

LISTERIA MONOCYTOGENES

RESUMEN

Listeria monocytogenes puede infectar a una gran variedad de especies animales, pero la listeriosis clínica es esencialmente una enfermedad de los rumiantes, con casos esporádicos y ocasionales en otras especies. Los principales signos clínicos de la listeriosis animal son la encefalitis, la septicemia y el aborto, y a menudo se relaciona con forrajes almacenados, normalmente ensilados. Los hallazgos post-mortem y la histopatología dependen de la presentación clínica.

La listeriosis es una de las enfermedades más importantes transmitida por los alimentos. Los signos clínicos de la enfermedad en el hombre comprenden la septicemia, la meningitis (o meningoencefalitis) y la encefalitis. En las mujeres gestantes, las infecciones intrauterinas o del cuello del útero pueden provocar abortos espontáneos o nacidos muertos, y pueden ir precedidas de signos gripales, como la fiebre. Listeria monocytogenes también se ha relacionado con signos gastrointestinales acompañados de fiebre. Aunque la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la mortalidad de la enfermedad sistémica/encefáltica puede ser muy alta, con valores cercanos al 20-30%. Se estima que en Europa el porcentaje de personas que contraen esta enfermedad y son hospitalizadas es superior al 95%. Se considera que los ancianos, las mujeres gestantes, los recién nacidos y los individuos inmunocomprometidos corren un grave riesgo de contraer la enfermedad.

Se han identificado varios determinantes moleculares y celulares de la virulencia de este agente patógeno intracelular y, aunque existen evidencias de polimorfismo entre las distintas especies de L. monocytogenes respecto a algunos de estos determinantes de virulencia, dicha heterogeneidad no se puede correlacionar con la capacidad o la incapacidad de este microorganismo de producir la enfermedad. En los próximos años, a medida que se disponga de más información cuando se haya secuenciado la totalidad del genoma, tal cambie este punto de vista. Por tanto, todas las cepas de L. monocytogenes se considera que pueden llegar a ser patógenas.

Identificación del agente: *Se dispone de gran variedad de métodos convencionales y rápidos para la detección e identificación de L. monocytogenes en producción primaria, en muestras de alimento para animales o para el consumo humano, y en muestras clínicas procedentes de animales con listeriosis. Los métodos convencionales siguen siendo los de referencia, es decir, aquellos respecto a los cuales se validan los demás. En estos métodos se utilizan agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento para reducir el número de microorganismos contaminantes y permitir la multiplicación de L. monocytogenes. El desarrollo de medios cromógenos ha permitido una detección más fiable de este microorganismo. La detección de antígenos de L. monocytogenes mediante inmunohistoquímica es una forma útil de diagnosticar la forma encefáltica de la enfermedad*

Aunque no se necesite con fines reglamentarios, se dispone de diferentes niveles de subtipificación de las cepas de L. monocytogenes, como la serotipificación mediante las técnicas clásicas de agrupación por aglutinación o reacción en cadena de la polimerasa, y la electroforesis en gel de campo pulsante. La estructura de la población y la filogenia pueden estudiarse mediante tipificación de secuencias multi-locus. Las pruebas de subtipificación están estandarizadas a nivel internacional por los estudios colaborativos y la red PulseNet Internacional de la Organización Mundial de la Salud.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas de detección de anticuerpos tradicionalmente no se han utilizado para el diagnóstico de la listeriosis. Se han probado varios formatos y todos han resultado ser poco fiables y carentes de sensibilidad y de especificidad. En algunos estudios epidemiológicos se han utilizado pruebas serológicas experimentales basadas en la detección de anti-listeriolisina O, y como apoyo al diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central con un resultado negativo en el cultivo.

Requisitos para las vacunas: se ha comprobado que es muy difícil desarrollar vacunas efectivas contra *L. monocytogenes* que, al ser un microorganismo intracelular, necesita la participación de los linfocitos T efectoras para desencadenar una respuesta inmunitaria efectiva. Se han estudiado vacunas experimentales utilizando animales de laboratorio con el fin de conferir protección frente a la infección por *L. monocytogenes* mediante distintas estrategias, como la inmunización con ADN plasmídico, la señalización de los CD40 junto con *L. monocytogenes* inactivada por calor, el empleo de mutantes deficientes en listeriolisina O inoculados junto con listeriolisina O encapsulada en liposomas, y la inmunización con antígenos de *Listeria* e IL-12.

A. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes puede infectar a una amplia gama de especies animales, entre las que se encuentran mamíferos, aves, peces y crustáceos (Tabla 1), aunque la mayoría de casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes; los cerdos casi nunca desarrollan la enfermedad y, generalmente, las aves son portadoras subclínicas del microorganismo. En lo animales, la mayor parte de las infecciones son subclínicas, pero puede producirse una enfermedad invasiva esporádicamente o en forma de brote. Además del impacto económico de la listeriosis en la producción de rumiantes y de otras especies animales, los rumiantes pueden desempeñar un papel como fuente de infección para el hombre, principalmente por el consumo de productos animales contaminados. Puede tener lugar la transmisión directa por animales infectados, especialmente durante el parto de las vacas o las ovejas (Wesley, 2007), pero son infecciones muy infrecuentes. La importancia comparativa de la transmisión zoonótica de la enfermedad al hombre no está clara, y para la salud pública es más relevante la contaminación que se produce a partir del ambiente en el que se procesan los alimentos (Roberts & Wiedmann, 2003).

Tabla 1. Especies de las que se ha aislado *Listeria monocytogenes*

Mamíferos				
Ganado vacuno	Gatos	Conejos	Ovejas	Ciervos
Cobayas	Cabras	Mapaches	Chinchillas	Cerdos
Ratas	Mofetas	Caballos	Ratones	Visones
Perros	Lemmings	Hurones	Zorros	Topillos
Alces	Humanos			
Aves				
Canarios	Patos	Lechuzas	Pinzones	Águilas
Loros	Pollos	Gansos	Perdices	Cranes
Halcones	Faisanes	Tórtolas	Cotorras	Palomas
Gaviotas	Pavos	Lagópodos	Currucas zarceras	Urogallos
Otros				
Ranas	Crustáceos	Garrapatas	Peces	Hormigas
Moscas	Caracoles			

Los signos clínicos de la listeriosis en los animales son rombencefalitis (o, en algunos casos, alteraciones encefalíticas más diseminadas), septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas. Durante un brote en una parvada o un rebaño, normalmente tiene lugar solo una forma clínica de listeriosis. La forma rombencefálica se denomina “enfermedad de los círculos” por una tendencia de los animales a desplazarse en círculos en un único sentido, que es el signo más frecuente de la enfermedad en los rumiantes. Además, está entre las causas más habituales de enfermedad neurológica en los rumiantes. Los signos clínicos son depresión, anorexia, presión y giro de la cabeza hacia un lado, y parálisis unilateral de pares craneales. Esto último se debe a la afectación de los pares craneales y de sus núcleos en el tronco encefálico. El aborto suele tener lugar en las

fases finales de la gestación (pasados los 7 meses en el ganado vacuno y pasadas las 12 semanas en las ovejas) (Hird & Genigeorgis, 1990; Walker, 1999). La forma septicémica es relativamente poco común y por lo general, aunque no de manera invariable, se produce en el animal neonato. Se caracteriza por abatimiento, falta de apetito, fiebre y muerte. También se han descrito la oftalmítis bovina y ovina (Walker & Morgan, 1993). En ocasiones muy infrecuentes la mastítis de rumiantes se ha asociado a una infección por *L. monocytogenes*. Y de manera también muy infrecuente, en las ovejas pueden tener lugar infecciones gastrointestinales (Clark *et al.*, 2004). Cuando se produce listeriosis en cerdos, el signo clínico principal es la septicemia y son menos frecuentes los casos de encefalitis y muy infrecuentes los abortos. Aunque las aves suelen ser portadoras subclínicas, se han descrito casos esporádicos de listeriosis, siendo lo más frecuente la septicemia y mucho menos común la aparición de meningoencefalitis. La listeriosis aviar puede ser el resultado de una infección secundaria en un entorno de enfermedad vírica y salmonelosis (Wesley, 2007).

En la listeriosis de los animales, los hallazgos post-mortem y la histopatología dependen de la presentación clínica. En la forma encefalítica, el líquido cefalorraquídeo puede estar turbio y los vasos meníngeos congestionados. Las lesiones macroscópicas en general son sutiles y se caracterizan por una congestión vascular y un ligero cambio de coloración del tronco encefálico. En ocasiones, el bulbo raquídeo presenta zonas de reblandecimiento (malacia) y abscedificación. Sin embargo, la enfermedad cursa con una histopatología característica que consiste en focos de neutrófilos y macrófagos intraparenquimatosos (microabscesos) en el tronco encefálico con manguito mononuclear perivascular adyacente. Los microabscesos a menudo afectan más gravemente a un lado. Puede presentarse una anatomopatología más extensa, de tipo malácico. El bulbo raquídeo y el puente son las partes más gravemente afectadas. En la forma septicémica, pueden detectarse focos múltiples de necrosis en el hígado y, con menor frecuencia, en el bazo. Los fetos abortados de los rumiantes muestran muy pocas lesiones macroscópicas, pero puede producirse autólisis si el feto estuvo retenido antes del parto (Low & Donachie, 1997; Walker, 1999).

Las pruebas indican que la listeriosis animal a menudo se asocia al almacenamiento de forraje y al entorno como fuente principal de contaminación. En el entorno, este microorganismo saprófito puede vivir en el suelo, el agua y materia vegetal en descomposición, desde donde podría contaminar el alimento de los animales. El ensilado es la fuente más frecuente (Fenlon, 1985; Wiedmann *et al.*, 1997a). En la listeriosis septicémica/abortiva, la mucosa intestinal es la vía de entrada principal, después de la ingesta. El periodo de incubación puede ser de tan solo 1 día. En la rombencefalitis, *L. monocytogenes* probablemente invade el tronco encefálico por medio de los pares craneales atravesando la mucosa oral. El periodo de incubación es considerablemente más largo que en la forma septicémica, normalmente de 2-3 semanas. En las ovejas y en las cabras la enfermedad suele ser aguda, y dura de 1 a 4 días (Roberts & Wiedmann, 2003), mientras que en el ganado vacuno puede ser más larga.

