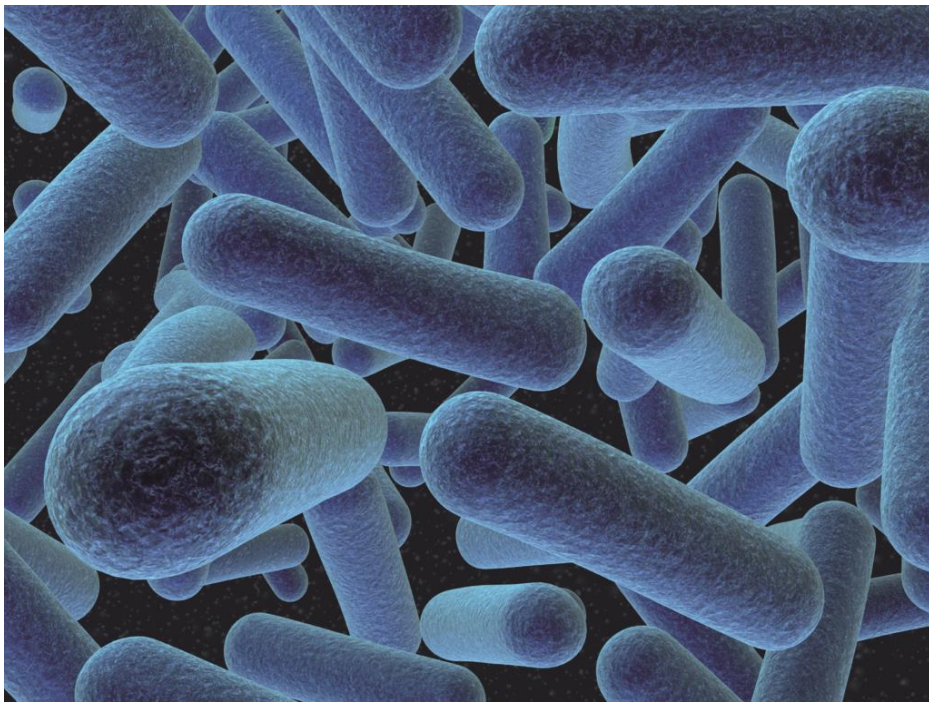




UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

**Control microbiológico de *Listeria monocytogenes* en alimentos para consumo destinado a lactantes**



María de la Paz Fernández González



**Universidad de Sevilla**

**Facultad de Farmacia**

**Grado en Farmacia**

**Trabajo Fin de Grado**

**“Control microbiológico de *Listeria monocytogenes* en alimentos para consumo destinado a lactantes”**

**Revisión Bibliográfica**

**Autora:**

**María de la Paz Fernández González**

**Tutora:**

**Eloísa Pajuelo Domínguez**

**Dpto. de Microbiología y Parasitología**

**Sevilla, 6 de julio del 2016**

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>2</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>2</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>3</b>
1. Definiciones.....	3
2. Evolución de la normativa microbiológica respecto de los alimentos para lactantes.....	4
3. Método horizontal para la detección y el recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> . Norma ISO 11290-1. Parte 1: método de detección.....	9
4. Consideraciones históricas sobre <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
5. Microbiología de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
6. Patogénesis .....	20
7. Epidemiología .....	25
8. Manifestaciones clínicas de listeriosis.....	27
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34-40</b>

## RESUMEN

La listeriosis se trata de una infección provocada por *L. monocytogenes* siendo su principal vía de transmisión, la ingestión de alimentos contaminados. Si bien la incidencia de esta enfermedad no es muy elevada, la morbilidad sí es un factor a tener en cuenta ya que cuando aparece de forma tardía en recién nacidos suele manifestarse gravemente con afectación al SNC, pudiendo provocar meningitis bacteriana en neonatos. Incluso puede llegar a contabilizarse entre un 30 y un 50% de mortalidad en estos casos.

En la mayoría de las ocasiones (aproximadamente el 95% de los casos), la listeriosis en el neonato se presenta como consecuencia de su transmisión vertical desde la madre, bien “*in utero*”, ya que este microorganismo puede atravesar la barrera placentaria, o perinatal en el momento del parto.

Pero aún se registran un 5% de los casos en los que la listeriosis aparece en lactantes de más de 6 meses, estando en este caso, su incidencia asociada ya al consumo de alimentos, por lo que el control microbiológico de los alimentos para lactantes y de usos médicos especiales es muy importante.

Este trabajo pretende revisar la normativa vigente para el análisis de los alimentos para lactantes, así como la norma que se utiliza para llevar a cabo este análisis. Por otro lado, se ha abundado en el conocimiento de la microbiología de *Listeria monocytogenes*, de su taxonomía y de la clínica, particularmente en aspectos como su vía de transmisión, patogenicidad, enfermedades producidas por este microorganismo, profilaxis y tratamiento.

**Palabras clave:** *L. monocytogenes*, listeriosis, lactantes, prueba CAMP, alimentos, taxonomía

## INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* se transmite principalmente por vía digestiva a través de los alimentos contaminados y afecta a colectivos especialmente susceptibles: ancianos y recién nacidos, mujeres gestantes y personas inmunocomprometidas; en estos colectivos la letalidad puede alcanzar el 30%.

*L. monocytogenes* se diferencia de otros patógenos por su alta capacidad de resistencia a condiciones adversas: frío (<0° C), calor (>50° C), acidez (pH>4,3) y salinidad (12% de cloruro sódico), y por presentar gran ubicuidad en el medio ambiente. Todos estos factores favorecen la contaminación de los alimentos.

Por ello, se hace necesario un control microbiológico de los alimentos, especialmente aquellos destinados a los lactantes y para usos médicos especiales, ya que como se ha comentado, estos colectivos son particularmente sensibles.

Para ello, las autoridades sanitarias han desarrollado una estricta normativa para el control microbiológico de los alimentos infantiles, que afecta tanto a toda la vida útil del producto alimenticio, como a las buenas prácticas de higiene durante el proceso de producción. Además, la inclusión de esta enfermedad entre las Enfermedades de Declaración Obligatoria en España en 2015 es otra de las estrategias encaminadas a disminuir el riesgo de esta enfermedad y sus consecuencias en lactantes.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos principales de esta revisión bibliográfica abarcan:

1. La evaluación de la normativa por la que se rige el control microbiológico de alimentos para el consumo destinado a lactantes, teniendo en cuenta su evolución mediante todas las modificaciones que ha ido presentando hasta la normativa vigente.
2. El conocimiento del método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*, en concreto la Norma ISO11290-1: método de detección. Se indicará el protocolo vigente seguido en los laboratorios para detección de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos.
3. La revisión monográfica de *Listeria monocytogenes*, incluyendo sus antecedentes históricos, morfología, pruebas bioquímicas y de identificación, taxonomía y patogenicidad.
4. La consideración de las manifestaciones clínicas de listeriosis, así como su epidemiología y tratamiento.

## **METODOLOGÍA**

La metodología seguida en esta investigación ha consistido en la búsqueda bibliográfica y en la revisión de artículos científicos y bases de datos. La gran heterogeneidad del tema y el importante número de estudios relacionados con *L. monocytogenes* ha supuesto la necesidad de centrarnos en determinados criterios que permitieran acotar la búsqueda bibliográfica, para una elaboración adecuada de este Trabajo de Fin de Grado. Puesto que el título de la revisión es “Control microbiológico de *L. monocytogenes* en alimentos para consumo destinado a lactantes”, el criterio de selección seguido para la búsqueda de la información consiste en la división de la información en tres partes diferenciadas:

Una primera parte centrada en la normativa vigente que se aplica al control microbiológico de los alimentos, para ello se ha hecho uso de:

1. El Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, para la definición de términos

2. Reglamento (CE) no 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios y sus posteriores modificaciones de 2007 y 2010.

Una segunda parte centrada en la redacción del método de detección de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos, para lo que se ha utilizado la versión oficial, en español, de la Norma ISO 11290-con sus correspondientes actualizaciones.

Finalmente, se ha abordado la microbiología de *L. monocytogenes* y las manifestaciones clínicas típicas de listeriosis. En esta parte, las principales palabras claves utilizadas para la búsqueda de información han sido: *L. monocytogenes*, listeriosis, lactantes, prueba CAMP, alimentos y taxonomía. También se han usado otras palabras claves de carácter más secundario como; neonatos, epidemiología, patogenicidad, serotipo, *Listeria* spp, meningitis bacteriana neonatal. Como fuentes de información se han utilizado fundamentalmente bases de datos de revistas científicas, entre los que destacan: Scopus, Pubmed, ScienceDirect, National Library of Medicine (MEDLINE plus), Scientific Electronic Library Online (Scielo), Elsevier y Medwave. A estos recursos he accedido principalmente mediante la Biblioteca de la Universidad de Sevilla (<http://bib.us.es/>). Además, se han consultado algunas páginas webs de organismos oficiales (NIH, CDC, Ministerio de Sanidad y Seguridad Social, Junta de Andalucía, SAS, etc.). La última fecha de consulta de algunos de ellos ha sido el 07/06/ 2016, con la intención de una recopilación adecuada, verídica y actualizada de la información requerida.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. DEFINICIONES**

Según el Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación, se entenderá por:

- Lactantes: los niños que tengan menos de doce meses.
- Preparados para lactantes: los productos alimenticios destinados a la alimentación especial de los lactantes durante los primeros meses de vida, que satisfagan por sí mismos las necesidades nutritivas de estos lactantes hasta la introducción de una alimentación complementaria apropiada.

## **2. EVOLUCIÓN DE LA NORMATIVA MICROBIOLÓGICA RESPECTO DE LOS ALIMENTOS PARA LACTANTES**

### **2.1. Normativa hasta el año 2005**

El comité científico de medidas veterinarias relacionadas con la salud pública, emitió un dictamen el 23 de septiembre de 1999 sobre la evaluación de los criterios microbiológicos para los productos alimenticios de origen animal destinados al consumo humano. Éste recomienda que los criterios microbiológicos sean pertinentes y eficaces en lo que se refiere a la protección de la salud de los consumidores. Además, el comité emitió a la vez otro dictamen sobre *Listeria monocytogenes*. En él se recomendaba como objetivo que la concentración de *Listeria monocytogenes* en los alimentos se mantuviera por debajo de 100 ufc/g y posteriormente el Comité científico de alimentación humana (SCF) respaldó estas recomendaciones en su dictamen de 22 de junio de 2000.

### **2.2. Necesidad de la adecuación a la normativa común europea: el reglamento de 2005**

La normativa microbiológica que se aplica a los alimentos listos para el consumo destinado a lactantes y a usos médicos especiales, se basa en el siguiente reglamento: REGLAMENTO (CE) n° 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Con las respectivas modificaciones posteriores por los Reglamentos CE 1441/2007 D.O.U.E. de 07/12/2007 y Reglamento 365/2010 D.O.U.E. de 29/04/2010.

Según este reglamento, uno de los objetivos fundamentales de la legislación alimentaria es asegurar un nivel elevado de protección de la salud pública. Para ello, se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Puesto que los riesgos microbiológicos de los productos alimenticios constituyen una de las principales fuentes de enfermedades de origen alimentario, dichos productos no deben contener microorganismos ni sus toxinas o metabolitos en cantidades que supongan un riesgo inaceptable para la salud humana

La principal modificación que introduce este reglamento es la necesidad de adoptar buenas prácticas de higiene y la aplicación de procedimientos basados en los principios de análisis de peligros y puntos de control críticos ( HACCP), ya que se entiende como un método preventivo que garantiza la seguridad de los alimentos y también es necesario fijar criterios microbiológicos que establezcan un límite por encima del cual, un producto alimenticio deba considerarse contaminado de forma inaceptable con los microorganismos para los que se hayan fijado los criterios. Ello implica que el productor tiene que garantizar el control microbiológico de su producto antes de que éste abandone las instalaciones del productor.

En el artículo 3 del reglamento (CE) no 2073/2005, cabe destacar como condición general, que cuando sea necesario, los explotadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación de un producto determinado realizarán estudios para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda la vida útil. Esto se debe aplicar especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *Listeria monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria.

