

República de Colombia
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Vigilancia
de Medicamentos y Alimentos
INVIMA

Listeriosis

Ana Isabel Muñoz Cajiao
Graciela Díaz Figueroa

República de Colombia
Ministerio de Salud
Instituto Nacional de Vigilancia
de Medicamentos y Alimentos

Listeriosis

Monografía

Ana Isabel Muñoz Cajiao

Graciela Díaz Figueroa

Bacteriólogas

División de Alimentos y Bebidas Alcohólicas

Santa Fe de Bogotá, D.C., noviembre de 1998

©Derechos reservados por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA

Prohibida toda reproducción parcial o total,
sin previa autorización escrita de la institución.

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, INVIMA
Avenida Eldorado con carrera 50
Santa Fe de Bogotá

Primera edición 1998

500 ejemplares

Edición, diagramación e impresión: División de Biblioteca y Publicaciones, INS

ISBN 958-13-0115-1

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN -----	5
1. Clasificación taxonómica -----	7
2. Generalidades de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	8
2.1 Hábitat -----	8
2.2 Características generales -----	8
2.2.1 Resistencia -----	9
2.2.2 Termorresistencia -----	9
2.2.3 Patogenicidad -----	10
2.3 Características bioquímicas -----	11
2.4 Constitución antigénica -----	11
3. Epidemiología de la listeriosis -----	13
3.1 Definición -----	13
3.2 Nota histórica -----	13
3.3 Transmisión -----	15
3.4 Grupos de riesgo -----	17
3.5 Alimentos asociados -----	17
3.6 Prevención y control -----	17
3.6.1 Para la industria -----	18
3.6.2 Para las autoridades de salud -----	19
3.6.3 Para las entidades prestadoras de servicios de salud -	20
3.6.4 Para el sector de agricultura y ganadería -----	20
3.6.5 Para el consumidor -----	20
4. Patogenia -----	21
4.1 Virulencia -----	21
4.2 Listeriosis humana -----	24
4.3 Listeriosis animal -----	27
4.4 Diagnóstico -----	28
4.5 Tratamiento -----	29
5. Procedimiento analítico -----	30

5.1 Recomendaciones previas a los análisis -----	30
5.2 Preparación de los homogenizados de los alimentos ----	30
5.3 Investigación de <i>L. monocytogenes</i> en los alimentos ----	30
5.4 Equipos y materiales -----	31
5.5 Medios de cultivo -----	31
5.6 Reactivos -----	32
5.7 Técnica para productos lácteos -----	33
5.7.1 Método de aislamiento -----	33
5.7.2 Método de identificación -----	35
5.7.3 Resultado de las pruebas bioquímicas de <i>L. monocytogenes</i> -----	40
5.8 Informe de los resultados -----	40
5.9 Métodos rápidos para la identificación de <i>Listeria</i> -----	40
5.9.1 Sistema de identificación API por estuches -----	40
5.9.2 Métodos químicos -----	41
5.9.3 Métodos inmunológicos -----	41
5.10 Técnica para productos cárnicos -----	42
5.10.1 Método de aislamiento -----	42
5.10.1.1 Enriquecimiento selectivo primario -----	42
5.10.1.2 Enriquecimiento selectivo secundario -----	42
5.11 Fórmulas y técnicas de preparación de los medios de cultivo -----	42
5.12 Reactivos -----	48
6. Recomendaciones -----	52

INTRODUCCIÓN

La listeriosis humana es una enfermedad de rara ocurrencia, ocasionada por una bacteria llamada *Listeria monocytogenes* (1). Forma parte de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), los cuales actúan solamente como vehículo en la penetración del germen en el organismo (2-4).

A pesar de que el número de personas afectadas por esta enfermedad es relativamente bajo, comparado con otras enfermedades, la mortalidad es alta (5) ya que aproximadamente 20 a 30% de las personas con listeriosis mueren (6, 7).

Las manifestaciones primarias en el ser humano son infecciones del sistema nervioso central, siendo la más común la meningitis; en la gravidez, la interrupción del embarazo, e infecciones perinatales severas como la septicemia (1, 5, 8).

Las infecciones por *L. monocytogenes* ocurren, principalmente, en personas en las cuales su inmunidad celular está disminuida (9) y se comporta como un microorganismo oportunista (9-11).

En los últimos años, el número de casos de listeriosis notificados mundialmente ha aumentado, debido al perfeccionamiento de las técnicas microbiológicas, al incremento del número de personas con el riesgo de adquirir esta enfermedad (12) y a la tendencia de ingerir cierto tipo de alimentos (5) que, por sus características, se prestan con más facilidad para ser los vehículos de transmisión.

A pesar de que *L. monocytogenes* fue descubierta en 1911 (13) y aislada por vez primera en humanos en 1929 (14), el conocimiento de este microorganismo se comienza a desarrollar a partir de 1950 cuando se descubre una serie de manifestaciones en animales domésticos y en el hombre, ocasionados por *L. monocytogenes* (15, 16); sin embargo, sólo en la década de los ochenta cobra real importancia al relacionarla como agente causal de una serie de brotes epidémicos acaecidos en Canadá, Estados Unidos y Europa ocasionados por el consumo de alimentos como leches pasteurizadas, quesos y vegetales (7, 17, 18).

La listeriosis ha sido estudiada y reconocida su importancia en los países industrializados (5, 6). Otros países han detectado casos esporádicos de listeriosis humana o casos de contaminación de alimentos (5). Los informes de listeriosis humana procedentes de Suramérica, África y Asia son pobres (5, 6), posiblemente porque esta infección no ha sido lo suficientemente investigada.

En Colombia, se han realizado estudios de incidencia de *L. monocytogenes* en leche cruda y pasteurizada que consume la población cundiboyacense (19), como también en quesos frescos y madurados que se comercializan en Santa Fe de Bogotá (20). Los resultados indican que la incidencia de *L. monocytogenes* en leches crudas es de 34% y de 2% en leches pasteurizadas (19). Estos porcentajes representan una alta incidencia de contaminación por *L. monocytogenes*, en comparación con estudios realizados por países industrializados como Holanda que registra 4,4% (21); Francia que informa 4 a 6% (7), y Estados Unidos, 12% en leches crudas (22).

Los resultados obtenidos en quesos frescos informan una incidencia de 26,6% de *L. monocytogenes* y, en quesos madurados, de 22,8% (20); esto, al igual que el estudio en leches nos demuestra una alta incidencia de contaminación por *L. monocytogenes* comparativamente con resultados obtenidos por países industrializados que informan una incidencia de 2 a 10% en las diferentes variedades de quesos (6, 23).

La revista de la Asociación Colombiana de Neurología de septiembre de 1992 informa dos casos de pacientes con listeriosis en los cuales hubo compromiso del sistema nervioso central y cuyo cultivo del líquido cefalorraquídeo fue positivo para *L. monocytogenes* (24).

La importancia de las propiedades patológicas de la bacteria *L. monocytogenes* amerita un estudio amplio y una cuidadosa revisión bibliográfica que permitan informar al personal de salud, a la industria y al consumidor sobre este «nuevo» enemigo que está afectando encubiertamente la salud y la economía de nuestro país. Por sus características fisiológicas, bioquímicas y serológicas requiere técnicas microbiológicas estandarizadas para el aislamiento y la identificación del germen en los alimentos que favorecen su desarrollo.

I. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El manual de Bergey, en su novena edición, considera el género *Listeria* con ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi* y *L. denitrificans* (25); de estas especies, *L. grayi* y *L. murrayi* actualmente son consideradas como subespecies de una sola especie definida como *L. grayi* (26). *L. denitrificans* es morfológica, bioquímica y serológicamente diferente; los estudios del ácido nucleico indican que no corresponde al género *Listeria* (25) y, por tanto, ha sido considerada dentro de un nuevo género, *Jonesia* (27). Ahora seis especies necesitan ser diferenciadas (cuadro I) (28).

L. monocytogenes es hemolítica y patógena para el hombre y los animales; se diferencia de *L. innocua* en que ésta no es hemolítica, ni patógena para el hombre o los animales (29). La especie de *Listeria* descrita más recientemente como patógena es *L. ivanovii*, fuertemente beta hemolítica, y está asociada con patología animal siendo raro el aislamiento de cepas humanas (30, 31).

Cuadro I. Diferenciación de especies de *Listeria*

Especie	Hemólisis (beta) ^a	Reducción de nitrato	Producción de ácido			Virulencia a ratón
			Manitol	Ramnosa	Xilosa	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	^b V	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	^b V	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	-
<i>L. grayi</i> c	-	V	+	V	-	-

^a Sangre de cordero

^b V variable

^c *L. grayi*, ahora incluye la especie reductora de nitratos, ramnosa, variable anteriormente conocida como *L. murrayi*.

Tomado de: FDA. Manual de bacteriología analítica. *Listeria monocytogene*. 1995(28).

2. GENERALIDADES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

2.1 Hábitat

Listeria monocytogenes es un germen ubicuo (6); se encuentra en el suelo, el polvo, el agua, los alimentos ensilados, las aguas residuales, el forraje, el fango, los abonos naturales y las aguas de ríos; se ha aislado del intestino del hombre y de los animales mamíferos, domésticos y salvajes, de pájaros, peces y crustáceos (3, 8, 17, 18).

Los estudios realizados en mataderos y plantas elaboradoras de ovoproductos revelan que 30% de sus trabajadores alberga *L. monocytogenes* en sus heces (18).

La excreción del microorganismo por materia fecal en personas sanas es menor de 1%; en contactos y pacientes asintomáticos es de 26% y en trabajadores de mataderos es de 4,8% (24, 32).

2.2 Características generales

L. monocytogenes es un bacilo o cocobacilo grampositivo, con extremos redondeados, de 0,5 a 2,0 micras de largo por 0,5 micras de grueso; se puede presentar en diferentes formas, solos, en parejas o en cadenas cortas de 3 a 5 organismos, algunas veces en forma de V o de Y; carece de cápsula y esporas. Es móvil mediante flagelos peritricos y esta movilidad se manifiesta mejor a temperaturas de 20 a 25 °C, aunque puede llegar a ser imperceptible o nula a 37 °C, cuando reduce sus flagelos a 1 o 2 en su posición polar. Aunque es grampositivo, en cultivos viejos puede aparecer como gramnegativo al perder su capacidad de retener el colorante (18, 25). Es aerobio y anaerobio facultativo (25).

En cuanto a temperatura, sus límites de crecimiento están entre 1 y 45 °C, con temperatura óptima entre 30 y 37 °C (18, 25); es psicrófilo, tiene habilidad de crecer a temperaturas de refrigeración (33).

Con respecto al pH, es capaz de desarrollarse en un rango de 4,1 a 9,6. Pasados estos límites, se inhibe su crecimiento, aunque puede sobrevivir (2, 18, 25).

El crecimiento óptimo se produce en una atmósfera constituida por 5% de oxígeno y de 5 a 10% de dióxido de carbono (18).

Sus requerimientos nutricionales son: vitaminas del grupo B, biotina, riboflavina, tiamina y ácido tióctico; algunos aminoácidos, cisteína, glutamina, isoleucina, leucina y valina, y carbohidratos tales como la glucosa (25, 34).

2.2.1 Resistencia

Es bastante resistente a condiciones ambientales adversas; puede sobrevivir semanas a meses en hierba, arena, tierra, leche y otros productos (18).

Se ha comprobado su supervivencia durante 295 días y aún más tiempo en suelos húmedos (35).

En leche en polvo sobrevive 12 semanas (36).

En queso Cheddar y en helados, su supervivencia es mayor a los 150 días (18).

Puede sobrevivir 30 días en yogurt (37).

Soporta altas concentraciones de cloruro de sodio ya que es capaz de sobrevivir en concentraciones de 25%; se desarrolla a concentraciones de 10% (18, 25, 38); la sal y los nitritos utilizados separadamente no son buenos inhibidores, pero sí lo son cuando se utilizan en combinación en cantidades permitidas para ellos (18).

2.2.2 Termorresistencia

Su resistencia al calor ha sido estudiada a raíz de un brote de listeriosis ocurrido en los Estados Unidos por el consumo de leche pasteurizada (4), originando diferentes opiniones en los investigadores referentes a que la pasteurización clásica no siempre destruye a *L. monocytogenes*.

Estas son algunas de las principales teorías:

- Potel (1955) sostiene que la bacteria puede resistir la temperatura de pasteurización (39).
- Barza (1985) considera la teoría no comprobada de la supervivencia de *L. monocytogenes* en la leche pasteurizada y aduce que se debe a que la bacteria es englobada por el alto contenido de material graso o por los leucocitos de ésta (casos de mastitis) (40).
- Bradshaw (1985) informa que el tratamiento térmico de la leche a 71,7 °C

- durante 9 segundos, con un contenido de 10^5 células de *L. monocytogenes* por mL, es suficiente para que la leche esté libre de *L. monocytogenes* (41).
- Doyle (1987) dice que *L. monocytogenes* sobrevive a la temperatura de pasteurización HTST, 71,7 °C por 15,4 segundos (42).
 - Obiger (1976) afirma que *L. monocytogenes* muere a temperatura de pasteurización HTST (18).
 - Algunos investigadores dicen que la termorresistencia de *L. monocytogenes* no se ve afectada por su situación intracelular (43, 44).
 - La Organización Mundial de la Salud (OMS) (1988) concluye que la pasteurización es un proceso seguro el cual reduce el número de *L. monocytogenes* contenido en la leche cruda a niveles en los cuales no presenta un riesgo apreciable para la salud humana, pero recomienda hacer más estudios al respecto (5).

L. monocytogenes puede estar presente en la leche como germen libre, especialmente después de una buena homogenización o en forma intracelular. Según algunos investigadores, cuando se encuentra libre en la leche, se destruiría por las técnicas habituales de pasteurización, pudiendo resistirla si se encuentra en forma intracelular y cuando existe alta carga microbiana (18).