Aunque *L. monocytogenes* se ha considerado durante muchos años un microorganismo patógeno de los animales, su destacable papel como patógeno humano transmitido por los alimentos solo se hace evidente a partir de 1980, cuando se publica un informe de un brote de listeriosis de Canadá relacionado con la ensalada de col (Schlech *et al.*, 1983). Los datos de este brote y el nivel de ensalada de col contaminada se utilizaron varios años después para establecer los criterios microbiológicos a 100 unidades formadoras de colonia/g como nivel del *Codex Alimentarius*. Hoy en día, *L. monocytogenes* se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades transmitidas por alimentos. En total, se han notificado 80 brotes en todo el mundo, y aunque se han notificado en varios países, la mayoría de casos humanos son esporádicos. La posible explicación de la aparición de la listeriosis humana transmitida por alimentos como un asunto del máximo interés para la salud pública ha de buscarse en los importantes cambios en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como principal medio de conservación de los mismos, los cambios en los hábitos alimenticios de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados, y un incremento del número de personas con un riesgo alto de sufrir la enfermedad (ancianos, mujeres embarazadas, recién nacidos e inmunodeprimidos) (Rocourt & Bille, 1997; Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Si bien *L. monocytogenes* se ha notificado en varios países, su incidencia depende de los hábitos alimentarios, los tipos de cocción, el uso de la refrigeración y la importación de alimentos.

Las formas invasivas de la listeriosis humana son la septicemia, la meningitis (o meningoencefalitis) y la encefalitis (rombencefalitis). También se presentan signos gastrointestinales que cursan con fiebre. A pesar de que la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la mortalidad puede alcanzar valores de alrededor del 30%. En mujeres embarazadas, la infección puede dar lugar a abortos, nacidos muertos o nacimientos prematuros, y puede ir precedida de signos gripales, como la fiebre (Painter & Slutsker, 2007; Rocourt & Bille, 1997).

Listeria monocytogenes es un bacilo grampositivo responsable de la mayor parte de las infecciones que afectan al hombre, aunque se han publicado algunos casos de infección debidos a *L. ivanovii*. En los animales, *L. monocytogenes* es responsable de la mayoría de las infecciones, pero también se han registrado infecciones por *L. ivanovii* y *L. seeligeri*. *Listeria ivanovii* se ha relacionado con abortos y se la ha considerado como causa de la meningoencefalitis en ovejas, aunque de forma muy esporádica (Tabla 2).

Aunque *L. monocytogenes* posee un potencial zoonótico evidente, también es uno de los principales contaminantes medioambientales, de relevancia a nivel de salud pública.

Las cepas de *L. monocytogenes* pueden subtipificarse por varios métodos con fines de investigación epidemiológica, pero aún no ha sido resuelta la cuestión fundamental de si todas las cepas de *L. monocytogenes* son capaces de causar la enfermedad (Graves *et al.*, 2007; Jacquet *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 1992; 1993).

Se han identificado varios determinantes moleculares de virulencia que intervienen en la infección celular por *L. monocytogenes* y el hecho de que todavía no se conozca su mecanismo de acción, hace de *L. monocytogenes* uno de los modelos más interesantes de interacción patógeno-hospedador, tanto a nivel celular como molecular. Estos determinantes de virulencia son, entre otros, las internalinas, la listeriolisina O (LLO), la proteína ActA, dos fosfolipasas, una metaloproteasa, la proteína Vip, un sistema de exclusión de la bilis (BilE) y una hidrolasa de sales biliares (Cabanés *et al.*, 2005; Cossart & Toledo-Arana, 2008; Dussurget *et al.*, 2002; Sleator *et al.*, 2005). Aunque existe polimorfismo entre diferentes cepas de *L. monocytogenes* en cuanto a algunos de estos determinantes de virulencia, este hecho no puede correlacionarse con la capacidad o la incapacidad del microorganismo para producir la enfermedad (Jacquet *et al.*, 2002). No obstante, las internalinas A y B median la entrada de *L. monocytogenes* en algunos cultivos celulares humanos y el atravesamiento de la pared intestinal en jerbos o ratones transgénicos que expresen su receptor, la E-cadherina humana, en los eritrocitos. Algunas cepas de *L. monocytogenes* expresan una forma no funcional truncada de internalina. Jacquet *et al.* (2004) hallaron que las cepas que causan enfermedad clínica en el ser humano expresan una internalina de longitud completa con mucha más frecuencia (96%) que las cepas recuperadas de productos alimentarios (65%). De entre aquellas cepas clínicas, el serotipo 4b, que es el que está implicado en la listeriosis humana con más frecuencia, expresa internalina de longitud completa. Así, se estableció que la internalina desempeña un papel crucial en la patogenia de la listeriosis humana, y se reconoció la expresión de la internalina como marcador de virulencia para el ser humano (Bonazzi *et al.*, 2009; Jacquet *et al.*, 2004).

Tabla 2. Virulencia de las especies de *Listeria*

Especies de <i>Listeria</i>	Virulencia en el ser humano	Virulencia en los animales
<i>L. monocytogenes</i>	+	+
<i>L. ivanovii</i> subesp. <i>ivanovii</i>	– ^a	+
<i>L. ivanovii</i> subesp. <i>londoniensis</i>	–	+
<i>L. innocua</i>	– ^b	–
<i>L. welshimeri</i>	–	–
<i>L. seeligeri</i>	– ^b	+
<i>L. grayi</i> subesp. <i>grayi</i>	– ^b	–
<i>L. grayi</i> subesp. <i>murrayi</i>	–	–
<i>L. marthii</i>	–	–
<i>L. rocourtiae</i>	–	–
<i>L. weihenstephanensis</i>	–	–
<i>L. fleischmannii</i> subesp. <i>fleischmannii</i>	–	–
<i>L. fleischmannii</i> subesp. <i>coloradensis</i>	–	–

a: solo 11 casos humanos de infección notificados; b: solo 1 caso humano de infección notificado.

Listeria monocytogenes está clasificada en el Grupo 2 de Riesgo para la infección humana y debe manipularse aplicando las medidas correspondientes, que se describen en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*. Las medidas de biocontención deben determinarse mediante un análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *L. monocytogenes* muestras de la cadena alimentaria (muestras de producción primaria, de alimento para animales, de alimento destinado al consumo humano, y del entorno) y muestras de listeriosis animal. Dado que los niveles bajos de *L. monocytogenes* podrían ser difíciles de detectar, ciertos métodos también podrían ir destinados a detectar especies de *Listeria* se hayan utilizado como indicadores biológicos de la presencia de *L. monocytogenes* en muestras de alimento humano y muestras vegetales del entorno. Tanto en los casos animales como en los humanos, los métodos bacteriológicos convencionales son importantes por varias razones: su empleo permite obtener el microorganismo en cultivo puro, lo que será útil para fines reguladores, de vigilancia epidemiológica y de gestión de brotes. Siguen siendo los métodos de referencia frente a los cuales se comparan y validan otros métodos. Normalmente, estos métodos son muy sensibles y no requieren un equipo sofisticado ni caro, lo cual permite que se utilicen mucho. Algunas desventajas de este grupo de métodos son el periodo de tiempo relativamente largo que se necesita para completar los protocolos; la experiencia práctica que se precisa en varias manipulaciones; la necesidad de muchos productos químicos, reactivos y medios diferentes; la posibilidad de que algunos microorganismos contaminantes enmascaren la presencia de las bacterias que se pretende detectar, e incluso que presenten un sobrecrecimiento; que pasen desapercibidas variantes atípicas del microorganismo diana; y la subjetividad relativa que supone la interpretación del crecimiento bacteriano en placas de agar con un medio selectivo y diferencial (Andrews, 2002).

El aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de muestras de la cadena alimentaria y muestras de listeriosis animal requiere el uso de agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento que mantengan los niveles de microorganismos contaminantes en valores razonables y permitan la multiplicación de *L. monocytogenes* hasta niveles que sean suficientes para poder detectar este microorganismo. Con este fin, en las primeras pruebas serológicas de detección de *Listeria*, se utilizaba regularmente el enriquecimiento en frío (Gray *et al.*, 1948), explotando la capacidad del microorganismo de multiplicarse a temperaturas de refrigeración (unos 4°C), mientras que las bacterias contaminantes no se multiplicarían a estas condiciones. Sin embargo, dicho procedimiento necesita tiempos de incubación muy largos, a menudo meses, por lo que resulta inadecuado para las investigaciones actuales de brotes de transmisión alimentaria y de casos esporádicos, así como para la puesta en práctica de programas efectivos de análisis de riesgos y control de puntos críticos (HACCP) en las plantas de procesamiento y producción de alimentos. Se han incorporado compuestos selectivos en los medios de cultivo que permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* a temperaturas de incubación normales; de este modo se acorta el tiempo requerido para el desarrollo selectivo del microorganismo. Ejemplos de estos compuestos selectivos son cicloheximida, colistina, cefotetán, fosfomicina, cloruro de litio, ácido nalidíxico, acriflavina, feniletanol, ceftazidima, polimixina B y moxalactam. El desarrollo de medios cromógenos ha permitido una mejora en el aislamiento de este microorganismo en muestras procedentes de la cadena alimentaria.