Por otra parte, la Comisión técnica de peligros biológicos (Comisión BIOHAZ) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la cual emitió, el 9 de Septiembre de 2004, un dictamen sobre los riesgos microbiológicos en los preparados para lactantes y preparados de continuación en el que se concluyó que *Salmonella* y *Enterobacter sakazakii* son los microorganismos más preocupantes en los preparados para lactantes, preparados para lactantes destinados a usos médicos especiales y preparados de continuación. La presencia de dichos agentes patógenos en alimentos supone un riesgo considerable si hay condiciones que permiten su multiplicación. Las enterobacteriáceas, presentes más a menudo, podrían usarse como indicador del riesgo, por este motivo, la EFSA recomendó que se efectuaran controles y pruebas de enterobacteriáceas, tanto en el entorno de fabricación, como en el producto acabado. Sin embargo, además de especies patógenas, la familia de las enterobacteriáceas incluye también especies medioambientales que aparecen con frecuencia en el entorno de fabricación sin plantear ningún riesgo para la salud. Por lo tanto, la familia de las enterobacteriáceas puede usarse para la vigilancia habitual y, en caso de que se manifieste su presencia, pueden iniciarse controles de agentes patógenos específicos.

Dentro del Artículo 5 del reglamento, se desarrollan las normas específicas para las pruebas y la toma de muestras. Siendo importante resaltar que se deberán tomar muestras en las zonas de trabajo y del equipo utilizado en la producción de los productos alimenticios, cuando dicha toma sea necesaria para garantizar el cumplimiento de los criterios microbiológicos. Por lo que los explotadores de las empresas alimentarias que produzcan alimentos listos para el consumo susceptibles de plantear un riesgo de *Listeria monocytogenes* para la salud pública, deberán tomar siempre muestras de las zonas y el equipo de producción, como parte de su plan de muestro y con el fin de detectar la posible presencia de dicha bacteria. Ocurrirá lo mismo en el caso de los explotadores de las empresas alimentarias que produzcan preparados deshidratados para lactantes, o alimentos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses, y que presenten un riesgo de *Enterobacter sakazakii*. Éstos deberán controlar las zonas y el equipo de producción para detectar la presencia de enterobacteriáceas.

**REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Tablas 1 y 2).**



**Tabla 1. CAPITULO 1. Criterios de seguridad alimentaria**

Categorías de alimentos	Microorganismos/ sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras <sup>(1)</sup>		Límites <sup>(2)</sup>		Método analítico de referencia <sup>(3)</sup>	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales <sup>(4)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
1.22 Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses, tal como se contempla en los criterios para las enterobacteriáceas en el capítulo 2.2 del presente anexo.	<i>Salmonella</i>	30	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.23 Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses, tal como se contempla en los criterios para las enterobacteriáceas en el capítulo 2.2 del presente anexo.	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	Ausencia en 10 g		ISO/DTS 22964	Productos comercializados durante su vida útil

(1) n = número de unidades que componen la muestra; c = número de unidades de muestreo con valores superiores a m o comprendidos entre m y M.

(2) Para estos criterios, se entenderá que m=M.

(3) Se utilizará la última versión de la norma.

### Interpretación de los resultados

Los límites indicados se refieren a cada muestra analizada. Los resultados de las pruebas demuestran la calidad microbiológica del lote analizado, aunque también podrían utilizarse para demostrar la eficacia del procedimiento HACCP o la higiene correcta del proceso.

***L. monocytogenes***, en alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes y para usos médicos especiales:

— Se considera un resultado satisfactorio, si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria,

— Se considera un resultado insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras.

(*L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *L. monocytogenes* antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que los haya producido, cuando no pueda demostrar que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil:

— satisfactorio, si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria,

— insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras.)

**Salmonella**, en diferentes categorías de productos alimenticios:

— Se considera un resultado satisfactorio, si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria,

— Se considera un resultado insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras.

**Enterobacter sakazakii**, en preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses:

— Se considera un resultado satisfactorio, si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria,

— Se considera un resultado insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras.

**Tabla 2. CAPÍTULO 2. Criterios de higiene de los procesos**

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultado insatisfactorio
		n	c	m	M			
Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses	<i>Enterobacteriaceas</i>	10	0	Ausencia en 10 g		ISO 21528-1	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción para minimizar la contaminación. Si se detectan enterobacteriáceas en cualquiera de las muestras simples, el lote deberá analizarse para detectar <i>E. sakazaki</i> y <i>Salmonella</i>

**Interpretación de los resultados**

**Enterobacteriaceae**, en preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses:

— Se considera un resultado satisfactorio, si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria,

— Se considera un resultado insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras.

### 2.3. Modificación de la normativa de 2005: el reglamento de 2007

#### Reglamento (ce) nº 1441/2007 de la comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el reglamento (CE) no 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

En los capítulos 1 y 2 del anexo I del Reglamento (CE) nº 2073/2005 se establecen criterios de seguridad alimentaria y criterios de higiene de los procesos relativos a los preparados deshidratados para lactantes y los alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses. En el punto 2.2 del capítulo 2 de dicho anexo se establece que si al someter a prueba los preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados se detectan *Enterobacteriáceas* en cualquiera de las muestras simples, el lote deberá analizarse para detectar *Enterobacter sakazakii* y *Salmonella*.

### 2.4. Nuevo Dictamen de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

La comisión técnica de peligros biológicos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), emitió un dictamen el 24 de enero de 2007, sobre las *Enterobacteriaceas* como indicadoras de *Enterobacter sakazakii* y *Salmonella*. La conclusión a la que se llegó fue que no es posible establecer una correlación entre las *Enterobacteriaceas* y *Salmonella*, y que tampoco existe una correlación entre las *Enterobacteriaceas* y *Enterobacter sakazakii*, exceptuando algunos casos en los que sí podría establecerse. Por todo ello, no procede seguir aplicando la disposición del Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativa al análisis de preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados para detectar *Salmonella* y *Enterobacter sakazakii* en caso de detectarse *Enterobacteriáceas* en cualquiera de las muestras. Debido a esto es conveniente adaptar la parte 2.2 del capítulo 2 del anexo I del citado Reglamento, quedando de la siguiente manera (Tabla 3):

Tabla 3. Criterios para la detección de Enterobacteriáceas en preparados para lactantes

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de muestreo		límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		n	c	m	M			
Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses	Enterobacteriáceas	10	0	Ausencia en 10 g		ISO 21528-1	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción para minimizar la contaminación

*Enterobacteriáceas*, en preparados deshidratados para lactantes, alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses y preparados deshidratados de continuación:

- Se considera un resultado satisfactorio, si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria.
- Se considera un resultado insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras.

## 2.5. Nueva modificación del reglamento de 2005: adaptación a la terminología taxonómica

**Reglamento (UE) n° 365/2010 de la comisión de 28 de abril de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n o 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriáceas en la leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina.**

La modificación del anexo 1 del Reglamento (CE) n° 2073/2005 relacionada con los aspectos que estamos estudiando, consiste en un cambio en la nomenclatura de *Enterobacter sakazakii* por *Cronobacter* spp., a raíz de un reciente cambio en la taxonomía (Iversen et al., 2008). Así, el punto 1.23 de dicho Reglamento quedará sustituido por el siguiente texto (Tabla 4):

Tabla 4. Criterios para la detección de *Enterobacter sakazakii* en preparados para lactantes

Categoría de alimentos	Microorganismos/ sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras		Límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
1.23 Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes de menos de seis meses	<i>Cronobacter</i> spp. ( <i>Enterobacter sakazakii</i> )	30	0	Ausencia en 10 g	ISO/TS 22964	Productos comercializados durante su vida útil

## 3. MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y EL RECuento DE *Listeria monocytogenes*. NORMA ISO 11290-1. PARTE 1: MÉTODO DE DETECCIÓN.

Como se mencionó anteriormente en el Reglamento (CE) n° 2073/2005, el método analítico de referencia para el control de los alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales, se encuentra recogido en la norma ISO 11290-1:1996. La versión oficial en español, que fue aprobada en diciembre de 1996, se llama “Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*.” Concretamente nos centramos en la parte 1, puesto que es la que engloba el método de detección, definiéndose detección de *L. monocytogenes*, como la determinación de la presencia o ausencia de este microorganismo en una cantidad, peso o volumen, dado de producto, cuando se realizan los

ensayos de esta parte de la Norma ISO. En Octubre de 2004, se produce la primera modificación de la versión oficial en español, ISO 11290-1:1996/AM 1:2004. Concretamente la modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión. Ésta modificación complementa y modifica a la Norma UNE-EN ISO 11290-1 de noviembre de 1997. A continuación se redactará el protocolo actualizado, puesto que la Normativa vigente indica que ha de aplicarse la última versión de la Norma ISO.

Con objeto de proteger la salud del personal del laboratorio, se recomienda que las pruebas para detectar *Listeria monocytogenes* se realicen en laboratorios equipados convenientemente, bajo el control de un microbiólogo experimentado, y se aconseja tener especial cuidado con los desechos del material incubado, ya que este microorganismo pertenece al grupo de bioseguridad 2 (Public Health Agency of Canada, 2011). En particular, las mujeres embarazadas no deben manipular cultivos de *Listeria monocytogenes*.

### 3.1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta parte de la norma UNE 11290 describe el método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes* y se aplica a productos destinados al consumo humano o a la alimentación animal.

### 3.2. PRINCIPIO

La detección de *L. monocytogenes* debe efectuarse en cuatro etapas sucesivas; hay que tener en cuenta que *Listeria* spp. puede estar presente en un número pequeño y es muy frecuente que se encuentre acompañada de un mayor número de otros géneros, siendo necesario, por tanto, un enriquecimiento selectivo.

3.2.1 Enriquecimiento primario en un medio líquido de enriquecimiento selectivo con concentración reducida de agentes selectivos (Caldo Fraser a media concentración).

Inocular un medio de enriquecimiento selectivo primario conteniendo un volumen de cloruro de litio y la mitad del volumen de ácido nalidíxico y acriflavina. Incubación de la muestra para ensayo a 30° C durante 24 h. Este enriquecimiento con una concentración reducida de inhibidores se utiliza en parte, para detectar *Listeria* spp, dañadas.

3.2.2 Enriquecimiento secundario en un medio líquido de enriquecimiento selectivo con agentes selectivos (Caldo Fraser).

Inocular el cultivo obtenido en el apartado 2.1 en un medio líquido de enriquecimiento secundario (caldo Fraser) y posterior incubación a 35°C o 37°C durante 48 h.

### 3.2.3 Siembra en placa e identificación

De los cultivos obtenidos en los apartados 2.1 y 2.2, se siembra en placa con dos medios sólidos selectivos:

- Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (ALOA). ALOA, es un ejemplo de medio apropiado disponible comercialmente, se permite el uso de otros medios con la misma formulación. Las colonias de *L. monocytogenes* se aprecian verde-azuladas rodeadas de un halo opaco. Hay veces que presentan un halo muy débil en los casos de estrés, particularmente en caso de estrés ácido. Tras la incubación a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \text{ h} \pm 3\text{h}$ , se observa el crecimiento en las placas, si éste es escaso o si no se observan colonias, se vuelven a incubar durante  $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$  más.
- Cualquier otro medio sólido selectivo a elección del laboratorio y que sea complementario al Agar Listeria según Ottaviani y Agosti, tal como Oxford o PALCAM. Transcurrido el tiempo de incubación adecuado, se examina para comprobar la presencia de colonias y considerar si son *Listeria* spp. o *Listeria monocytogenes*, según sus características y el medio utilizado. En caso de utilizarse Agar OXFORD, las colonias de *L. monocytogenes* incubadas durante 24 h serían pequeñas (1mm), de coloración grisácea rodeada de halos negros. Después de 48 h pueden adquirir un brillo verdoso con diámetro de 2 mm y se mantienen halos negros con centros hundidos. En Agar PALCAM, el crecimiento de *Listeria* spp, después de 24 h, se da en forma de pequeñas colonias de coloración grisácea verde o verde oliva. El diámetro es de 1.5 a 2 mm con halos negros siempre. Tras 48 h, las colonias se muestran verdes, del mismo tamaño, con depresión central y rodeadas del halo negro (Leclercq, 2004).

### 3.3. CONFIRMACIÓN DE *LISTERIA* SPP

Para la confirmación tomar de cada placa de cada medio selectivo cinco colonias sospechosas de ser *Listeria* spp. Si en una de las placas hubiera menos de cinco colonias presuntivas se toman todas ellas. Se plaquean en nuevo medio TSA y se incuban a  $35^{\circ} \text{C}$  o  $37^{\circ} \text{C}$  durante 18 h o 24 h. Las pruebas que se mencionan a continuación deben realizarse a partir de cultivos puros en TYSEA.

3.3.1 Prueba de iluminación de Henry, no es siempre necesaria. Consiste en iluminar las colonias con luz blanca de forma oblicua en un ángulo de  $45^{\circ}$ . Bajo esta luz, las colonias se observan de un tono azulado y con la superficie rugosa.

3.3.2 Tinción de Gram

Efectuar la tinción en una colonia separada. *Listeria* spp, se observará como bacilos cortos y estrechos Gram positivos (Figura 1, A).