Se deduce, entonces, que si los microorganismos resisten la temperatura de pasteurización de la leche, sobre todo si su carga inicial es elevada, los pocos que puedan sobrevivir tienen la oportunidad de multiplicarse a temperatura de refrigeración durante el almacenamiento del producto debido al carácter psicrotrófico de la bacteria; y con respecto a la mejora en la tecnología de los alimentos, que ha conseguido la disminución de la flora competitiva de contaminación, pero, en el caso de *L. monocytogenes*, por ser psicrotrófico continúa el riesgo, debido a que crecerá más fácilmente (18).

La cocción de productos cárnicos a una temperatura interna de 70°C durante 2 minutos, destruirá *L. monocytogenes* (34, 45, 46).

2.2.3 Patogenicidad

Uno de los tantos factores de patogenicidad de *L. monocytogenes* es la producción de una hemolisina llamada listeriolisina O (LLO), la cual ocasiona la lisis de los glóbulos rojos, observándose como una ligera beta-hemólisis en agar sangre (18, 34); sin embargo, esta hemólisis es extremadamente variable y se dificulta su detección *in vitro* (47).

2.3 Características bioquímicas

(18, 25, 28)

Cuadro 2

Reacciones bioquímicas	Respuesta
Técnica de Henry para observación de colonias producida por luz oblicua transmitida	Colonias azul-gris
Catalasa	Positiva
Citocromo oxidasa	Negativo
Motilidad en forma de sombrilla (T: 20-25 °C)	Positiva
Voges-Proskauer	Positivo
Rojo de metilo	Positivo
H ₂ S	Negativo
Indol	Negativo
Reducción de nitratos	Negativo
Hidrólisis de la esculina	Positivo
Hidrólisis de la caseína	Negativo
Hidrólisis de la gelatina	Negativo
Hidrólisis de la urea	Negativo
Fermentación sin gas de:	
· Glucosa	Positivo
· Ramnosa	Positivo
· Maltosa	Positivo
Fermentación de:	
· Xilosa	Negativo
· Manitol	Negativo

2.4 Constitución antigénica

Las cinco verdaderas especies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. seeligeri*, se caracterizan por poseer antígenos que dan origen a 17 serovariedades.

Los antígenos somáticos O (1-4) dan origen a 15 serovariedades y hay 5 antígenos flagelares o antígenos H (a-e).

L. monocytogenes está representada por 13 serovariedades (34) (cuadro 3).

En *L. monocytogenes*, los serotipos que con mayor frecuencia se aíslan son el serotipo 1 con 33% y el serotipo 4 con 65% (18, 34).

95% de los aislamientos humanos corresponde a los serotipos 1/2 a, 1/2b, 4b (6). Pero, la mayoría de los serotipos aislados de origen humano corresponde al serotipo 4b, mientras que el serotipo 1/2 se ha aislado principalmente de los alimentos y del ambiente de producción (48).

Cuadro 3. Serología de las diferentes especies de *Listeria*.

Especies	Serotipos
<i>L. monocytogenes</i>	1/2A, 1/2B, 1/2C, 3A, 3B, 3C, 4A, 4AB, 4B, 4C, 4D, 4E, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4AB, 6A, 6B, Un ^a
<i>L. welshimeri</i>	6A, 6B
<i>L. seeligeri</i>	1/2B, 4C, 4D, 6B, Un

^aUn: indefinido

Tomado de: FDA. Manual de bacteriología analítica. *Listeria monocytogenes*; 1995(28).

Gray y Killinger, en 1966, indicaron que los serotipos de *Listeria* no están relacionados ni con el hospedador ni con el proceso patológico, ni tampoco con el origen geográfico (16).

A pesar de que los serotipos 1/2 a y 4b presentan algunas diferencias geográficas, 65 a 80% de los brotes de listeriosis ocurrida en Estados Unidos y Canadá pertenece al serotipo 4b. En Europa oriental, África occidental, Alemania central, Finlandia y Suecia la serovariedad registrada es 1/2a; en Francia y Holanda, los serotipos aislados son 1/2a y 4b en proporciones aproximadamente iguales (49).

3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LISTERIOSIS

3.1 Definición

Se ha dado el nombre de listeriosis al grupo general de desórdenes causados por *L. monocytogenes* (8, 16) y es clínicamente definida cuando el microorganismo es aislado de sangre, de LCR o de tejidos que normalmente son estériles (placenta, feto) (8) y los alimentos se han visto implicados como el medio de transporte de *L. monocytogenes*, en la penetración al organismo en tejidos y órganos de elección (2).

3.2 Nota histórica

Hulphers, en 1911, aisló por primera vez *L. monocytogenes* de un foco necrótico del hígado de un conejo, un bacilo al cual le llamó *Bacillus hepatis* (16).

En 1926, Murray, Webb y Swann lo aislaron durante una epidemia de mononucleosis que afectó a conejos y cobayos en algunos laboratorios de Cambridge, como un bacilo grampositivo y le dio el nombre de *Bacterium monocytogenes* (13); *monocytogenes*, debido al hallazgo de un gran número de monocitos en sangre periférica de animales infectados en forma natural y artificial (16). Luego, se aisló de ovejas, cabras, cerdos, caballos, ratas y moscas (18).

En 1927, Pirie le dio el nombre de *Listerella hepatolytica* (16), nombre que fue cambiado en 1940 por *Listeria monocytogenes* (16, 50).

Nifeldt, en 1929, informó el primer caso de listeriosis humana.

L. monocytogenes es realmente importante y comienza a ser investigado en los años ochenta, al presentarse una serie de epidemias relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con este microorganismo (5-8).

El primer brote de listeriosis se observó en 1981 en Nueva Escocia, Canadá; afectó a 41 personas, entre ellas, 7 adultos y 34 en edad perinatal y ocasionó la muerte a 18 personas. El alimento implicado fue la ensalada de repollo fertilizado con estiércol de ovejas con listeriosis. Esta ensalada fue refrigerada

durante un tiempo. El origen se confirmó por medio de estudios epidemiológicos y microbiológicos y se aisló el serotipo 4b (3).

En 1983, un brote de listeriosis ocurrió en Boston (Massachusetts); afectó a 49 personas: 7 recién nacidos y 42 adultos, de los cuales murieron 14 personas. El alimento incriminado fue la leche pasteurizada; posiblemente, contaminada después de la pasteurización; se aisló el serotipo 4b en 80% (4).

En 1985, en California, se presentó una epidemia ocasionada por *L. monocytogenes*, la cual afectó a 142 personas. 93 eran mujeres embarazadas y 49 adultos. Ocasionó la muerte a 48 personas. El alimento implicado fue el de queso fresco, tipo mexicano. 82% correspondió al serotipo 4b (51).

En Filadelfia (Pensilvania), entre 1986 y 1987, hubo 36 casos: 32 personas adultas no embarazadas y 4 recién nacidos. En total, ocasionó la muerte a 16 de las personas afectadas. Los alimentos implicados fueron los helados, el salami y las hortalizas (52). Estos fueron los mayores brotes de listeriosis en Norteamérica entre 1981 y 1987.

En Europa, se observaron brotes de listeriosis desde 1983 a 1993. Suiza registró 122 casos de listeriosis, en un período de cuatro años, comprendido entre 1983 y 1987. El alimento implicado fue queso de pasta blanda de marca Vacherin Mont d'Or (6, 53). Pero, el brote de listeriosis más relevante fue ocasionado por este tipo de quesos consumidos en la cena de año nuevo en 1987 que afectó a 31 personas, de las cuales murieron 3 (7).

El Reino Unido, en 1988, registró 2 casos esporádicos, ambas mujeres embarazadas, y se produjo aborto y muerte del feto. Los alimentos implicados fueron el pollo y el queso (54).

En el Reino Unido, entre 1989 y 1990, hubo un brote que afectó a 300 personas y el alimento implicado fue un paté (6, 55).

En la mayoría de los brotes anteriores, se encontró el serotipo 4b como el agente causal.

En Francia, en 1992, se presentaron 279 casos de listeriosis en 10 meses. El alimento implicado fue la lengua de cerdo en aspic (6, 56).

Francia, informó 25 casos de listeriosis en 1993, ocasionados por productos sudados de cerdo (6, 57).

Observando los anteriores datos, podemos concluir que se conocen pocos brotes epidémicos pero muy importantes y con una alta mortalidad.

En Colombia, a pesar de que se habían presentado casos comprobados de listeriosis humana (24), no se había realizado ningún estudio que demostrara la relación de dicha enfermedad con la ingestión de algunos alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Fue, entonces, cuando el Grupo de Microbiología de Alimentos del Instituto Nacional de Salud hizo su primera investigación en leches crudas y pasteurizadas que consume la población cundiboyacense (19).

3.3 Transmisión

A pesar de que la epidemiología de la enfermedad continúa siendo bastante desconocida, todo parece indicar que la infección se produce primordialmente por vía oral (2, 32) siendo las fuentes de infección: el hombre, los animales y el medio ambiente (18).

Las vías de contagio son:

- Por exposición directa, el germen invade la piel y las conjuntivas. Es el caso de veterinarios y granjeros que manipulan animales recién nacidos y productos del aborto (16).
- Por vía transplacentaria o transgenital (3).
- Principalmente, por vía oral debido a la ingestión de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (1-3).

Estudios epidemiológicos realizados durante las principales epidemias en EUA y Europa han demostrado que la ingestión de alimentos contaminados causa la enfermedad (3, 4, 18, 32) y que, en la mayoría de brotes epidémicos en los seres humanos, se ha encontrado una fuente alimentaria (3, 4) y debido a que el microorganismo se puede encontrar en todo lugar y, como consecuencia de sus características ecológicas, tiene la capacidad de ser transmitido al ser humano mediante la cadena alimenticia, medio ambiente-animal-alimento-persona (figura 1) (58).

Se ha demostrado que la contaminación por *L. monocytogenes* en plantas procesadoras de alimentos proviene de animales o productos de origen ani-

mal infectados, trabajadores portadores asintomáticos o por manipulación inadecuada de los alimentos (6).

Los desechos líquidos de las plantas procesadoras de alimentos donde la bacteria puede crecer aumenta la diseminación de *L. monocytogenes* en el ambiente (6).

El papel de los silos en la transmisión de la enfermedad animal fue documentado por Gray en 1966 (16).

L. monocytogenes es, por tanto, un microorganismo ambiental cuyo medio primario de transmisión a los humanos es a través de los alimentos contaminados durante su producción y procesamiento (5).

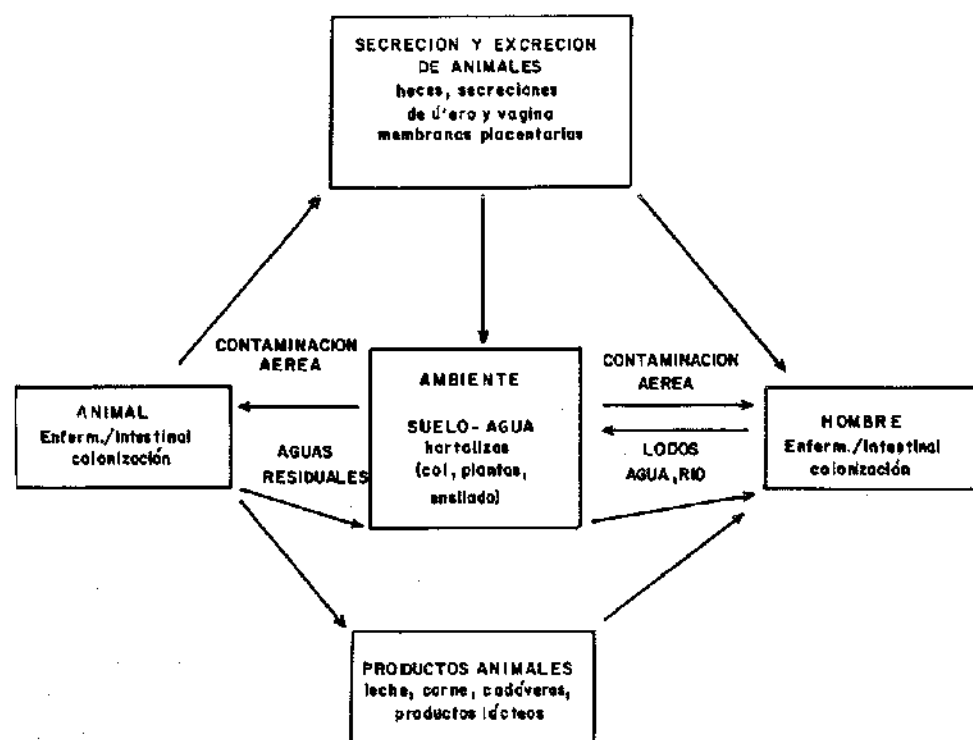


Figura 1. Epidemiología de la listeriosis, tomado de AUdirier A and Martin C. Phage typing of *Listeria monocytogenes* int. J. Food microbiology 1989;8:(58)251-7

3.4 Grupos de riesgo

Diversos estudios epidemiológicos muestran ciertas categorías de consumidores los cuales son particularmente sensibles a la infección con *L. monocytogenes*, provocando enfermedades graves y muerte. Se trata, en particular, de:

- mujeres en embarazo (5, 6, 8);
- los recién nacidos o niños en el período neonatal (5, 6, 8);
- personas en las cuales el sistema inmunológico se encuentra comprometido debido a enfermedades tales como el cáncer, el SIDA, la diabetes, etc.; intervenciones médico-quirúrgicas como los trasplantes renales, los tratamientos de quimioterapia, la radioterapia o la terapia con cortisona (9, 10), o como consecuencia de hábitos como el alcoholismo (5, 6, 8);
- ancianos en los cuales los mecanismos de defensa se encuentran disminuidos (5, 6, 8).

