan et al., 2017)

En este sentido, el año pasado se produjo uno de los peores brotes epidémicos de esta bacteria en los últimos años, que afectó fundamentalmente a Andalucía, provocando el contagio de más de 200 personas y la muerte de 3 de ellas, además de 2 abortos y 3 muertes fetales. Ello justifica la actualidad y la oportunidad de este trabajo de Fin de Grado, que tiene como objetivo general hacer una revisión de la microbiología y la patogenicidad de esta bacteria, y en particular revisar la información epidemiológica sobre el brote de 2019.

OBJETIVOS

1. Describir las características microbiológicas y bioquímicas de *Listeria monocytogenes*.
2. Conocer las enfermedades causadas por este microorganismo.
3. Revisar la fisiopatología de la listeriosis invasiva.
4. Conocer la epidemiología del brote de listeriosis de 2019.
5. Conocer el control microbiológico de los alimentos para la detección de este patógeno y comprender las causas del brote, así como reflexionar sobre cómo se pueden evitar en el futuro.

METODOLOGÍA

Para la redacción de este trabajo se ha buscado información en bases de datos públicas como Scopus, Pubmed, Medline, Mendeley y Google Scholar, además de Google. Se han utilizado como palabras clave tanto en español como en inglés: *Listeria monocytogenes*, brote epidémico, Andalucía, 2019, listeriosis, meningitis, aborto, alimentos, detección.

Además se han consultado datos epidemiológicos en la página web del Instituto de Salud Carlos III (<https://www.isciii.es/Paginas/Inicio.aspx>), en el Ministerio de Sanidad (<https://www.msbs.gob.es/>) y en la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (<https://www.juntadeandalucia.es/organismos/saludyfamilias.html>).

Se ha filtrado la información dando prioridad siempre a los artículos en inglés (aunque se ha utilizado alguna revisión en español) de los últimos 10 años preferentemente y publicados en revistas de prestigio en las áreas de Medicina, Epidemiología, Inmunología y Ciencia de los Alimentos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Listeria monocytogenes crece a temperaturas de 1 a 45 °C, con temperatura óptima de 30 a 37 °C (Muñoz et al., 2011; Alós, 2009; Shamloo et al., 2018); tiene la habilidad de soportar temperaturas de refrigeración y es capaz de desarrollarse a pH de 4,4 a 9,6. Asimismo, crece en concentraciones altas de cloruro de sodio (15 %). Es un microorganismo ambiental que tiene la facultad de adherirse a las superficies, formando biopelículas para protegerse de la acción de los tratamientos

antimicrobianos. En el ambiente de fábrica de producción de alimentos, tiene la oportunidad de contaminar en sus diferentes etapas, siendo esta vía la más frecuente para llegar al ser humano. (Buchanan et al., 2017; Gilmour et al., 2010).

Las pruebas convencionales para su identificación son: tinción de Gram, reacción de catalasa positiva, oxidasa negativa, hidrólisis de esculina positiva que puede demostrarse en el agar bilis esculina (**Figura 5**), dado que es capaz de crecer en bilis al 40%, fermentación de glucosa y maltosa, motilidad positiva a 25 °C que en medio semisólido se observa en forma de paraguas cercano a la superficie (**Figura 6**). En la tinción de Gram se observa como bacilo Gram positivo corto, regular, no esporulado (**Figura 3**), que crece con facilidad en medios enriquecidos con sangre de cordero, tras 18 a 24 horas de incubación en aerobiosis. Las colonias son pequeñas, blanco grisáceas y presentan hemólisis que excede escasamente el borde de la colonia (**Figura 4**); puede ser confundida con *Streptococcus agalactiae*.

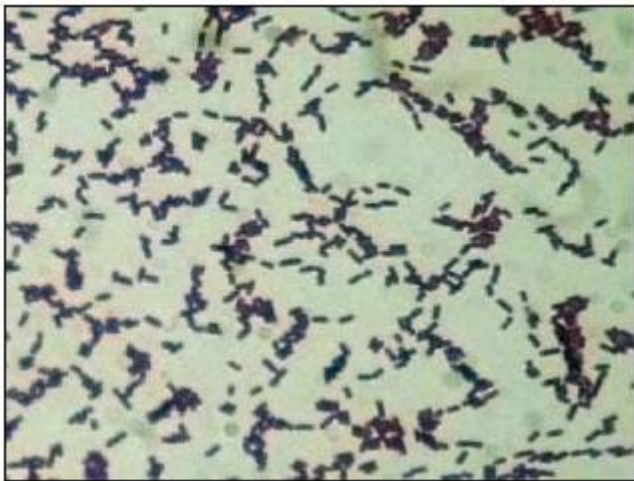


Fig. 3. Tinción de Gram. *L. monocytogenes* son bacilos grampositivos.

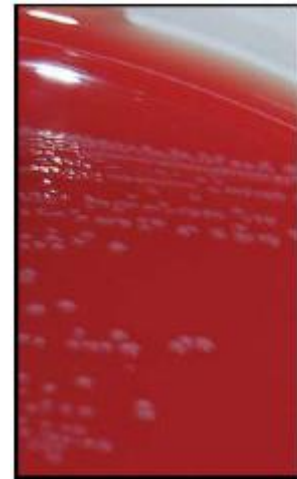


Fig. 4. Colonias en agar sangre. Producen un halo débil de hemólisis beta.



Fig. 5. Hidrólisis de esculina. Dan positiva la prueba de la esculina por hidrólisis de esculina para producir esculetina y glucosa.



Fig. 6. Prueba de movilidad a 25°C. Esta bacteria tiene una típica movilidad en paraguas.

La prueba de CAMP es positiva (**Figura 7**). Las galerías bioquímicas (API Coryne de Biome-rioux y Rapid ID CB-plus de Remel) son capaces de identificar el género pero presentan dificultad para diferenciarla de *L. innocua*. *Listeria monocytogenes* tiene un patrón de susceptibilidad estable, generalmente es sensible a penicilina, ampicilina, amino-glucósidos, eritromicina, rifampicina, tetraciclina, cotrimoxazol, vancomicina e imipenemcilastatina. Las cefalosporinas son inefectivas *in vivo*, y hay resistencia mediada por plásmidos a macrólidos y tetraciclinas. Para testeo de sensibilidad, el CSLI recomienda efectuar microdilución en caldo. Están estandarizados los puntos de corte para penicilina, ampicilina y cotrimoxazol (Benadof, 2008).



Fig. 7. Prueba de CAMP positiva. Se genera una lisis de los eritrocitos del agar sangre.

Los métodos rápidos tales como citometría de flujo, técnicas de ensayo inmunosorbente ligados a enzimas, hibridación de ADN, y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han evolucionado recientemente para detectar *Listeria* spp. y, en algunos casos, más concretamente *L. monocytogenes*. Sin embargo, en muchos laboratorios, el aislamiento seguido de la identificación del microorganismo sigue siendo el método utilizado para detectar *Listeria* spp. En la actualidad, los aislamientos de *Listeria* se reconocen principalmente en función de la morfología y características bioquímicas. Entre estas características, la hemólisis es el único marcador que distingue a *L. monocytogenes* (hemolíticos y patógenos) de *L. innocua* (no hemolítico y no patógeno), las dos especies más frecuentemente aisladas de alimentos. (Leclercq et al., 2011)(Kérouanton et al., 2010). El principal inconveniente de los métodos convencionales es que son laboriosos y lentos, ya que requieren más de una semana para la detección y confirmación de patógenos (Dwivedi and Jaykus, 2011; Law et al., 2014; Letchumanan et al., 2015). Por ello y gracias a los recientes avances en tecnología molecular, los métodos moleculares como PCR se han utilizado como una

alternativa a los métodos de cultivo y serológicos para la prueba de alimentos (Gasánov et al., 2005). Dichos métodos pueden proporcionar resultados más precisos y confiables; sin embargo requieren instrumentos especializados y personal altamente capacitado (Gasánov et al., 2005; Jadhav et al., 2012; Law et al., 2014).

2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR *LISTERIA MONOCYTOGENES*

La infección por *Listeria monocytogenes* ocasiona la enfermedad denominada listeriosis, causada principalmente por el consumo de productos alimenticios contaminados (Liu et al., 2005). Las formas más frecuentes de infección son: gastroenteritis, neurolisteriosis, bacteriemia y la infección materno-neonatal. Los factores de riesgo que se han identificado para el desarrollo de bacteriemia y neurolisteriosis son: edad avanzada, inmunodeficiencias (innatas y celulares), neoplasias (sobre todo hematológicas), infección por VIH, cirrosis hepática, diabetes mellitus, alcoholismo y tratamientos inmunosupresores. (Martín-Fortea et al., 2020)

Sus manifestaciones clínicas se pueden agrupar en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva. (Loo et al., 2020).