### 3.3.3 Reacción de la catalasa

Tomar una colonia separada de las placas mencionadas anteriormente y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos. La formación inmediata de burbujas de gas, correspondientes al O<sub>2</sub> desprendido tras la descomposición del agua oxigenada, indicará que la reacción es positiva.

### 3.3.4 Prueba de la movilidad

Se toma una colonia aislada y se suspende en un tubo conteniendo TSYEB. Se incuba a 25 ° C de 8 h a 24 h hasta que el medio se vuelva turbio. A continuación, se debe depositar una gota del cultivo en un portaobjetos de vidrio, mediante un asa, colocar un cubreobjetos y examinarlo en el microscopio. *Listeria* spp. aparecerá como bacilos cortos y estrechos con movilidad. La movilidad también se puede observar en medio semisólido a 22° C en forma de paraguas (Figura 1).

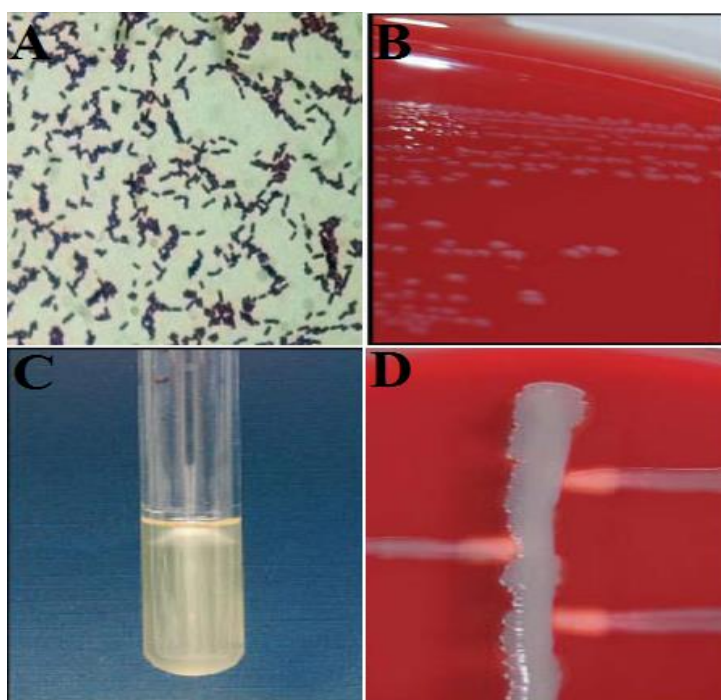


Figura 1. Pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes*. A. Tinción de Gram, se observan bacilos cortos Gram positivos. B. Aspecto de las colonias en agar sangre. C. Movilidad de *Listeria* en paraguas a 22°C. D. Prueba CAMP.

## 3.4. CONFIRMACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

3.4.1 Ensayo de hemólisis: Si la reacción de la catalasa y las características morfológicas y fisiológicas son indicativas de existencia de *Listeria* spp., se inoculan las placas de agar sangre de cordero, (Figura 4, B) para determinar la reacción hemolítica. Antes de usar dichas placas se debe secar la superficie del agar. A continuación toma una colonia aislada del punto 3, se siembra y se hace una punción para cada cultivo mediante un alambre. Al mismo tiempo se

deben sembrar controles positivos (*L. monocytogenes*) y negativos (*L. innocua*). Después de la incubación a 35 ° C o 37 ° C durante 24 h ± 2 h, examinar las cepas control y las muestras bajo una luz brillante.

*L. monocytogenes*: aparece como zonas aclaradas y estrechas ( $\beta$ -hemólisis).

*L. innocua*: no muestra zonas claras alrededor de la siembra.

*L. seeligeri*: muestra zonas de hemólisis débiles.

*L. ivanovii*: generalmente muestra zonas anchas claramente delineadas de  $\beta$ -hemólisis.

La reacción hemolítica también puede realizarse empleando glóbulos rojos de sangre de carnero. Se dispersa la colonia en 150  $\mu$ l de TSYEB, se incuba a 37 ° C durante 2 h. A continuación, se añaden 150  $\mu$ l de la suspensión de glóbulos rojos y luego se incuba de nuevo a 37° C de 15-60 min. Finalmente se refrigera a 3 ° C ± 2 ° C durante 2 h aproximadamente y se examina si hay actividad hemolítica.

### 3.4.2 Utilización de carbohidratos

Inocular cada caldo de carbohidratos con un cultivo en TSYEB mediante un asa. Incubar a 35 o 37 ° C hasta 5 días. La reacción positiva vendrá indicada por una coloración amarilla con la formación de ácido y tiene lugar en 24-48 h.

### 3.4.3 Prueba CAMP

Sembrar en forma de líneas rectas cultivos tanto de *Staphylococcus aureus* como de *Rhodococcus equi* en placas de agar sangre de cordero. De manera que los cultivos sean paralelos y opuestos. El inóculo debe ser homogéneo y fino, (Figuras 1.D y 2) que se consigue utilizando un asa de inoculación o alambre en ángulo recto al agar. A continuación, sembrar las cepas a analizar aisladas del punto 3 de forma similar en ángulo recto a los cultivos, es decir, sembrar a la vez cultivos control de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, y *L. ivanovii* en dicha placa, de tal forma que no se toque con *S. aureus* y *R. equi*. y estén separados como mínimo de 1 mm a 2 mm. (Figura 2).

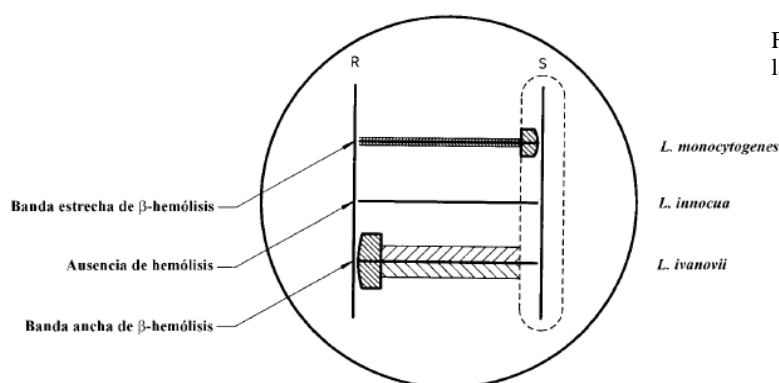


Figura 2. Inóculo e interpretación de las placas del ensayo de CAMP



Incubar las placas a 35 ° C o 37 ° C durante 18 h a 24 h. La reacción se considera positiva con la presencia de una zona de beta-hemólisis acentuada en la intersección de la cepa ensayada con cada uno de los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la prueba CAMP para *Listeria monocytogenes* respecto de *Rhodococcus equi* y *Staphylococcus aureus*.

Especie	Reacción positiva	Reacción negativa
<i>R. equi</i>	“Hemólisis ancha en forma de cabeza de flecha” (5-10 mm)	Hemólisis débil se extiende alrededor de 1 mm de la intersección entre la cepa ensayada y la zona de difusión de <i>R. equi</i> .
<i>S. aureus</i>	Zona pequeña de hemólisis extendiéndose alrededor de 2 mm de la cepa ensayada y dentro de la zona de hemólisis débil debido a <i>S. aureus</i> . Con <i>L. monocytogenes</i> , no se dan zonas amplias de hemólisis.	No hay hemólisis

Sin embargo, la identificación de especies de *Listeria* por métodos bioquímicos es un proceso laborioso y costoso, que implica aislamiento primario con medios selectivos y de enriquecimiento, seguido de tinción de Gram y pruebas bioquímicas múltiples (Liu, 2006). La incorporación de diversos procedimientos bioquímicos en una única plataforma de pruebas ha simplificado el proceso de diagnóstico para las especies de *Listeria*. Cabe destacar la prueba API, que se trata de una técnica específicamente diseñada para el aislamiento e identificación de las especies de dicho género (Allerberger, 2003) (Figura 3). El método se emplea sobre todo en el aislamiento e identificación de las distintas especies de determinadas muestras de agua o alimentos contaminados, de una manera rápida y fiable (Farouk y cols., 2015).

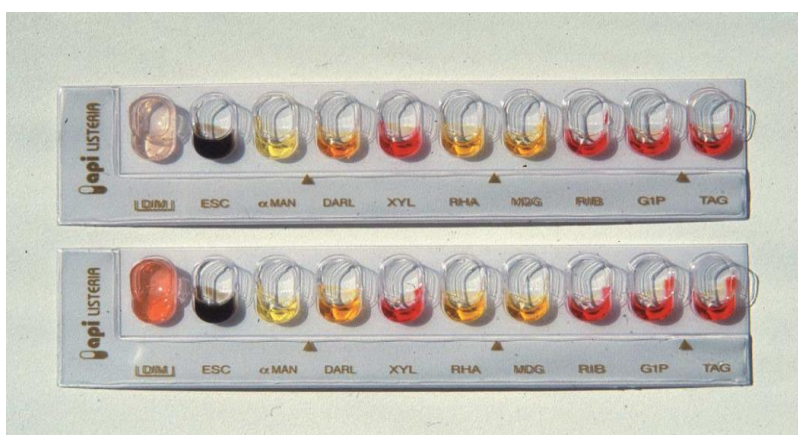


Figura 3. Test de la prueba Api Listeria. Distinción entre *L. monocytogenes* (arriba) y *L. innocua* (abajo). (Allerberger, 2003).

Los procedimientos de identificación de la técnica API, consisten en diez pruebas (Allerberger, 2003). Se trata de una tira o microtubo, que contiene 10 pocillos, en cada uno de los cuales tiene lugar una de las siguientes reacciones (Tabla 6):

La diferenciación entre *L. innocua* y *L. monocytogenes* basado en la presencia o la ausencia de arilamidasa, (prueba DIM), la hidrólisis de esculina, la presencia de ox-manosidasa, y la producción de ácido a partir de D-arabinosa, D-xilosa, L-ramnosa, alfa-metil-D-glucósido, D-ribosa, glucosa-1- fosfato, y D-tagatosa.

Tabla 6. Identificación de *Listeria* basada en el test API (Farouk y cols., 2015).

Test	Active ingredients	QTY (mg cup <sup>-1</sup> )	Reactions	Results (ZYM B/ $\leq$ 3 min)	
				Negative	Positive
DIM	Enzymatic substrate	0.106	Differentiation <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	Pale orange Pink beige Grey beige	Orange
ESC	Esculin	0.16	Hydrolysis (ESCulin)	Pale yellow	Black
	Ferric citrate	0.024			
$\alpha$ MAN	4-nitrophenyl- $\alpha$ D-mannopyranoside	0.045	$\alpha$ -MANnosidase	Colorless	Yellow
DARL	D-arabitoL	0.40	Acidification (D-ARabitoL)	Red/orange-red	Yellow/ yellow- orange
XYL	D-Xylose	0.40	Acidification (XYLose)		
RHA	L-Rhamnose	0.40	Acidification (RHAmnose)		
MDG	Methyl- $\alpha$ D-glucopyranoside	0.40	Acidification (Methyl- $\alpha$ D-Glucopyranoside)		
RIB	D-Ribose	0.40	Acidification (RIBose)		
G1P	Glucose-1-Phosphate	0.40	Acidification (Glucose-1-Phosphate)		
TAG	D-Tagatose	0.40	Acidification (TAGATOSE)		

Se obtienen inóculos bacterianos a partir de colonias aisladas con una pipeta y se suspende en 2 ml del medio de suspensión API (McFarland). En la caja de incubación, existen unos pocillos en los que deben distribuirse 3 ml de agua destilada para crear una atmósfera húmeda. A continuación, la tira se retira de su embalaje, se coloca en la bandeja y se inocula la suspensión bacteriana en los pocillos. Finalmente ésta se incuba 18-24 horas a 37 ° C en condiciones aerobias. Los Resultados de la reacción se determinan de acuerdo a cambios de color funcionales que actúan como indicadores. La interpretación de los resultados es fácil y se realiza en función de las instrucciones del fabricante (Figura 3), (Farouk y cols., 2015). De esta manera se consigue la identificación y determinación de las especies del género *Listeria*, entre un gran número de microorganismos y con cantidades mínimas de material y mano de obra. Además de la obtención de unos resultados fiables 24 horas después de la incubación. Debido a esto, la técnica API, es rápida y barata. Por lo tanto, parece ser una buena herramienta para la práctica habitual de muchos laboratorios, especialmente aquellos relacionados con la microbiología presente en los alimentos y en el medio ambiente (Bille y cols., 1992).