El diagnóstico bacteriológico de la listeriosis animal ha consistido tradicionalmente en la siembra directa de las muestras en placa con medio de agar sangre o en otros medios enriquecidos y, en paralelo, el empleo de la técnica de "enriquecimiento en frío", con subcultivos semanales durante 12 semanas (Gray *et al.*, 1948; Quinn *et al.*, 1999; Walker, 1999). Se ha observado que para el diagnóstico de la forma encefalítica de la enfermedad en los rumiantes, la detección de antígenos de *L. monocytogenes* por medio de la inmunohistoquímica en tejidos fijados en formalina es más sensible que la siempre directa en placa y el cultivo bacteriano con enriquecimiento en frío (Campero *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 1995). Lo mismo ocurre en el diagnóstico de la rombencefalitis humana. No obstante, contrariamente a lo que se observa en medicina humana, en los animales es muy difícil, si no imposible, aislar el microorganismo a partir del líquido cefalorraquídeo o identificar el microorganismo por PCR en el líquido cefalorraquídeo. Así pues, actualmente el diagnóstico confirmativo de la rombencefalitis listérica en el animal vivo no es posible y solo puede lograrse post-mortem, hallando lesiones histológicas características, por inmunohistoquímica, o por aislamiento bacteriano o PCR con muestras del tronco encefálico.

La introducción de procedimientos alternativos de enriquecimiento y agentes selectivos para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos y de muestras medioambientales ha abierto la posibilidad de utilizar algunas de estas técnicas para el análisis bacteriológico de muestras procedentes de animales con listeriosis. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las características de rendimiento no pueden garantizarse cuando estos últimos métodos se utilizan fuera del ámbito para el que se han validado.

A pesar de los avances conseguidos en el aislamiento selectivo de *L. monocytogenes* a partir de muestras de la cadena alimentaria, todavía existe la posibilidad de mejorar en varios ámbitos. Ningún procedimiento se puede considerar por sí solo lo bastante sensible para detectar *L. monocytogenes* a partir de todos los tipos de alimentos (Donnelly & Nyachuba, 2007). Además, pueden encontrarse células de *L. monocytogenes* en estado subletal en alimentos procesados debido a la congelación, el calentamiento, la acidificación y otros tipos de tratamientos físicos o químicos. Para que estas bacterias en estado subletal y viables pero no cultivables se puedan detectar en el cultivo, se necesitan condiciones especiales de cultivo para reparar el daño.

1.1. Métodos de aislamiento

Los métodos convencionales para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir muestras de la cadena alimentaria que han ganado aceptación para fines de regulación internacional son el método de la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE.UU. (Hitchins & Jinneman, 2011), el método oficial de la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 2012) y los métodos del Comité Europeo para la Normalización (CEN, EN), de la Organización Internacional de Normalización (ISO) (ISO, 1996; 1998; 2005a; 2005b), del Comité Nórdico de Metodología para el Análisis de Alimentos (NMKL) (NMKL, 2007) y del Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos del Departamento de Agricultura de EE.UU. (USDA) (USDA-FSIS, 2013a; 2013b).

Los métodos del EN ISO, la FDA, el USDA y la AOAC deben utilizarse según su ámbito de aplicación, pero cubren una gran variedad de matrices alimentarias. Las muestras de alimento que vayan a analizarse deben ser representativas del alimento, e incluir la superficie externa y el interior. Los métodos de cultivo convencionales son un procedimiento de enriquecimiento basado en el uso de medios de cultivo celular líquidos que contienen agentes selectivos. El método de la AOAC exige un enriquecimiento selectivo distinto que contenga agentes selectivos distintos.

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, un método puede ser más adecuado que otro. El subcomité 9 de Microbiología del Comité técnico (CT) 34 de Productos agroalimentarios de la ISO, en acuerdo con el comité técnico EN CEN/TC275 de Análisis de alimentos, Microbiología de la cadena alimentaria, afirma que la Norma ISO EN 11290, partes 1 y 2 (ISO, 1996; 1998; 2005a; 2005b) puede utilizarse para la detección de *L. monocytogenes* en una gran variedad de alimentos y productos alimenticios, pero también en muestras de producción primaria y ambientales. Aunque reconocen que esta norma puede no ser la más apropiada en ciertos casos, recomiendan que se lleve a cabo el máximo esfuerzo para aplicar este método horizontal en la medida de lo posible.

Se describe el principio del método de la ISO EN 11290 Parte 1 enmendado para la detección de *Listeria monocytogenes* (ISO, 2005a), que cubre todas las muestras de la cadena alimentaria y de la producción primaria. De forma resumida, tras preparar la porción problema y la suspensión inicial, la primera fase es la inoculación de un medio de enriquecimiento primario selectivo que contiene un volumen de cloruro de litio y medio volumen de acriflavina y ácido nalidixico (caldo Fraser semi), que también se utiliza como líquido de dilución para la porción problema. Se incuba la porción problema a $30\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. La segunda fase es la inoculación del medio de enriquecimiento líquido secundario de potencia completa (caldo Fraser completo) con un cultivo obtenido en la primera fase. Se incuba el caldo Fraser a entre $35\pm 1^\circ\text{C}$ y $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. En la tercera fase, se siembran las muestras de los cultivos obtenidos en las fases primera y segunda, en los medios sólidos selectivos: "agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti" (ALOA[®]) y agar de tipo ALOA[®], que contiene cloruro de litio, ácido nalidixico, ceftazidima, polimixina B y anfotericina B (o cicloheximida), y cualquier otro medio sólido selectivo a elección del laboratorio, como el Oxford o PALCAM (agar polimixina-acriflavina-litio cloruro-ceftazidima-esculina-manitol). Se incuba el agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti a $37\pm 1^\circ\text{C}$ y se examina pasadas 24 ± 3 horas para comprobar si presenta las colonias características que se considera que corresponden a *L. monocytogenes*. Las colonias características de *L. monocytogenes* en agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti son de un color azul verdoso y están rodeadas por un halo opaco (ISO, 2005a). El agar Oxford contiene cloruro de litio, cicloheximida, colistina, acriflavina, cefotetán y fosfomicina como agentes selectivos, y las colonias características de las especies de *Listeria* son pequeñas y negras, y están rodeadas por un halo negro. Se incuba el segundo medio selectivo a la temperatura adecuada y se examina en el momento adecuado. Se subcultiva la supuesta *L. monocytogenes* y se confirma por medio de pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas apropiadas, según se describe en la norma. Para el método de la enumeración que se describe en la norma ISO EN 11290, Parte 2, solo puede utilizarse "agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti" (ISO, 2005b).

Existen dos grupos generales de medios cromógenos para *Listeria*. En el primero se emplea un cromógeno que detecta la actividad β -D-glucosidasa, que es indicativa de especies de *Listeria*; por otra parte, la formación de un halo bien definido alrededor de la colonia, que indica el uso de lecitina por parte del microorganismo, se emplea para identificar *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*. Los medios de este grupo son ALOA[®] y los medios de tipo ALOA[®]. En el segundo grupo, se utiliza un sustrato cromógeno para detectar la actividad de la fosfolipasa-C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC). Con este grupo de ágar, *L. monocytogenes* y algunas *L. ivanovii* se unen al cromógeno, y el resto de especies de *Listeria* permanecen blancas. En algunos medios de este último grupo, se ha añadido azúcar en forma de xilosa para distinguir entre *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* por la presencia de un halo amarillo que rodea las colonias de *L. ivanovii*. *Listeria monocytogenes* genera colonias azules (PI-PLC positivas) sin halo amarillo (xilosa negativas) y *L. ivanovii* produce colonias azul verdosas (PI-PLC positivas) con halo amarillo (xilosa positivas). Otras colonias de *Listeria* son

blancas (PI-PLC negativas). No se conoce ninguna colonia de *L. monocytogenes* que sea xilosa negativa y PI-PLC negativa.

En el método de la FDA (Hitchins & Jinnemans, 2011), que se describe en el capítulo 10 del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM), al cual puede accederse on line, el caldo de enriquecimiento tamponado para *Listeria* (BLEB) es el enriquecimiento base. El caldo base de triptona y soja con extracto de levadura se ha suplementado con fosfato monopotásico para mejorar la capacidad de tamponamiento, y se ha añadido ácido pirúvico para contribuir a la recuperación de células estresadas o dañadas. Las porciones que se analizarán se enriquecen previamente en BLEB durante 4 horas a 30°C, se añaden agentes selectivos, acriflavina HCl (10 mg/litro), ácido nalidíxico (40 mg/litro) y cicloheximida (50 mg/litro) y el enriquecimiento continúa a 30°C durante 48 horas. Las muestras enriquecidas se siembran en estría a las 24 y 48 horas en placas de agar selectivo/diferencial que contengan esculina y hierro férrico, como los medios Oxford, o una modificación, como el agar MOX (MOX), o bien cloruro de litio/feniletanol/moxalactam (LPM) suplementado con Fe³⁺. También se recomienda la opción de un agar cromógeno secundario. Se subcultiva el supuesto *L. monocytogenes* y se confirma mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas apropiadas, según se describe en el método.

El método del USDA-FSIS incluye dos pasos de enriquecimiento (USDA-FSIS, 2013a; 2013b): el enriquecimiento “primario” se lleva a cabo en medio de cultivo de la Universidad de Vermont (UVM) que contenga ácido nalidíxico y acriflavina, y el enriquecimiento “secundario” se lleva a cabo en caldo Fraser, que contenga ácido nalidíxico, cloruro de litio y acriflavina o caldo de enriquecimiento para *Listeria* tamponado con morfolina-ácido propanosulfónico (MOPS-BLEB). Las condiciones de incubación se describen en este método y varían en función de la matriz escogida para el paso del enriquecimiento. Tras el enriquecimiento selectivo, los cultivos se siembran en placa con agar MOX que contenga cloruro de litio, colistina y moxalactam. Se subcultiva el supuesto *L. monocytogenes* y se confirma mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas apropiadas, según se describe en el método.

En el método del NMLK (NMKL, 2007), el enriquecimiento primario en caldo Fraser semi, a 30°C durante 24 horas, va seguido de un enriquecimiento secundario en caldo Fraser completo, a 37°C durante 48 horas. Los cultivos obtenidos de ambos pasos de enriquecimiento se siembran en placa con un medio de aislamiento específico para *L. monocytogenes*, agar ALOA[®] o bien un agar sangre para *Listeria monocytogenes* (LMBA) o un agar cromógeno para *Listeria*, que básicamente es como el medio ALOA[®], y en otro medio de aislamiento selectivo sólido; este último es opcional. Se subcultiva el supuesto *L. monocytogenes* y se confirma mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas apropiadas, según se describe en el método.