3.5 Alimentos asociados

Los alimentos que con mayor frecuencia se han asociado con *L. monocytogenes* son las leches crudas, la carne de cerdo, la carne cruda de ave, la carne picada y congelada de vaca, la carne de cordero, la carne cruda de vaca, el bistec de carne de vaca, las empanadas de carne de vaca, los embutidos secos y frescos de carne cruda en general, las carnes listas para comer, el salchichón, las porciones de carne de pavo, los canales de pollo, los pollos asados, los pollos y los patos crudos, el pollo precocido refrigerado, los helados, los quesos blandos y semiblandos, los alimentos marinos, el huevo entero líquido, los asados de carne al por menor, los alimentos semipreparados congelados, las ensaladas frescas, las hortalizas como rábanos, pepinos, col, repollo, lechuga y champiñones, y las patatas (34).

3.6 Prevención y control

A pesar de la amplia distribución de este microorganismo en la naturaleza, la infección es prevenible y susceptible de control con medidas de relativa fácil aplicación y bajo costo, aplicables para cualquier patógeno. De hecho, es necesario reconocer que un programa eficaz de prevención y control implica la participación activa de muchos grupos y entidades.

A continuación se plantean medidas específicas dadas, en su mayoría, por la Organización Mundial de la Salud que corresponde cumplir a los diferentes sectores afectados y a las entidades de control.

3.6.1. Para la industria

- realizar campañas de capacitación y concientización para manipuladores de alimentos, sobre prácticas adecuadas de higiene y limpieza (5);
- asegurar la adecuada higiene y limpieza en todo el personal que, directa o indirectamente, manipula alimentos (5);
- evitar la contaminación cruzada de productos crudos con cocidos (5);
- aislar físicamente todas las áreas del proceso (5);
- mantener en la fábrica, en cuanto sea posible, un ambiente seco debido a que *L. monocytogenes* es común en ambientes húmedos (5);
- identificar oportunidades de supervivencia y crecimiento de *L. monocytogenes* en el ambiente de la industria y, por supuesto, en el producto (5);
- identificar vehículos de contaminación y eliminarlos (5);
- implantar regímenes de cuarentena adecuados para eliminar microorganismos patógenos en caso de contaminación (5);
- asegurar que las comidas empacadas en empaques intactos que han recibido procesos listerizados en cualquier momento de su producción, estén libres de *L. monocytogenes* durante el tiempo normal durante el cual el producto permanece en los estantes y mientras el empaque permanezca intacto (5);
- asegurar la adecuada conservación de los productos ya elaborados (5);
- desarrollar investigación de nuevas soluciones tecnológicas al problema de *L. monocytogenes* en productos que no se someten a tratamientos listericidas antes del consumo pero que han sido tradicionalmente considerados sin problemas, como es el caso de las comidas crudas mezcladas con otros ingredientes (5);
- utilizar un programa óptimo de control de calidad; se recomienda la implantación del sistema HACCP (análisis de riesgos y puntos críticos de control) (5);
- seleccionar los desinfectantes que sean capaces de inactivar los microorganismos en presencia de materia orgánica (5). Un desinfectante que se puede recomendar es el hipoclorito de sodio a concentraciones de 50 a 200 ppm con tiempos de contacto de 3 a 30 minutos; pero, en cada situación específica, se debe emplear la concentración bactericida mínima durante el menor tiempo posible (59, 60);
- colaborar de cerca con los operarios de los equipos para mejorar el diseño higiénico (5);
- asegurar que los procesos de limpieza y desinfección sean efectivos (5);
- asegurar la adecuada conservación de los productos ya elaborados (5);
- recordar que el mejor control de la listeriosis con respecto a los alimentos es la aplicación de buenas prácticas de manufactura (18). Por tanto, la

comisión internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos (ICMSF) considera que sólo el dominio higiénico preventivo de cada etapa del proceso de fabricación de un alimento podrá reducir o eliminar *L. monocytogenes* (61).

3.6.2. Para las autoridades de salud

- Desarrollar programas amplios de información sobre la prevención de *L. monocytogenes* al consumidor (5);
- comenzar o continuar los programas de educación pública para ayudar a los consumidores a protegerse de este microorganismo en comidas crudas solas o mezcladas y en comidas procesadas de frecuente manipulación (5);
- estimular el uso de radiación ionizante para la eliminación de *L. monocytogenes*, especialmente, comidas que son susceptibles de contaminación con este microorganismo y para cualquier comida empacada, procesada o cruda (5);
- verificar que los consumidores no reciban un falso sentido de seguridad tanto en comidas crudas como en procesadas (5);
- sustraer del mercado cualquier comida que haya demostrado ser casualmente asociada con casos humanos de listeriosis (5);
- trabajar con sectores afectados de la industria alimenticia para poder prevenir y eliminar la presencia de *L. monocytogenes* en las comidas (5);
- cooperar con la industria alimenticia, con universidades e institutos de investigación para coordinar programas de investigación sobre este microorganismo (5);
- promover investigación para determinar formas para reducir o eliminar *L. monocytogenes* de la comida cruda y de comida procesada en áreas de salud pública donde el impacto es mayor; por ejemplo, en delikatessen y restaurantes (8);
- educar a los profesionales de la salud acerca del problema de la listeriosis producida por los alimentos para que ellos puedan hacer recomendaciones apropiadas a los pacientes que tienen alto riesgo de contraer la enfermedad y acerca de los beneficios y riesgos de consumir alimentos crudos, mezclados o procesados (5);
- hacer un seguimiento epidemiológico de los casos de listeriosis humana clínicamente comprobados (5);
- establecer un sistema de monitorización para detectar casos aislados y epidemias de listeriosis humana (5);
- implantar medidas de vigilancia, control y análisis de alimentos susceptibles en las plantas de fabricación, para asegurar productos libres de

contaminación con *L. monocytogenes* (18). Al respecto, la ICMSF considera que estos análisis sólo verifican que el sistema de control de calidad implantado en la fábrica (HACCP) asegura calidad microbiológica. Además, la ICMSF considera que los análisis microbiológicos de *L. monocytogenes* para productos tomados en el mercado o en libre circulación no garantizan seguridad y, por tanto, no recomienda planes de muestreo propuestos para análisis de rutina de alimentos como medio para asegurar inocuidad (61).

3.6.3 Para las entidades prestadoras de servicios de salud

- Informar a las personas que pertenecen a los diferentes grupos de riesgo sobre la contaminación con *L. monocytogenes* (5);
- desinfectar sistemáticamente las salas y habitaciones ocupadas por recién nacidos infectados con listeriosis (3);
- tomar medidas de aislamiento apropiadas para casos sospechosos y comprobados de listeriosis, especialmente, en áreas endémicas.

3.6.4 Para el sector de agricultura y ganadería

- Evitar el uso de fertilizantes crudos en los cultivos (heces y desechos) (5);
- incinerar los productos de animales infectados recién nacidos y de abortos ocasionados por *L. monocytogenes* (18);
- comercializar solamente leches procedentes de animales sanos, libres de mastitis. Gutter y colaboradores, en 1980, comprobaron la presencia de *L. monocytogenes* en la leche un mes después de la suspensión de los síntomas clínicos en el animal infectado (62).

3.6.5 Para el consumidor

- Adquirir productos alimenticios en expendios que ofrezcan la mayor seguridad por su empaque, conservación e higiene (5);
- no consumir leche cruda ni derivados lácteos elaborados con leche cruda (19, 20).

4. PATOGENIA

4.1 Virulencia

L. monocytogenes es un microorganismo virulento, facultativo intracelular (3, 16), que es capaz de invadir y multiplicarse en diversos tipos de células del huésped (eucariotes) (63, 64), especialmente en macrófagos (65, 66), enterocitos (67) y hepatocitos (68, 69) y es responsable de diversas infecciones en humanos y animales (16).

Los pasos en el proceso de la infección han sido objeto de interesantes estudios, los cuales sugieren la presencia de receptores de membrana, presentes en el hombre y en los animales, que permiten la penetración de la bacteria al enterocito, al hepatocito y al macrófago del huésped, y su capacidad de atravesar los endotelios y alcanzar los órganos blanco de infección (64).

Muchos de los conocimientos de la listeriosis humana han sido reproducidos experimentalmente en el ratón (70) y en la inducción de inmunidad mediada por células (71). Estos estudios revelan que, en una primera infección con *L. monocytogenes*, se produce una respuesta eficiente de inmunidad celular (linfocitos T) y que los anticuerpos juegan un papel (no medible) en la recuperación de la infección primaria y en la protección contra la infección secundaria (65, 70-72).

La entrada en el organismo del huésped ocurre con la ingestión de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (73), lo cual sugiere que el mejor sitio de penetración en el huésped es el intestino (74). La entrada en células intestinales es motivo de incertidumbre (72); se han descrito dos sitios: la penetración y multiplicación dentro de los enterocitos observada *in vivo* a través del microscopio electrónico (67) y en las células M que cubren las placas de Peyer, donde la bacteria penetra y se multiplica (75, 76). Luego, atraviesa la barrera intestinal donde puede invadir y multiplicarse en células fagocíticas (macrófagos) e ir por vía sanguínea a hígado y bazo (67).

En hígado, es rápidamente fagocitada por las células de Kupffer (macrófagos) y la mayoría del inóculo (90%, aproximadamente) es fagocitado durante las primeras seis horas (66, 68). Aquí, las bacterias sobrevivientes crecen e infectan los hepatocitos adyacentes, los cuales son destruidos por los

neutrófilos durante las primeras 24 horas y, en una etapa más tardía, de la infección por los macrófagos (69, 77).

Una vez lisados los hepatocitos, la bacteria es liberada y puede ser ingerida por neutrófilos o macrófagos; la temprana muerte en el hígado sirve para reducir la infección a niveles en los cuales el huésped puede resolver este problema por mecanismos de resistencia (73, 77, 78). En el ratón, el hepatocito es el mejor sitio para la multiplicación intracelular de la bacteria (69, 77).

Durante el proceso de infección, dependiendo de la respuesta inmunitaria del huésped, la bacteria será eliminada o diseminada por vía sanguínea al cerebro o a la placenta (16).

El mecanismo de entrada de *L. monocytogenes*, estudiado por un grupo de investigadores del Instituto Pasteur (7, 72, 73), muestra que cuando la célula bacteriana entra en contacto con el huésped hay una respuesta de fagocitosis, la cual es producida por dos tipos de células fagocíticas (72, 73): los macrófagos (65, 66) y las células no fagocíticas o fagocito-inducidas como son las células epiteliales intestinales (67) y los hepatocitos (68, 69).

En el caso de la penetración de la bacteria en la célula huésped a través de macrófagos, se requiere la presencia de receptores como el CR3 y otros aún no conocidos (72). Los estudios *in vitro* demuestran que en esta respuesta existen dos tipos de macrófagos de acuerdo con su actividad listericida, algunos que permiten el crecimiento intracelular de la bacteria y otros que la conducen a la muerte (65, 72, 79, 80); y que, de acuerdo con el tipo de receptor usado durante la fagocitosis, influye directamente sobre el destino de la bacteria (72).

En los macrófagos listericidas, la bacteria permanece atrapada en la vacuola del fagolisoma (81, 82); en este caso, el receptor utilizado es el receptor CR3 (81, 83, 84), mientras que los macrófagos peritoneales no listericidas fagocitan *Listeria* por otros receptores diferentes al CR3, aún no conocidos (84, 85).

Parece probable que los macrófagos listericidas destruyen *L. monocytogenes* por vías tóxicas diferentes (radicales de oxígeno, nitrógeno) (86, 87).

En el caso de la internalización inducida de *L. monocytogenes* en células no fagocíticas profesionales, (células epiteliales caco-2) intervienen dos proteínas (73): la internalina que es una proteína de 80 kD, proteína de la superficie de la célula (88) y la proteína P60 que es la proteína extracelular grande sugerida en el proceso de invasión y que tiene actividad bacteriolítica (89); el papel de la proteína P60 en la entrada debe ser indirecto debido a que la sola presencia de internalina es suficiente para la entrada de *L. monocytogenes* en células epiteliales caco-2 *in vitro* (72).

Los mutantes en el gen *inl A* que codifica para internalina, no son invasores en las células epiteliales de la línea caco-2. Además, la introducción de *inl A* en un plásmido en *L. innocua*, una especie no patógena y no invasora, permiten a esta bacteria recombinante entrar en las células caco-2 *in vitro* (72, 73). Se piensa que la proteína P60 es requerida en una etapa posterior de la división celular (89).

Además, los estudios de hibridación han mostrado que *inl A* es parte de una familia multigénica; un miembro de esta familia *inl B* que codifica para una proteína de la superficie es necesario para la entrada de *L. monocytogenes* en los hepatocitos humanos (HepG-2) y murinos (ATCC TIB73) (72, 74).

La infección en la célula huésped comienza con la internalización de la bacteria en la célula huésped (73).

La bacteria se encuentra en el fagolisoma donde permanece por 30 minutos antes de lisarlo (73). Las condiciones que existen en el fagolisoma, pH ácido 5,5 y bajas concentraciones de hierro no le permiten multiplicarse (64), pero provocan la secreción de una hemolisina llamada listeriolisina O (LLO)(64). LLO es una proteína de 58,6 kD (73, 90) que reconoce el colesterol de membrana (73) y después, por oligomerización, va a formar poros lisando la membrana del fagolisoma y emigrando al citosol de la célula en donde encuentra un medio favorable para su multiplicación (64, 91).

Esta listeriolisina O (LLO) es el primer factor de virulencia identificado y juega un papel esencial en la multiplicación intracelular (64, 92). Sin embargo, no existe una correlación entre la actividad hemolítica de una cepa y su virulencia (47).

El mecanismo de escape de la bacteria, de la membrana vacuolar al citoplasma, ha sido estudiado por mutagénesis de transposones y se observa que los mutantes no hemolíticos son incapaces de multiplicarse intracelularmente debido a que no producen LLO y, por tanto, no pueden lisar la membrana (64, 93).