### 3.5. CONFIRMACIÓN DEFINITIVA

Las cepas que se consideran *L. monocytogenes*, se pueden enviar a un laboratorio de referencia para *Listeria* para determinar el tipo serológico o incluso el tipo lisogénico. El envío debe ir acompañado con la información de las cepas disponible.

### 3.6. CULTIVOS CONTROL

Son necesarios para determinar la capacidad de los medios de enriquecimiento e identificación de permitir el crecimiento selectivo de *L. monocytogenes*. Se debe proceder con los frascos control de la misma forma que con los cultivos analizados para demostrar que los cultivos de control positivos se recuperan.

### 3.7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se debe registrar la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la porción ensayada, especificando la masa en gramos o el volumen en mililitros de la muestra analizada.

### 3.8. PRECISIÓN DEL MÉTODO

Se han seleccionado características de rendimiento, que son eficacia, conformidad y concordancia. Estas características se determinaron empleando tres tipos de alimentos contaminados a varios niveles y con materiales de referencia.

3.8.1 Eficacia: porcentaje de muestras identificadas correctamente.

- Muestras positivas: la eficacia se denomina sensibilidad, es el porcentaje de muestras correctamente identificadas como positivas. Se asume que todas las muestras positivas contienen el organismo.
- Muestras negativas: la eficacia se denomina especificidad, es el porcentaje de muestras correctamente identificadas como negativas.

Valores globales: Para la indicación general de sensibilidad (Se) y de especificidad (Sp), pueden utilizarse los siguientes valores cuando se analizan muestras de alimentos en general; Sp= 97.4%, Se=85.2%. Según estos valores puede interpretarse que una muestra que contiene *L. monocytogenes* debe reconocerse como positiva en el 85.2% de los casos si es analizada con este método.

3.8.2 Conformidad: La conformidad es la posibilidad, expresada en porcentaje, de encontrar el mismo resultado en dos porciones de análisis idénticas, analizadas en el mismo laboratorio, en condiciones de repetibilidad (mismo técnico, mismo aparato, mismos reactivos), en el menos tiempo posible. Por ejemplo, los dos positivos o los dos negativos.

Valores globales: Para la indicación general de la conformidad (Ac), se utiliza el siguiente valor; Ac: 88.7%. Según este valor si dos porciones para análisis idénticas de una muestra que contiene *L. monocytogenes*, son analizadas por el mismo técnico en un período corto de tiempo y con exactamente las mismas condiciones operativas, hay un 88.7 % de posibilidades de obtener el mismo resultado para ambas porciones. (Presencia de *L. monocytogenes*).

3.8.3 Concordancia: Es la posibilidad, expresada en porcentaje, de encontrar el mismo resultado para dos muestras idénticas analizadas en dos laboratorios distintos. La concordancia.

Valores globales: Para la indicación general de la concordancia (Cc), puede utilizarse el siguiente valor: Cc=84.4 %. Según este valor, si dos porciones para análisis idénticas de una muestra que contiene *L. monocytogenes* son analizadas por dos laboratorios hay un 84.4 % de posibilidades de obtener el mismo resultado para ambas porciones del análisis (Presencia de *L. monocytogenes*).

### 3.9. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá especificar el método utilizado, las temperaturas de incubación y los resultados obtenidos, además de cualquier incidente que haya podido influenciar los resultados. En definitiva, deberá incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

## 4. CONSIDERACIONES HISTÓRICAS SOBRE *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes*, es una bacteria que debe su nombre a Joseph Lister (1872-1912) considerado uno de los padres de la microbiología, junto a Kock y Pasteur (Ledermann, 2008). No obstante, la bacteria fue descubierta 14 años después de su muerte (1926) por Murray, Webb y Swann, microbiólogos de la Universidad de Cambridge, quienes la aislaron de conejos y conejillos de indias de laboratorio y llamaron a este nuevo agente *Bacterium monocytogenes*, debido a la monocitosis que causó en aquellos animales. (Murray y cols., 1926). Respecto a la relación del género con Lister, la bacteria fue bautizada en honor de Lister por James Hunter Harvey Pirie (1877- 1965), bacteriólogo y geólogo escocés, que identificó también la bacteria un año más tarde (1927) y la denominó como *Listerella hepatolytica* (Pirie, 1927; 1940). Con

el tiempo varios investigadores fueron aislando la misma bacteria y le dieron diferentes nombres, lo que causó cierta confusión en cuanto a la nomenclatura de la misma. EL problema fue resuelto en 1957 por el alemán Heinz Seeliger, conocido taxónomo, quien en honor a Lister impuso el nombre *Listeria monocytogenes*. Esto fue aprobado por la Comisión Judicial de Nomenclatura bacteriológica y Taxonomía (Anon, 1954). El epíteto específico *monocytogenes* alude a la monocitosis que causa.

## 5. MICROBIOLOGÍA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

*Listeria monocytogenes* se trata de un bacilo pequeño, regular y corto (Figura 4), de aproximadamente 0,4 por 1 a 1,5  $\mu\text{m}$  (Collins y cols., 1991; Vazquez-Boland y cols., 2001) con lados paralelos y extremos romos. Tiene un bajo contenido en G+C (37-42%) (Sallen y cols., 1996; Allerberger, 2003; Liu, 2006) Es una bacteria Gram-positiva, no esporulada y móvil, ya que posee flagelos peritricos. Puede formar pequeñas colonias de color blanco grisáceo, que están rodeadas de una delgada zona de hemólisis.

*Listeria monocytogenes* está ampliamente distribuida en la naturaleza, es una bacteria ubicua y ha sido aislada de diversas fuentes ambientales, como suelos, polvo, en la vegetación en descomposición, en aguas, alcantarillado, incluso en alimentos para animales, desde donde se incorpora a la cadena alimentaria y pasa a formar parte de la flora fecal de muchos mamíferos, entre ellos, la de seres humanos adultos sanos (Vazquez-Boland y cols., 2001; Orsi y cols., 2011). Presenta gran resistencia a las condiciones adversas del ambiente, debido a que es un microorganismo anaerobio facultativo, puede encontrarse en un amplio rango de pH, entre 4,3 y 9,1 y a elevadas concentraciones de NaCl 12% (w / v). Además, la bacteria es capaz de crecer en un intervalo de  $<0^{\circ}\text{C}$  y  $>50^{\circ}\text{C}$ , el cual, incluye la temperatura de refrigeración ( $4-10^{\circ}\text{C}$ ). (Olivares R, 2009). Esto la ha llevado a ser reconocida como una de las principales bacterias patógenas transmitidas por los alimentos y ha generado una preocupación particular con respecto a la manipulación de los mismos (Mraheil y cols., 2013; McLauchlin y cols., 2014).



Figura 4. Morfología de *Listeria monocytogenes* observada al microscopio electrónico de barrido.

## 5.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las especies de *Listeria* comparten características morfológicas y bioquímicas estrechamente relacionadas. Algunas de estas características comunes, que se han utilizado para la diferenciación de las distintas especies de *Listeria* de otras bacterias, son: reacción de catalasa positiva, prueba de Indol y oxidasa negativa, hidrólisis de esculina, pero no urea. Por otro lado, *Listeria spp.* poseen propiedades bioquímicas distintas que permiten la distinción entre especies patógenas y no patógenas de *Listeria*, como pueden ser: variabilidad en su capacidad para fermentar L-ramnosa, D-xilosa, y alfa-metil-D-manopiranosido y también, actividades hemolítica, lecitinasa, y la fosfolipasa C (Liu, 2006).

Por ejemplo, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se diferencian de otras especies de *Listeria* ya que muestran variaciones significativas en su capacidad de producción de una amplia, clara o doble zona de hemólisis en agar sangre de caballo u oveja, y entre ellas en la capacidad de producir ácido a partir de L-ramnosa, D-xilosa y alfa-metil-D-manósido (Ermolaeva y cols., 2003). Del mismo modo, *L. innocua* y *L. welshimeri* se distinguen de *L. monocytogenes* por su beta hemólisis negativa y sus características de fermentación (Robinson y cols., 2000). Además, *L. ivanovii* se distingue de *L. monocytogenes* por su fuerte reacción lecitinasa con o sin carbón vegetal en el medio, en comparación con *L. monocytogenes*, lo que requiere carbón para su reacción lecitinasa (Ermolaeva y cols., 2003).

En cuanto a la prueba CAMP, *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* dan positivo con *Staphylococcus aureus* y negativo en la prueba CAMP con *Rhodococcus equi*; a diferencia de *L. ivanovii* que da una prueba CAMP positiva con *R. equi* y prueba CAMP negativa con *S. aureus*. Todas los demás *Listeria* especies son prueba CAMP negativo (McLauchlin y cols., 2014).

Tabla 7. Interpretación de las propiedades morfológicas y fisiológicas y de las reacciones bioquímicas para identificación de *Listeria spp.*

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		Ensayo de CAMP	
		Rhamnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi subsp. murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: Reacción variable  
 (+): Reacción débil  
 +: > 90% de reacciones positivas  
 -: sin reacción

## 5.2. TAXONOMÍA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

El Género *Listeria* pertenece a la familia *Listeriaceae*, a su vez ésta, se encuentra dentro de la clase *Bacilli* y del phylum *Firmicutes*. Actualmente el género cuenta con 17 especies distintas (Tabla 8) descritas hasta la fecha. Dos de ellas se consideran especies patógenas, *Listeria monocytogenes*, patógeno para el hombre y *L. ivanovii*, patógena para animales, principalmente bovinos y rumiantes pequeños y rara vez afecta al hombre. Además de especies no patógenas que incluyen *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtae*, *L. fleischmannii* y *L. weihenstephanensis* (Guillet y cols., 2010) y siete nuevas especies como *L. riparia*, *L. aquatica*, *L. grandensis*, *L. floridensis*, *L. cornellensis*, *L. booriae* y *L. newyorkensis*.

Tabla 8. Especies descritas dentro del género *Listeria* hasta la fecha.

ESPECIES	REFERENCIAS
<i>L. monocytogenes</i>	(Murray y cols., 1926; Pirie, 1940)
<i>L. ivanovii</i>	(Seeliger y cols., 1984)
<i>L. seeligeri</i>	(Rocourt, Grimont., 1983)
<i>L. innocua</i>	(Bubert y cols., 1992)
<i>L. welshimeri</i>	(Rocourt, Grimont, 1983)
<i>L. grayi</i>	Rocourt y cols., 1992
<i>L. marthi</i>	(Graves y cols., 2010)
<i>L. rocourtae</i>	(Leclercq y cols., 2010)
<i>L. fleischmannii</i>	(Bertsch y cols., 2012)
<i>L. weihenstephanensis</i>	(Lang y cols., 2012)
<i>L. riparia</i>	(Den Bakker y cols., 2014)
<i>L. aquatica</i>	(Den Bakker y cols., 2014)
<i>L. grandensis</i>	(Den Bakker y cols., 2014)
<i>L. floridensis</i>	(Den Bakker y cols., 2014)
<i>L. cornellensis</i>	(Den Bakker y cols., 2014)
<i>L. booriae</i>	(Weller y cols., 2015)
<i>L. newyorkensis</i>	(Weller y cols., 2015)

## 6. PATOGÉNESIS

Como mencionamos anteriormente, *Listeria monocytogenes* se encuentra de forma natural en la capa superficial del suelo rico en materia vegetal en descomposición. A partir de este hábitat, ganan acceso al huésped vertebrado a través de la vía oral, utilizando alimentos contaminados

como vehículo (Vazquez-Boland y cols., 2001), por tanto, el tracto gastrointestinal es el primer sitio de entrada de este microorganismo al hospedador. La bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hemato-encefálica y placentaria (Figura 5). 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 alcanza el hígado y el bazo, donde puede replicarse en el interior de macrófagos o células epiteliales. Si la replicación de *L. monocytogenes* no es controlada por una efectiva respuesta inmune innata, la bacteria escapa y continúa replicándose. 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 y cols., 2011).