Todos los medios de cultivo que se preparen deben someterse a un control de calidad, como por ejemplo, a las normas ISO 11133 (ISO, 2003; 2009).

El procedimiento original y tradicional de aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de tejidos animales consiste en la siembra directa de las muestras en placas con medio agar sangre de oveja u otro medio de cultivo rico y la utilización en paralelo de la técnica de “enriquecimiento en frío”, con subcultivos semanales durante 12 semanas (Gray *et al.*, 1948; Quinn *et al.*, 1999; Walker, 1999). La técnica del enriquecimiento en frío ya no se aplica. El aislamiento mediante siembra directa en placa es relativamente fácil si el microorganismo está presente en gran número en un lugar normalmente estéril, como sucede en el caso de la forma septicémica de la enfermedad, sin embargo, el aislamiento es difícil cuando el microorganismo está presente en número reducido, como sucede en el caso de la forma encefalítica o si las muestras están fuertemente contaminadas.

En el caso de la listeriosis animal, las muestras deben escogerse de acuerdo a la presentación clínica de la enfermedad: material procedente de lesiones del hígado, riñones y/o bazo, en el caso de la forma septicémica; líquido cefalorraquídeo, puente y bulbo raquídeo, en el caso de la forma rombencefalítica; y placenta (cotiledones), contenido del abomaso fetal y/o secreciones uterinas, en el caso del aborto. Se deben emplear temperaturas de refrigeración (4°C) para la manipulación, conservación y transporte de muestras. Si la muestra ya está congelada, se debe mantener congelada hasta su análisis.

El protocolo recomendado para el aislamiento de *L. monocytogenes* de material de necropsias de animales se describe más adelante como el primero en publicarse (Eld *et al.*, 1993).

1.1.1. Procedimiento para el aislamiento a partir de material de necropsias de animales

- i) Se inoculan 10–25 g o ml de muestra (dependiendo de la cantidad de muestra disponible) en 225 ml de caldo de enriquecimiento para *Listeria*. Cuando se trate de muestras de

listeriosis animal, el tamaño de la muestra para el inóculo puede ser pequeña y menor que el recomendado para las muestras de alimentos (25 g o ml). Si ese es el caso, debe inocularse la mayor cantidad posible de material de muestra (teóricamente, 10–25 g o ml) (Eld *et al.*, 1993). (Caldo base de enriquecimiento para *Listeria*: caldo de tripton y de soja (Oxoid), 30 g; extracto de levadura Difco, 6 g; agua, 1 litro; agentes selectivos: acriflavina, 2,3 mg; ácido nalidíxico, 9,2 mg; cicloheximida, 11,5 mg; se añaden agentes selectivos a 225 ml de caldo base).

- ii) Se incuba el caldo a 30°C durante 48 horas.
- iii) Se extiende 0,1 ml de cultivo con caldo para enriquecimiento sobre placas con agar de Oxford.
- iv) Se incuban las placas a 37°C. Se observa el crecimiento de bacterias transcurridas 24 y 48 horas.
- v) Se comprueba en cinco colonias (o todas si se dispone de pocas) con el aspecto característico de *L. monocytogenes*: la forma celular, la reacción de Gram, la actividad hemolítica en agar sangre (sangre de caballo desfibrinada), la movilidad en agitación a 20°C, la fermentación de la glucosa (+), la ramnosa (+) y la xilosa (–), la hidrólisis de la esculina y la producción de catalasa.

1.1.2. Protocolo alternativo

Existen protocolos alternativos para los laboratorios veterinarios de ámbito nacional; a continuación se detalla un ejemplo:

- i) Se comprueba que la muestra no esté contaminada por el entorno. En caso de duda, se esteriliza con un quemador Bunsen o se cauteriza con un hierro, por ejemplo las muestras de encéfalo contaminadas durante la extracción del cráneo. La porción problema se homogeneiza en agua de peptona tamponada con un machacador para conseguir una suspensión inicial consistente. Las muestras que no se hayan machacado se guardan a 2–8°C.
- ii) La suspensión inicial se inocular en caldo de enriquecimiento, como caldo encéfalo-corazón o caldo Rosenow. Al mismo tiempo, se distribuye, para su observación directa, en agar Palcam modificado o en agar sangre de oveja Columbia con ácido nalidíxico (15 mg/litro) y sulfato de colistina (10 mg/litro), si se considera que la muestra no está contaminada. La base Palcam se modifica del siguiente modo: se prepara un suplemento (que contenga 100.000 Unidades Internacionales de sulfato de polimixina B, 20 mg de ceftazidima, 5 mg de clorhidrato de acriflavina, 200 mg de cicloheximida y 10 ml de agua estéril), se esteriliza por filtración y 10 ml se añaden a 1000 ml del medio base Palcam.
- iii) Se incuba a 37±1°C durante 24 horas en el caso del cultivo líquido, y durante 24–48 horas en el caso del cultivo sólido.
- iv) Pasadas 24 horas, si aparecen en las placas de Petri colonias supuestamente de *Listeria*, se toman para realizar pruebas de confirmación. Si no hay ninguna, las placas se incuban de nuevo en las mismas condiciones durante 24 horas. El caldo de enriquecimiento se siembra en estría en medio Palcam y en agar de sangre de oveja Columbia con ácido nalidíxico (15 mg/litro) y sulfato de colistina (10 mg/ml), y se incuba a 37±1°C durante 24 horas. En el caso del agar Palcam y el Palcam modificado, se exponen las placas al aire durante 1 hora para que el medio recupere su color rosa a púrpura. Pasadas 24 horas, *Listeria* sp. crece en estos últimos medios en forma de colonias pequeñas o muy pequeñas de color verde grisáceo o verde aceituna, de 1,5–2 mm de diámetro, a veces con centros negros, pero siempre con halos negros. Pasadas 48 horas, aparece *Listeria* sp. en forma de colonias verdes de unos 1,5–2 mm de diámetro, con una depresión central y rodeadas de un halo negro. En el agar sangre de oveja Columbia con ácido nalidíxico y sulfato de colistina, *Listeria* sp. crece en forma de colonias grises y planas y *L. monocytogenes* presenta una zona pequeña de hemólisis que podría observarse tras retirar la colonia. *Listeria ivanovii* presenta una débil actividad hemolítica alrededor de la colonia.
- v) A las 48 y las 72 horas, si en las placas de Petri aparecen colonias supuestamente de *Listeria*, se toman para realizar otras pruebas confirmativas. Si hay cinco colonias supuestamente de *Listeria*, se toman todas. Si hay más de cinco, se escogen solo cinco.

En el caso de las heces, el ensilado y la placenta, se aplican dos modificaciones a este último protocolo.

En el caso de las heces y el ensilado, se prepara una suspensión a 1/10 (25 g en 225 ml) en caldo Fraser semi y se incuba a 30±1°C durante 24 horas. A las 24 horas, esta suspensión se siembra en estría en medio Palcam modificado, y se lleva a cabo un subcultivo en caldo Fraser completo a razón de 0,1 ml en 10 ml. Los medios se incuban a 37±1°C durante 24 horas. A las 48 horas, este caldo Fraser incubado se siembra en estría en Palcam modificado, y las placas de Petri se incuban a 37±1°C durante 24–48 horas. El caldo Fraser se vuelve a incubar a 37±1°C durante 24 horas antes de sembrarlo en estría en Palcam modificado.

En el caso de las muestras de placenta, la porción problema se diluye a 1/2 y 1/5 en agua de peptona tamponada y se aísla directamente en medios selectivos. El Palcam se sustituye, en este caso, por Palcam modificado.

ALOA® y otros medios cromógenos para *Listeria* permiten el crecimiento de la mayoría de especies de *Listeria* y pueden utilizarse en microbiología clínica para el cribado de muestras humanas de heces.

1.2. Métodos de identificación convencionales

Las colonias típicas de *Listeria* sp., una vez obtenidas en el medio selectivo/diferencial, se seleccionan para la posterior identificación a nivel de especie, empleando una batería de pruebas. Estas pruebas son la reacción a la tinción de Gram, la prueba de la catalasa, la de la movilidad (llevando a cabo una preparación húmeda que se observará al microscopio de contraste de fases, o bien inoculando la muestra en agar de movilidad semi-sólido [0,2–0,4% de agar] o en tubos de Graigie o tubos en U), la de la hemólisis y la del uso de hidratos de carbono (Tablas 3 y 4).

Para observar la movilidad a propulsión, se lleva a cabo una preparación de gota colgante a partir de un cultivo de caldo joven, como por ejemplo, extracto de triptona, soja y levadura, y se incuba a temperatura ambiente 24-48 horas. Cuando se utiliza agar de movilidad semi-sólido tras la inoculación por picadura (alrededor de 1 cm) y una incubación a 20-28 °C, aparece gran cantidad de listerias en el medio, que se vuelve turbio. A unos 0,5 cm por debajo de la superficie del agar, se observa una capa característica de mayor crecimiento, como un paraguas. Esto ocurre debido a que *Listeria* se desarrolla mejor en condiciones de aerobiosis que en condiciones estrictamente anaerobias.

Para comprobar la actividad hemolítica, se utilizan placas de agar que contenga sangre de caballo y de oveja. Tras la incubación a 37°C durante 24 horas y la inoculación por perforación del medio, *L. ivanovii* presenta una amplia zona de hemólisis. La zona de hemólisis de *L. monocytogenes* es estrecha, y a menudo no va mucho más allá del borde de las colonias. En este caso, la extracción de las colonias podría facilitar la interpretación. Algunas cepas de *L. monocytogenes*, aunque muy pocas, no son hemolíticas.