La listeriosis invasiva (Van Stelten and Nightingale, 2008a) se produce cuando la infección ocasionada por las células bacterianas atraviesa la barrera intestinal y alcanza sistemas y órganos que son blanco de infección, como son el sistema nervioso central y el útero en la mujer embarazada (Mammina et al., 2009; Volpe Sperry et al., 2008) ocasionando meningitis (Evans et al., 2004; Nightingale et al., 2005; Shen et al., 2006; Van Stelten and Nightingale, 2008a; Volpe Sperry et al., 2008), bacteriemias (Evans et al., 2004; Shen et al., 2006) septicemias (Evans et al., 2004; Mammina et al., 2009; Nightingale et al., 2005; Shen et al., 2006; Van Stelten and Nightingale, 2008a; Volpe Sperry et al., 2008) meningoencefalitis (Evans et al., 2004; Shen et al., 2006; Van Stelten and Nightingale, 2008) absceso cerebral o espinal, listeriosis pontobulbar y romboencefalitis (Mammina et al., 2009; Pan et al., 2009a). En la mujer embarazada se disemina por vía sanguínea y atraviesa la barrera placentaria (Volpe Sperry et al., 2008), lo que conlleva a una infección en el feto o en el recién nacido que da origen a abortos espontáneos (Evans et al., 2004; Nightingale et al., 2005; Shen et al., 2006; Volpe Sperry et al., 2008), muerte fetal, septicemia neonatal grave, muerte neonatal, meningitis infantil y granulomatosis (Mammina et al., 2009; Sánchez et al., 2001).

La listeriosis no invasiva se manifiesta por síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, y su periodo de incubación es corto (Mammina et al., 2009).

La listeriosis invasiva afecta a los grupos de población más vulnerables como: mujeres embarazadas, niños en periodo neonatal, ancianos y personas con depresión del sistema inmunológico por enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), por medicamentos como la cortisona o por hábitos como el

alcoholismo (Gilbreth et al., 2005; Kim et al., 2008; Mammina et al., 2009). A pesar de que la listeriosis es de rara presentación, comparada con otras enfermedades transmitidas por alimentos (Pan et al., 2009b; Van Stelten and Nightingale, 2008), su mortalidad es alta, con un promedio de 20 a 30 % (Evans et al., 2004; Kagkli et al., 2009; Kim et al., 2008; Mammina et al., 2009; Pan et al., 2009b; Van Stelten and Nightingale, 2008).

3. FISIOPATOLOGÍA DE LA LISTERIOSIS INVASIVA

El parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* se ha convertido en un modelo importante para la investigación de los mecanismos moleculares del parasitismo intracelular de otras bacterias. Conceptos como la inhabilidad de los anticuerpos para proteger contra infecciones ocasionadas por patógenos intracelulares, la importancia de macrófagos activados en la eliminación de parásitos intracelulares, y el papel que juegan los linfocitos T en la inmunidad celular inmediata fueron establecidos bajo los estudios con el modelo murino de listeriosis (Barreto et al., 2017; Torres et al., 2005a).

La heterogeneidad en la virulencia de *L. monocytogenes* ha sido observada en estudios *in vivo* (ratón) y en estudios *in vitro* (cultivos celulares); pero la correlación entre el nivel de virulencia y el origen o tipo de cepa no ha sido establecida. Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas entre la virulencia de cepas de origen clínico y de alimento, siendo las primeras las que presentan dosis letales más bajas (Nørrung and Andersen, 2000). Basados en los antígenos somático (O) y flagelar (H), existen hasta el momento 13 serotipos de *L. monocytogenes*. Todos ellos podrían causar listeriosis, pero tres (1/2a, 1/2b y 4b) son más frecuentes en los casos de listeriosis humana y animal (Abdollahzadeh et al., 2017; Jamshidi and Zeinali, 2019). El serotipo 4b está estrechamente relacionado con los brotes de listeriosis (Jalali et al., 2015). Otros serotipos, como el 1/2c, han sido encontrados como contaminantes de alimentos. Algunas de estas serovariedades son compartidas por *L. innocua* y por *L. seeligeri*. *L. innocua* está representada sólo por tres serovariedades y es considerada una variante no patógena de *L. monocytogenes* (Tabla 2) (Torres et al., 2005b).

Tabla 2. Serología de las diferentes especies de Listeria (Torres et al., 2005b).

Especie	Serovariedad
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, In ^a
<i>L. weishimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, In

La listeriosis se define clínicamente cuando el microorganismo es aislado de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) o de otros sitios del organismo humano o animal, que normalmente son estériles (placenta) (Inoue et al., 2017; Le Monnier et al., 2011). La susceptibilidad del hospedador juega un papel importante en la presentación de la enfermedad tras la exposición a *L. monocytogenes*; así la mayoría de pacientes experimentan un defecto fisiológico o patológico que afecta a la inmunidad mediada por células T, lo que justifica la clasificación de *L. monocytogenes* como un patógeno oportunista. La fisiopatología de la infección por *L. monocytogenes* en humanos y animales no está totalmente esclarecida. La investigación de la fisiopatología de listeriosis requiere de un modelo animal en el cual el agente infeccioso pueda manifestar el mismo tropismo celular y tisular que en humanos; modelo en el que se observen los mismos efectos directos e indirectos que causan los daños inmunopatológicos (Lecuit and Cossart, 2002).

Los alimentos son la principal ruta de adquisición del patógeno y, por lo tanto, el tracto gastrointestinal es el primer sitio de entrada de *L. monocytogenes* al hospedador (J. A. Vázquez-Boland et al., 2001). Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hematoencefálica y placentaria. Al cruzar la barrera intestinal, la bacteria se absorbe desde el lumen intestinal, atravesando las células epiteliales y si el sistema inmune no es capaz de controlar eficientemente la infección, la bacteria seguirá multiplicándose y la infección puede diseminarse al torrente sanguíneo y a los ganglios linfáticos. Tras el ingreso al torrente sanguíneo, la mayoría de las bacterias alcanzan el hígado y el bazo, donde pueden multiplicarse en el interior de macrófagos o células epiteliales. Si la multiplicación de *L. monocytogenes* no es controlada por una efectiva respuesta inmune innata, la bacteria escapa y continúa dividiéndose. La supervivencia del hospedador depende del desarrollo de una efectiva respuesta inmune adaptativa; de otro modo, la bacteria puede ingresar nuevamente al torrente sanguíneo y alcanzar el cerebro o la placenta, causando infecciones sistémicas potencialmente letales (Camejo et al., 2011). La capacidad de *L. monocytogenes* para multiplicarse en el citosol de las células infectadas y diseminarse de célula-célula le permite evitar la respuesta inmune humoral (Pamer, 2004).

Ciclo intracelular de *L. monocytogenes*

El proceso de infección comprende varias etapas: adhesión e invasión de la célula del hospedador, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y proliferación extracelular (Chen et al., 2009; Témoïn et al., 2008) (**Figura 9**). En cada una de estas etapas están involucrados múltiples factores de virulencia (Vázquez-Boland et al., 2001) (**Tabla 3**).

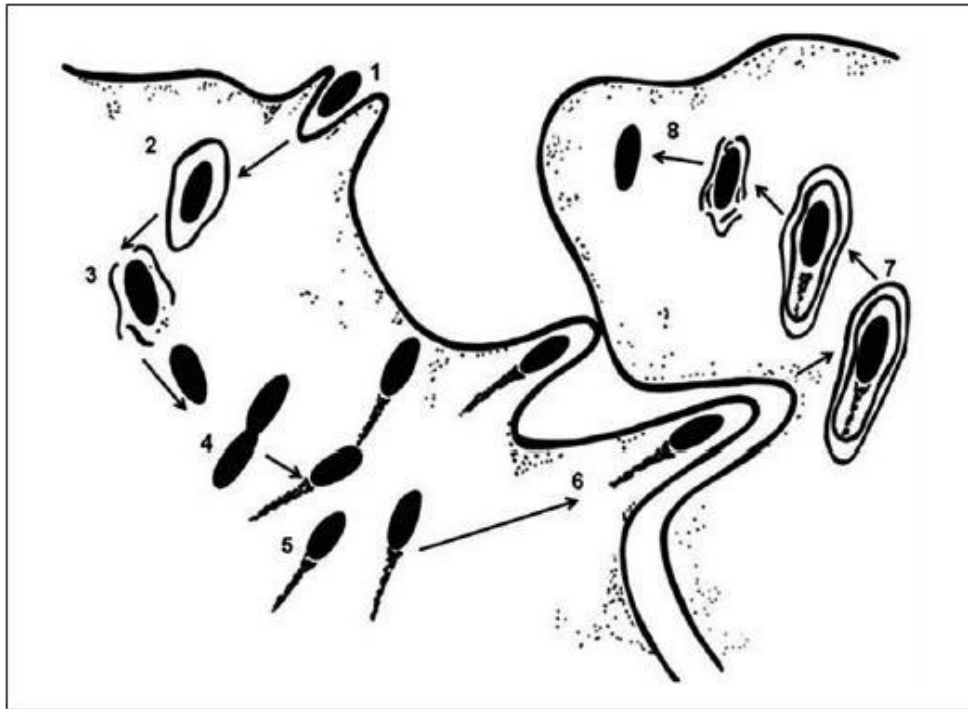


Fig. 9. Esquema del ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes*. 1. Entrada en la célula del hospedador; 2. Supervivencia dentro de la vacuola fagocítica; 3. Disrupción de las membranas del fagosoma y escape al citosol; 4. Replicación en el citosol; 5. Movimiento a través de la polimerización de actina; 6. Propagación célula-célula; 7. Supervivencia en fagosomas secundarios; 8. Escape del fagosoma secundario y reinicio del ciclo (Pizarro-Cerdá et al., 2004; Vázquez-Boland et al., 2001).