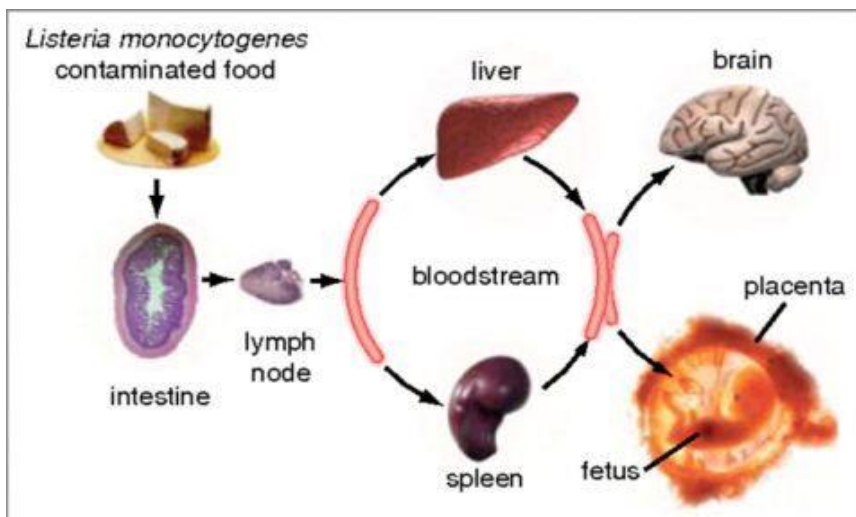


Figura 5. Mecanismo de infección de *Listeria monocytogenes*. A través de los alimentos contaminados, *L. monocytogenes* llega al tracto gastrointestinal y pasa al torrente sanguíneo, desde dónde las bacterias alcanzan el hígado y el bazo. Pueden verse afectados tanto el cerebro como la placenta, causando listeriosis.

## 6. 1 CICLO INTRACELULAR DE *L. MONOCYTOGENES*

El proceso de infección comprende varias etapas, en las que están involucrados múltiples factores de virulencia (Chen y cols., 2009; Témoín y cols., 2008).

**1. Adhesión e invasión de la célula hospedadora.** Para ingresar al medio intracelular *Listeria* utiliza dos proteínas de invasión que son InlA y InlB, codificadas por los genes *inlA* e *inlB*, respectivamente. Se tratan de proteínas de superficie conocidas como *Invasinas* o *Internalinas A* y *B*, que interactúan con dos receptores celulares de transmembrana:



·) **E-Caderina**, en el caso de **Internalina A**, la proteína E-Caderina tiene un papel muy importante en las uniones intercelulares. Se sabe que cuando se producen fenómenos de remodelación en la vellosidad intestinal esta proteína queda expuesta en la superficie del lumen, donde se encuentra *Listeria*; en ese momento se produce la interacción entre Internalina A y E-Caderina, que culmina en la fagocitosis de la bacteria (Pizarro-Cerdá, Cossart, 2006; Bonazzi y cols., 2009).

·) **Tirosin-kinasa Met-c**, en el de **Internalina B**; esta proteína tendría un rol en el paso de *Listeria* a través de la barrera hematoencefálica.

Ambas interacciones favorecen la entrada de la bacteria mediante fagocitosis por las células hospedadoras del **epitelio intestinal** y se traslada de célula en célula sin exponerse al ambiente extracelular (Shen y cols., 2000).

**2. Escape de la vacuola.** Una vez en el interior de la célula *Listeria* expresa la proteína Listeriolisina O, responsable de su capacidad de invasión y virulencia, ya que 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 hacia el citoplasma. (Gedde y cols., 2000).

**3. Multiplicación intracelular.** Después de la replicación, se induce la polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria, denominados filopodios; este proceso es dirigido por la proteína ActA. Se produce la formación de una estructura semejante a una cola de cometa que facilita el movimiento intracelular, permitiendo la invasión de nuevas células. (Liu y cols., 2007).

**4. Proliferación extracelular.** Cuando alcanza las fronteras celulares es capaz de inducir una fagocitosis por parte de otra célula vecina, lo que permite que el ciclo se repita mientras la bacteria se mantiene oculta para el sistema inmunológico (Figura 6).

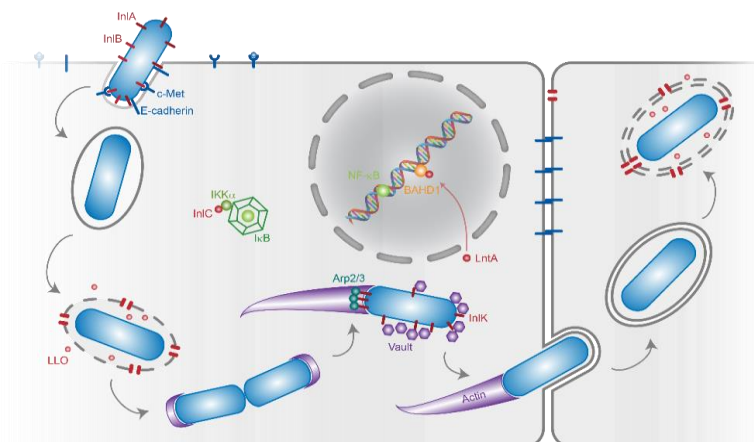


Figura 6. Esquema del ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes*. Con entrada en la célula hospedera, supervivencia dentro de la vacuola fagocítica, disrupción de las membranas del fagosoma y escape al citosol; replicación en el citosol, movimiento a través de la polimerización de actina, propagación célula-célula, supervivencia en fagosomas secundarios, escape del fagosoma secundario y reinicio del ciclo. (Pizarro-Cerdá y cols., 2004).

Desde el punto de vista inmunológico, *Listeria* es el modelo clásico para estudiar la respuesta inmune innata y adaptativa a organismos intracelulares. La respuesta innata es inmediata e involucra a monocitos y macrófagos, los que producen interleuquinas (IL-1, IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), que produce reclutamiento celular, principalmente de neutrófilos. (Posfay-Barbe, Wald, 2009). A esta reacción inicial le sigue la respuesta inmune adaptativa, que llega a su máximo una semana después de la infección y se ejerce a través de los linfocitos T CD8 (+). Esta respuesta tiene dos objetivos principales: generar lisis de las células afectadas e inducir la producción de interferón (INF) gamma, que evita la diseminación de la bacteria y controla la replicación. La eliminación de *Listeria monocytogenes* se atribuye a una respuesta de células Th 1; el INF gamma es un promotor de este tipo de respuesta y además inhibe la expansión de las células Th 2 (Olivares, 2009).

## 6. 2 FACTORES DE VIRULENCIA

*L. monocytogenes* se caracteriza por tener una alta heterogeneidad en la virulencia. Gran parte de las cepas son virulentas y capaces de producir alta mortalidad; en cambio existen otras que son avirulentas e incapaces de establecer una infección dentro del hospedador. Las diferencias en la virulencia entre las cepas de *L. monocytogenes* pueden deberse a polimorfismos en las secuencias nucleotídicas de estos genes, debido a mutaciones puntuales y/o la presencia o ausencia de algún gen de virulencia. (Olier y cols., 2002). Los genes de virulencia de *Listeria spp.*, como en otras bacterias patógenas, se codifican a nivel de cromosoma y están en su mayoría organizados en unidades discretas genéticas conocidas como islas de patogenicidad (PAIS). Estas son adquiridas por las bacterias a través de transferencia de genes como parte de elementos genéticos móviles, y por consiguiente juegan un papel clave en la evolución de virulencia bacteriana. (Hacker y cols., 1997; Hacker, Kaper, 2000). De hecho, los genes de virulencia *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*, se encuentran en una isla de patogenicidad de 9 Kb del cromosoma, llamada LIPI-1, presente en *L. monocytogenes* y *L. vanovii*. Los genes *inlA* y *inlB* no se encuentran codificados en LIPI-1, sino que se han asociado a islotes genéticos, los cuales también han sido identificados en otras especies de *Listeria*. LIPI-1 se encuentra insertada, establemente, en el cromosoma, en la misma posición en todas las especies. (Vazquez-Boland y cols., 2001) (Figura 7).

La proteína PrfA, es la encargada de la regulación de los genes de virulencia *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, y *hpt*, la cual, está presente en todas las cepas de *L. monocytogenes* y se involucra directamente en la expresión de los genes, pudiendo actuar como un activador o represor de los mismos. Este mecanismo de control mediado por PrfA es el más importante, ya que es requerido en la regulación de los factores de virulencia involucrados durante la transición de la bacteria desde el medio ambiente, dónde vive como saprófito a un estilo de vida como

parásito intracelular. El gen *prfA* está ausente en *L. innocua* y *L. welshimeri*; sin embargo, está presente, pero silenciado, en *L. seeligeri* (De las Heras y cols., 2011).

Además se ha identificado una regulación a nivel transcripcional (expresión del promotor), traduccional (ARN termosensor) y post-traduccional (activación de PrfA) (Scorti y cols., 2007).

Por tanto, la relación de ambos permite una regulación precisa de los genes de virulencia necesarios para que *L. monocytogenes* se desarrolle al interior de la célula y, además, previene que la bacteria gaste energía en la producción de factores de virulencia que no son necesarios cuando este microorganismo se encuentra fuera del hospedador. No obstante, PrfA es el mecanismo de control más importante y el cual es requerido para la expresión de los factores de virulencia esenciales para el ciclo intracelular (Vera y cols., 2013) (Figura 7).

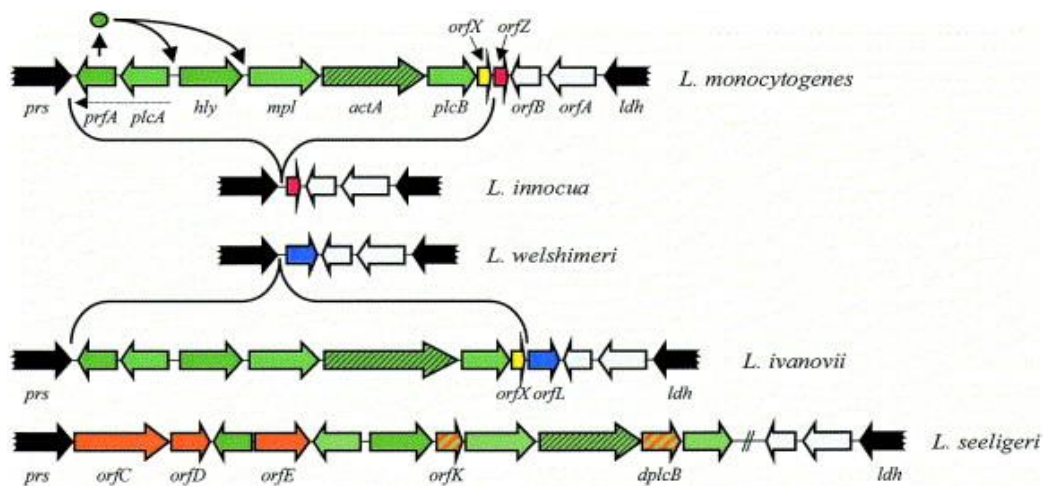


Figura 7. Estructura genética de la región cromosómica de la agrupación de genes de virulencia (LIPI-1) en *Listeria spp.* Los genes pertenecientes a LIPI-1 están en verde. Podemos ver que las especies que tienen la agrupación de genes de virulencia son las que poseen la capacidad patogénica, (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*) sin embargo, las especies no patógenas (*L. innocua* y *L. welshimeri*) presentan delección de dicha región. *L. seeligeri*, tampoco cuenta con la isla de patogenicidad, ya que está modificada por inserción. (Vazquez-Boland y cols., 2001).

### 6. 3 SEROTIPOS INFECCIOSOS

La tipificación serológica se trata de un método que permite diferenciar las distintas cepas de *L. monocytogenes*, esta técnica se utiliza para determinar la prevalencia de serotipos específicos en análisis epidemiológicos de Listeriosis. Se basa en la detección de antígenos somáticos y flagelares mediante antisueros polivalentes y monovalentes. Esto ha permitido caracterizar la especie de *L. monocytogenes* en 13 serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Seeliger, Höhne, 1979; Allerberger, 2003)

Según la estructura filogenética de *L. monocytogenes*, encontramos tres divisiones genéticas, que se representan por tres linajes: el linaje I contiene serotipos 4b, 1/2b, 3b, 4d, 4e y 7; dentro

de este linaje se encuentran todas las cepas epidémicas de brotes y casos de listeriosis humanas clínicas y transmitidas a través de los alimentos (Tabla 9). El linaje II, serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; contiene aislamientos de casos en humanos y en animales y el linaje III incluye tres grupos, IIIA, IIIB y IIIC y los serotipos 4a, 4c y 4b, este linaje está asociado con aislamiento de animales (Ragon y cols., 2008; Velge, Roche, 2010).

Tabla 9. Serotipos más destacados pertenecientes a las diferentes especies de *Listeria*

Especie	Serovariedad
<i>L. monocytogenes</i>	½a, ½b, ½c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, In <sup>a</sup>
<i>L. weishimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	½b, 4c, 4d, 6b, In

Se ha observado que los serotipos de *L. monocytogenes* 1 / 2a, 1 / 2b y 4b son los principales responsables del 98% de los casos documentados de listeriosis en humanos (Jacquet y cols., 2002; Chen y cols., 2007; Allerberger, Wagner, 2010). Los análisis de rutina de tipificación serológica de *L. monocytogenes* con el método tradicional de aglutinación, tienen sus limitaciones por coste elevado, aseguibilidad, disponibilidad de los sueros, buena calidad en su preparación y experiencia técnica para efectuar el ensayo; estos factores hacen que la reproducibilidad de la serotipificación no sea siempre sea satisfactoria. Por esto se utiliza el método de PCR múltiple para diferenciar cuatro principales serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, como método alternativo de la tipificación serológica de *Listeria* (Doumith y cols., 2004; Doumith y cols., 2005).