Diversos estudios sugieren que otros factores diferentes a la LLO pueden estar involucrados en el escape del fagolisoma como la enzima fosfolipasa C (PI-PLC)(73, 94, 95) enzima que actúa sobre la fosfatidilinositol, es una proteína de 36,3 kDa (96).

Una vez ubicada la bacteria en el citoplasma, se multiplica en un tiempo aproximado de una hora y comienza a moverse asociándose con filamentos de actina de la célula huésped (73, 93). Estos filamentos se reúnen en la parte posterior de la bacteria interviniendo en su movimiento a través del citoplasma a la periferia de la célula (73, 93, 96). Este movimiento es rápido; se piensa que la fuerza de propulsión (en forma de cohete) se debe a la polimerización de la actina de la célula huésped (96-98).

El contacto del movimiento de la bacteria con la membrana del plasma induce la formación de una protuberancia para la formación del pseudópodo; el contacto entre esta protuberancia y las células vecinas resulta en la internalización de la bacteria, quedando el pseudópodo en la nueva célula infectada; la bacteria es rodeada por dos membranas plasmáticas, las cuales deben ser lisadas para poder iniciar un nuevo ciclo de multiplicación y movimiento (73, 99). La lisis de las dos membranas de la vacuola es debida a la fosfolipasa C o lecitinasa específica de fosfatidilcolina (PI-PLC) (100), una proteína de 33 kDa (73, 95).

Entonces, *L. monocytogenes* se puede diseminar directamente de una célula a otra, evitando así unos mecanismos de defensa del huésped como son los anticuerpos circulantes y el complemento (figura 2) (72).

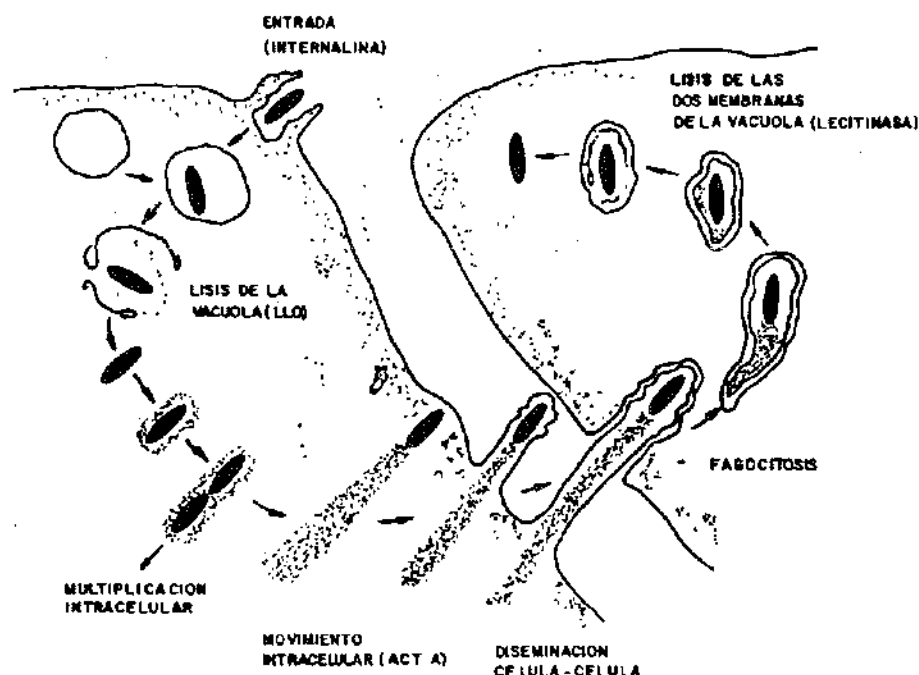


Figura 2. Los pasos sucesivos del proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes*. Tomado de Dramsi S., Lebrun M., Cossart P. Molecular and genetic determinants involved in invasión of mamalian cells by *Listeria monocytogenes* 1996 Instituto Pasteur (72).

4.2 Listeriosis humana

L. monocytogenes ocasiona la enfermedad en humanos en la forma de infecciones oportunistas severas (3, 100).

La puerta usual de entrada es el intestino y aún no se sabe si produce diarrea por sí misma o si aprovecha la infección por otro patógeno para poder invadir la mucosa intestinal y, de allí, diseminarse por vía hematógica para infectar otros órganos como el hígado, el bazo, el corazón, el sistema nervioso central y el útero (3, 24, 32). Los síntomas gastrointestinales tales como náuseas, vómitos y diarreas pueden preceder a las formas más serias de listeriosis o pueden ser solamente síntomas (8, 32).

El período de incubación en personas adultas es de una a varias semanas de duración y, en bebés infectados en el momento de nacer, el período de incubación es de 1 a 4 semanas después del nacimiento (34).

Cuando *L. monocytogenes* se disemina por vía sanguínea al sistema nervioso central puede ocasionar enfermedades como la meningitis supurativa aguda, la cerebritis focal o multifocal, la meningoencefalitis, el absceso cerebral o espinal, la listeriosis pontobulbar o la romboencefalitis (12, 24, 32, 101, 102). Es probable que muchos casos de listeriosis no se diagnostiquen debido a que se pueden confundir fácilmente con otras infecciones bacterianas tales como micosis o neurotuberculosis (24, 32, 102).

Esta listeriosis del SNC es de rara ocurrencia en el adulto y afecta tanto a huéspedes normales como a personas con compromiso de la inmunidad celular (12, 24, 32).

En la mujer embarazada, *L. monocytogenes* se disemina por vía sanguínea y atraviesa la barrera transplacentaria, ocurriendo infección en el feto y en el recién nacido (3, 32). Esta infección ocurre con mayor frecuencia en el tercer trimestre del embarazo; se puede presentar como asintomática o presentarse como un simple período febril de corta duración o proceso viral, mialgias y cefalalgias (6, 7, 32) en la que, tres semanas más tarde de la presencia de estos síntomas (7, 32), ocurre el aborto espontáneo, la muerte fetal, los mortinatos, la septicemia neonatal severa y la meningitis infantil (6, 7, 32).

La literatura hace mención de historias de pérdidas fetales ocurridas por *L. monocytogenes*, pero no han sido lo suficientemente documentadas mediante la tipificación de cepas (6).

La mujer embarazada es más susceptible de sufrir listeriosis debido a la disminución de la inmunidad celular (7) y, también, al aumento de la hormona progesterona la cual permite el desarrollo de *L. monocytogenes* (18).

Produce también granulomatosis, septicemia en neonatos (3, 32) y septicemias en adultos, las cuales se ven con frecuencia comprometidos con otitis media, faringitis y sinusitis (16, 32).

Produce endocarditis, neumonía, conjuntivitis (1, 32, 101), uretritis (3), peritonitis, lesiones cutáneas papulares y pústulas cutáneas (16); como el número de casos de listeriosis en humanos es relativamente pequeño, se sospecha que se producen formas subclínicas de esta infección que, de alguna manera, conducen a la inmunidad (24, 32).

En neonatos, es la tercera causa de muerte por meningitis ocasionada por *L. monocytogenes* después de *E. coli* y *S. agalactiae*; también produce granulomatosis infantil séptica (3).

La mortalidad, en casos de meningoencefalitis asociados a septicemias y en período neonatal, puede llegar hasta 80% (8, 32).

Pero, la mortalidad por meningitis influida por factores predominantes es de 30%, en pacientes inmunodeprimidos es de 60% y en huéspedes normales de 13% (24, 101).

En los Estados Unidos, el Centro para el Control de la Enfermedades (CDC) informa que se producen 1.600 casos de listeriosis humana por año, de las cuales ocurren 415 muertes (8).

En el hombre y en los animales, existe un estado de portador asintomático (16, 18, 32).

La dosis infectante de *L. monocytogenes* aún no es conocida (5, 8, 18). Para algunos investigadores, es de 10^3 a 10^5 UFC/mL (18), pero, es lógico pensar que la dosis infecciosa en *L. monocytogenes* como de cualquier otro patógeno transmitido por alimentos, depende de los siguientes factores: el estado inmunológico del huésped, la concentración del patógeno en el alimento, la virulencia de la cepa y la cantidad de alimento consumido (6).

4.3 Listeriosis animal

Gutter, en 1985, clasificó la enfermedad así (15, 17):

I- «Infección de la gravidez con el subsecuente aborto, mortinatos, o muerte neonatal» (15, 17). Los bovinos y las ovejas son los animales domésticos afectados con mayor frecuencia; por vía sanguínea, se infecta el útero y, rápidamente, la placenta y el feto es abortado. También, se han informado abortos en cerdos.

II- «Infecciones viscerales o septicemias» (15, 17). Estas infecciones son las más comunes durante las primeras semanas de vida y se manifiestan por lesiones en el hígado. Están asociadas con el nacimiento de corderos como una infección antenatal; los bovinos pueden estar afectados en menor grado.

III- «Encefalitis en rumiantes» (15, 17). Los animales domésticos como ovejas, cabras, ganado y búfalos de agua dulce son los que con mayor frecuencia se ven afectados. Es más común en la época de invierno en Norteamérica, en regiones de severos climas, debido al estrés del animal al tener que soportar fríos intensos y es más común en ganado de carne que en ganado de leche

debido a que están menos protegidos al frío. Afecta el cerebro y puede ocasionar parálisis facial y excesiva salivación, aunque no todos los animales que sufren listeriosis presentan estos síntomas.

La encefalitis puede ser extremadamente aguda en ovejas y cabras, causando la muerte en 4 a 48 horas después de la aparición de los primeros síntomas de la infección. En bovinos, la infección es menos aguda y la mayoría de las vacas sobreviven 4 a 14 días después de los primeros síntomas de la infección.

IV- «*Queratitis infecciosa bovina*» (15, 17). Es una infección que ocurre en los ojos, pero se ha visto que *L. monocytogenes* no es el único agente etiológico de esta enfermedad puesto que se ha aislado en presencia de otros microorganismos como *Neisseria catarrhalis*, *Mycoplasma bovis* y *Moraxella bovis*.

V- «*Mastitis bovina*» (15, 17). Se ha aislado *L. monocytogenes* en casos de mastitis bovina, pero no en una alta frecuencia como era de esperarse (16, 17). Gutter y colaboradores, en 1980, afirmaron que los bajos informes de mastitis bovina se deben a que, en el material para examen, *L. monocytogenes* se pierde fácilmente y demostraron que, en la leche infectada, se excretaba durante un mes después de haber desaparecido los síntomas de la enfermedad (17, 62).

VI- «*Infecciones mixtas*» (15, 17). Han ocurrido, junto con infección de *L. monocytogenes*, otras infecciones y condiciones, pero, la relación entre los dos no es aún muy clara. Esto incluye abortos en bovinos, mastitis bovina y encefalitis en ovinos.

VII- «*Otras especies*» (15, 17). La incidencia de listeriosis causada por *L. monocytogenes* en cerdos es rara, pero los pocos casos informados son similares en ovejas y en ganado.

En aves de corral, usualmente es la forma de septicemia, aunque se puede afectar el SNC.

Los pájaros son bastante resistentes a la infección por *L. monocytogenes* y en ellos ocurre cuando se han vuelto susceptibles por otras enfermedades. Los roedores han sufrido listeriosis como los conejos domésticos y las chinchillas.

4.4 Diagnóstico

1. Diagnóstico epidemiológico (3, 7, 8)

2. Diagnóstico clínico

El aislamiento, la identificación y la serología a partir de muestras de sangre, LCR, secreciones vaginales, placenta, en muestras de materia fecal y de frotis rectales de *L. monocytogenes* se puede lograr, pero con dificultades y limitaciones (8, 32). En el laboratorio, *L. monocytogenes* se puede confundir fácilmente en la coloración de Gram con difteroides, *H. influenzae* o *Streptococcus pneumoniae* (24, 32).

4.5 Tratamiento

Cuando la listeriosis se diagnostica en una etapa temprana de la infección, se puede tratar satisfactoriamente con altas dosis de antibióticos; los más frecuentemente usados son la ampicilina o la penicilina sola o en combinación con aminoglucósidos (24, 32, 73).

Varios estudios *in vitro* demuestran que cuando se combina la ampicilina con aminoglucósidos se alcanza un efecto bactericida mucho más rápido que si se administraran en forma individual y, por tanto, favorece la destrucción intracelular de la bacteria (24, 32, 103).

Otros antibióticos que se pueden utilizar en el caso de que la persona sea alérgica a la penicilina son el cotrimoxazol, la eritromicina, el cloranfenicol, la rifampicina y la amoxicilina (1, 24, 32, 103).

Se están haciendo estudios *in vitro* e *in vivo* con liposomas cargados con ampicilina con resultados satisfactorios, con el objeto de favorecer la penetración del antibiótico cuando *L. monocytogenes* se encuentra en forma intracelular y así ocasionar su muerte debido a que los antibióticos no siempre la destruyen en su totalidad por su situación intracelular (24, 32, 104).

5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

5.1. Recomendaciones previas a los análisis

En la investigación de *L. monocytogenes*, las muestras perecederas deben enviarse, conservarse y almacenarse a temperaturas de refrigeración (4 °C) (28), siempre que no sea posible su análisis en las primeras horas después de recibida.

Si las muestras llegan congeladas, deben mantenerse en ese estado hasta su análisis y deben analizarse en un período no superior a 7 días (105).

Las muestras congeladas se deben descongelar para su análisis en su envase original o en el recipiente en que llegaron al laboratorio durante un tiempo máximo de 18 horas (105).

Las muestras no perecederas deben almacenarse en un lugar fresco, protegido de la luz, la humedad, la contaminación y analizarse en un plazo máximo de 3 días (105).

5.2. Preparación de los homogenizados

El proceso de homogenización puede realizarse en homogenizador (106), el cual es en la actualidad el método más adecuado para una buena homogenización; también puede efectuarse con licuadora o manualmente con la ayuda de implementos estériles.