Tabla 3. Principales factores de virulencia de *L. monocytogenes* involucrados en el ciclo intracelular (Vázquez-Boland et al., 2001)

Locación cromosoma	Gen	Producto del gen	Función
LIPI- 1	<i>hly</i>	Listeriolisina O (LLO)	Lisis del fagosoma
	<i>plcA</i>	Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI- PLC)	Lisis del fagosoma
	<i>plcB</i>	Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC- PLC)	Lisis del fagosoma
	<i>mpl</i>	Precursor zinc metaloproteasa (Mpl)	Procesa al precursor PC- PLC a su forma madura
	<i>prfA</i>	Factor regulador positivo A (PrfA)	Requerida para la expresión de los factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>
	<i>actA</i>	Proteína inductora de ensamblaje actina	Participa en la movilidad intra- intercelular
Exterior LIPI- 1	<i>hpt</i>	Proteína transportadora de hexosa fosfato	Requerido para el crecimiento intracelular
	<i>inlA</i>	Internalina A (InlA)	Participa en la invasión celular
	<i>inlB</i>	Internalina B (InlB)	Molécula señalizadora y participa en la invasión celular
	<i>inlC</i>	Internalina C (InlC)	Proteína secretada, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i>
	<i>inlJ</i>	Internalina J (InlJ)	Adhesión celular, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i>

Adhesión celular

La adhesión a las células del hospedador es una etapa fundamental en la patogenicidad bacteriana (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006). Para *L. monocytogenes* se ha descrito la participación de varios factores que permiten establecer un contacto íntimo con las células del hospedador, destacándose las proteínas Lap, Ami, FbpA, LapB e InlJ. Lap es una adhesina, inicialmente denominada proteína 104, que está presente en todas las especies de *Listeria* spp. con excepción de *L. grayi* (Camejo et al., 2011); Ami, amidasa autocatalítica (Camejo et al., 2011); FbpA, proteína de superficie

homóloga a las proteínas atípicas de unión a fibronectina. Además, FbpA parece ejercer un rol de chaperona para los factores de virulencia InIB y LLO (Camejo et al., 2011; Dramsi et al., 2004), estabiliza o permite la secreción correcta de ellos (Dramsi et al., 2004). LapB es una proteína necesaria para la adhesión y el ingreso en líneas celulares de mamíferos y para la virulencia en roedores infectados vía intravenosa u oral. Además, se ha informado que esta proteína está ausente en especies no patógenas de *Listeria* (Camejo et al., 2011; Reis et al., 2010). Finalmente, la proteína InIJ, proteína perteneciente a la familia de las internalinas (InI), cuya expresión es inducida *in vivo* y actúa como una adhesina que se encuentra unida covalentemente al peptidoglicano; esta unión se realiza mediante la enzima sortasa A (SrtA) (Sabet et al., 2005). La importancia de esta proteína en la virulencia queda demostrada al realizar estudios con cepas de *L. monocytogenes* que presentan mutaciones en el gen *srtA* (Garandeau et al., 2002) como así también, al emplear cepas donde la proteína InIJ está ausente, debido a una delección del gen *inJ* (Camejo et al., 2011); en ambos casos se produce una reducción significativa en la virulencia.

Por otra parte, se ha identificado la participación de proteínas adicionales en el proceso de adhesión como la proteína DtlA, la cual añade residuos de D-alanina a los ácidos lipoteicoicos, proceso que contribuye a la adhesión y virulencia de *L. monocytogenes* (Camejo et al., 2011); la proteína CtaP, la cual está asociada con el transporte de cisteína, resistencia a ácidos, integridad de la membrana celular y con la adhesión al hospedador (Camejo et al., 2011) y las proteínas ActA, InIF y RecA, que participan en el proceso de adhesión.

Invasión celular

Las dos principales proteínas de invasión de *L. monocytogenes* son InIA y InIB, codificadas por los genes *inIA* e *inIB*, respectivamente (Bonazzi et al., 2009).

Actualmente, las InI se clasifican en tres grupos, de acuerdo a la estructura de superficie de *L. monocytogenes* con la que se relaciona su extremo C-terminal. Así, InIA se une en forma covalente al peptidoglicano; en cambio InIB se une mediante interacción electrostática a moléculas de ácidos lipoteicoicos (Jonquière et al., 1999) permitiendo la adherencia de las bacterias a la célula eucariota y por ende la invasión. Estas proteínas se unen a proteínas de la superficie de la célula del hospedador, InIA se une al receptor E-cadherina, glicoproteína transmembrana localizada en la superficie basolateral de varios tipos de células, incluyendo el enterocito. Por lo tanto, la interacción InIA/E-cadherina es crítica para la invasión del epitelio intestinal y activa una compleja vía de señalización que conduce a la reorganización del citoesqueleto. Por su parte, para InIB se han reconocido varias moléculas como potenciales receptores; entre ellas destaca el receptor para el factor de crecimiento de hepatocito (receptor Met) (Shen et al., 2000). Met es un receptor transmembrana con un dominio intracelular con acción tirosina kinasa y, por lo tanto,

la interacción InIB/ Met produce una fosforilación transitoria de Met (Camejo et al., 2011). El receptor Met permite que *L. monocytogenes* se internalice en una gran variedad de células. Por lo tanto, este microorganismo puede invadir diferentes hospedadores eucariotas, pero la eficiencia de la infección depende de la especie. Se ha determinado que la interacción InIA/E-cadherina e InIE/Met son especie-específica; así un residuo de prolina en posición 16 en E-cadherina de humanos y cobaya es esencial para la interacción con InIA; en cambio, un residuo de ácido glutámico en la misma posición como es el caso de E-cadherina de ratón o rata, impide este reconocimiento (Lecuit et al., 2001). Por otra parte, InIB interactúa con el receptor Met de humano y ratón pero no reconoce el de cobaya o conejo (Khelef et al., 2006). Mientras InIB presenta un tropismo más amplio, InIA le confiere a *L. monocytogenes* un tropismo más reducido, ya que E-cadherina sólo es expresada por un número limitado de células de origen epitelial (López et al., 2006).

Para que *L. monocytogenes* atraviese la barrera intestinal, es crucial la participación de InIA; en cambio, estudios más recientes han determinado que tanto InIA y InIB son fundamentales para la invasión placentaria. Pocos estudios han abordado los mecanismos implicados en el cruce de la barrera hemato-encefálica, la cual conduce a meningoencefalitis. La única proteína posiblemente involucrada, lo cual ha sido sugerido por los estudios *in vitro*, es InIB. Aunque se ha propuesto que E-cadherina también podría estar participando, considerando su expresión en las células que constituyen el epitelio de la barrera hemato-encefálica (Lecuit, 2005; Stavru et al., 2011).

Además de las InI anteriormente mencionadas, se han descrito alrededor de 27 InI en *L. monocytogenes* entre las que se puede mencionar InIC, InIC2, InID y otras proteínas con actividad de autolisina como Auto, Ami y p60 (López et al., 2006). Junto a estas proteínas accesorias se tiene otra proteína LPXTG, la proteína Vip, que se encuentra unida al peptidoglicano y que también es necesaria para el ingreso de *Listeria* a varias líneas celulares epiteliales (Camejo et al., 2011; Reis et al., 2010). Sin embargo, InIA y InIB, siguen siendo los principales factores de virulencia implicados en la invasión celular, en especial en fagocitos no-profesionales (Pizarro-Cerdá et al., 2012). En este proceso de internalización son las transformaciones post-traduccionales que sufren los receptores de las InIA y InIB, E-cadherina y Met, las autoras de la activación de la cascada de señales que conlleva a la polimerización de los filamentos de actina, proceso fundamental para la internalización e invasión de *L. monocytogenes*. Además se sugirió la participación de clatrina en este proceso (Veiga et al., 2007), descubrimiento bastante sorprendente, ya que esta molécula se relacionaba sólo con la internalización de macromoléculas. En la actualidad, se sabe que clatrina actúa como una plataforma para el reclutamiento de proteínas como Dab2, Hip 1R y miosina VI, todas implicadas en el rearrreglo de los filamentos de actina (Bonazzi et al., 2011). Sin embargo, los eventos moleculares íntimos que se producen

entre la endocitosis mediada por clatrina y los rearrreglos de actina durante la invasión de *L. monocytogenes* no se conocen aún (Mostowy and Cossart, 2012).