En la investigación de brotes de listeriosis, la caracterización de los serotipos de *L. monocytogenes* proporciona una valiosa información, la cual permite diferenciar entre aislamientos pertenecientes a un brote y aquellos que no forman parte del mismo y, así, disminuir el número de cepas que necesitan ser caracterizadas por electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Chen y cols., 2007), prueba que tiene una mayor discriminación. Este se considera el método de referencia e identifica el subtipo molecular involucrado en el brote (Doumith y cols., 2004; Ward y cols., 2008; Gilmour y cols., 2010).

## 7. EPIDEMIOLOGÍA

La listeriosis humana afecta más frecuentemente a las personas con enfermedades graves subyacentes e inmunodeprimidos, los ancianos, las mujeres embarazadas, y neonatos. Sin embargo, los pacientes sin factores de riesgo y aparentemente sanos también pueden infectarse (Lamont y cols., 2011). Los individuos con mayor riesgo de contraer listeriosis incluyen aquellos con neoplasias malignas o que se someten a terapia inmunosupresora. Otras causas

predisponentes son presencia de agentes para reducir el ácido del estómago, SIDA, el alcoholismo, enfermedad hepática alcohólica, diabetes y los destinatarios de las válvulas cardíacas protésicas o juntas de articulación. La enfermedad afecta con más frecuencia en el torrente sanguíneo, el útero durante el embarazo, o el sistema nervioso central (McLauchlin y cols., 2014; Allerberger, Huhulescu, 2015).

La listeriosis es una enfermedad infecciosa relativamente rara. En 2013, la incidencia de listeriosis fue de tres por millón en los EE.UU, cuatro por millón en Austria y seis por millón en Alemania (Crim y col., 2014). La bacteremia originada por *Listeria* ha aumentado considerablemente en pacientes ancianos e inmunodeprimidos en las últimas décadas en la mayoría de los países europeos, sin embargo, no se ha producido ningún aumento significativo de listeriosis asociada al embarazo; la incidencia anual es de aproximadamente tres casos por cada 100.000 recién nacidos (Allerberger, Wagner, 2010). En Austria, de aproximadamente 70.000 partos por año, se producen 2-3 casos de listeriosis; en Alemania con 680.000 nacimientos cada año hay 20-30 casos cada año. La incidencia de listeriosis asociada al embarazo en algunas zonas de vigilancia activa de EE. Actualmente es de unos 50-100 casos de aproximadamente 4 millones de nacimientos por año. En cuanto a las embarazadas españolas, se estimó un caso de cada 8000 embarazos.

La aparición de la listeriosis humana puede estar influenciada por algunos patrones sociales, por ejemplo, Gillespie y cols., (2010) han demostrado que la incidencia de listeriosis humana ha sido mayor en zonas más desfavorecidas de Inglaterra en comparación con otras más ricas, y aquellos afectados eran más propensos a comprar alimentos en pequeños establecimientos o directamente de servicios locales (panaderos, carniceros, pescaderos y fruterías) (Allerberger, Steliana, 2015).

En España, un estudio descriptivo retrospectivo sobre los casos de listeriosis ocurridos entre 2001-2007 (Tabla 10), recogió la información epidemiológica de 1242 casos de listeriosis, lo que supone una tasa de incidencia media de 0,56 casos por 100.000 habitantes y año (Parrilla, Vaqué, 2014). La incidencia ha mostrado una tendencia anual ascendente estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ), y ha sido muy superior a la notificada en España (0,16) mediante el Sistema de Información Microbiológica, de carácter voluntario, lo que evidencia la infradeclaración existente. Por grupos de edad, gran parte de los casos se situaron en las etapas extremas de la vida: el 55,48% en personas de >60 años y el 16,20% en niños/as de 0-4 años. La tasa de incidencia fue de 0,99 y 1,36 casos por 100.000 habitantes/año en las personas de >60 años y 0-4 años, respectivamente. Uno de cada cinco casos de listeriosis eran neonatos o mujeres gestantes, en los que, la meningitis y/o sepsis fue la manifestación clínica más relevante (Parrilla, 2011).

La inclusión de la listeriosis en el Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria, lo cual ha ocurrido recientemente (Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, que en su anexo I incluye la

listeriosis como EDO), permitirá dimensionar su presencia, así como conocer las características de la afectación humana y mejorar su prevención y control.

Tabla 10. Incidencia de listeriosis en las diferentes comunidades autónomas españolas entre los años 2001-2007.

Comunidad autónoma	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Total	Casos declarados	Casos aportados	Casos publicados	Total
Andalucía	26	10	31	29	45	46	50	237	201	0	36	237
Aragón	6	2	3	4	11	11	6	43	0	43	0	43
Asturias	2	2	2	4	9	8	11	38	28	0	10	38
Canarias	4	4	4	11	10	9	6	48	48	0	0	48
Cataluña	45	39	47	102	56	57	36	382	382	0	0	382
Extremadura	3	4	1	3	5	7	6	29	0	29	0	29
Galicia	14	8	21	22	23	28	35	151	0	151	0	151
Madrid	23	18	25	21	9	16	8	120	102	0	18	120
Navarra	3	3	6	3	7	4	7	33	18	0	15	33
País Vasco	20	22	13	23	24	22	28	152	152	0	0	152
La Rioja	1	0	2	2	0	1	3	9	0	9	0	9
Melilla	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>147</b>	<b>112</b>	<b>155</b>	<b>224</b>	<b>199</b>	<b>209</b>	<b>196</b>	<b>1242</b>	<b>931</b>	<b>232</b>	<b>79</b>	<b>1242</b>

## 8. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LISTERIOSIS

Como se ha mencionado anteriormente, dentro de las especies del género *Listeria*, es destacable *L. monocytogenes* como organismo patógeno para el ser humano, convirtiéndose en el agente causante de listeriosis humana, una infección potencialmente fatal (Allerberger, Wagner, 2010).

Debido a la amplia distribución de *L. monocytogenes*, pueden darse varias formas de transmisión de la enfermedad en humanos. La principal vía de transmisión es indirecta, mediante el consumo de alimentos contaminados. También se puede considerar a la listeriosis como una zoonosis, ya que ciertas poblaciones como veterinarios, trabajadores de granja o mataderos, pueden contaminarse por contacto directo, mediante animales infectados, materiales de origen animal o secreciones infectadas con *Listeria*. Además, existen evidencias de casos de infección cruzada entre recién nacidos, presentándose también como una enfermedad nosocomial. En este caso la transmisión sería a través de la leche materna contaminada o bien, a través del personal, instalaciones y equipos del hospital ( Hof y cols., 2001; Allerberger, 2007)

La Listeriosis puede clasificarse según el grado de afectación a la salud del individuo, como listeriosis invasiva y no invasiva (Nightingale y cols., 2005; Disson y cols., 2008) y también es

posible diferenciarlas en función del tipo de individuo afectado como Listeriosis perinatal o bien, listeriosis en pacientes adultos. Entre las manifestaciones clínicas más frecuentes que presenta dicha enfermedad, se encuentran:

- **Gastroenteritis aguda febril**

La gastroenteritis febril es la manifestación propia en una persona inmunocompetente; se suele producir tras la ingestión de un gran inóculo de bacterias mediante el alimento contaminado. (Ooi, Lorber, 2005). Los síntomas incluyen fiebre, diarrea acuosa, náuseas, vómitos, dolor de cabeza y dolores en las articulaciones y músculos (Berrada y cols., 2006; Todd, Notermans, 2011). La duración típica de los síntomas es de dos a tres días y la recuperación es generalmente completa. En un inmunocompetente no es necesario tratar el cuadro, ya que muchas veces es asintomático (Olivares, 2009).

- **Infecciones durante el embarazo**

En embarazadas las infecciones son clínicamente leves o asintomáticas, pero cursan con bacteriemia de modo que se pueden presentar síntomas inespecíficos como fiebre, escalofríos, dolor lumbar o configurar un cuadro tipo gripal, que es una de las manifestaciones más frecuentes. Por fortuna, el compromiso del SNC es poco frecuente en las embarazadas, pero la infección fetal y neonatal es grave y su mortalidad puede llegar a 20 ó 30% (Janakiraman, 2008) El riesgo de las mujeres embarazadas de contraer listeriosis en comparación con las mujeres no embarazadas en edad fértil de la misma edad es mucho mayor (Goulet y cols., 2012; Pouillot y cols., 2012). La infección se disemina desde el sistema circulatorio materno hacia el feto, probablemente a través de la placenta (Disson y cols., 2008).

La mayoría de las infecciones maternas ocurren durante el tercer trimestre del embarazo, ya que la inmunidad de células T está más reducida, pero pueden ocurrir durante toda la gestación (Al-Tawfiq, 2008). La listeriosis durante el embarazo supone una seria amenaza para el bebé, pudiendo producir abortos y la muerte fetal (Todd, Notermans, 2011). El grado de severidad depende de la edad gestacional en el momento de la infección, cuánto más pronto se dé, menores serán las posibilidades de supervivencia (Lallemand y cols., 1992; Kaur y cols., 2007).

- Cuando se produce antes del tercer trimestre por lo general resulta en una muerte intrauterina. El feto desarrolla una infección grave y multisistémica, resultado de la transmisión transplacentaria, que involucra órganos internos (hígado, bazo, pulmones, riñones, cerebro), con la formación generalizada de lesiones granulomatosas, sobre todo en el hígado y placenta. Esta condición es llamada granulomatosis infantiséptica y suele provocar la muerte del feto antes o justo después del nacimiento (Lorber, 2010). Cuando la infección tiene lugar en el tercer

trimestre, puede dar lugar también a la muerte intrauterina o bien, la entrega de un neonato gravemente enfermo. Este tipo de listeriosis neonatal, se conoce como infección de aparición temprana, con síntomas que ocurren en la primera semana de vida. En este caso hay un inicio temprano de sepsis en el recién nacido que se caracteriza por signos inespecíficos de la infección y por ser prematuro. Las lesiones cutáneas pueden estar presentes (Figura 8), a veces con granulomas y el recién nacido puede tener convulsiones, insuficiencia respiratoria y aquellos que sobreviven suelen presentar secuelas a largo plazo, especialmente aquellos de partos prematuros o con afectación del sistema nervioso central (Vazquez- Boland, 2001; Allerberger, Huhulescu, 2015)



Figura 8. Granulomatosis Infantiséptica. Se aprecian granulomas multiorgánicos manifestándose en la piel, del tamaño de la cabeza de un alfiler. Se tratan de nódulos de color blanco-amarillento y con un halo rojo (Allerberger, Huhulescu, 2015).

-Si los síntomas se producen a partir del octavo día y hasta 4 semanas después del nacimiento, se trata de una listeriosis neonatal de aparición tardía. Los bebés con inicio tardío de la infección generalmente nacen a término y es probable que el momento de infección ocurra durante el paso por el canal del parto o desde el entorno post-natal. Este tipo de listeriosis se caracteriza por compromiso del SNC, de hecho, *listeria monocytogenes* es una de las tres principales causas de meningitis bacteriana en neonatos. Esto da lugar al desarrollo de meningitis, y en ocasiones de neumonía. Sin embargo, con un tratamiento adecuado, el cuadro presenta un mejor pronóstico que la listeriosis neonatal de aparición temprana (Jackson y cols., 2010).

#### • Sepsis sin foco evidente

La bacteriemia sin foco evidente es la manifestación más frecuente en inmunocomprometidos y ancianos. Los síntomas son similares a los de cualquier otra causa de bacteriemia: fiebre, mialgias, pródromo con diarrea y náuseas (Olivares, 2009). El choque séptico puede desarrollarse y afectar al cerebro y meninges, conduciendo a la meningoencefalitis o encefalitis. Esto último es más frecuente en personas asociadas a condiciones debilitantes subyacentes graves (McLauchlin y cols., 2014).



### • Infección del sistema nervioso central

La infección del SNC por *Listeria* que se manifiesta con mayor frecuencia es la meningoccefalitis. Existen además otras como cerebritis, abscesos cerebrales y rombocefalitis, pero son menos comunes.