La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) es una herramienta muy útil que facilita la identificación a nivel de especie de las cepas *Listeria* aisladas. Se emplea en los protocolos ISO y en algunos protocolos de la AOAC, y se considera opcional en los métodos de la FDA y del USDA-FSIS. Esta prueba es fácil de realizar e interpretar. Consiste en sembrar en estría una cepa β-hemolítica de *Staphylococcus aureus* (ATCC™ cepa 49444® o 25923®, NCTC™ cepa 7428® o 1803®) y de *Rhodococcus equi* (ATCC™ cepa 6939®, NCTC™ cepa 1621®) en líneas únicas rectas y paralelas, en una placa de agar sangre de oveja, o bien en una placa con doble capa de agar con la capa de agar sangre superior muy delgada. Las estrías deben tener la suficiente separación para permitir que las cepas problema y las cepas control de *Listeria* se puedan sembrar perpendicularmente, entre los dos microorganismos indicadores, sin que los toquen (separados 1–2 mm). Después de una incubación de 24–48 horas a 35–37°C (12–18 horas si se emplea la capa superior fina de agar sangre), se considera una reacción positiva la aparición de una zona destacada de β-hemólisis en la intersección de las cepas problema/control con las cepas indicadoras. *L. monocytogenes* es positivo con la siembra de *S. aureus* y negativo con la de *R. equi*, mientras que la prueba con *L. ivanovii* produce las reacciones inversas (Quinn *et al.*, 1999). En el género *Listeria* se han descrito taxonómicamente diez especies: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii* subesp. *ivanovii* y subesp. *londoniensis*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi* subesp. *grayi* y subesp. *murrayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subesp. *fleischmannii* y subsp. *coloradensis*. Las especies nuevas (*L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subesp. *fleischmannii* y subesp. *coloradensis*) se aíslan principalmente de muestras del entorno y son muy infrecuentes (den Bakker *et al.*, 2013). *Listeria fleischmannii* podría aislarse de muestras de producción primaria y el suelo de plantas o sótanos.

Tabla 3. Características más destacadas de las principales especies de *Listeria*

Prueba	Reacción de <i>Listeria</i> sp.
Tinción de Gram	Positiva
Morfología celular	Bacilo corto (0,4-0,5 µm × 0,5-2,0 µm) que no forma esporas, con algunos flagelos peritricosos
Condiciones de crecimiento	Aerobia y anaerobia facultativa
Movilidad	Movilidad a propulsión o en paraguas en agar de movilidad positiva a 20–28°C, negativa a 37°C
Catalasa	Positiva
Oxidasa	Negativa
Hidrólisis de la esculina	Positiva
Indol	Negativa
Ureasa	Negativa

Tabla 4. Diferenciación de las principales especies de *Listeria*

Especie	β-hemólisis	Producción de ácido a partir de			Reacción de Christie, Atkins, Munch-Petersen (CAMP) en agar sangre de oveja con	
		L-Ramnosa	D-Xilosa	D-Manitol	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	–	–	+	–
<i>L. innocua</i>	–	V	–	–	–	–
<i>L. ivanovii</i> subesp. <i>ivanovii</i>	+	–	+	–	–	+
<i>L. ivanovii</i> subesp. <i>iondoniensis</i>	+	–	+	–	–	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	–	+	–	(+)	–
<i>L. welshimeri</i>	–	V	+	–	–	–
<i>L. grayi</i> subesp. <i>grayi</i>	–	–	–	+	–	–
<i>L. grayi</i> subesp. <i>murrayi</i>	–	+	–	+	–	–

V: variable; (+): reacción débil; +: >90% reacciones positivas; –: ausencia de reacción.

La serología, la tipificación de secuencias multi-locus (MLST) y la prueba de la patogenicidad en modelo animal se consideran métodos opcionales. Liu *et al.* (2007) revisaron la prueba de la virulencia de *L. monocytogenes* e intentaron definir su virulencia.

1.3. Métodos rápidos de identificación

Los siguientes protocolos incluyen pruebas comerciales convencionales y no convencionales y kits de análisis del ácido nucleico para facilitar la identificación de *L. monocytogenes* (Jadhav *et al.*, 2012). Se ha descubierto que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dirigida al gen *hly*, es sensible y rápida para confirmar la identificación de *L. monocytogenes* sospechoso aislado en placas de agar selectivo-diferencial (Gouws & Liedemann, 2005).

Se han validado métodos comerciales de identificación alternativos mediante uno o más sistemas formales de validación reconocidos, como AOAC, MicroVal, Nordval Internacional y Afnor Certification (Afnor Certification, 2013; AOAC, 2012; Lombard & Leclercq, 2011; Microval, 2013; NordVal Internacional, 2013). Esta lista aumenta constantemente a medida que van aplicando las nuevas tecnologías a las necesidades de los laboratorios. Se publican online actualizaciones periódicas de estos métodos alternativos en las páginas web de los organismos de validación, junto con las referencias clave y el ámbito de aplicación, el estado respecto a la validación y la certificación del método.

Se han desarrollado medios cromógenos para confirmar la identificación de *L. monocytogenes*. Principalmente se basan en la detección de actividad PI-PLC y de la fermentación de la L-ramnosa. Se escoge una colonia supuestamente de *L. monocytogenes* y se distribuye en forma de banda de 2 cm

de ancho. *Listeria monocytogenes* presenta una actividad PI-PLC y una zona amarilla de fermentación de la L-ramnosa. Algunas cepas de *L. monocytogenes*, aunque muy pocas, son ramnosa negativas.

Existe un sistema comercial para la identificación provisional de especies de *Listeria* que se han aislado a partir de muestras de la cadena alimentaria. Supone una alternativa a las pruebas bioquímicas que se realizan en las cepas de *Listeria* por métodos convencionales. Consiste en analizar microtubos miniaturizados sobre una tira o una tarjeta que reacciona en caso de fermentación, de uso o de actividad enzimática, que puede detectarse después de 24 horas de incubación a 37°C. Para la identificación bioquímica, la diferenciación de las especies de *Listeria* se basa en un código que se obtiene añadiendo los valores numéricos de cada grupo de varias pruebas, y otra prueba como las reacciones obtenidas a partir de la prueba CAMP y las características de hemólisis, que se analizan por separado. Un método comercial que se basa en la presencia o ausencia de arilamidasa, distingue entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* sin necesidad de realizar pruebas de actividad hemolítica.

La identificación puede realizarse mediante secuenciación del ADNr de la subunidad 16S o de los genes *iap* (Bubert *et al.*, 1999). Tras la extracción del ADN con kits comerciales, se lleva a cabo una PCR a punto final del ADNr de la subunidad 16S o de genes *iap*. Los productos de la PCR se purifican y secuencian con un secuenciador en el laboratorio. La secuencia se compara con la base de datos de ADN accesible por internet empleando el programa informático BLAST. Recientemente, se ha añadido una PCR cuantitativa para la identificación de cepas al manual online BAM de la FDA, que puede encontrarse en el siguiente enlace:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm279532.htm>.

Un método alternativo para la identificación rápida de especies de *Listeria* es la espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), que cada vez se utiliza más en los laboratorios de microbiología. Los sistemas de identificación MALDI-TOF MS se basan en la comparación del espectro de masas de la cepa analizada con bases de datos de referencia. Se han desarrollado varias bases de datos y estrategias de identificación. En el caso de las cepas de *Listeria*, el género podría identificarse con exactitud, pero no la especie (Farfour *et al.*, 2012).

1.4. Los métodos alternativos de detección de *Listeria* clásica

Se han desarrollado varios métodos basados en pruebas inmunológicas o en el reconocimiento del ácido nucleico para detectar *L. monocytogenes* en muestras de la cadena alimentaria (Jadhav *et al.*, 2012). Algunos de ellos se han validado mediante uno o más sistemas formales de validación reconocidos, como AOAC, MicroVal, Nordval International y Afnor Certification (Afnor certification, 2013; AOAC, 2012; Dunbar *et al.*, 2003; Lombard & Leclercq, 2011; Microval, 2013; NordVal International, 2013; Sewell *et al.*, 2003). Se publican online actualizaciones periódicas de estos métodos junto con las referencias clave y el estado respecto a la validación y la certificación del método.

Las secuencias de ADN diana para el diagnóstico son el gen *hly*, el gen *iap* y el gen de ADNr de la subunidad 16S en un formato de PCR y de qPCR. El método del USDA-FSIS, MLG8A.05¹, describe el uso de PCR para realizar un cribado de alimentos respecto a *L. monocytogenes* y se basa en el uso de una prueba BAX para el cribado respecto a *L. monocytogenes*.

Los métodos alternativos basados en la PCR para la detección de *Listeria* deberán validarse y utilizarse con un control de calidad acorde a las directrices de la OIE descritas en el *Manual Terrestre* de la OIE y/o las normas o directrices que exija la reglamentación regional o nacional.

1.5. Antibiogramas

Listeria monocytogenes es intrínsecamente resistente a las cefalosporinas (cefazolina, ceftiofur, cefpiroma), las quinolonas (ácido nalidixico y las primeras fluoroquinolonas, como la ofloxacina), la fosfomicina y la clindamicina. Casi nunca se observa resistencia adquirida. La mayoría de cepas aisladas son susceptibles a la penicilina G, la amoxicilina, los aminoglucósidos (gentamicina), las tetraciclinas, los fenicoles, el trimetoprim y las sulfonamidas, la rifampicina y los glucopéptidos (vancomicina) (Granier *et al.*, 2011; Troxler *et al.*, 2000). A frecuencias muy bajas, se ha observado resistencia a la tetraciclina en muestras de distintas procedencias: carne de ternera, plantas de procesado de carne de ternera, carrillos de cerdos y oveja. También se ha observado resistencia a la

¹ Disponible en Qualicon-Dupont, Wilmington, EE.UU.

eritromicina en muestras ambientales y de alimento. Es importante destacar que hasta ahora no se ha observado resistencia a las penicilinas (Granier *et al.*, 2011).

Los antibiogramas suelen estar indicados en bacterias patógenas cuando inducen una infección que requiere un tratamiento antimicrobiano, y si la identificación del microorganismo no es suficiente como para predecir de forma fiable la respuesta a este tratamiento.