Supervivencia, multiplicación e invasión célula-célula

Una vez dentro de la célula, la vacuola fagocítica es lisada por la toxina listeriolisina O (LLO) y dos fosfolipasas C (PLC): fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC) y fosfatidilcolina-PLC (PC-PLC), codificadas por *plcA* y *plcB*, respectivamente. LLO es una toxina dependiente de colesterol y capaz de formar poros en la membrana de los fagosomas, permitiendo que *L. monocytogenes* escape de las vacuolas primarias y secundarias (Gedde et al., 2000). Esta acción citolítica de LLO se ve aumentada por la acción de PI-PLC, que reconoce como sustrato a fosfatidilinositol y por PC-PLC, que es una lecitinasa, que tiene actividad enzimática sobre fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Camejo et al., 2011). PC-PLC es expresada como protoenzima y se requiere la metaloproteasa dependiente de zinc Mpl, para su maduración. Una vez libre en el citosol, *L. monocytogenes* expresa los genes para adquirir los nutrientes necesarios para la multiplicación intracelular. Se ha determinado que el gen *hpt*, que codifica para el transportador de hexosa 6-fosfato, es importante para el óptimo crecimiento intracelular de *Listeria*. Tras la replicación, se induce la polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria; este proceso es dirigido por la proteína ActA. La formación de una estructura semejante a una cola de cometa facilita el movimiento intracelular, permitiendo la invasión a células vecinas, mediante un proceso que implica la formación de una protrusión que contiene a la bacteria rodeada por una vacuola de doble membrana, la cual es lisada por PC-PLC, PI-PLC y LLO (Chen et al., 2009; Liu et al., 2007; Roche et al., 2005).

Se han identificado otros factores de virulencia involucrados en la colonización del hospedador; sin embargo, éstos no serían específicos de *L. monocytogenes*, ya que también han sido detectados en otras especies de *Listeria*. Estos factores son conocidos como factores de virulencia accesorios y entre éstos se encuentran la proteína p60 (producto del gen *iap*), secretada por todas las cepas de *Listeria*, que parece estar involucrada en los últimos pasos de la división celular (Wuenscher et al., 1993); los mediadores en respuesta al estrés (ClpC, ClpE, ClpP), involucrados en el escape desde el fagosoma y en la multiplicación intracelular. También se ha asignado un rol importante a la presencia de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, las que actúan en conjunto para detoxificar radicales libres y, por último, los sistemas de captación de hierro, que permiten a la bacteria capturar el hierro de los tejidos del hospedador.

En estos últimos años, se ha relacionado la capacidad de sobrevivir y multiplicarse dentro de la célula del hospedador con algunos mecanismos como evasión de los mecanismos de defensa de la célula del hospedador, ya sea en el citosol o en la vacuola fagocítica, característica que está otorgada por la presencia de enzimas que

modifican el peptidoglicano como PgdA, que deacetila los residuos de N-acetilglucosamina produciendo resistencia a la enzima lisozima (Boneca et al., 2007; Stavru et al., 2011); también se informa de la capacidad de la proteína ActA para evitar la autofagia, proceso en el cual *L. monocytogenes* es degradada en los lisosomas (Dortet et al., 2011; Yoshikawa et al., 2009). Finalmente, hay evidencias experimentales que señalan que *L. monocytogenes* es capaz de inducir modificaciones en las histonas y remodelar la cromatina; por lo tanto, tendría una participación en lo que se conoce como regulación epigenética (Cossart and Toledo-Arana, 2008; Dussurget et al., 2004; Hamon et al., 2006; Lecuit, 2007; Stavru et al., 2011).

4. EPIDEMIOLOGÍA DEL BROTE DE LISTERIOSIS DE 2019

La listeriosis tiene una incidencia estimada de 3-6 casos por millón de habitantes por año y es mayor en países en desarrollo. En el periodo de 2015 a 2018 se notificaron a la RENAVE 1.369 casos confirmados de listeriosis. En este periodo sólo se notificaron 7 casos probables. El número de casos se incrementó desde los 256 casos declarados en 2015 a los 432 casos declarados en 2018 (**Tabla 4**). El incremento, en parte, se puede explicar por la paulatina implantación de la vigilancia de esta enfermedad en las CCAA. Las tasas de incidencia fueron 0,64 en 2015; 0,95 en 2016; 0,71 en 2017 y 1,06 en 2018. De acuerdo con los datos de la vigilancia en Europa que coordina el ECDC, en el año 2017 (último publicado) la tasa de incidencia mediana (rango intercuartil) en la Unión Europea fue de 0,34 casos por 100.000 habitantes y el rango intercuartil (RIQ) fue 0,47. (RENAVE, 2018).

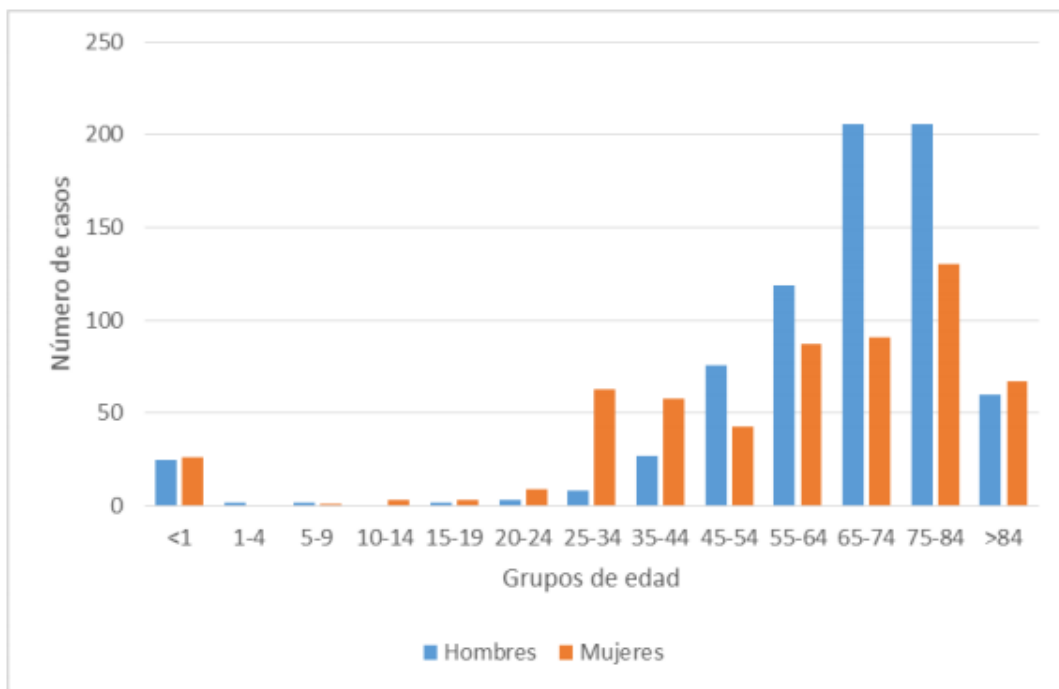
Tabla 4. Casos de listeriosis confirmados notificados a la RENAVE según la fecha de inicio de síntomas. Periodo 2015-2018.

Comunidades Autónomas	Año				
	2015	2016	2017	2018	Total
Andalucía	67	66	49	77	259
Aragón	6	15	7	14	42
Canarias	11	13	7	14	45
Cantabria	1	1	9	10	21
Castilla La Mancha	3	16	12	21	52
Castilla y León	12	39	24	37	112
Cataluña	67	85	59	70	281
C. Valenciana	41	41	29	46	157
Extremadura	13	6	7	8	34
Madrid	19	45	51	86	201
Navarra	11	7	7	5	30
País Vasco		39	32	39	110
La Rioja	4	6	6	5	21
Ceuta	1	-	-	-	1
Melilla	-	3	-	-	3
Total	256	382	299	432	1.369

Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE)