Procedimiento:

- Pesar en la bolsa para homogenizador, previamente tarada, 25 g representativos de la muestra total (tomando tanto de la superficie como de su interior).
- Añadir 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (EB).
- Colocar la bolsa en el homogenizador y hacer funcionar el aparato por 2 minutos, el tiempo máximo de homogenización dependerá del tipo de alimento. No debe sobrepasar los 3 minutos.

5.3. Investigación de *L. monocytogenes* en alimentos

La principal vía de entrada de este microorganismo en el cuerpo humano es la oral. Es de suma importancia el análisis de los alimentos para detectar su presencia. Aún no es posible recomendar un solo método para el aislamiento

y la identificación de *L. monocytogenes* que sea completamente satisfactorio para todos los alimentos. Los métodos que se utilizan son en esencia similares en principio; comprenden varias etapas sucesivas: enriquecimiento selectivo, siembra en placas de agar selectivo, identificación de las colonias con pruebas bioquímicas, confirmación serológica y tipificación por medio de bacteriófagos.

La presencia de *L. monocytogenes* en productos procesados térmicamente indica tratamiento inadecuado o contaminación posterior al proceso (107).

5.4 Equipos y materiales

- Homogenizador con sus respectivas bolsas
- Balanza de una capacidad no inferior a 2.500 g y una sensibilidad de 0,1 g.
- Instrumentos para preparar las muestras: cuchillos, tenedores, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, sacabocados, morteros con sus respectivos pistilos, etc., previamente esterilizados en autoclave o por aire caliente.
- Refrigerador de 0 a 5 °C.
- Erlenmeyer con capacidad de 500 mL
- Estufa de incubación a 30 y 35 °C $\pm$ 2 °C
- Baño de agua regulable
- Microscopio
- Cabina de flujo laminar
- Microscopio estereoscopio
- Potenciómetro
- Centrífuga
- Pipetas bacteriológicas de 1 y 10 mL
- Cajas de Petri (90 a 100 mm)
- Tubos de ensayo
- Láminas portaobjetos
- Asas de inoculación
- Pipeteador
- Gradillas

5.5. Medios de cultivo

- Caldo de enriquecimiento para *Listeria* (EB), volúmenes de 225 mL por erlenmeyer (medio #1)

- Agar Oxford en placa (OXA) (medio #2)
- Agar Palcam en placa (medio #3)
- Agar triptosa con ácido nalidíxico en placas (ATN) (medio #4)
- Agar tripticasa soya con extracto de levadura en placa (TSAYE) (medio #5)
- Caldo de infusión cerebro-corazón, volúmenes de 5 mL por tubo (medio #6)
- Agar movilidad nitrato modificado Hatano Schuch, volúmenes de 10 mL por tubo (medio #7)
- Agar tripticasa soya adicionado con 5% de sangre desfibrinada de cordero en placas con 15 mL (medio #8)
- Agar Columbia doble capa al 5% de sangre desfibrinada de cobayo en placas (medio #9)
- Caldo carbohidrato rojo de fenol para los hidratos de carbono: xilosa, ramnosa y manitol, volumen de 5 mL por tubo (medio #10)
- Agar infusión cerebro-corazón, tubos, volúmenes de 10 mL por tubo con superficie inclinada (medio #11)
- Caldo de enriquecimiento para *Listeria* LEB (1), volúmenes de 225 mL por erlenmeyer (medio #12)
- Tubos con 10 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* LEB 2 (medio #13)
- Agar triptosa, tubos, volúmenes de 10 mL por tubo con superficie inclinada (medio #14)

5.6. Reactivos

- Solución de acriflavina-HCl al 0,5% en agua destilada (reactivo #1)
- Solución de ácido nalidíxico-sal sódica al 0,5% en agua destilada (reactivo #2)
- Solución de cicloheximida al 1% en solución al 40% de etanol-agua (reactivo #3)
- Peróxido de hidrógeno al 3% (vol/vol) (reactivo #4)
- Colorantes de la tinción de Gram (reactivo #5)
- Reactivo de Gries (reactivo #6)
- Polvo de zinc (reactivo #7)
- Sangre desfibrinada de cordero o de oveja (reactivo #8)
- Sangre desfibrinada de cobayo (reactivo #9)
- Solución de xilosa al 5% (reactivo #10)

- Solución de ramnosa al 5% (reactivo #11)
- Solución de manitol al 10% (reactivo #12)
- Estuche de sueros tipificadores de *Listeria* (reactivo #13) (Difco)
- Bacto FA buffer dried, Difco (reactivo #14)
- Solución salina estéril al 0,85% (reactivo #15)
- Solución acriflavina al 1% en hidróxido de sodio 0,1N (reactivo #16)
- Solución de acriflavina al 0,2% en hidróxido de sodio 0,1N (reactivo #17)
- Solución de ácido nalidíxico-sal sódica al 2% en hidróxido de sodio 0,1N (reactivo #18)

5.7. Técnica para productos lácteos

La técnica utilizada para el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* es la recomendada por la FDA, modificada en algunos aspectos (28).

5.7.1. Método de aislamiento

5.7.1.1. Enriquecimiento selectivo

- Homogenizar 25 g de la muestra con 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (EB) (medio #1)
- Incubar a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24-48 horas
- Realizar control positivo con cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19118
- Realizar control negativo con cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

5.7.1.2. Siembra en placa con medios selectivos a las 24 y a las 48 horas

- Transferir una asada del cultivo obtenido en el caldo de enriquecimiento (EB) a placas con agar Oxford (medio #2) y Palcam (medio #3); aislar por agotamiento
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24-48 horas
- Realizar control positivo: cepa *L. monocytogenes* ATCC 19118
- Realizar control negativo: cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Las colonias típicas de *L. monocytogenes*, en las placas de agar Oxford, son de color verde-negro con un halo negro, debido a la hidrólisis de la esculina *L. monocytogenes*: esculina (+).
- Las colonias típicas de *L. monocytogenes* en las placas de agar Palcam son de color verde grisáceo con un halo marrón-negro sobre un fondo rojo cereza, debido a la hidrólisis de la esculina y no fermentación del manitol.

L. monocytogenes: esculina (+), manitol (-)

Otras bacterias pueden formar halos negros, pero el desarrollo de color toma más de dos días.

- Seleccionar 3-5 colonias típicas de *Listeria* en cada placa de agar utilizada

5.7.1.3 Purificación (107)

- Con asa recta, tocar suavemente cada colonia seleccionada, sembrarla por agotamiento en una placa con agar triptosa-ácido nalidíxico (ATN) (medio #4)
- Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 18-24 horas
- Observar a las 24 horas las colonias crecidas en el agar (ATN) por el método de iluminación de Henry (108) con ayuda de un estereoscopio. Un procedimiento sencillo es disponer de una fuente de luz blanca, un espejo plano y un trípode. La luz debe incidir sobre el espejo, formando un ángulo de 45° y reflejarse hacia arriba atravesando la placa de agar en un ángulo de 45° ; observar la placa mirándola desde arriba (figura 3).
- Realizar control positivo: cepa *L. monocytogenes* ATCC 19118
- Realizar control negativo: cepa *Streptococcus faecalis* ATCC 19433
- Las colonias de *L. monocytogenes* son pequeñas, de borde nítido, ligeramente abombadas con superficie lisa y, con la luz incidente oblicua, exhiben superficie azulada.
- Las colonias de *S. faecalis* son amarillas hasta amarillas rojizas tornasoladas.

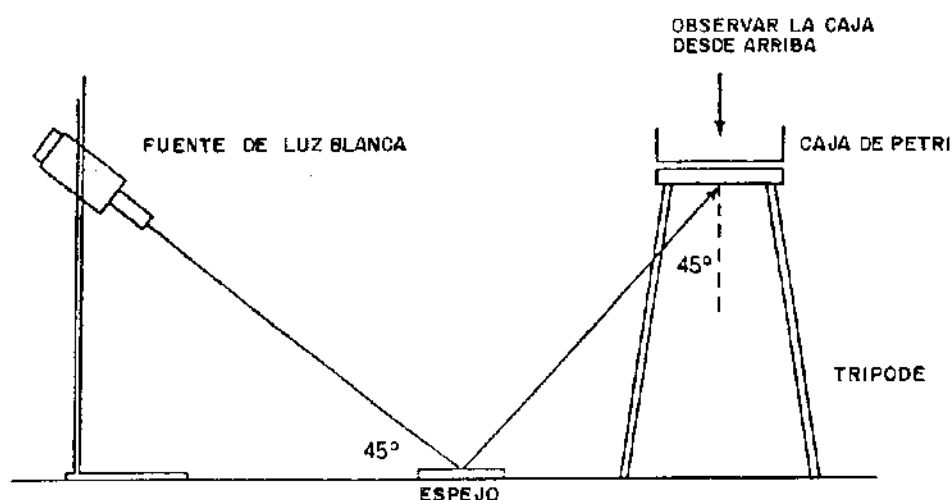


Figura 3. Observación de placas por el método de iluminación de Henry. Tomado de: Seeliger HPR. Listeriosis. Hafner Publishing Co. (108).

5.7.1.4 Segunda purificación (28)

- Tomar una colonia típica de *Listeria* de cada placa de agar (ATN), repicarla por agotamiento en una placa con agar tripticasa-soya-extracto de levadura (TSAYE) (medio #5)
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 18-24 horas
Adicionalmente, realizar cultivos en fase estacionaria de cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 49444 y *Rhodococcus equi* ATCC 6939
- Transferir una asada de cada una de las cepas estándar a tubos con 5 mL de caldo de infusión cerebro-corazón (medio #6)
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 18-24 horas

5.7.2 Métodos de identificación

A partir de los cultivos puros obtenidos en el agar tripticasa-soya-extracto de levadura (TSAYE), realizar las siguientes pruebas:

5.7.2.1 Observación de las colonias por el método de iluminación de Henry

5.7.2.2 Investigación de catalasa

- Colocar en un portaobjeto una gota de peróxido de hidrógeno al 3% (reactivo #4) y suspender la colonia
- Observar si se producen o no burbujas de gas
- *L. monocytogenes*: catalasa (+) produce burbujas de gas

5.7.2.3 Coloración de Gram

- Preparar un frotis y colorear por el método de Gram (reactivo #5)
- *L. monocytogenes*: bacilos o cocobacilos grampositivos; en cultivos viejos, bacilos o cocos gramnegativos
- Descartar los cultivos que no cumplan con las siguientes características:
 - 1) catalasa (+)
 - 2) bacilos o cocobacilos grampositivos

5.7.2.4 Movilidad y reducción de nitrato

- Inocular con asa recta, por punción central, tubos con agar movilidad-nitrato modificado Hatano Schuch (medio #7) (107). También se puede utilizar el medio de SIM o el agar motilidad de Difco.
- Incubar a temperatura ambiente 2-5 días
- Observar el crecimiento
L. monocytogenes: crecimiento típico en forma de sombrilla
- Descartar los tubos que no presenten esta apariencia (figura 4)

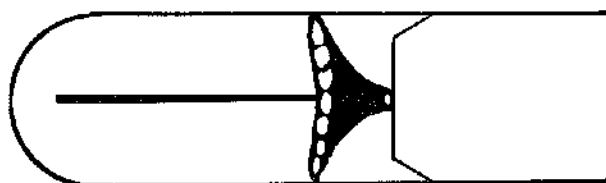


Figura 4. Crecimiento en forma de sombrilla.

- Revelar la prueba de nitrato después de la lectura de la movilidad; comprobar la presencia de nitritos en el medio de movilidad-nitrato, añadiendo unos miligramos del reactivo de Griess (reactivo #6); la aparición de un color rojo indica la presencia de nitritos (positividad); en el caso de que no ocurra cambio de color, añadir unos miligramos de polvo de zinc (reactivo #7) para determinar la presencia de nitrato residual. La aparición de un color rojo indica la presencia de nitrato residual en el medio y, por tanto, una reacción negativa.

Color rojo: no hay reducción de nitrato.

Color del reactivo: hay reducción del nitrato.

L. monocytogenes: nitrato (-)

crecimiento típico de sombrilla

Nota: actualmente, la prueba de reducción de nitratos es opcional (28).

5.7.2.5 Hemólisis

- Dibujar una rejilla con 20-25 cuadrículas por placa en el fondo de una caja de Petri con agar tripticasa-soya adicionado con 5% de sangre de cordero (medio #8)
- Tomar una colonia típica y sembrarla por picadura en una de las cuadrículas
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas
- Realizar controles positivo y negativo en cuanto a hemólisis
- Observar la hemólisis

L. monocytogenes: ATCC 19118 presenta ligera beta hemólisis.

L. ivanovii: ATCC 19119 presenta zonas bien delimitadas y amplias de hemólisis.

L. innocua: ATCC 33090 no muestra hemólisis.

- Este procedimiento también se puede realizar sembrando una colonia del cultivo puro en placas con agar Columbia doble capa (medio #9) adicionado con 5% de sangre de cobayo (109)
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas

- Observar la hemólisis

5.7.2.6 Prueba de CAMP

- Sembrar líneas verticales (paralelas) de cultivos frescos de *Staphylococcus aureus* beta hemolítico y *Rhodococcus equi*, sobre placas delgadas y frescas con agar tripticasa-soya adicionado con 5% de sangre de cordero (medio #8)
- Inocular horizontalmente (ángulo de 90 °) las muestras en estudio y los controles positivos y negativos para hemólisis, a 1 o 2 mm de los cultivos anteriores, sin tocarlos.
- Incubar a 35 °C $\pm$ 2 por 24 horas

Considerar una reacción positiva para CAMP, cuando se presenta una zona clara de beta-hemólisis en la intersección de la muestra en estudio con la cepa de *S. aureus* o *R. equi*.