Meningoccefalitis - ocurre con mayor frecuencia en los recién nacidos después de tres días de edad y en adultos inmunocomprometidos y ancianos. El inicio de la meningoccefalitis, puede ser repentino o agudo, con fiebre, intenso dolor de cabeza, náuseas, vómitos y signos de irritación meníngea, o puede ser subaguda, particularmente en una inmunocomprometido o ancianos, con signos neurológicos focales. Estos incluyen anormalidades craneales, ataxia, temblores, hemiplejía, sordera, convulsiones e incluso fluctuaciones en el nivel de la conciencia (Mylonakis y cols., 1998; Brouwer y cols., 2006).

Cerebritis - resulta de la invasión hematogena directa del parénquima cerebral, por lo general con poca o ninguna participación de las meninges (Figura 9). Sin embargo, los síndromes de meningitis y encefalitis pueden ocurrir también. La presentación clínica de la encefalitis va de fiebre y dolor de cabeza hasta hemiplejía y se asemeja a un accidente cerebrovascular (Watson y cols., 1978).

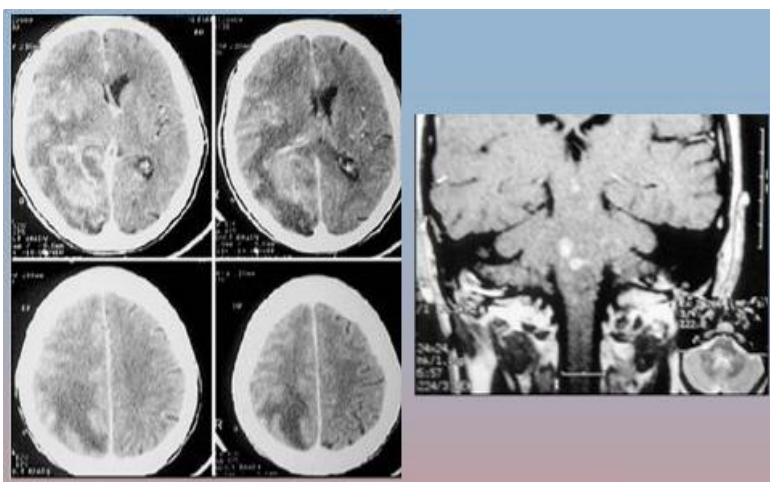


Figura 9. Infección del SNC por *Listeria*. (Olivares, 2009).

Romboccefalitis - se trata de una encefalitis que compromete el tronco cerebral y /o el cerebelo. Es una rara manifestación de la infección por *Listeria* que ocurre típicamente en individuos sanos a través del consumo de alimentos contaminados (Kleemann y cols., 2009). La rombocefalitis a menudo sigue un curso bifásico, comenzando con dolor de cabeza, fiebre, náuseas y vómitos, seguidos de varios días por parálisis de los nervios craneales, ataxia, temblores y otros signos cerebelosos. Además produce disminución de la conciencia, y posiblemente convulsiones y hemiparesia. Casi la mitad desarrollan insuficiencia respiratoria (Moragas y cols., 2011).

### • **Otras infecciones más raras denominadas infecciones focales**

Las infecciones focales por *Listeria* son muy poco frecuentes, la mayoría de estas infecciones focales no tienen características distintivas (Mylonakis y cols., 1998), pero tienden a ocurrir en mayor medida en personas inmunodeprimidas, entre ellas destacan:

- Infecciones de la piel o de los ojos, como resultado de una exposición ocupacional directa en veterinarios, agricultores y trabajadores de laboratorio, pero no suelen ser muy frecuentes.
- Otras complicaciones pueden ser el síndrome oculoglandular, linfadenitis, neumonía, empiema, dermatitis, miocarditis, endocarditis en pacientes con lesiones cardíacas subyacentes o bien, con válvulas cardíacas protésicas, artritis séptica, osteomielitis, infección de la articulación protésica, fascitis necrotizante (Kowalski, Agger, 2009) artritis e infección del injerto protésico, incluyendo fístulas de diálisis (Zeitlin y cols., 1982).
- Abscesos cerebrales y espinales (Eckburg, Montoya, 2001).
- La peritonitis puede ocurrir en pacientes tratados con diálisis peritoneal continua ambulatoria y aquellos con cirrosis (Dylewski, 1996).

## 8.1 PERÍODO DE INCUBACIÓN

El período de incubación de la gastroenteritis por *Listeria* es más corto que el período de incubación de la enfermedad invasiva (Ooi, Lorber, 2005). Para la gastroenteritis, el período de incubación promedio es de 24 horas, con un intervalo de horas a 6-10 días aproximadamente, después de haber ingerido una dosis alta del patógeno a través de alimentos. Para la listeriosis invasiva el período de incubación promedio es de 21 días (Allerberger, Wagner, 2010). Los datos de investigaciones de brotes e informes de casos recientes, han mostrado algunas diferencias en los períodos de incubación de distintas formas de listeriosis invasiva. Según esos estudios, el período de incubación de listeriosis asociada a embarazo puede variar entre 17-67 días aproximadamente. En el caso de bacteremia suele encontrarse entre 1-12 días y en caso de meningitis, puede variar entre 1 y 14 días (King y cols., 2013).

## 8.2 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la infección por *Listeria* puede sospecharse a partir de los hallazgos clínicos. No hay forma clínica para distinguir la infección provocada por *Listeria* de muchas otras enfermedades infecciosas que pueden conducir a la fiebre y síntomas constitucionales (Shetty y cols., 2009). Como resultado, el diagnóstico sólo puede establecerse mediante el cultivo del organismo a partir del líquido cefalorraquídeo o la sangre. Para llegar al diagnóstico es importante tener un alto grado de sospecha clínica y buscar el antecedente epidemiológico de consumo de alimentos sospechosos, sobre todo lácteos, especialmente en el contexto de pacientes inmunodeprimidos o embarazadas. Por este motivo la obtención de hemocultivos

deben ser considerados en cualquier mujer embarazada con síntomas febriles, cuando no hay una explicación alternativa y evidente. Además el cultivo vaginal o cultivos de heces no son útiles en el diagnóstico, debido a que algunas de las mujeres son portadoras asintomáticas (Jankiraman, 2008). *L. monocytogenes* se pueden cultivar fácilmente a partir de especímenes clínicos tales como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido amniótico, placenta, meconio, loquios, lavados gástricos o hisopos para los oídos de los recién nacidos, mediante siembra directa del material en placas de agar sangre y e incubándose durante una noche a 35 grados en atmósfera ambiente (Armstrong, Brainstem, 1993; Olivares, 2009).

-En la mayoría de los estudios de meningitis por *Listeria*, el análisis del LCR revela una pleocitosis que se relaciona típicamente con una elevación moderada en la concentración de proteínas y puede estar asociada con una baja concentración de glucosa. La infección por *Listeria* es la principal causa de meningitis bacteriana (no tuberculosa) en la que se puede encontrar un número de linfocitos en el LCR (> 25 por ciento) (Mylonakis y col., 1998).

- En cuanto a la romboencefalitis, la mayoría de los casos ocurren en adultos previamente sanos; no hay casos registrados en lactantes. El diagnóstico diferencial de romboencefalitis incluye una serie de enfermedades infecciosas y no infecciosas (Kayaaslan y cols., 2009). Aunque *Listeria monocytogenes* es la causa infecciosa más común de romboencefalitis, el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) a menudo revela sólo alteraciones leves, lo que puede retrasar el diagnóstico (Armstrong, Fung, 1993). Los cultivos de líquido cefalorraquídeo son positivos en 40% de los casos y los hemocultivos, en 60 a 70% de ellos.

-En el caso de cerebritis, los hemocultivos a menudo son positivos y los niveles de glucosa en LCR son normales en dos tercios de los casos.

-La PCR es la única prueba utilizada para la detección rápida de *L. monocytogenes* en muestras clínicas. El ensayo de PCR es particularmente útil cuando la administración previa de los agentes antimicrobianos es susceptible de comprometer los cultivos (Shetty y cols., 2009).

-El cultivo de heces para la *Listeria* no está indicado en pacientes con listeriosis sistémica. Sin embargo, es un buen método en pacientes con sospecha de gastroenteritis por *Listeria*, o cuando se investiga un brote de listeriosis. Se deben utilizar medios selectivos especiales ya que, los cultivos de rutina para los patógenos entéricos, no soportan el crecimiento de *Listeria*.

### 8. 3 TRATAMIENTO

Existen dos factores que dificultan el tratamiento de la listeriosis: primero, los pacientes afectados generalmente son inmunocomprometidos, por lo tanto, presentan cuadros atípicos. Segundo, el ciclo de vida intracelular y la formación de granulomas en los tejidos dificultan una rápida respuesta al antibiótico, ya que se requieren altas concentraciones intracelulares.

El tratamiento más recomendado es la combinación sinérgica de dos antibióticos; ampicilina o penicilina, más gentamicina, por vía intravenosa (Hof, 2003). La eficacia clínica de penicilina y ampicilina es solamente bacteriostática contra *L. monocytogenes*, dándole importancia a los propios mecanismos de defensa celular del cuerpo. El uso de gentamicina como coadyuvante no debe ser prescrito para mujeres embarazadas, debido a que puede provocar efectos teratogénicos (Jacobson, 2008). No obstante, *Listeria monocytogenes* es sensible a muchos más antibióticos, de ahí que sea posible el uso de alternativas. Sin embargo, presenta resistencia frente a las cefalosporinas de tercera generación, que son medicamentos de primera línea frente a la meningitis (Lungu y cols., 2011).

En caso de alergia se recomiendan cotrimoxazol y trimetoprim (Tunkel y cols., 2004). Sin embargo, el cotrimoxazol no debe ser utilizado en el primer trimestre de embarazo, ya que puede limitar la interrupción del metabolismo del ácido fólico y provocar defectos en el tubo neural, ni en el tercer trimestre por riesgo de kernicterus (Lamont y cols., 2011) en embarazadas se podría utilizar vancomicina o meropenem por vía intravenosa (Temple, Nahata, 2000; Lin y cols., 2013). Algunos de las alternativas que podrían hacer frente a *L. monocytogenes*, serían Linezolid, macrólidos, meropenem, vancomicina y rifampicina, sin embargo su utilización y eficacia son inciertas y han dado lugar a polémica (Allerberger, Dierich, 1992).

En cuanto a la duración de la terapia, en pacientes inmunocompetentes se recomienda dos semanas en bacteriemia y entre dos semanas y cuatro semanas en caso de infección del SNC. En pacientes inmunocomprometidos el tratamiento se prolonga entre tres y seis semanas en cuadros de bacteriemia y entre cuatro y ocho semanas en infecciones del sistema nervioso central. (Olivares, 2009).

## CONCLUSIONES

1. *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo que provoca infección intestinal, y enfermedades invasivas como meningitis y bacteriemia. Los principales grupos de riesgo son embarazadas, neonatos e inmunodeprimidos.

2. Si bien la incidencia no es muy alta, se debe conceder mayor importancia a *Listeria monocytogenes* por su alta tasa de mortalidad, así como a la morbilidad de algunas de las enfermedades que produce.

3. En los últimos años se está registrando un incremento de los casos, motivado por el consumo de alimentos precocinados y listos para el consumo y a su declaración como EDO en países europeos.

4. Dada la vulnerabilidad de neonatos y niños menores de tres años, el control microbiológico de los alimentos para lactantes es de los más exhaustivos, equiparándose al de los alimentos para usos médicos especiales. El control de *Listeria* se debe efectuar durante todo el proceso del alimento, desde su producción por las empresas alimentarias y durante toda la vida útil del producto comercializado.

5. La declaración de la listeriosis como EDO en España, al igual que ya se había hecho en la mayoría de los países europeos y en Andalucía, contribuirá a tener un mayor control epidemiológico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

### **1. CAPÍTULOS DE LIBRO Y LIBROS**

Allerberger F. *Listeria*. En: Simjee S, editor. Foodborne diseases. Totowa, Nueva Jersey: Human Press; 2007.p.27-39

Lorber B. *Listeria monocytogenes*. En: Mandell G.L, Bennett J.E, Dolin R, editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ª ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010.p.2707.

McLauchlin J, Catherine E D, Christine E. R. *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. En: Rosenberg E, editor. The prokaryotes: *Firmicutes* and *tenericutes*.4ª ed. New Delhi, India; 2014.p.241–54.

Mobarak Abu M, Sukhadeo B, Torsten H, Trinad C. *Listeria*. En: Rosenberg E, editor. The prokaryotes: Human microbiology. 4ª ed. Germany, India: Springer; 2013.p.219–230.

Robinson R. K, Batt C. A, Patel P.D. Encyclopedia of Food Microbiology. 1ª ed. San Diego; Academic Press; 2000.