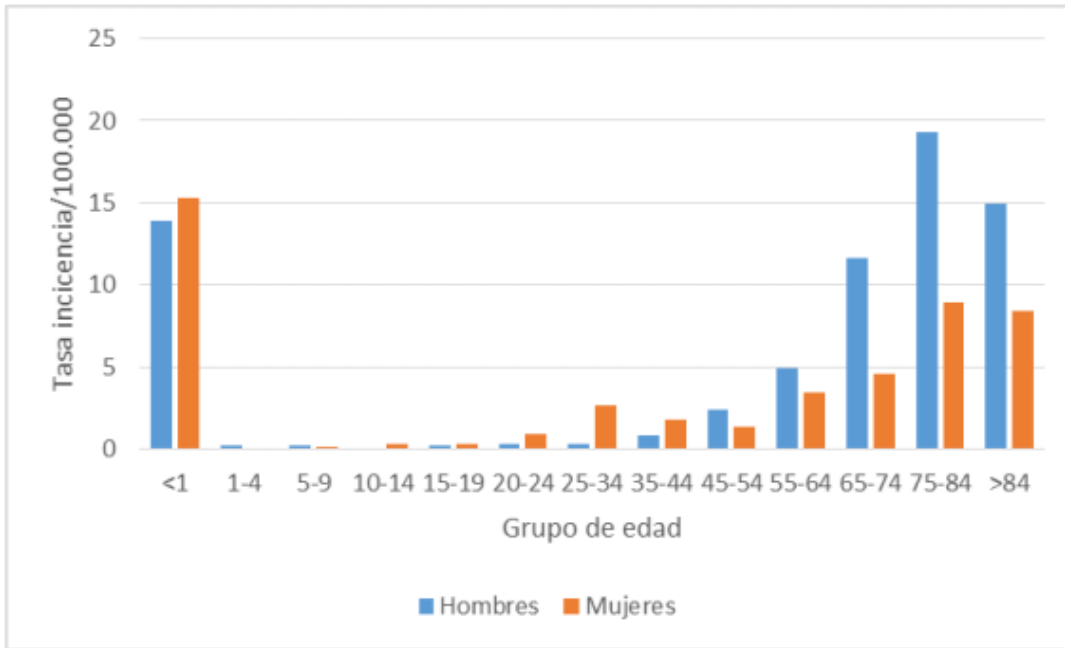
En este periodo se notificaron 741 casos en hombres y 581 mujeres (en 47 casos no se dispone de esta información). El cociente hombre/mujer para el periodo fue de 1,28 (osciló entre 1,08 en 2015 y 1,46 en 2017). La mediana de la edad en el periodo de estudio fue de 71 años para los hombres y de 64 para las mujeres, la diferencia es estadísticamente significativa. (RENAVE, 2018)

En las **figuras 10 y 11** se han representado los casos confirmados en el periodo 2015-2018 y sus tasas por grupos de edad y sexo. Se observa un número similar de casos en niños y niñas menores de 1 año de edad (25 y 26 respectivamente) que se corresponden con tasas de 13,9 y 15,3. Los casos notificados con edades entre 1 y 24 años son muy pocos (9 hombres y 16 mujeres). A partir de los 25 años los casos aumentan con la edad. Casos y tasas son superiores en hombres excepto en los grupos de edad de 20-24 a 35-44 en los que casos y tasa fueron superiores en mujeres.



Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE)

Fig. 10. Casos de listeriosis confirmados notificados a la RENAVE según la edad y el sexo. Periodo 2015-2018.



*Casos confirmados. Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE)

Fig. 11. Tasas* de incidencia media de listeriosis para 2015-2018 según la edad y el sexo.

En el periodo 2015 a 2018 se produjeron 124 defunciones, una media anual de 31 y una letalidad global para el periodo de 9,1%. No hubo ningún fallecido en pacientes de menos de 20 años de edad. En 2015 se produjo la letalidad más elevada con 11,7% (30 fallecidos) y la más baja en 2017 con 8,0% (24 fallecidos). (RENAVE, 2018).

Tabla 5. Ejemplos de brotes de listeriosis asociadas a contaminación de alimentos (tabla de elaboración propia).

Alimento	País	Fecha	Número de casos	Número de fallecimientos	Referencia bibliográfica
Producto cárnico	Canadá	2008	57	22	(Wilson and Keelan, 2008)
Cecinas, embutidos y quesos	Chile	2008/09	164	16	(Olea et al., 2012)
Queso	Alemania	2006/07	189	26	(Shamloo et al., 2019)
Queso suave	Suecia	2001	120	0	(Shamloo et al., 2019)

Brote de 2019 en Andalucía

El Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social confirmó la existencia de 226 casos por el brote de listeriosis asociado al consumo de carne mechada industrial de la empresa sevillana Magrudis, propietaria de la marca 'La Mechá', 216 de ellos, en Andalucía (Viernes, 2019).

La mayoría de los casos se han registrado en Sevilla (173), aunque se han encontrado en casi todas las provincias: Cádiz (13), Granada (6), Huelva (18) y Málaga (6). (Viernes, 2019) (Figura 12).

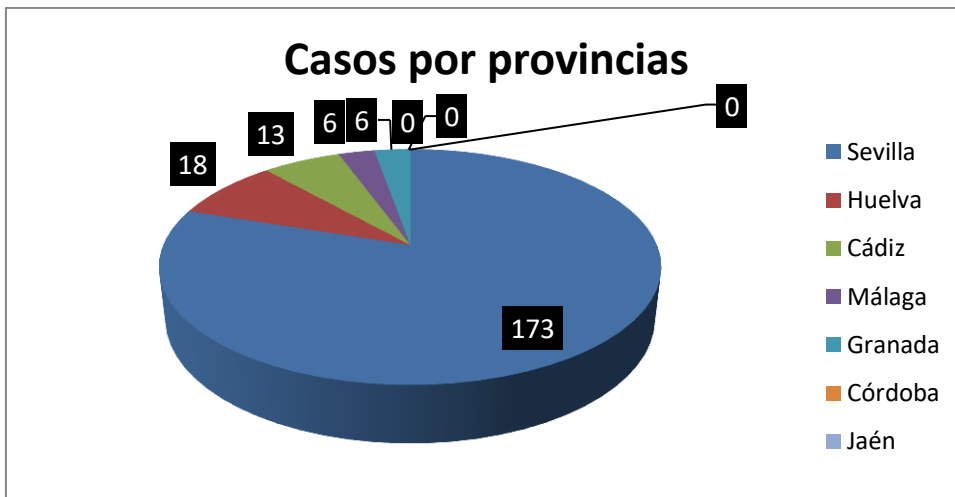


Fig. 12. Distribución de casos de listeriosis por provincias.

El 57 % eran mujeres (123), con una edad media de 45,5 años y el 43 % de los afectados fueron hombres (93), con una edad media de 50 años (Viernes, 2019) (Figura 13) (Figura 14).



Fig. 13. Distribución de casos de listeriosis por sexo.

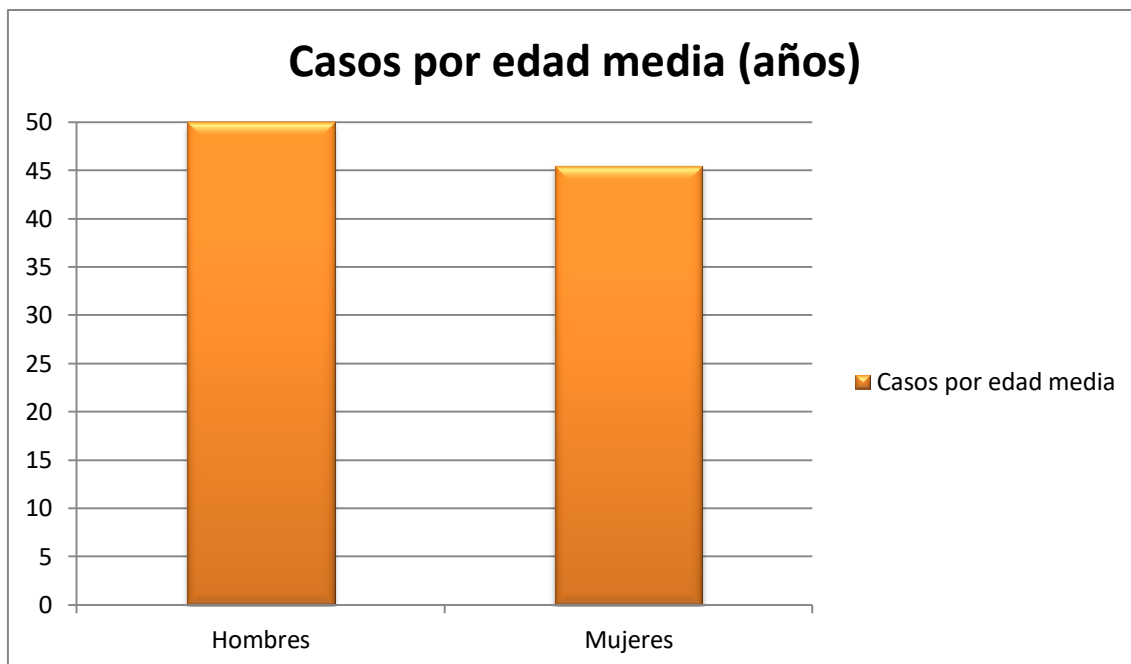


Fig. 14. Distribución de casos de listeriosis por edad.

Los casos confirmados en embarazadas fueron 37. En dos de ellas el embarazo resultó en aborto (hasta la semana 20 de gestación), en tres en muerte fetal (después de la semana 20 de gestación) y en 6 de ellas parto prematuro. Se diagnosticaron 22 cuadros con afectación del SNC y 4 sepsis graves, entre las que se registraron tres defunciones (letalidad en enfermedad invasiva grave 11,5 %): dos personas mayores de 70 años con comorbilidades graves y una persona mayor de 90 años (RENAVE, 2019).