La hemólisis de *L. monocytogenes* se intensifica cerca al cultivo de *S. aureus*. La hemólisis de *L. ivanovii* se realza cerca al cultivo del *R. equi*. La hemólisis de *L. seeligeri* se intensifica cerca de *S. aureus*. Las otras especies de *Listeria* al no ser hemolíticas presentan una reacción de CAMP negativa (figura 5 y cuadro 4)

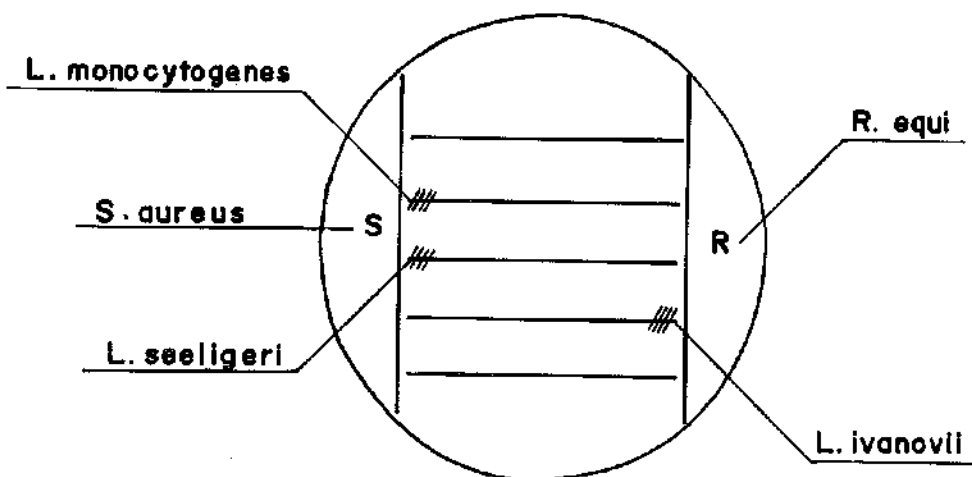


Figura 5. Prueba de CAMP para *L. monocytogenes*. Tomado de: FDA. Bacteriological analytical manual. Food and drug administration, 8 edición, 1995 (28).

Cuadro 4. Prueba de CAMP. Reacciones de las diferentes especies de *Listeria*.

Especies	Interacción hemolítica	
	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	- ^a
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-

^a Raras cepas son S+ y R+, pero la reacción R+ es mucho menos pronunciada que la de la *L. ivanovii*. Tomado de: FDA. Bacteriological and analytical manual. Food and Drug Administration, 8 edition, 1995 (28).

5.7.2.7 Fermentación de carbohidratos (107)

- Inocular con asa los tubos que contienen cada uno de los carbohidratos xilosa, ramnosa y manitol (medio #10)
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24-48 horas
- Descartar a los 7 días de incubación
- Observar el viraje del indicador, generalmente, ocurre a las 48 horas.
 - L. monocytogenes*: xilosa (-)
 - manitol (-)
 - ramnosa (+)

5.7.2.8 Prueba biológica de invasividad (107)

La prueba de ANTON (107) es la más clásica para demostrar la patogenicidad:

- A partir del cultivo puro, realizar una siembra sobre la superficie inclinada de un tubo con agar infusión cerebro-corazón (medio #11) o agar triptosa (medio #14)
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 18-24 horas
- Adicionar al cultivo obtenido, 1 mL de solución salina estéril al 0,85%; mezclar para desprender el cultivo (reactivo #15)
- Transferir esta suspensión a un tubo estéril
- Inocular una gota del cultivo en la conjuntiva del cobayo
- Observarlo durante 96 horas
- Realizar control positivo: *L. monocytogenes* ATCC 19118
- Realizar control negativo: *L. innocua* ATCC 33090

Prueba positiva: queratoconjuntivitis en un lapso de 96 horas

5.7.2.9 Prueba serológica (28)

Esta prueba sirve como evidencia corroborativa en la determinación del organismo como agente etiológico de la enfermedad.

La identificación final no se puede hacer sin la caracterización morfológica, serológica y bioquímica. Más de 90% de *L. monocytogenes* puede ser serotipificadas con el estuche de sueros tipificadores de *Listeria* (reactivo #13).

Prueba rápida en lámina

- Realizar dos transferencias sucesivas del cultivo en estudio en un tubo con la superficie inclinada de agar triptosa o infusión cerebro-corazón.
- Incubar a 35 °C $\pm$ 2 por 18-24 horas.
- Adicionar al cultivo obtenido 3 mL de *Bacto FA buffer dried* (Difco) (reactivo #14).
- Mezclar para desprender el cultivo.
- Transferir esta suspensión a un tubo estéril.
- Calentar la suspensión con el organismo a 80 °C por 1 hora.
- Centrifugar por 30 minutos a 1.600 revoluciones por minuto.
- Retirar 2,2-2,3 mL del fluido y resuspender los organismos con la porción restante del líquido y continuar con las instrucciones de la casa fabricante correspondiente utilizada (Difco).

Los laboratorios que realicen la detección rutinaria de *Listeria* en alimentos deben utilizar pruebas bioquímicas y, posteriormente, someter dichas cepas a pruebas serológicas para determinar si son *Listeria*.

La identificación definitiva de *Listeria*, como perteneciente a un determinado serotipo, requiere el envío de cepas a un centro especializado en tipificación.

5.7.2.10 Tipificación mediante bacteriófagos

Desde el punto de vista epidemiológico, es una prueba muy útil que se realiza en laboratorios especializados (28).

5.7.3 Resultados de las pruebas bioquímicas de *L. monocytogenes*.

- Catalasa: positiva
- Nitratos: negativos
- Hemólisis: ligera beta-hemólisis
- Motilidad: positiva, en forma de sombrilla
- CAMP: positivo con *S. aureus*.
- Xilosa: negativo
- Manitol: negativo
- Ramnosa: positivo
- Esculina: positivo
- Prueba de ANTON: positiva

5.8. Informe de los resultados

- Expresar los resultados como:
L. monocytogenes/_{25g}: positivo o negativo

5.9. Métodos para la identificación de *Listeria*

Los cultivos puros pueden ser rápidamente identificados por estuches comerciales que ofrecen ciertas ventajas, por ejemplo, ahorro de tiempo y de trabajo.

5.9.1. Sistemas de identificación API por estuches

La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales Internacionales (AOAC) ha adoptado el sistema MICRO ID[™] General Diagnostic y el sistema Automicrobic (VITEK) como primeros métodos oficiales (28).

5.9.1.1 El sistema MICROID[™] General Diagnostic

Identifica *Listeria*, si la reacción de CAMP es conocida en 24 horas. Se añaden suspensiones de los organismos a discos de papel impregnados con reactivos que pueden detectar la presencia de metabolitos o enzimas producidos por *Listeria*. Los resultados se interpretan por cambios de color con la ayuda de un código manual. Hay un servicio de identificación computadorizado (110).

5.9.1.2 El sistema automicrobic (VICTEK) tarjetas de identificación

Es un sistema automatizado que incorpora un dispensador de diluciones y un módulo de llenado para la distribución de las suspensiones en pocillos dispuestos en placas. Un módulo computadorizado proporciona las identificaciones después de 8 horas de incubación (110).

5.9.2. Métodos químicos

5.9.2.1. Sondas de ADN

Se han preparado sondas de ADN para detectar *Listeria* en los alimentos (111, 112). El método de hibridización de colonias ideado por Grunsteir y Hognes (113) se ha utilizado con buenos resultados para detectar *L. monocytogenes*. Una sonda de ADN está integrada por una secuencia del ADN de un microorganismo de interés que pueden ser utilizada para detectar ADN homólogo o secuencias de ARN. En efecto, la sonda de ADN se debe hibridar con el ADN de la cepa que se quiere detectar. La sonda de ADN se debe marcar con isótopos C^{14} , H^3 , P^{32} o I^{125} , siendo el C^{14} el más utilizado, con el fin de poder determinar si ha tenido lugar la hibridización. Existen estuches de ADN no radioactivos, específicos para la identificación de *L. monocytogenes* (28, 114).

5.9.2.2. Amplificación del ADN (reacción en cadena de la polimerasa) (PCR)

Esta técnica es aplicable a la identificación de microorganismos transmitidos por alimentos que, en la actualidad, no se pueden detectar por procedimientos más rápidos. La PCR se ha utilizado para detectar cepas de *L. monocytogenes* (115). El método utiliza ADN polimerasa termoestable y los iniciadores específicos 5' y 3' para oligonucleótidos, después de una serie de 20 a 50 ciclos de amplificación, una sola molécula de ADN puede ser amplificada hasta 10^7 . El ADN amplificado es detectado mediante el uso de geles de agarosa, empleando una sonda marcada con isótopos radioactivos. Requiere un ambiente de trabajo muy limpio ya que el ADN que se contamina puede ser amplificado con el de los microorganismos de interés.

5.9.3. Métodos inmunológicos (34)

Utilizan una enzima unida a un antígeno o a un anticuerpo.

5.9.3.1. Prueba de Elisa

Se utiliza para detectar y determinar la cantidad de microorganismos o sus productos metabólicos en los alimentos.

La prueba de Elisa se realiza en microplacas de poliestireno revestidas con antígeno e incubadas con antisuero. Después de su incubación y lavado, se añade una preparación de anti-inmunoglobulina marcada con una enzima;

después de un suave lavado, la enzima que queda en el tubo o en el pocillo de la microplaca de microtitulación se ensaya para determinar la cantidad de anticuerpos específicos en el suero. La cantidad de enzimas presente se averigua mediante la determinación colorimétrica del sustrato enzimático. Existen estuches comerciales de Elisa para *Listeria* (Organon Teknika Corporation) (28).

5.10. Técnica para productos cárnicos

La técnica utilizada para productos cárnicos es la recomendada por el Ministerio de Agricultura de Brasil (107).

5.10.1. Método de aislamiento

5.10.1.1 Enriquecimiento selectivo primario

- Homogenizar 25 g de la muestra que se va a analizar con 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* LEB (1) (medio #12) adicionado con 0,225 de solución de acriflavina al 1% en hidróxido de sodio 0,1 N (reactivo #16).
- Incubar a 30 °C $\pm$ 2 por 18-24 horas.

5.10.1.2 Enriquecimiento selectivo secundario

- Transferir 0,2 mL del cultivo obtenido en el caldo LEB (1) a un tubo con 10 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* LEB (2) (medio #13) adicionado con 0,1 mL de solución de acriflavina al 0,2% en hidróxido de sodio 0,1 N (reactivo #17).
- Incubar a 30 °C $\pm$ 2 por 18-24 horas
- Transferir una asada del cultivo LEB (2) a placas con agar Oxford y Palcam.
- Seguir la misma pauta utilizada en la técnica de la FDA a partir del numeral 5.7.1.3.
- Purificación

5.11 Fórmulas y técnicas de preparación de los medios de cultivo

5.11.1. Caldo base de enriquecimiento selectivo para *Listeria* (EB)

Fórmula:

Caldo tripticasa soya	30 g
Extracto de levadura	6 g
pH final	7,3 +/- 0,2

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

Distribuir 225 mL en erlenmeyer y añadir antes de su uso 0,455 mL de la solución de acriflavina-ácido clorhídrico al 0,5% (reactivo # 1), 1,8 mL de la solución de ácido nalidíxico-sal sódica al 0,5% (reactivo #2) y 1,15 mL de la solución de cicloheximida al 1% (reactivo #3) (28).

Nota: existen diferentes casas comerciales conocidas que distribuyen estos medios (Difco, OXOID, Merck). Para su preparación, esterilización, conservación y uso deben seguirse estrictamente las indicaciones del fabricante.

5.11.2. Agar base Oxford (OXOID)

Código CM856

Fórmula	g/L
Agar sangre base Columbia	39,0
Esculina	1,0
Citrato férrico de amonio	0,5
Cloruro de litio	15,0
pH final	7,0 ± 0,2

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante. Adicionar, antes de su uso, el contenido del vial código SR 140 y reconstituir con 5 mL de etanol/agua destilada (1:1) con concentraciones para 500 mL de medio de:

Cicloheximida	210 mg
Sulfato de colistina	120 mg
Acriflavina	2,5 mg
Cefotetan	1,0 mg
Fosfomicina	5,0 mg

El medio de cultivo preparado puede conservarse hasta 10 días en refrigeración (2 - 8 °C) (116).

5.11.3. Agar base Palcam Oxoid

Código CM877

Fórmula	g/L
Agar sangre base Columbia	39,0
Extracto de levadura	3,0
Glucosa	0,5
Esculina	0,8
Citrato férrico de amonio	0,5
Manitol	10,0
Rojo de fenol	0,08
Cloruro de litio	15,0
pH final	7,0 ± 0,2

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante. Adicionar, antes de su uso, el contenido del vial código SR 150E y reconstituir con 2 mL de agua destilada estéril para 500 mL de medio con concentraciones de:

Polimixina B	5,0 mg
Acriflavina	2,5 mg
Ceftacidina	10 mg

El medio de cultivo preparado puede conservarse hasta cuatro semanas en refrigeración (2 - 8 °C) en oscuridad (116).

5.11.4. Agar triptosa con ácido nalidíxico (ATN)

Fórmula	g/L
Bacto triptosa (Difco)	20,0
Cloruro de sodio	5,0
Dextrosa	1,0
Extracto de levadura	6,0
Agar	15,0

Solución de ácido nalidíxico-sal sódica al 2% en hidróxido de sodio 0,1N=1 mL (reactivo 18).

Disolver los ingredientes completamente en un litro de agua destilada desionizada, dejar reposar por 15 minutos y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Verter en placas $\pm$ 15 mL, pH final 7,4 $\pm$ 0,2 (107).

5.11.5. Agar tripticasa soya con extracto de levadura (TSAYE)

Fórmula	g/L
Agar de tripticasa soya	40,0
Extracto de levadura	6,0

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante (28).