En el caso del tratamiento de la infección por *L. monocytogenes*, la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos todavía es predecible, y la terapia se aplica mucho de forma empírica. No obstante, los antibiogramas pueden ser una herramienta útil en estudios epidemiológicos o para evaluar nuevos agentes antimicrobianos. Además, dado que *L. monocytogenes* se considera un microorganismo exigente en cuanto a cultivo, las metodologías empleadas en los antibiogramas y su interpretación, a menudo poco estandarizadas, además del hecho de que haya pocos estudios publicados, en ocasiones podrían ser cuestionables.

Recientemente, estos problemas de metodología se han abordado en dos instituciones distintas. En Europa, Eucast (www.eucast.org) propuso en 2011 una metodología para llevar a cabo antibiogramas de *L. monocytogenes* mediante difusión de disco. En EE.UU., dos documentos del Clinical and Laboratory Standards Institute (www.clsi.org), el M31-A3, relativo a los antibiogramas de bacterias de animales, y el M45-A2, relativo a los antibiogramas de bacterias exigentes, proporcionan directrices y criterios de interpretación para evaluar la susceptibilidad de *L. monocytogenes* por el método de la microdilución en caldo de cultivo.

1.6. Métodos de subtipificación

La mayor parte de detecciones reguladoras de *L. monocytogenes* no exigen ninguna tipificación específica de las cepas aisladas. Sin embargo, los esquemas de tipificación pueden ser de utilidad en los estudios de brotes, en el seguimiento medioambiental y en la vigilancia de la salud pública.

Listeria monocytogenes puede subtipificarse mediante varias estrategias, como la serotipificación, la fagotipificación, el análisis del ADN mediante enzimas de restricción (empleando enzimas con alta frecuencia de corte y electroforesis en gel convencional o utilizando enzimas con baja frecuencia de corte y electroforesis en gel de campo pulsante [PFGE] para separar los fragmentos), la tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y el análisis mediante chips de ADN.

Se recomienda que la tipificación de las cepas de *L. monocytogenes* se remita al centro de referencia apropiado debido a la necesidad de reactivos específicos, de procedimientos que aseguren una calidad rigurosa y de algún equipamiento sofisticado. Estos Laboratorios de Referencia podrían ser de ámbito nacional, regional o internacional. A nivel internacional, solo existe un Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la listeriosis transmitida por los alimentos (Institut Pasteur, París).

1.6.1. Serotipificación

Las cepas de *L. monocytogenes* pueden asignarse a 13 serotipos diferentes (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e y 7), en función de su combinación de antígenos somático (O) y flagelar (H), según el protocolo de Seeliger y Höhne (1979). Tienen en común antígenos de serotipificación *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*. Solo existe un kit comercial con todos estos antifactores (Denka Seiken, Tokyo, Japón). Aunque todas estas cepas se consideran patógenos potenciales, la mayoría (>95%) de las cepas aisladas de casos clínicos humanos pertenecen a tres serotipos: 1/2a, 1/2b, y 4b. Comparada con otros métodos de subtipificación, la serotipificación presenta un poder de discriminación bajo, pero puede proporcionar una información valiosa para facilitar el descarte de cepas que no forman parte del brote o para una investigación sobre un caso humano esporádico. Frecuentemente, las cepas procedentes de alimentos o de fuentes medioambientales no son tipificables con los sueros antifactor estándar comerciales, y requieren otros sueros. En este caso, la tipificación podría realizarse en el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la listeriosis transmitida por los alimentos (Institut Pasteur, París).

Dado que la serotipificación no es rentable, exige habilidad técnica y hace necesarios los antisueros, actualmente a menudo se sustituye por una PCR rápida y reproducible, desarrollada por Doumith *et al.* (2004), que detecta los cuatro fragmentos de ADN *prs*, ORF2110, ORF2819, *lmo1118*, *lmo0737*. Este método de genoserotipificación ahora está reconocido y validado a nivel internacional. Todas las especies de *Listeria* excepto *L. rocourtiae* poseen un fragmento de gen *prs* amplificable. El serogrupo IIa determinado mediante PCR engloba cepas de los serotipos 1/2a y 3a (amplificación de los fragmentos de ADN *prs* y

Imo0737); el serogrupo IIb determinado por PCR engloba cepas de los serotipos 1/2b, 3b, and 7 (amplificación de los fragmentos de ADN *prs ORF2819*); el serogrupo IIc determinado por PCR engloba cepas de los serotipos 1/2c y 3c (amplificación de los fragmentos de ADN *prs, Imo0737* y *Imo1118*); el serogrupo IVb determinado por PCR engloba cepas de los serotipos 4b, 4d y 4e (amplificación de los fragmentos de ADN *prs, ORF2819* y *ORF2110*). Finalmente, el serogrupo L de PCR comprende cepas de otros serovares de *L. monocytogenes* y otras especies, excepto *L. rocourtiae*.

1.6.2. Linaje

Tras la serotipificación, *L. monocytogenes* se puede clasificar en tres posibles linajes, de los cuales: el linaje I engloba los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e; el linaje II engloba los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; y el linaje III engloba los serotipos 4a, 4c y el atípico 4b, según Wiedmann *et al.* (1997). Todavía no está del todo claro a qué linaje pertenecen los serotipos 4ab y 7, debido a la escasez de este tipo de cepas. En el linaje III, se han identificado tres subgrupos claramente diferenciados genéticamente (IIIA, IIIB, and IIIC) a partir de análisis comparativos de las secuencias de los genes *actA* y *sigB*. Fenotípicamente, el linaje IIIa se comporta como un *L. monocytogenes* típico en cuanto a su capacidad de fermentar la ramnosa, mientras que las cepas de los linajes IIIB y IIIC son considerablemente deficientes en el uso de la ramnosa. Los linajes I y II están involucrados en casos de listeriosis humana documentados, y el linaje III casi nunca se relaciona con brotes a pesar de que se aísla con frecuencia de muestras de alimento y ambientales. Las cepas de los linajes I y II parecen ser igual de prevalentes en los animales.

1.6.3. Análisis del ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción

El análisis del ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción (REA) es un método útil de subtipificación de *L. monocytogenes*. Como estas enzimas son muy específicas en el reconocimiento de las secuencias de nucleótidos, los fragmentos resultantes de la digestión del ADN, de tamaños y movilidad electroforética diferentes, reflejan las diferencias genómicas, lo que resulta en unas huellas genéticas específicas para cada una de las distintas cepas, que en realidad están relacionadas. El método presenta un grado alto de reproducibilidad debido a la especificidad de las endonucleasas de restricción. De las endonucleasas de restricción probadas con *L. monocytogenes* en un estudio multicéntrico de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las más útiles fueron *HaeIII*, *HhaI* y *CfoI* (Bille & Rocourt, 1996; Graves *et al.*, 2007). Sin embargo, debido al gran número de posibles sitios de reconocimiento enzimático en el genoma bacteriano, a veces aparecen huellas genéticas complejas con baja resolución o con solapamiento de las bandas, lo que dificulta su interpretación. La técnica no es adecuada, por tanto, para comparar un gran número de patrones de cepas o para elaborar bases de datos dinámicas (Graves *et al.*, 2007).

Cuando se combina el REA con un análisis de hibridación de tipo Southern, que emplee sondas cromosómicas marcadas, solo se detectarán los fragmentos de restricción específicos asociados a los *loci* cromosómicos correspondientes, por lo que se analizará un número significativamente más bajo de fragmentos de ADN. Esta técnica se conoce como análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Cuando se utilizan sondas de ADN correspondientes a los ARN ribosómicos, se detectan únicamente los fragmentos de restricción concretos asociados con los *loci* cromosómicos de los ARNr. Esta técnica se denomina ribotipificación y se utiliza mucho en la subtipificación de *L. monocytogenes*, principalmente con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Sin embargo, esta técnica tiene un poder de discriminación menor que la fagotipificación, el REA o la electroforesis enzimática multilocus (MEE). La compañía Qualicon ha diseñado un sistema de ribotipificación automático, el RiboPrinter, que genera, analiza y almacena los patrones de ribotipificación de diversas bacterias, incluida *Listeria*.

Si se emplean endonucleasas de restricción con baja frecuencia de corte para digerir ADN cromosómico íntegro, tales como las enzimas *Apal*, *SmaI*, *NotI* o *Ascl*, se obtienen fragmentos muy grandes. A causa de su tamaño, estos fragmentos grandes no se pueden separar cuando se someten a una electroforesis convencional en gel de agarosa. Sin embargo, aplicando cambios periódicos de la orientación del campo eléctrico a lo largo del gel, a través de pulsos, los fragmentos grandes pueden “avanzar lentamente” en la matriz de agarosa y separarse de acuerdo a sus distintos tamaños. Esta técnica se conoce como electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) y ha revolucionado la separación precisa de los fragmentos de ADN de tamaño superior a 40 kilobases. La PFGE se aplica en la tipificación de *L. monocytogenes* y se ha visto que es un método muy reproducible y discriminatorio. Particularmente, la PFGE es útil para la tipificación de las cepas del serotipo 4b, que no se subtipifican de forma satisfactoria mediante la mayor parte de los métodos de subtipificación disponibles. Las principales

desventajas de la PFGE son la duración del procedimiento (2–3 días) y el gasto de grandes cantidades de enzimas de restricción, que son caras, al igual que el equipamiento especializado necesario para llevarlo a cabo (Graves *et al.*, 2007). El Centro para la Prevención y el Control de las Enfermedades (CDC) de EE.UU. ha establecido la PulseNet, una red informática de laboratorios reguladores de los alimentos y de la salud pública a nivel nacional o internacional que subtipifica de manera rutinaria mediante PFGE las bacterias patógenas de transmisión alimentaria. Los laboratorios de la PulseNet emplean protocolos rigurosamente estandarizados para la PFGE de *Listeria* con las enzimas endonucleasas *Apal* y *Ascl*, que permiten comparar rápidamente los patrones obtenidos por PFGE procedentes de lugares diferentes, vía Internet. *Listeria monocytogenes* se incorporó a la red PulseNet en 1999 (Graves & Swaminathan, 2001) y el último protocolo se publicó en 2009 (Graves *et al.*, 2001, Halpin *et al.*, 2009). En Europa, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) están generando bases de datos con perfiles obtenidos con la PGFE de *L. monocytogenes* aisladas de casos humanos, de alimentos y de animales, con el objetivo de investigar brotes tanto a nivel nacional como internacional.