Causas posibles del brote

En principio, el proceso de horneado debería haber logrado que la temperatura de la carne mechada, en todos los puntos, alcanzara o superara los 83-84 °C. Este tipo de tratamiento térmico es suficiente para la eliminación efectiva de *L. monocytogenes*, siempre que la combinación temperatura/tiempo sea la adecuada. Para *L. monocytogenes* el tratamiento térmico necesario es una combinación de temperatura/tiempo de 70 °C durante 2 minutos, para conseguir una reducción logarítmica de 6 del número de células de *L. monocytogenes* (Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2020). Esta reducción también podría alcanzarse con otras combinaciones de tiempo y temperatura. En el caso del brote de listeriosis de carne mechada, hay que contemplar como una causa posible de la contaminación del producto final una combinación de tiempo y temperatura insuficiente en todos los puntos de la pieza de carne y de su relleno.



Fig. 15. Carne mechada afectada por el brote de Listeriosis.

Si el proceso de horneado hubiera funcionado adecuadamente, el producto hubiese salido del horno sin *L. monocytogenes* y, por tanto, la contaminación del mismo se habría producido entre la salida del horno y el envasado al vacío. La coincidencia genética entre los aislados de superficies y los del alimento y clínicos refuerzan la hipótesis de que la carne mechada sufrió una contaminación cruzada después del horneado, causada por los manipuladores, las superficies de trabajo, los utensilios o el ambiente. El hecho de que diferentes lotes de fabricación fueran contaminados por la misma cepa, avalaría la hipótesis de la presencia en las instalaciones de *L. monocytogenes* persistente, así como la presencia de biofilms en las instalaciones (Blog sobre seguridad alimentaria, 2019).

Una vez contaminada la carne, la bacteria tenía muchas posibilidades de sobrevivir y proliferar. El hecho de que el producto estuviera almacenado a temperaturas de refrigeración y que estuviera envasado al vacío, no impide la supervivencia y proliferación, ya que *L. monocytogenes* es anaerobio facultativo y puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno, por ejemplo, en envasados al vacío o en atmósferas modificadas.

La contaminación después del horneado se habría podido evitar con unos programas adecuados de higiene de los manipuladores y de limpieza y desinfección de las instalaciones. Los procedimientos de limpieza y desinfección en industrias cárnicas son imprescindibles para la prevención de contaminaciones cruzadas, y deben incluir la detección y eliminación de biofilms y la prevención del desarrollo de cepas persistentes (Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2020). En este sentido se ha desarrollado una metodología específica, denominada Listeria Defense, para prevenir la contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* en

plantas de procesado. Esta metodología implementa una intervención integral para la detección, eliminación y prevención de la contaminación por *Listeria*, orientada a minimizar la posibilidad de contaminación de alimentos por *L. monocytogenes*.

5. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS PARA LA DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES

La contaminación de los alimentos puede ocurrir en cualquier fase en la que el producto se haya expuesto al medio ambiente, incluyendo la elaboración, el transporte, las ventas al por menor, los servicios de comidas y los hogares. Esta contaminación puede producirse por contacto del alimento con materiales contaminados como materias primas, superficies de la industria alimentaria (utensilios, loncheadoras, cuchillas, cintas transportadoras), aerosoles o a través del personal. Además de la transmisión alimentaria puede existir transmisión directa por animales infectados, especialmente durante el parto de vacas u ovejas, pero son infecciones muy infrecuentes, que afectarían fundamentalmente a veterinarios y/ o ganaderos. Para la salud pública es mucho más relevante la contaminación que se produce a partir del ambiente en el que se procesan los alimentos en las industrias alimentarias. Otra vía de contagio es la transmisión vertical, es decir, de la madre al feto a través de la placenta o durante el parto. (Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2020)

Los alimentos más frecuentemente asociados con la listeriosis son los listos para el consumo refrigerados con una vida útil prolongada. En los brotes conocidos a nivel mundial, los alimentos implicados incluyeron productos cárnicos listos para el consumo como salchichas cocidas o patés, pescados ahumados, productos lácteos (quesos de pasta blanda, leche cruda y helados elaborados con leche cruda) y ensaladas preparadas, así como verduras y frutas frescas. Muchos alimentos listos para el consumo incluyen en su proceso de producción una fase que elimina *L. monocytogenes* (cocción, horneado, etc.). La presencia de la bacteria en estos productos está típicamente relacionada con la recontaminación de los mismos antes del envasado final o con la manipulación posterior durante su comercialización (loncheado) o en el hogar. Si el proceso de fabricación del alimento listo para el consumo no incluye un tratamiento que elimine la bacteria, la seguridad del mismo dependerá de las medidas tomadas durante toda la cadena alimentaria para reducir al mínimo la contaminación y limitar su proliferación. Tiene especial relevancia el mantenimiento de la cadena de frío. Por otra parte, existen alimentos listos para el consumo en los que, por sus características, no puede crecer *L. monocytogenes*, como son los que hayan recibido tratamiento térmico cuando la recontaminación no sea posible tras el mismo (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final, como conservas), pan, galletas y productos similares, azúcar, miel y golosinas,

chocolate, productos de cacao y sal de cocina.(Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2020).

Control microbiológico de los alimentos

Según un modelo utilizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el 92% de los casos de listeriosis invasiva serían atribuibles a dosis superiores a 100.000 unidades formadoras de colonias (ufc) por porción. Suponiendo un tamaño de porción promedio de 50 g, esto correspondería a una concentración de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo por encima de 2.000 ufc/g en el momento del consumo. No obstante, una pequeña proporción de casos están asociados con alimentos listos para el consumo y niveles más bajos de *L. monocytogenes*.

Los brotes están generalmente relacionados con alimentos que presentan altos niveles de *Listeria*. La dosis infectiva depende también de factores individuales, como el estado inmunitario, edad, etc.

La normativa de la UE exige que los alimentos listos para el consumo que pueden presentar riesgo contengan un máximo de 100 ufc/g, requiriéndose en algunos casos la ausencia de la bacteria en 25 g de alimento, proporcionando un elevado margen de seguridad (Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2020).

Detección de *L. monocytogenes* en alimentos

La detección de *Listeria* en alimentos se ha ido desarrollando en los últimos años y podemos encontrar una gran variedad de métodos que van desde el aislamiento e identificación de la bacteria mediante técnicas microbiológicas convencionales hasta los más sofisticados métodos genéticos basados en microarrays, sin olvidar la amplificación de ácidos nucleicos, detección de anticuerpos y ELISA (Zorn et al., 2019).

De acuerdo con la mayoría de los Organismos que legislan la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos, los métodos de aislamiento deben ser lo suficientemente precisos para detectar un microorganismo en 25 gramos de alimento. Esta sensibilidad sólo puede lograrse mediante el uso de medios de enriquecimiento (Zorn et al., 2019).

Los medios de agar comunes para estudiar la caracterización de *L. monocytogenes* son el agar triptona-soja (TSA), agar nutritivo y agar sangre. Los métodos de prueba convencionales para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos implican crecimiento en medio de enriquecimiento previo, seguido de crecimiento en medio selectivo y pruebas bioquímicas y serológicas confirmatorias (Farber and Peterkin, 1991). Estos métodos requieren mucho tiempo y trabajo. Además, la incubación prolongada permite el crecimiento de otros microorganismos. Aunque este método ha

contribuido mucho al conocimiento actual sobre la epidemiología de la listeriosis, el período de incubación prolongado necesario para obtener resultados positivos es una gran desventaja. Desde entonces, se han producido importantes mejoras en los medios de enriquecimiento selectivo, disminuyó el tiempo necesario para el análisis de varios meses a menos de 1 semana (Ryser and Marth, 2007). Actualmente se utiliza con frecuencia el medio cromogénico específico ALOA (Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti). Este agar contiene litio y varios antibióticos como agentes selectivos e incluye 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosido (BCIG) y lipasa C como agentes diferenciales. Las colonias de *Listeria monocytogenes* aparecen de color azul debido a la hidrólisis de BCIG por la enzima beta-galactosidasa del microorganismo, y con un halo opalescente alrededor debido a la lipasa (**Figura 16**). *L. innocua* produce también colonias azules pero no están rodeadas del halo opalescente.

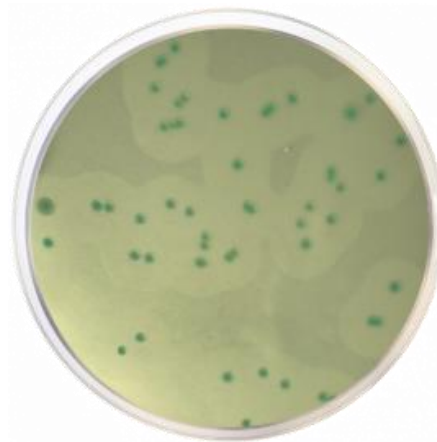


Figura 16. Aspecto de *Listeria monocytogenes* en agar ALOA, caracterizado por colonias azules rodeadas de un halo opalescente.