5.11.6. Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

Fórmula	g/L
Infusión de cerebro	12,5
Infusión de corazón	5,0
Proteosa-peptona	10,0
D(+) glucosa	2,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dibásico de Na	2,5
Disolver 37 g/L y esterilizar en autoclave (117).	
pH final	7,4 $\pm$ 0,2

5.11.7. Agar movilidad nitrato modificado Hatano Schuch

Fórmula	g/litro
Nitrato de potasio (KNO_3)	1,5
Peptona	5,0
Agar	3,0

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada hasta la disolución completa; dejar en reposo por 15 minutos. Distribuir en tubos, volúmenes de 10 mL. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Dejar solidificar en posición vertical (107).

5.11.8. Agar tripticasa-soya adicionado con 5% de sangre desfibrinada

Fórmula	g/L
Peptona de caseína	15,0
Peptona de harina de soya	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar	15,0

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

Fundir el agar y mantenerlo en 50 °C en baño de María. Adicionar 5% de sangre de cordero desfibrinada. Distribuir 12 mL en las cajas de Petri; usar las cajas lo más frescas posibles y con la superficie seca (107).

pH final: 7,3±0,1

5.11.9. Agar Columbia doble capa al 5% de sangre desfibrinada de cobayo

Fórmula	g/L
- Agar Columbia base (Oxoid)	44,0

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

Fundir el agar y mantenerlo a 50 °C en baño de María.

- Agar Columbia base al 5% de sangre desfibrinada de cobayo.

A 95 mL de medio de cultivo base estéril, incorporar mezclando homogéneamente 5 mL de sangre desfibrinada de cobayo.

- Agar Columbia doble capa con sangre desfibrinada de cobayo.

Verter en cajas de Petri 10 mL de agar Columbia base, dejar solidificar.

Añadir una segunda capa de 4,5 mL de agar Columbia base al 5% de sangre desfibrinada de cobayo; dejar solidificar. Almacenar en refrigeración (2-8 °C) (109).

5.11.10. Caldo carbohidrato rojo de fenol

Caldo base:

Fórmula	g/L
Tripton	5,0
Peptona de carne	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Rojo de fenol	0,018

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

pH final: $7,4 \pm 0,2$

- Adicionar a 100 mL de caldo base estéril, 10 mL de la solución del azúcar previamente preparada y esterilizada por filtración.

- Xilosa, solución acuosa al 5% (reactivo #10)

- Ramnosa, solución acuosa al 5% (reactivo #11)

- Manitol, solución acuosa al 10% (reactivo #12)

pH final: $7,4 \pm 0,2$ (107)

5.11.11. Agar infusión cerebro-corazón

Fórmula	g/L
---------	-----

Infusión de cerebro	12,5
---------------------	------

Infusión de corazón	5,0
---------------------	-----

Proteosa-peptona	10,0
------------------	------

D(+) glucosa	2,0
--------------	-----

Cloruro de sodio	5,0
------------------	-----

Agar	15,0
------	------

pH final: $7,4 \pm 0,2$

Por tratarse de un medio deshidratado, se deben seguir las instrucciones del fabricante (107).

5.11.12. Caldo de enriquecimiento para *Listeria* LEB (I)

Fórmula	g/L
---------	-----

Proteosa peptona	5,0
------------------	-----

Triptona	5,0
----------	-----

Extracto de carne purificada	5,0
------------------------------	-----

Extracto de levadura	5,0
----------------------	-----

Cloruro de sodio	20,0
------------------	------

Fosfato de potasio	1,3
--------------------	-----

Fosfato disódico	12,0
------------------	------

Ácido nalídixico, solución

al 2 % en hidróxido de sodio 0,1N 1,0 mL

pH final $7,4 \pm 0,2$

Disolver los componentes en 1 litro de agua. Distribuir el medio en volúmenes de 225 mL por erlenmeyer. Esterilizar 15 minutos a 121 °C. Enfriar y almacenar

en refrigeración (2-8 °C). Antes de su uso, adicionar 0,225 mL de la solución acuosa al 1% de acriflavina (esterilizada por filtración)(reactivo #16) (107).

5.11.13. Caldo de enriquecimiento para *Listeria* LEB (2)

Fórmula	g/L
Proteosa peptona	5,0
Triptona	5,0
Extracto de carne purificada	5,0
Extracto de levadura	5,0
Cloruro de sodio	20,0
Fosfato de potasio	1,3
Fosfato disódico	12,0
Ácido nalidíxico, solución al 2% en hidróxido de sodio 0,1 N	1,0 mL
pH final	7,4±0,2

Disolver los componentes en 1 litro de agua. Distribuir el medio en tubos por 10 mL. Esterilizar 15 minutos a 121 °C. Enfriar y almacenar en refrigeración (2-8 °C). Antes de su uso, adicionar 0,1 mL de la solución acuosa al 0,2% de acriflavina (esterilizada por filtración)(reactivo #17) (107).

Nota: este caldo tiene la misma composición del caldo LEB 1, excepto la composición final de la acriflavina.

5.11.14. Agar triptosa

Fórmula	g/L
Bacto triptosa (Difco)	20,0
Cloruro de Sodio	5,0
Dextrosa	1,0
Agar	15,0
(28)	

5.12 Reactivos

5.12.1. Solución de acriflavina-ácido clorhídrico al 0,5% en agua destilada

Pesar 0,5 g de acriflavina-ácido clorhídrico y completar a 100 mL con agua destilada (28).

5.12.2. Solución de ácido nalidíxico-sal sódica al 0,5% en agua destilada

Pesar 0,5 g de ácido nalidíxico-sal sódica y completar a 100 mL con agua destilada (28).

5.12.3. Solución de cicloheximida al 1,0% en solución al 40,0% de etanol y agua

- Solución 40,0% (vol/vol) etanol y agua
Tomar 40 mL de etanol + 60 mL de agua.
- Pesar 1,0 g de cicloheximida y completar a 100 mL con la solución al 40,0% de etanol y agua (28).

Nota: los reactivos acriflavina-ácido clorhídrico, ácido nalidíxico-sal sódica, cicloheximida, son distribuidas comercialmente por Sigma.

5.12.4. Peróxido de hidrógeno al 3% (vol/vol)

Tomar 10 mL de la solución de peróxido de hidrógeno al 30% y completar a 100 mL (28).

5.12.5. Colorantes y materiales de la tinción de Gram

- Solución de cristal violeta

Fórmula

Cristal violeta	2,0 g
Alcohol etílico (95%)	20 mL
Oxalato amónico	0,8 g
Agua destilada	80 mL

Nota: disolver el cristal violeta en alcohol y el oxalato amónico en el agua destilada; mezclar las dos soluciones y esperar 24 horas antes de utilizar la mezcla (117).

- Solución de iodo

Fórmula

Yodo metálico	1,0 g
Yoduro potásico	2,0 g
Agua destilada	100 mL

Nota: triturar el yoduro potásico y el yodo juntos en un mortero, añadiendo pequeñas cantidades de agua durante la operación. Pasar la solución a un matraz volumétrico y enjuagar el mortero, completando el volumen a 100 mL (117).

- Colorante de contraste

Fórmula

Fuschina básica	0,25 g
-----------------	--------

Alcohol etílico (95%)	10,0 mL
-----------------------	---------

Agua destilada	100,0 mL
----------------	----------

Nota: disolver la fuschina básica en el alcohol etílico y mezclar la solución resultante con el agua destilada (117).

5.12.6. Reactivo de Griess

Fórmula

Naftilamina	1,0 g
-------------	-------

Acido sulfanílico	10,0 g
-------------------	--------

Acido tartárico	89,0 g
-----------------	--------

Nota: mezclar todos los componentes y envasar en frasco oscuro (117).

5.12.7. Polvo de zinc

Distribuido comercialmente por Merck (117).

5.12.8. Sangre de cordero

Recolectar la sangre de cordero en un recipiente con perlas de vidrio estériles rotándolas suavemente hasta que la fibrina quede adherida a las perlas. Dejar en reposo a temperatura ambiente por 1 o 2 horas. Separar la sangre desfibrinada y distribuirla en recipientes estériles. Guardar en refrigeración (107).

5.12.9. Sangre de cobayo

Recolectar la sangre de cobayo en un recipiente con perlas de vidrio estériles rotándolas suavemente hasta que la fibrina quede adherida a las perlas. Dejar en reposo a temperatura ambiente por 1 o 2 horas. Separar la sangre desfibrinada y distribuirla en recipientes estériles. Guardar en refrigeración (107).

5.12.10. Solución de xilosa al 5%

Pesar 5 g del carbohidrato xilosa y completar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar por filtración (107).

5.12.11. Solución de ramnosa al 5%

Pesar 5 g del carbohidrato ramnosa y completar a 100 g con agua destilada. Esterilizar por filtración (107).

5.12.12. Solución de manitol al 10%

Pesar 10 g del carbohidrato manitol y completar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar por filtración (107).

5.12.13. Estuche de sueros tipificadores de *Listeria*

Distribuidos comercialmente por Difco (28).

5.12.14. Bacto fa buffer dried (Difco)

5.12.15. Solución salina estéril 0,85%

Pesar 0,85 g y completar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave, 15 minutos a 121 °C (28).

5.12.16. Solución de acriflavina al 1,0% en hidróxido de sodio 0,1 N

- Solución de hidróxido de sodio 0,1 N
Pesar 4 g de hidróxido de sodio (lentejas) y completar a 1.000 con agua destilada
- Solución de acriflavina al 1,0%
Pesar 1 g de acriflavina y completar a 100 mL con la solución de hidróxido de sodio 0,1 N (107).

5.12.17. Solución de acriflavina al 0,2% en hidróxido de sodio 0,1 N

Pesar 0,2 g de acriflavina y completar a 100 mL con la solución de hidróxido de sodio 0,1 N (107).

5.12.18. Solución de ácido nalidíxico-sal sódica al 2% en hidróxido de sodio 0,1 N

Pesar 2 g de ácido nalidíxico-sal sódica y completar a 100 mL con hidróxido de sodio 0,1 N (107).

6. RECOMENDACIONES

Las personas que comienzan a trabajar en la investigación de *L. monocytogenes* deben tener en cuenta que:

- *L. monocytogenes* es un germen patógeno para el hombre por lo que se deben tener precauciones especiales al realizar las diferentes etapas de la técnica.
- Se requiere la monitorización de los planes de aseguramiento de la calidad para *L. monocytogenes* del laboratorio de referencia para poder garantizar que el método analítico empleado es capaz de recuperar la mínima cantidad de células esperada (118).
- Es necesario contar con personal calificado para aislar *L. monocytogenes* en alimentos, dado que a diferencia de su aislamiento en muestras clínicas -por ejemplo, sangre para hemocultivo, éste es largo y de cuidado (7).
- Mujeres en embarazo no deben trabajar en aislamiento de *L. monocytogenes*.

AGRADECIMIENTOS

- Al Instituto Nacional de Salud por haber auspiciado la estandarización de la técnica de *L. monocytogenes* en productos cárnicos y lácteos.
- Al doctor Carlos A. Hernández, jefe de la División de la Biblioteca y Publicaciones del Instituto Nacional de Salud, por la lectura crítica del manuscrito.
- A la doctora Shaynoor Dramsi de la Unidad de Interacciones Celulares Bacterianas del Instituto Pasteur por la corrección del análisis de la virulencia de *L. monocytogenes*.
- Al doctor Erick Sánchez, jefe de la Unidad de Neurología del Hospital San Ignacio de la Pontificia Universidad Javeriana, por su valioso aporte en la listeriosis humana.
- A la señora Grace de Morillo por su valiosa colaboración, especialmente, en la corrección de la sintaxis.
- A las compañeras Martha Stella Holguín y Nadenka Melo por la transcripción del manuscrito.
- A la señora Imelda Flórez Rojas de la Biblioteca José Celestino Mutis del Instituto Nacional de Salud por su colaboración en las referencias bibliográficas.



REFERENCIAS

1. Margaret W, Seeliger HPR. *Listeria monocytogenes* infections-therapeutics possibilities and problems. *Infections* 1988;16(Supl.2):5175-7.
2. Shelef LA. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef of liver during storage at 4 and 25 °C. *J Food Prot* 1989;52(6):379-83.
3. Schlech WF, et al. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 1983;308:203-6.
4. Fleming DW, et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* 1985;312(7):404-7.
5. WHO. Foodborne listeriosis. WHO Working Group. *Bull World Health Org* 1988;66(4):421-8.
6. Rocourt J. *Listeria monocytogenes*: the state of the science. *Dairy Food and Environm Sanit* 1994;14(2):70-82.
7. Moinet ML. *Listeria*, le germe imprevisible. *Science et Vie* 1988;(844):22-30.
8. Hitchins A. FDA. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: lecture and laboratory. En: *Basic Microbiology*; 1991; Tab.E1-Tab. E10 (Office of Regulatory Affairs).
9. Máscola L, et al. Listeriosis an uncommon opportunistic infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome: a report of five cases and review of the literature. *Am J Med* 1988;84:162-4.
10. Gantz NM, et al. Listeriosis in immunosuppressed patient: a cluster of eight cases. *Am J Med* 1975;58:637-43.
11. Watson GW, et al. *Listeria cerebritis*. *Arch Intern Med* 1978;138:83-7.