1.6.4. Tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos

Aunque se han publicado trabajos acerca del análisis de la secuencia de genes únicos como medio para tipificar las cepas de *L. monocytogenes*, la determinación de la variación alélica de genes múltiples, introducida recientemente, resulta una metodología de tipificación muy prometedora para este microorganismo. Este enfoque se ha descrito para un pequeño grupo de otros microorganismos y se conoce como tipificación basada en la secuencia multi locus (MLST) (Chenal-Franisque *et al.*, 2011; Ragon *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2003; Spratt, 1999). Se han utilizado la amplificación directa y la secuenciación de nucleótidos con buena discriminación entre las cepas analizadas. Debido a que la MLST se basa en la secuencia de nucleótidos, es muy discriminativa y proporciona resultados precisos. La MLST ha permitido definir un complejo clónico, que ofrece una visión de la estructura de la población y de la filogenia dentro de una población de cepas aisladas. Parte de este complejo clónico ha estado implicado en brotes o podría estar relacionado con formas clínicas que darían al responsable de la gestión del riesgo información adicional sobre las cepas aisladas. Podría utilizarse información nueva relativa a la secuenciación del genoma completo en los estudios de investigación y en la vigilancia del perfil molecular de *Listeria*, y que podría cambiar esta visión en los próximos años (den Bakker *et al.*, 2010).

2. Pruebas serológicas

Tradicionalmente, para diagnosticar la listeriosis no se han utilizado pruebas serológicas de detección de anticuerpos. Han sido muy poco fiables, y carentes de sensibilidad y de especificidad. Se han intentado sin éxito varios formatos, como el ELISA, la transferencia puntual o la microaglutinación (reacción de Gruber-Widal), para el diagnóstico de casos de listeriosis humana demostrada en cultivo, incluso en ausencia de inmunosupresión. Se ha observado una considerable reacción cruzada con determinantes antigénicos de otros organismos grampositivos. Por otra parte, *L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo y es muy común la exposición habitual de los animales y del hombre a este microorganismo. Muchos individuos sanos son portadores intestinales (2–6%) y en el hombre se ha descrito la prevalencia de anticuerpos séricos anti-*L. monocytogenes* en un nivel tan alto como del 53%. El nivel de portadores en los animales es similar al de humanos, con algunas diferencias dependiendo de la especie, y el porcentaje es ligeramente más alto durante la estación de estabulación en comparación con la de pastoreo de los animales (Husu, 1990; Iida *et al.*, 1991).

El descubrimiento reciente de que la hemolisina de *L. monocytogenes*, la listeriolisina O (LLO), es un factor importante de virulencia y que puede estimular una respuesta de anticuerpos, ha hecho reanudar el interés acerca de la posibilidad de utilizar las pruebas serológicas para el diagnóstico de la listeriosis, en particular en los pacientes con afectación del sistema nervioso central, con líquido cefalorraquídeo y sangre estériles, y en los casos de listeriosis perinatal. En el diagnóstico de la listeriosis experimental de ovejas se aplica un ELISA indirecto basado en la detección de los anticuerpos anti-LLO (Low *et al.*, 1992). Sin embargo, la LLO está relacionada antigénicamente con varias citolisinas, entre ellas la estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus pyogenes*, la neumolisina de *S. pneumoniae* y la perfringolisina de *Clostridium perfringens*. Los problemas de reactividad cruzada de los anticuerpos anti-LLO con las citolisinas, particularmente con la SLO y la neumolisina, han obstaculizado el desarrollo de pruebas serológicas específicas y fiables basadas en la detección de anticuerpos anti-LLO. Además, los anticuerpos anti-LLO se encuentran en una proporción de individuos sanos y pacientes con infecciones producidas por otras bacterias, hongos o virus (27%, en conjunto), aunque con títulos inferiores a los que presentan pacientes con listeriosis. La absorción de los antiseros que se van a diagnosticar con la SLO es solo parcialmente efectiva para eliminar la reactividad cruzada completa. Estas pruebas experimentales se han utilizado en algunos estudios epidemiológicos y como apoyo al diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central con resultado negativo en cultivo. Se han intentado formas recombinantes de la LLO como alternativas a la LLO natural como antígeno de diagnóstico en pruebas de inmunotransferencia (Lhopital *et*

al., 1993). Estas pruebas serológicas para el diagnóstico de la listeriosis deben validarse por completo, pero debe desarrollarse un banco biológico de sueros.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Se ha comprobado que es muy difícil desarrollar vacunas efectivas contra *L. monocytogenes*, puesto que, al ser un microorganismo intracelular, necesita de la participación de los linfocitos T efectores para desencadenar una respuesta inmunitaria efectiva. Se han estudiado vacunas experimentales utilizando animales de laboratorio con el fin de conferir protección frente a la infección por *L. monocytogenes* mediante varias estrategias, pero estas todavía se encuentran lejos de estar disponibles para ser utilizadas en el hombre o en los animales domésticos. Estas estrategias experimentales son la inmunización con ADN plasmídico, la señalización de los CD40 junto con *L. monocytogenes* inactivada por calor, el empleo de mutantes deficientes en LLO inoculados junto con LLO encapsulada en liposomas, y la inmunización con antígenos listeriales e IL-12.

La modificación genética de *L. monocytogenes* también se está considerando como vector efectivo vacunal para la expresión, secreción y transporte intracelular de antígenos extraños para inducir respuestas inmunitarias potentes frente a antígenos víricos y células tumorales.

Sin embargo, el medio más práctico y factible de reducir el riesgo de listeriosis en humanos es a través de medidas dietéticas y de preparación de alimentos que no solo reduzcan el riesgo de contraer listeriosis, sino que también contribuyan a la prevención de otras infecciones frecuentes transmitidas por alimentos, tales como las causadas por *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Campylobacter*. Estas medidas preventivas comprenden la cocción completa de los alimentos crudos de origen animal, el mantenimiento de las carnes no cocinadas alejadas de las verduras, alimentos cocinados y alimentos preparados, el lavado a fondo de verduras frescas antes de comerlas, el lavado de manos, cuchillos y tablas de corte después de manipular alimentos no cocinados y evitar leche no pasteurizada o sus productos derivados. Las personas inmunodeprimidas, los ancianos, las mujeres gestantes y otros grupos de riesgo alto de contraer la listeriosis deben evitar los alimentos que se han asociado epidemiológicamente a esta enfermedad, p. ej. quesos frescos, pescado ahumado en frío y paté. Estos individuos deben evitar también otros alimentos ya preparados a menos que sean calentados hasta ebullición antes de ser consumidos.

La industria alimentaria y las agencias de salud pública desempeñan un papel crucial en la prevención de la listeriosis transmitida por alimentos mediante el desarrollo y puesta en práctica de programas efectivos HACCP para reducir la presencia de *L. monocytogenes* en todos los puntos críticos durante la producción de alimentos y en la cadena de distribución (desde la granja al mercado).

Igualmente, la falta de vacunas bien diseñadas y probadas para uso en animales hace que el control de la listeriosis en animales sea más factible evitando las condiciones medioambientales que favorezcan su presentación. Existe un nexo bien establecido entre la alimentación con ensilado y la listeriosis y, como *L. monocytogenes* se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, actuando como portadores los animales y las aves, no es infrecuente la contaminación del ensilado. Por tanto, se tendría que reducir la probabilidad de multiplicación del microorganismo, lo que sucede con más frecuencia a valores de pH superiores a 5, en particular en los casos en los que se produce una fermentación ineficaz o hay un desarrollo concomitante de mohos. Habría que intentar que la producción del ensilado resultara de buena calidad, con un corte temprano de la hierba, con la contaminación mínima de tierra o heces y asegurando una fermentación anaeróbica óptima, para garantizar que el pH disminuya hasta quedar por debajo de 5,0; a ese nivel, se inhibe el crecimiento de *Listeria* sp. Debe seleccionarse el mejor ensilado para la alimentación, especialmente en el caso de las ovejas, descartando el material con señales claras de contaminación por hongos. También debe eliminarse el material que ocupa los primeros centímetros de la parte superior, la parte frontal y los costados de la alpaca o bolsa después de abrirla. Las sobras del ensilado deben eliminarse (Low & Donachie, 1997).