Gran variedad de pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas también se utilizan para la identificación de microorganismos en métodos convencionales. En los últimos años, varios kits comerciales han sido desarrollados para simplificar y automatizar la identificación de organismos individuales, el resultado es comparable al de los sistemas de identificación convencionales (Mandal et al., 2011).

El kit API Listeria (BioMerieux, La Balme-les-Grottes, Francia), es un kit rápido utilizado para detectar *L. monocytogenes* basado en características morfológicas y bioquímicas.

El funcionamiento del kit comercial API es la comparación de la fermentación de azúcar. Consiste en 10 tiras para evaluar la presencia o ausencia de lo siguiente: arilamidasa (prueba DIM), hidrólisis de esculina, presencia de α -manosidasa y producción de ácido a partir de D-arabitol, D-xilosa, L-ramnosa, α -metil-D-glucosidasa, D-ribosa, glucosa-1-fosfato y D-agatosa (Bille, et al., 1992). Durante la incubación, el metabolismo produce cambios de color que pueden detectarse espontáneamente o deben revelarse mediante la adición de reactivos.

Este sistema tarda 24 horas en identificar especies de *Listeria*. Los resultados positivos de los aislados de *Listeria* se indican mediante hidrólisis de esculina y producción de ácido a partir de D-arabitol, así como a partir de D-arabitol y α -metil-D-glucosidasa (excepto *L. grayi*). La presencia de arilamidasa (prueba DIM) y α -manosidasa, y la producción de ácido a partir de D-xilosa, L-ramnosa, D-ribosa, glucosa-1-fosfato, y D-tagatosa se utilizan para la identificación de especies y subespecies. El color de cada microtubo se analiza utilizando el software del sistema web API (Tabla 6) (Figura 17) (Setiani et al., 2015).

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas para el patógeno *Listeria monocytogenes* (Figura, 2013).

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
Glucosa	Positiva
Manosa	Positiva
Ramnosa	Positiva
Xilosa	Negativa
Manitol	Negativa
Ribosa	Negativa
Hidrólisis de hipurato	Positiva
Movilidad a 25°C	Positiva
Test de CAMP	Positiva
Crecimiento a 4°C	Positiva



Fig. 17. Color de los microtubos de API Listeria para *Listeria monocytogenes*.

CONCLUSIONES

1. El patógeno *Listeria monocytogenes* tiene la habilidad de contaminar productos alimenticios debido a su capacidad de soportar un elevado margen de temperaturas.
2. La listeriosis se puede dividir en invasiva, que presenta una sintomatología de mayor gravedad, y no invasiva, con síntomas más leves.
3. *L. monocytogenes* es un parásito oportunista y su virulencia depende tanto del estado del hospedador como de los diferentes serotipos de la bacteria.
4. El brote de listeriosis de 2019 afectó a 226 personas en España, siendo uno de los más importantes en los últimos años, de las cuales fallecieron 3. Pese a la elevada mortalidad que tiene esta enfermedad, en este caso no fue muy agresiva, influenciada por los avances en medicina.
5. Es importante establecer un protocolo para evitar la contaminación de los alimentos antes, durante o después de su procesado. Listeria Defense es una metodología útil para ello.

BIBLIOGRAFÍA

Abdollahzadeh E, Ojagh SM, Hosseini H, Irajian G, Ghaemi EA. Predictive modeling of survival/death of *Listeria monocytogenes* in liquid media: Bacterial responses to cinnamon essential oil, ZnO nanoparticles, and strain. Food Control 2017;73:954–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.014>.

Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. n.d. http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm (accessed June 1, 2020a).

Aesan - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. n.d. http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm (accessed June 5, 2020b).

Barreto J, Albuquerque DE, Dr O:, De Meis J. INSTITUTO OSWALDO CRUZ Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* e *Listeria monocytogenes*. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507>.

Benadof D. *Listeria monocytogenes*. Rev Chil Infectol 2008;25:350. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000500005>.

Bille, J, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin M-N, Caniaux I, et al. API Listeria, a New and Promising One-Day System To Identify Listeria Isolates Downloaded from. vol.

58. 1992.

Boerlin P, Rocourt J, Grimont F, Grimont PAD, Jacquet C, Piffaretti ANDJ-C. *Listeria ivanovii* subsp. londoniensis subsp nova. 1992.

Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cell Microbiol* 2009;11:693–702. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01293.x>.

Bonazzi M, Vasudevan L, Mallet A, Sachse M, Sartori A, Prevost MC, et al. Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization. *J Cell Biol* 2011;195:525–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105152>.

Boneca IG, Dussurget O, Cabanes D, Nahori MA, Sousa S, Lecuit M, et al. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:997–1002. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609672104>.

Buchanan RL, Gorris LGM, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 2017;75:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>.

Camejo A, Carvalho F, Reis O, Leitão E, Sousa S, Cabanes D. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2011;2:379–94. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17703>.

Chen J, Luo X, Jiang L, Jin P, Wei W, Liu D, et al. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol* 2009;26:103–11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.08.003>.

Cossart P, Toledo-Arana A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* 2008;10:1041–50. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.043>.

Dortet L, Mostowy S, Louaka AS, Gouin E, Nahori MA, Wiemer EAC, et al. Recruitment of the major vault protein by InlK: A *Listeria monocytogenes* strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathog* 2011;7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002168>.

Dramsi S, Bourdichon F, Cabanes D, Lecuit M, Fsihi H, Cossart P. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* 2004;53:639–49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04138.x>.

Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* Virulence. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:587–610. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090934>.

Dwivedi HP, Jaykus LA. Detection of pathogens in foods: The current state-of-the-art and future directions. *Crit Rev Microbiol* 2011;37:40–63. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.506430>.

Evans MR, Swaminathan B, Graves LM, Altermann E, Klaenhammer TR, Fink RC, et al. Genetic Markers Unique to *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Differentiate Epidemic Clone II (Hot Dog Outbreak Strains) from Other Lineages. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2383–90. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2383-2390.2004>.

Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 1991;55:476–511. <https://doi.org/10.1128/membr.55.3.476-511.1991>.

Fichas de agentes biológicos. n.d.

Figura. *Listeria monocytogenes*. vol. 30. 2013.

Finaliza el mayor brote de listeriosis en España - Blog sobre seguridad alimentaria. n.d. <https://www.betelgeux.es/blog/2019/11/28/finaliza-el-mayor-brote-de-listeriosis-en-espana/> (accessed June 4, 2020).

Garandeau C, Réglie-Poupet H, Dubail I, Beretti JL, Berche P, Charbit A. The sortase srtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. *Infect Immun* 2002;70:1382–90. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1382-1390.2002>.

Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:851–75. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.002>.

Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG, Portnoy DA. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2000;68:999–1003. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.999-1003.2000>.

Gilbreth SE, Call JE, Wallace FM, Scott VN, Chen Y, Luchansky JB. Relatedness of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:8115–22. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8115-8122.2005>.

Gilmour MW, Graham M, Van Domselaar G, Tyler S, Kent H, Trout-Yakel KM, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* 2010;11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-120>.

Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: A multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:423–34. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1413>.

Infecciones por *Listeria*. n.d.

Inoue T, Itani T, Inomata N, Hara K, Takimoto I, Iseki S, et al. *Listeria monocytogenes* septicemia and meningitis caused by listeria enteritis complicating ulcerative colitis. *Intern Med* 2017;56:2655–9. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8654-16>.

Jadhav S, Bhave M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 2012;88:327–41. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.01.002>.

Jalali M, Madani G, Merasi M, Metcalf D, Mirlohi M, Shamloo E. Prevalence of *Listeria*

species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. *Int J Environ Health Eng* 2015;4:1. <https://doi.org/10.4103/2277-9183.150384>.

Jamshidi A, Zeinali T. Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. *Int J Food Sci* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7835253>.

Jones GS, D’Orazio SEF. Monocytes Are the Predominant Cell Type Associated with *Listeria monocytogenes* in the Gut, but They Do Not Serve as an Intracellular Growth Niche. *J Immunol* 2017;198:2796–804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602076>.

Jonquières R, Bierne H, Fiedler F, Gounon P, Cossart P. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: A novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 1999;34:902–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01652.x>.

Kagkli DM, Iliopoulos V, Stergiou V, Lazaridou A, Nychas GJ. Differential *Listeria monocytogenes* strain survival and growth in Katiki, a traditional Greek soft cheese, at different storage temperatures. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:3621–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.01571-08>.

Kérouanton A, Marault M, Petit L, Grout J, Dao TT, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J Microbiol Methods* 2010;80:134–7. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.008>.