12. Brun B, et al. Fatal nonmeningitic listeria rhomboencephalitis: report of two cases. Arch Intern Med 1985;145:1982-5.
13. Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterised by large mononuclear leukocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes*. J Path Bact 1926;29:407-34.
14. Nyfeldt A. Etiologie de la mononucléose infectieuse. Compt Rend Soc Biol 1929;101:590-1.
15. Gitter M. Listeriosis in farm animal in Great Britain: in isolation and identification of microorganisms of medical and veterinary importance. Society for Applied Bact 1985;191-200.
16. Gray ML, Killinger AH. *Listeria monocytogenes* and listeric infection. Bact Rev 1966;30(2):309-82.
17. Prenice GA, Neaves P. *Listeria monocytogenes* in food: its significance and methods for its detection. Bull Int Dairy Fed 1988;223.
18. Pascual MR. *Listeria monocytogenes*. En: Microbiología alimentaria: detención de bacterias con significado higiénico sanitario. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III; 1989. p. 395-441.
19. Díaz G, Muñoz AI. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leches crudas y leches pasteurizadas en el altiplano cundiboyacence. Biomédica 1994; 14(Supl.1):58.
20. Muñoz AI, Díaz G. Determinación e identificación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y quesos madurados que se comercializan en Santafé de Bogotá. NotInvima 1996;1:19-21.
21. Beckers HJ, Soentero PSS, Delfou-van Asch EHM. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw-milk and its resistance to heat. Int J Food Microb 1987;4:249-56.
22. Hayes PS, et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Appl Environm Microb 1986;51:438-40.

23. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes* a foodborne pathogen. Microbiol Rev 1991;55:476-511.
24. Sánchez E, Pardo R. Listeriosis del sistema nervioso central: formas meníngeas agudas supurativas y romboencefálica. Acta Neurolog Colomb 1992;8(3):165-8.
25. Seeliger HPR, Jones D. *Listeria*. En: Sneath PMA, et al., editors. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. ed. Baltimore: Williams and Wilkins Co.; 1986. p.1235-45.
26. Jones D. Current classification of the genus *Listeria*. Isopol XI, Copenhagen; 1992. p.7-8.
27. Jones D, Seeliger HPR. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the taxonomy of *Listeria* and related bacteria (Minutes of meeting, Nantes, France, sep., 1985). Int J Syst Bact 1986;36:117-8.
28. Hitchins AD. *Listeria monocytogenes*. En: FDA Bacteriological Analytical Manual Food and Drug Administration, 8th ed. 1995. p.10.01-10.13.
29. Seeliger HPR. A pathogene listerien: *Listeria innocua* sp.n. (Seeliger et Schoofs, 1977). Zent Bakt Paras Inf Hyg Abt I Orig Reihe 1981;249:487-93.
30. Seeliger HPR, et al. *Listeria ivanovii* sp. nov. Int J Syst Bact 1984;34:336-7.
31. Cooper RF, Dennis SM. Further characterization of *Listeria monocytogenes* serotype 5. Can J Microb 1978;24:598-9.
32. Armstrong D. *Listeria monocytogenes*. En: Mandel GL, Douglas RG, Benett JE, editors. Principles and practice of infectious diseases. 4th. ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. p.1180-5.
33. Walker SJ, Archer P, Banks JG. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J Appl Bact 1990;68:157-62.

34. Jay JM. Microbiología moderna de los alimentos. 3ª ed. Zaragoza (España): Editorial Acribia; 1994.
35. Welshimer HJ. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. J Bact 1960;80:316-20.
36. Doyle MP, Meske LM, Marth EH. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. J Food Prot 1985;48(9):741-2.
37. Griffith M, Deibel KE. Survival of *Listeria monocytogenes* in yogurt with varying levels of fat and solids. J Food Safety 1990;10:219-30.
38. Cole NB, Jones MV, Holyoak C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. J Appl Bact 1990;69:63-72.
39. Potel J. Listeriose. En: Paul Parey. Berlín; 1958.
40. Barza M. Listerosis and milk. N Eng J Med 1985;312(7):438-40.
41. Bradshaw JG, et al. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. J Food Prot 1985;48:743-5.
42. Doyle MP, Glass KA, Beery JT. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. Appl Env Microb 1987;53:1433-8.
43. Bunning VK, et al. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. App Env Microbiol 1988;54:364-70.
44. Lovett J, Wesley JV, Vandermaaten MJ. High-temperature-short time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 1990;53:734-8.
45. MacKey BM, Bratchell N. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol 1989;9:89-94.

46. MacKey BM, et al. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. *Letts Appl Microbiol* 1990;10:251-5.
47. Kathariou S, et al. Levels of *Listeria monocytogenes* hemolysin are not directly proportional to virulence in experimental infection of mice. *Inf Imm* 1988;56:534-6.
48. Jacquet C, Bille J, Rocourt J. Typing of *Listeria monocytogenes* by restriction polymorphism of the ribosomal ribonucleic acid gene region. *Zbl Bakt* 1992;276:356-65.
49. Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Meth Microbiol* 1974;13:31-49.
50. Pirie JHH. *Listeria* change of name for a genus of bacteria. *Nature* 1940;145:264.
51. Linan MJ, et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med* 1988;319:823-8.
52. Shwartz BD, et al. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypothesis for the etiology of epidemic *Listeria monocytogens* infection. *J Inf Dis* 1989;159:680-5.
53. Bille J. Anatomy of a foodborne listeriosis outbreak: foodborne listeriosis. Proceedings of a symposium, Sept. 1988; Wiesbaden, FRG. Hamburg: B. Behr's Gmbh and Co.; 1988. p.29-36.
54. Kerr KG, Dealler SF, Lancey RW. Materno-fetal listeriosis from cooked-chilled and refrigerated food. *Lancet* 1988;2:1133.
55. McLauchlin J, Hall SM, Velani SK, Gilbert RJ. Human listeriosis and pate: a possible association. *Brit Med J* 1991;303:773-5.
56. Goulet V, Lepautre A, Rocourt J. Epidémie de listériose en France-Bilan final et resultats de l'enquete épidémiologique. *Bull Epid Hebdom* 1993;4:13-4.

57. Autores. Epidémie de listeriose a lysovar 2671-108-312 en France. Résultats préliminaires de l'enquête épidémiologique coordonnée par le réseau national de Santé publique. Bull Epid Hebdom 1993;34:157-8.
58. Audurier A, Martin C. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microb 1989;8:251-7.
59. Best M, Kennedy ME, Coates E. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. Appl Env Microb 1990;56(2):377-80.
60. Hayes PR. Limpieza y desinfección: métodos. En: Microbiología e higiene de los alimentos. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S. A.; 1993. p.251-85.
61. Proceedings (3rd: 1-2 June 1994: Laval - France). Food Safety'94. Critères microbiologiques et *Listeria monocytogenes*: propositions de LICMSF/Jouve, J. L. Asept: France, 1994. p.283-96.
62. Gitter M, Brodley R, Blampied PH. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. Vet Rec 1980;107:390-3.
63. Cossart P, Kocks C. The actin based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. Mol Microb 1994;13:395-402.
64. Berche P, Gaillard JL, Richard S. Invasiveness and intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. Infection 1988;(Suppl.2):145-8.
65. Mackaness GB. Cellular resistance to infection. J Exp Med 1962;116:381-406.
66. Mackaness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. J Exp Med 1964;120:105-20.
67. Racz P, Tenner K, Merö E. Experimental *Listeria* enteritides: I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. Lab Inv 1972;26:694-700.

68. Lepay DA, Steinman RM, Nathan CF. Liver macrophages in murine listeriosis: cell mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. *J Exp Med* 1985; 161:1503-12.
69. Rosen H, Gordon S, North RJ. Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells: absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in nonphagocytic cells. *J Exp Med* 1989;170:27-37.
70. Andurier A, Pardon P, Marly J. Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*. *Ann Microb* 1980;131 B:47-57.
71. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Ann Rev Immunol* 1993;11:129-63.
72. Dramsi S, Lebraun M, Cossart P. Molecular and genetic determinants involved in invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microb Imm* 1996;209:61-77
73. Sheehan B, et al. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. *Curr Top Micr Imm* 1994;192:187-216. (Bacteriol pathogenesis of plants and animals, Editor: J.L. Dang, Springer-Verlog).
74. Gaillard JL, et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from grampositive cocci. *Cell* 1991;65:1127-41.
75. MacDonald TT, Carter PB. Cell mediated immunity to intestinal infection. *Inf Imm* 1980;28:516-23.
76. Marco AJ, et al. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *L. monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol* 1992;107:1-9.
77. Colan JW, North RJ. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J Exp Med* 1991;174:741-4.

78. Colan JW, North R. Neutrophil-mediated lysis of infected hepatocytes. *ASM News* 1993;59:563-7.
79. Alford CA, King TE, Campbell PA. Role of transferrin, transferrin receptor and iron in macrophage listericidal activity. *J Exp Med* 1991;174:459-66.
80. Chastellier C, Berche P. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Inf Imm* 1994;62:543-53.
81. Drevets D, Canono BP, Campbell PA. Listericidal and nonlistericidal mouse macrophages differ in complement receptor type 3 mediated phagocytosis of *L. monocytogenes* and in preventing escape of the bacteria into the cytoplasm. *J Leuk Biol* 1992;52:70-9.
82. Portnoy DA, et al. Gamma interferon limits access of *L. monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med* 1989;170:2141-6.
83. Drevets D, Campbell PA. Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse macrophages. *Inf Imm* 1991;59:2645-52.
84. Drevets DA, Leenen PJM, Campbell PA. Complement receptor type 3 (CD11b/CD18) involvement is essential for killing of *Listeria monocytogenes* by mouse macrophages. *J Imm* 1993;151:5431-9.
85. Alvarez-Domínguez E, Carrasco-Marín E, Leyva-Cobian F. Role of complement component C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell-lines. *Inf Imm* 1993;61:3664-72.
86. Beckerman KP, et al. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. *J Imm* 1993;150:888-95.
87. Boockvar KS, Granger DL, Poston RM. Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. *Inf Imm* 1994;62:1089-100.
88. Dramsi S, Forestier C, Cossart P. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth

state, temperature and the pleiotropic activator, PrFa. Mol Microb 1993b;9:931-41.

89. Wuenscher M, Kohler S, Bubert A. The *lap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability and its gene product, P60 has bacteriolytic activity. J Bact 1993;175:3491-501.
90. Smyth CJ, Duncan JL. Thiol-activated (oxygen labile) cytolysin in bacterial toxins and cell membranes. New York: Academic Press, Inc.; 1978. p.129.
91. Donelson JE. The pushy ways of a parasite. Nature 1989;342:615.
92. Portnoy D, et al. Role of hemolysin for the intracellular growth of *L. monocytogenes*. Revista 1988;67:1459-71.
93. Gaillard JL, Berche P, Mounier J. In vitro model of penetration and intracellular growth of *L. monocytogenes* in the human enterocyte like cell line Caco-2. Inf Imm 1987;55:2822-9.
94. Golfine H, Knob C. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidyl-inositol-specific phospholipase C. Inf Imm 1992; 60:4059-67.
95. Geoffray C, et al. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *L. monocytogenes*. Inf Imm 1991;59(12):2382-8.
96. Tilney LG, Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J Cell Biol 1989;109:1597-1608.
97. Sanger JM, Sanger JW, Southwic FS. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. Inf Imm 1992;60:3609-19.
98. Theriot J, Mitchison TJ. The nucleation release model of actin filament dynamics in cell motility trends. Cell Biol 1992;2:219-22.

99. Cossart P. Actin-based bacterial motility. *Curr Op Cell Biol* 1995;7:94-101.
100. Vázquez-Boland JA, et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Inf Imm* 1992;60(1):219-30.
101. Nieman RE, Lorber R. Listeriosis in adults: a changing pattern, report of eight cases and review of the literature 1968-1978. *Rev Inf Dis* 1980;2:207-25.
102. Lavetter A, et al. Meningitis due to *Listeria monocytogenes*: a review of 25 cases. *N Eng J Med* 1971;285:598-603.
103. Espaze EP, Reynand AE. Antibiotic susceptibilities of *Listeria*: in vitro studies. *Infection* 1988;(Suppl.2):S160-S169.
104. Bakker-Woudenberg IAJM, et al. Liposome-encapsulated ampicillin against *Listeria monocytogenes* in vivo and in vitro. *Infection* 1988;16(Suppl.2): 165-9.
105. ICMSE. Preparación y dilución de los homogenizados de alimentos. Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológicas. 2ª ed. Zaragoza (España): Editorial Acribia, 1983. p.107-12.
106. Sharpe AN, Jackson AK. Stomaching: a new concept in bacteriological sample preparation. *Appl Microbiol* 1972;24:175-8.
107. Da Silva Longo D, et al. Métodos de análisis microbiológico para alimentos. Brazil: Ministerio da Agricultura; 1992. p.135.
108. Seeliger HPR. Listeriosis. New York: Hafner Publishing, Co.; 1961.
109. Dulce MT, et al. Haemolytic reaction of *Listeria monocytogenes* on bi layer Columbia agar plates with defibrinated guinea-pig blood. *Lett Appl Microbiol* 1992;15:78-9.
110. Collins CH, Lyne PM. Métodos de identificación. En: Métodos microbiológicos. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.; 1989. p.119-32.



111. Datta, AR, et al. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detection of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 1988;54:2933-7.
112. Notermans S, et al. Specific gene probe for detection of biotyped and serotyped *Listeria* strains. Appl Environ Microbiol 1989;55:902-6.
113. Grunstein M, Hogness DS. Colony hybridization a method for the isolation of cloned DNA that contain a specific gene. Proc Nat Acad Sci 1975;72: 3961-5.
114. Peterking PY, Idziack ES, Sharpe AN. Detection of *Listeria monocytogenes* by direct colony hybridization on hydrophobic grid membrane filters by using a chromogen-labeled DNA probe. Appl Environ Microbiol 1991;57:586-91.
115. Blais BW, Phillipe LM. A simple RNA probe system for analysis of *Listeria monocytogenes* polymerase chain reaction products. Appl Environment Microbiol 1993;59:2795-800.
116. Unipath. Manual OXOID. España: Unipath; 1995. p.153-62.
117. Sánchez M, et al. Análisis microbiológico de alimentos: manual de procedimientos. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1990. p.57-74.
118. Barbosa AMN, et al., editors. Laboratory quality assurance plan: methods for analysis of biological residues in products of animal source. Sao Paulo : Ministry of Agriculture and Agrarian Reform; 1991. p. 93-8.