### **2. TEXTOS ELECTRÓNICOS**

Centers for Disease Control and Prevention. National enteric disease surveillance: *listeria* annual summary: 2012 [en línea]. [Consultado en junio 2016]. Disponible en <http://www.cdc.gov/listeria/pdf/listeria-annual-summary-2012-508c>

De Pablo B, Moragas M. Subarea de sanidad alimentaria y consumo. Recopilación normas microbiológicas y parámetros físico-químicos relacionados. Ayuntamiento de Bilbao, 2010. [en línea]. [Consultado en Junio 2016]. Disponible en: [http://www.osakidetza.euskadi.eus/r8520432/es/contenidos/informacion/sanidad\\_alimentari/es\\_1247/adjuntos/recopilacionNormasMicrobiologicas2010\\_c.pdf](http://www.osakidetza.euskadi.eus/r8520432/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentari/es_1247/adjuntos/recopilacionNormasMicrobiologicas2010_c.pdf)

Fresquet J.L. Joseph Lister (1827-1912). 2015. Historiadelamedicina.org. [revisada en Julio 2007]. Disponible en <http://www.historiadelamedicina.org/lister>

Public Health Agency of Canada. 2011. *Listeria monocytogenes*: pathogen safety data sheet - infectious substances. Date Modified: 2012-04-30. <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/listeria-monocytogenes-eng>.

### 3. ARTÍCULOS

- Allerberger F, Steliana H. Pregnancy related listeriosis: treatment and control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015; 13(3):395–403.
- Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(1):16–23.
- Allerberger F. *Listeria* : growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; 35(3):183–189.
- Al-Tawfiq J.A. *Listeria monocytogenes* bacteremia in a twin pregnancy with differential outcome: fetus papyraceus and a full-term delivery. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008; 41:433-436.
- Anon. Opinion 12, conservation of *Listeria* Pirie 1940 as a generic name in bacteriology. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon*. 1954; (4) 150-151.
- Armstrong R.W, Fung P.C. Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1993; 16(5):689-702.
- Benadof D. *Listeria monocytogenes*. *Rev Chil Infectol*. 2008; 25(5):350.
- Berrada H, Soriano J. M, Pico Y, Mañes J. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol*. 2006; 107(2):202–206.
- 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. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58(6):1857–1860.
- Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: From structure to pathogenesis. *Cell Microbiol*. 2009; 11(5):693–702.
- Brouwer M. C, Van de Beek D, Heckenberg S. G. B, Spanjaard L, De Gans J. Meningitis in Adults. *Clin Infect Dis*. 2006; 43(10):1233–1238.
- 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(5):379–394.
- Chen J, Luo X, Jiang L, Jin P, Wei W, Liu D et al. Molecular characteristic and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol*. 2009; 26(1):103-111.
- Chen Y, Zhang W, Knabel S. J. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(3):835–846.
- Collins M. D, Wallbanks S, Lane D.J, Shah J, Nietupski R SJ et al. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*. 1991; 41(2):240–246.

- Crim S. M, Iwamoto M, Huang J. Y, Griffin P. M, Gilliss D, Alicia B et al. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006– 2013. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2014; 63(15):328-332.
- De las Heras A, Cain R. J, Bielecka M.K, Vazquez-Boland J. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14(2):118–127.
- Den Bakker H. C, Warchocki S, Wright E. M, Allred A. F, Ahlstrom C, Manuel C. S et al. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64(6):1882-1889.
- Disson O, Grayo S, Huillet E, Nikitas G, Langa-Vives F, Dussurget O et al. Conjugated action of two species specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature.* 2008; 455(7216): 1114–1118.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(8):3819–3822.
- Doumith M, Jacquet C, Gerner-Smidt P, Graves L. M, Loncarevic S, Mathisen T, et al. Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* Serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an International Standard. *J Food Prot.* 2005; 68:2648-2650.
- Dylewski J.S. Bacterial peritonitis caused by *Listeria monocytogenes*: case report and review of the literature. *Can J Infect Dis.* 1996; 7(1): 59-62.
- Eckburg P. B, Montoya J. G, Vosti K.L. Brain abscess due to *Listeria monocytogenes*: five cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2001; 80(4):223-235
- Ermolaeva S, Karpova T, Novella S, Wagner M, Scotti M, Tartakovskii I et al. A simple method for differentiation of *Listeria monocytogenes* base don induction of lecithinase activity by charcoal. *Int J Food Microbiol.* 2003; 82(1): 87-94.
- Farouk M, Abdel-Shafi S, Shalaby M, Mohamed R. Application of specific media, API technique and PCR for rapid confirmation of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs and water. *Res J Microbiol.* 2015; 10(3):100–113.
- Gedde M, Higgins D. E, Tilney L. G, Portnoy D. A. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2000; 68(2):999–1003.
- Gillespie I. A, Mook P, Little C. L, Grant k, Goutam K. A. *Listeria monocytogenes* Infection in the Over-60s in England Between 2005 and 2008: A Retrospective Case–Control Study Utilizing Market Research Panel Data. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(11):1373-1379.
- Gilmour M.W, Graham M, Van Domselaar G, Tyler S, Kent H, Trout-Yakel K. M, et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics.* 2010; 11(1):120.
- Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H et al. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(5):652–660
- Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F M-BM et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(1):136–138.

- Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer L, Tschäpe H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* 1997; 23(6):1089–1097.
- Hacker J, Kaper J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:641–679.
- Hof H, Lampidis R, Bensch J. Nosocomial *Listeria* gastroenteritis in a newborn, confirmed by random amplification of polymorphic DNA. *Clin Microb Infect.* 2001; 6(12):683–696
- Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tall B. D, Lehner A, Fanning S et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58: 1442–1447.
- Jackson K. A, Iwamoto M, Swerdlow D. Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiol Infect.* 2010; 138(10):1503–1509.
- Jacquet C, Gouin E, Jeannel D, Cossart P, Rocourt J. Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(2):616–622 .
- Jankiraman V. Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Rev Obstet Gynecol.* 2008; 1(4):179–185.
- Kaur S, Malik S.V, Vaidya V. M, Barbudde S. B. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. *J Appl Microbiol.* 2007; 103(5):1889–1896.
- Kayaaslan B. U, Akinci E, Bilen S, Gözel M. G, Erdem D, Aydin A. C et al. Listerial rhombencephalitis in an immunocompetent young adult. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(2):65–67.
- King L.A, Vaillant V, De Valk H, Goulet V. What is the incubation period for listeriosis? *BMC infect Dis.* 2013; 13:11.
- Kleemann P, Domann E, Chakraborty T, Bernstein I, Lohoff M. Chronic prosthetic joint infection caused by *Listeria monocytogenes*. *J Med Microbiol.* 2009; 58:138–141.
- Kowalski T. J, Agger W. A. Necrotizing Fasciitis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis.* 2009; 48:137–138.
- Lallemand A.V, Gaillard D.A, Paradis P.H, Chippaux C.G. Fetal listeriosis during the second trimester of gestation. *Pediatr Pathol.* 1992; 12(5):665–671
- Lamont R. F, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic J. P, Vaisbuch E, Kwon Kim S. et al. Listeriosis in human pregnancy: A systematic review. *J Perinat Med.* 2011; 39(3):227–236.
- Leclercq A. Colonial atypical morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid L mono and AIOA solid media. *J. Microbiol Methods.* 2004; 57(2):251–258.
- Ledermann D. W. En memoria de Lister. *Rev Chil infectología.* 2008; 25(5):351–356.



- Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol*. 2006; 55(6): 645–59.
- Liu. D, Lawrence M.L, Ainsworth A, Austin F.W. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol*. 2007; 118(2):101-115.
- 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(2):115–123.
- Moragas M, Martínez-Yélamos S, Majós C, Fernández-Viladrich P, Rubio F, Arbizu T. Rhombencephalitis. *Medicine (Baltimore)*. 2011; 90(4):256–261.
- Mylonakis E, Hohmann E. L, Calderwood S. B. Central Nervous System Infection with *Listeria monocytogenes*: 33 Years' Experience at a General Hospital and Review of 776 Episodes from the Literature. *Medicine (Baltimore)*. 1998; 77(5):313-336.
- Murray E. D. G, Webb, R. A, Swann, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J Pathol Bacteriol*. 1926; (29):407–439.
- Nightingale K. K, Windham K, Wiedmann M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. *J Bacteriol*. 2005; 187(16):5537–5551.
- Olivares. R. *Listeria monocytogenes*: bacteria antigua, desafío permanente. *Listeria monocytogenes*: an old bacteria, an ongoing challenge. *Medwave*. 2009; 9(6) 06.3994.
- Ooi S T, Lorber B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(9):1327–1332.
- Orsi R H, Bakker C, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*. 2011; 301(2):79-96.
- Parrilla F, Vaqué J. Estudio de la incidencia de listeriosis en España Incidence study of listeriosis in Spain. *Gac Sanit*. 2014; 28(1):74-76.
- Parrilla F. Estudio de incidencia de la listeriosis en España. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral. 2011.
- Pirie J. H. H. A new disease of veld rodents, 'Tiger River Disease'. *Publ S Afr Inst Med Res*. (1927); (3):63–186.
- Pirie J. H. H. The genus *Listerella*, Pirie. *Science*. 1940; (91):383.
- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006; 124(4):715–727.
- Posfay-Barbe K. M, Wald E.R. Listeriosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2009; 14(4):228-233.
- Pouillot R, Hoelzer K, Jackson K.A, Heno O.L, Silk B.J. Relative risk of listeriosis in foodborne diseases active surveillance network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(5):405-410 .
- Ragon M, Wirth F, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *Plos Pathog*. 2008; 4:149-160.

- Rocourt J, Boerlin P, Grimont F, Jacquet C, Piffaretti J. C. 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(1): 171-174
- Rocourt J, Grimont P.A.D. *Listeria welshimeri* sp. nov and *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of systematic bacteriology.* 1983; 33(4): 866-869.
- Sallen B, Rajoharison A, Desverenne S, Quinn F, Mabilat C. Comparative Analysis of 16S and 23S rRNA Sequences of *Listeria* species. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46(3):669–674.
- Scortti M, Monzó H.J, Lacharme-Lora L, Lewis D.A, Vazquez-Boland J. The PrfA virulence regulon. *Microbes and infection.* 2007; 9(10):1196-1207.
- Seeliger H. P. R, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol.* 1979; 31-49.
- Seeliger H. P. R, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont P. A. D, Jones D. *Listeria ivanovii* sp. nov. 1984; 34(3):336–337.
- Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell.* 2000; 103(3):501–510.
- Shetty A, McLaughlin J, Grant K, O'Brien D, Howard T, Davies E.M. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *J Hosp Infect.* 2009; 72(4):332-336.
- Témoin S, Roche S. M, Grépinet O, Fardini Y, Velge P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. *Microbiology* 2008; 154(3):939–948.
- Temple M. E, Nahata M. C. Treatment of listeriosis. *Ann Pharmacother.* 2000; 34(5):656-661.
- Todd E. C. D, Notermans S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 2011; 22(9):1484–1490.
- Vazquez-Boland J, Dominguez-Bernal G, González-zorn B, Kreft J, Goebel W. Pathogenicity islands and virulence evolution *Listeria*. *Microbes and infection* 2001; 3(7):571-584.
- Vazquez-Boland J, kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W. et *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(3):584–640.
- Velge P, Roche S.M. Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence?. *Fut Microbiol.* 2010; 5(12):1799-1821.
- Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Rev Chil Infect.* 2013; 30(4):407–416.
- Ward T. J, Ducey T. F, Usgaard T, Dunn K. A, Bielawski J. P. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74(24):7629–7642.
- Watson G. W, Fuller T. J, Elms J, Kluge R. M, Ronica M. *Listeria Cerebritis*: Relapse of Infection in Renal Transplant Patients. *Arch Intern Med.* 1978; 138(1):83.
- Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker H. C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65(1): 286-292.

Zeitlin J, Christos P, Carvounis M. D, Raymond G, Murphy M. S, Tortora G. T. Graft Infection and Bacteremia With *Listeria monocytogenes* in a Patient Receiving Hemodialysis. Arch Intern Med. 1982; 142(12):2191-2192.

#### 4. NORMATIVA

BOE: <https://www.boe.es/>

Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: método de detección. (ISO 11290-1:1996).

Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. Modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión. (ISO 11290-1:1996/AM 1:2004).

Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional.

Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. (Modificación 2014).

Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Referencia: DOUE-L-2007-82244.

Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Referencia: DOUE-L-2005-82539.

Reglamento (UE) nº 365/2010 de la comisión de 28 de abril de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriáceas en la leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina. Referencia: DOUE-L-2010-80710.