Khelef N, Lecuit M, Bierne H, Cossart P. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol* 2006;8:457–70. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00634.x>.

Kim JW, Siletzky RM, Kathariou S. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the Turkey processing plant environment in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:6623–30. <https://doi.org/10.1128/AEM.01282-08>.

Law JWF, Mutalib NSA, Chan KG, Lee LH. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: Principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol* 2014;5:770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>.

Leclercq A, Chenal-Francisque V, Dieye H, Cantinelli T, Drali R, Brisse S, et al. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int J Food Microbiol* 2011;147:74–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.010>.

Lecuit M. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect* 2007;9:1216–25. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.009>.

Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:430–6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01146.x>.

Lecuit M, Cossart P. Genetically-modified-animal models for human infections: The *Listeria* paradigm. *Trends Mol Med* 2002;8:537–42. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(02\)02413-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(02)02413-9).

Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, et al. A transgenic model for listeriosis: Role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* (80-) 2001;292:1722–5. <https://doi.org/10.1126/science.1059852>.

Letchumanan V, Yin W-F, Lee L-H, Chan K-G. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia. *Front Microbiol* 2015;6:33. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00033>.

Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol* 2007;118:101–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.045>.

Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Isolation and PCR amplification of a species-specific oxidoreductase-coding gene region in *Listeria grayi*. *Can J Microbiol* 2005;51:95–8. <https://doi.org/10.1139/w04-108>.

Loo Ke Yan, Vengadesh Letchumanan, Amreeta Dhanoa, Jodi Woan-Fei Law, Priyia Pusparajah, Bey-Hing Goh, Hooi-Leng Ser, Sunny Hei Won, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Kok-Gan Chan and Learn-Han Lee. Exploring the Pathogenesis, Clinical Characteristics and Therapeutic Regimens of *Listeria monocytogenes*. *Acta Scientific Microbiology* 2020, 3(3): 1-13. Doi: DOI: 10.31080/ASMI.2020.03.0531.

López V, Suárez M, Chico-Calero I, Navas J, Martínez-Suárez J V. [Foodborne *Listeria monocytogenes*: are all the isolates equally virulent?]. *Rev Argent Microbiol* 2006;38:224–34.

Madigan MT, Martinko JM; Bender KS; Buckley DH; Stahl DA. *Brock Biología de los microorganismos*. 2015. 14ª Edición. Pearson Educación, S.A., ISBN: 978-84-90352809.

Mamma C, Aleo A, Romani C, Pellissier N, Nicoletti P, Pecile P, et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy. *J Clin Microbiol* 2009;47:2925–30. <https://doi.org/10.1128/JCM.00102-09>.

Mandal PK, Biswas AK, Choi K, Pal UK. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. *Am J Food Technol* 2011;6:87–102. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.87.102>.

Martín-Fortea MP, Lambán Ibor E, Cebollada Sánchez R, Monforte Cirac ML. Bacteraemia due to *L. monocytogenes*: Description of cases and review of literature. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2020;55:50–3. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2019.05.007>.

Le Monnier A, Abachin E, Beretti JL, Berche P, Kayal S. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis by real-time PCR for the hly gene. *J Clin Microbiol* 2011;49:3917–23. <https://doi.org/10.1128/JCM.01072-11>.

Mostowy S, Cossart P. Virulence factors that modulate the cell biology of *Listeria* infection and the host response. *Adv. Immunol.*, vol. 113, Academic Press Inc.; 2012, p. 19–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394590-7.00007-5>.

Muñoz AI, Vargas M, Otero L, Díaz G, Guzmán V. 428 ARTÍCULO ORIGINAL. vol. 31.

2011.

Nightingale KK, Windham K, Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J Bacteriol* 2005;187:5537–51. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5537-5551.2005>.

Nørrung B, Andersen JK. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* 2000;30:228–32. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2000.00704.x>.

Olea A, Díaz J, Fuentes R, Vaquero A, García M. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *Rev Chil Infectol* 2012;29:504–10. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000600004>.

Oteo Juan Ignacio Alós J. *Listeria* Y LISTERIOSIS. n.d.

Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol* 2004;4:812–23. <https://doi.org/10.1038/nri1461>.

Pan Y, Breidt F, Kathariou S. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009a;75:5846–52. <https://doi.org/10.1128/AEM.00816-09>.

Pan Y, Breidt F, Kathariou S. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009b;75:5846–52. <https://doi.org/10.1128/AEM.00816-09>.

Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 2006;124:715–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>.

Pizarro-Cerdá J, Kühbacher A, Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: An updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a010009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010009>.

Pizarro-Cerdá J, Sousa S, Cossart P. Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. *Comptes Rendus - Biol* 2004;327:115–23. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2003.11.007>.

Reis O, Sousa S, Camejo A, Villiers V, Gouin E, Cossart P, et al. LapB, a Novel *Listeria monocytogenes* LPXTG Surface Adhesin, Required for Entry into Eukaryotic Cells and Virulence. *J Infect Dis* 2010;202:551–62. <https://doi.org/10.1086/654880>.

Roche SM, Gracieux P, Milohanic E, Albert I, Virlogeux-Payant I, Témoins S, et al. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6039–48. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6039-6048.2005>.

Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti JC. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol* 1992;42:171–4. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-1-171>.

Ryser ET, Marth EH. *Listeria*, listeriosis, and food safety. CRC Press; 2007.

Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, Cossart P, Bierne H. LPXTG protein InIj, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun* 2005;73:6912–22. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6912-6922.2005>.

Sánchez C. E, Castillo A, Ortega C. Infección perinatal por *Listeria*: reporte de un caso. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2001;52:199–202. <https://doi.org/10.18597/rcog.731>.

Setiani BE, Elegado FB, Perez MTM, Mabesa RC, Dizon EI, Sevilla CC. API Listeria Rapid kit for Confirmatory Fenotypic Conventional Biochemical Test of the Prevalence *Listeria Monocytogenes* in Selected Meat and Meat Products. *Procedia Food Sci* 2015;3:445–52. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.049>.

Shamloo E, Abdimoghadam Z, Nazari K, Hosseini SM, Hosseini H, Alebouyeh M. Long Term Survival of *Listeria monocytogenes* in Stress Conditions: High pH and Salt Concentrations. Undefined 2018.

Shamloo E, Hosseini H, Moghadam AZ, Larsen HM, Haslberger A, Alebouyeh M. Importance of *Listeria monocytogenes* in food safety: A review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iran J Vet Res* 2019;20:241–54.

Shen Y, Liu Y, Zhang Y, Cripe J, Conway W, Meng J, et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods in Florida. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5073–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.00435-06>.

Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 2000;103:501–10. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00141-0).

Stavru F, Archambaud C, Cossart P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: Novel insights. *Immunol Rev* 2011;240:160–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00993.x>.

Van Stelten A, Nightingale KK. Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the *Listeria monocytogenes* virulence-associated gene *inlA*. *Appl Environ Microbiol* 2008a;74:7365–75. <https://doi.org/10.1128/AEM.01138-08>.

Taxonomy browser (*Listeria*). n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1637> (accessed May 14, 2020).

Témoin S, Roche SM, Grépinet O, Fardini Y, Velge P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology* 2008;154:939–48. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011106-0>.

Torres K, Sierra S, Potou R, Carrascal A, Mercado M. PATOGENESIS DE *Listeria monocytogenes*, MICROORGANISMO ZOONOTICO EMERGENTE. *Rev MVZ Córdoba* 2005a. <https://doi.org/10.21897/rmvz.475>.

Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. (No Title). vol. 10. 2005b.

Vázquez-Boland José A., Domínguez-Bernal G, González-Zorn B, Kreft J, Goebel W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect* 2001;3:571–84. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01413-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01413-7).

Vázquez-Boland J. A., Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>.

Veiga E, Guttman JA, Bonazzi M, Boucrot E, Toledo-Arana A, Lin AE, et al. Invasive and Adherent Bacterial Pathogens Co-Opt Host Clathrin for Infection. *Cell Host Microbe* 2007;2:340–51. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.001>.

Viernes E. Descripción del brote. n.d.

Volpe Sperry KE, Kathariou S, Edwards JS, Wolf LA. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis as a tool for Subtyping *Listeria monocytogenes* strains. *J Clin Microbiol* 2008;46:1435–50. <https://doi.org/10.1128/JCM.02207-07>.

Wilson K, Keelan J. Learning from *Listeria*: The autonomy of the Public Health Agency of Canada. *CMAJ* 2008;179:877–9. <https://doi.org/10.1503/cmaj.081441>.

Wuenscher MD, Kohler S, Bubert A, Gerike U, Goebel W. The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J Bacteriol* 1993;175:3491–501. <https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3491-3501.1993>.

Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, et al. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* 2009;11:1233–40. <https://doi.org/10.1038/ncb1967>.

Zorn B, veterinaria RS-P, Abr-Jul undefined, 2009 undefined. *Listeria* y Listeriosis. n.d.