BIBLIOGRAFÍA

ANDREWS W. (2002). Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. In: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

AFNOR² Certification, NF Validation (2013). Validation AFNOR des méthodes alternatives d'analyse. Liste des méthodes validées en 2013. La Plaine Stade de France, France. <http://www.afnor-validation.org/afnor-validation-agroalimentaire/agroalimentaire.html>

2 AFNOR: Association Française de Normalisation

- AOAC³ International (2012). Official methods of analysis. Chapter 17: *Listeria*. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- BILLE J. & ROCOURT J. (1996). WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study – rationale and set-up of the study. *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 251–262.
- BONAZZI M., LECUIT M. & COSSART P. (2009). *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cell. Microbiol.*, **11**, 693–702.
- BUBERT, A., HEIN I., RAUCH M., LEHNER A., YOON B., GOEBEL W. & WAGNER M. (1999). Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4688–4692.
- CABANES D., SOUSA S., CEBRIÁ A., LECUIT M., GARCÍA-DEL PORTILLO F. & COSSART P. (2005). Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *The EMBO Journal*, **24**, 2827–2838.
- CAMPERO C.M., ODEÓN A.C., CIPOLLA A.L., MOORE D.P., POSO M.A. & ODRIÓZOLA E. (2002). Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J. Vet. Med. [B]*, **49**, 379–383.
- CHENAL-FRANCISQUE, V., LOPEZ J., CANTINELLI T., CARO V., TRAN C., LECLERCQ A., LECUIT M. & BRISSE S. (2011). Worldwide distribution of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 1110–1112.
- CLARK R.G., GILL J.M. & SWANNEY S. (2004). *Listeria monocytogenes* gastroenteritis in sheep. *NZ Vet. J.*, **52**, 46–47.
- COSSART P. & TOLEDO-ARANA A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes infection*, **10**, 1041–1050.
- DEN BAKKER H.C., CUMMINGS C.A., FERREIRA V., VATTA P., ORSI R. H., DEGORICJA L., BARKER M., PETRAUSKENE O., FURTADO M.R. & WIEDMANN M. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics*, **11**, 688.
- DEN BAKKER H.C., MANUEL C.S., FORTES E.D., WIEDMANN M. & NIGHTINGALE K.K. (2013). Genome sequencing identifies *Listeria fleischmannii* subsp. *coloradensis* subsp. nov., a novel *Listeria fleischmannii* subspecies isolated from a ranch in Colorado. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, DOI/10.1099/IJS,0.048587-0
- DONNELLY C.W. & NYACHUBA D.G. (2007). Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 215–256.
- DOUMITH M., BUCHRIESER C., GLASER P., JACQUET C. & MARTIN P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3819–3822.
- DUNBAR S.A., VANDER ZEE C.A., OLIVER K.G., KAREM K.L. & JACOBSON J.W. (2003). Quantitative multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J. Microbiol. Methods*, **53**, 245–252.
- DUSSURGET O., CABANES D., DEHOUX P., LECUIT M., BUCHRIESER C., GLASER P. & COSSART P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol. Microbiol.*, **45**, 1095–1106.
- ELD K., DANIELSSON-THAM M.-L., GUNNARSSON A. & THAM W. (1993). Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. *Vet. Microbiol.*, **36**, 185–189.
- FARFOUR E., LETO J., BARRITault M., BARBERIS C., MEYER J., DAUPHIN B., B. LE GUERN B., LEFLECHE A., BADELL E., GUISSO N., LECLERCQ A., LE MONNIER A., LECUIT M., RODRIGUEZ-NAVA V., BERGERON E., RAYMOND J., VIMONT S., BILLE E., CARBONNELLE E., GUET-REVILLET H., LECUYER H., BERETTI J. L., VAY C., BERCHE P., FERRONI A., NASSIF X. & JOIN-LAMBERT O. (2012). Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 2702–2707.
- FENLON D.R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 537–543.
- GAHAN C.G.M. & HILL C. (2005). Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1345–1353.
- GOUWS P.A. & LIEDEMANN I. (2005). Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Technol. Biotechnol.*, **43**, 201–205.

3 AOAC: Association of Official Analytical Chemists

- GRANIER S.A., MOUBARECK C., COLANERI C., LEMIRE A., ROUSSEL S., DAO T.T., COURVALIN P. & BRISABOIS A. (2011). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2788–2790.
- GRAVES L.M. & SWAMINATHAN B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, **65**, 55–62.
- GRAVES L.M., SWAMINATHAN B. & HUNTER S.B. (2007). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida–USA, 283–304.
- GRAY M.L., STAFSETH J., THORP JR F., SHOLL L.B. & RILEY W.F. (1948). A new technique for isolating *Listerellae* from the bovine brain. *J. Bacteriol.*, **55**, 471–476.
- HALPIN J.L., GARRETT N.M., RIBOT E.M., GRAVES L.M. & COOPER K.L. (2009). Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.*, **7**, 293–298.
- HIRD D.W. & GENIGEORGIS C. (1990). Listeriosis in food animals: clinical signs and livestock as a potential source of direct nonfoodborne infection for man. In: *Foodborne Listeriosis*, Miller A.J., Smith J.L. & Somkutti G.A., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 31–39.
- HITCHINS A.D. & JINNEMAN K. (2011). Chapter 10. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>
- HUSU J.R. (1990). Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 276–282.
- IIDA T., KANZAKI M., MARUYAMA T., INOUE S. & KANEUCHI C. (1991). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 873–875.
- ISO⁴ (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290-1, Geneva, Switzerland.
- ISO (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. International Standard ISO 11290–2, Geneva, Switzerland.
- ISO (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. International Standard ISO/TS 11133-1, Geneva, Switzerland.
- ISO (2005a). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. International Standard ISO 11290-1, Amendment 1, Geneva, Switzerland.
- ISO (2005b). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 2: Enumeration method. International Standard ISO 11290-2, AMENDMENT 1, Geneva, Switzerland.
- ISO (2009). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media International Standard ISO/TS 11133-2, Geneva, Switzerland.
- JACQUET C., GOUIN E., JEANNEL D., COSSART P. & ROCOURT J. (2002). Expression of ActA, Ami, InIB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 616–622.
- JACQUET C., DOUMITH M., GORDON J. I., MARTIN P. M., COSSART P. & LECUIT M. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.*, **189**, 2094–2100.
- JADHAV S., BHAVE M. & PALOMBO E.A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods*, **88**, 327–341.
- JOHNSON G.C., FALES W.H., MADDOX C.W. & RAMOS-VERA J.A. (1995). Evaluation of laboratory tests for confirming the diagnosis of encephalitic listeriosis in ruminants. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 223–228.
- LHOPITAL S., MARLY J., PARDON P. & BERCHE P. (1993). Kinetics of antibody production against listeriolysin O in sheep with listeriosis. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1537–1540.

4 ISO: Organización Internacional para la Normalización

- IIDA T., KANZAKI M., MARUYAMA T., INOUE S. & KANEUCHI C. (1991). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 873–875.
- LIU D., LAWRENCE M.L., AINSWORTH A.J. & AUSTIN F.W. (2007). Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int. J. Food. Microbiol.*, **118**, 101–115.
- LOMBARD B. & LECLERCQ A. (2011). Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. *Food Analytical Methods*, **4**, 163–172.
- LOPEZ J., KARPOWICZ E., HARGROVE W. & BECKER S. (1992). Comparison of the Intestinal Cell Uptake of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Human Clinical Cases of Listeriosis and From Meat Products, 92nd General Meeting Abstracts, American Society for Microbiology, P-38, 330.
- LOPEZ J., SINGH U., KARPOWICZ E., HARGROVE W. & ADAMS S. (1993). Comparison of the Intracellular Survival and Multiplication of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated From Human Clinical Cases of Listeriosis and From Meat Products, 93rd General Meeting Abstracts, American Society for Microbiology, P-80, 346.
- LOW J.C., DAVIES R.C. & DONACHIE W. (1992). Purification of listeriolysin O and development of an immunoassay for diagnosis of listeric infection in sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2505–2708.
- LOW J.C. & DONACHIE W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.*, **153**, 9–29.
- MICROVAL⁵ (2013). MICROVAL validated and certified alternative microbiological methods. NEN, Microval Secretariat, Delft, The Netherlands. <http://www.microval.org/contact.html>
- NMKL⁶ (2007). Method no. 136, Fourth Edition, *Listeria monocytogenes*. Detection in foods and feeding stuffs and enumeration in foods. NMKL, Secretary General, c/o Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norway.
- NORDVAL INTERNATIONAL (2013). List of methods. NMKL, Oslo, Norway. <http://www.nmkl.org/>
- PAINTER J. & SLUTSKER L. (2007). Listeriosis in humans. In: *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 85–110.
- QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby International, Edinburgh, Scotland, UK.
- RAGON M., WIRTH T., HOLLANDT F., LAVENIR R., LECUIT M., LE MONNIER A. & BRISSE S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.*, **4**:e1000146.
- ROBERTS A.J. & WIEDMANN M. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 904–918.
- ROCOURT J. & BILLE J. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.*, **50**, 67–73.
- SALCEDO C., ARREAZA L., ALCALA B., DE LA FUENTE L. & VAZQUEZ J.A. (2003). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 757–762.
- SCHLECH W.F. 3RD, LAVIGNE P.M., BORTOLUSSI R.A., ALLEN A.C., HALDANE E.V., WORT A.J., HIGHTOWER A.W., JOHNSON S.E., KING S., NICHOLLS E.S. & BROOME C.V. (1983). Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 203–206.
- SEELIGER H. P. R. & HÖHNE K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: *Methods in Microbiology*, Volume 13, Bergan T. & Norris J. R., eds. Academic Press, London, UK, New York, USA.
- SEWELL A.M., WARBURTON D.W., BOVILLE A., DALEY E.F. & MULLEN K. (2003). The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **81**, 123–129.
- SLEATOR R.D., WEMEKAMP-KAMPHUIS H.H., GAHAN C.G.M., ABEE T. & HILL C. (2005). A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.*, **55**, 1183–1195.
- SPRATT B.G. (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 312–316.
- SWAMINATHAN B. & GERNER-SMIDT P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.*, **9**, 1236–1243.

5 Microval: European Validation and Certification Organisation

6 NMKL: Comité Nórdico de Metodología para el Análisis de Alimentos

TROXLER R., VON GRAEVENITZ A., FUNKE G., WIEDEMANN B. & STOCK I. (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.*, **6**, 525–535.

USDA-FSIS⁷ (2012). Procedure for the use of a *Listeria monocytogenes* PCR Screening Test. *In: Microbiology Laboratory Guidebook*, 8A.05, 1–4. Available online:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook#.UcLqZazHnIc>

USDA-FSIS (2013a). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. *In: Microbiology Laboratory Guidebook*, 8.09 pp 1–20, Available online:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook#.UcLqZazHnIc>

USDA-FSIS (2013b). Flow charts for Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. *In: Microbiology Laboratory Guidebook*, 8 appendix 1.01. Available online:

<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/microbiology-laboratory-guidebook#.UcLqZazHnIc>

WALKER J.K. & MORGAN J.H. (1993). Ovine ophthalmitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Vet. Rec.*, **132**, 636.

WALKER R.L. (1999). *Listeria*. *In: Veterinary Microbiology*, Hirsh D.C. & Zee Y.C., eds. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, USA, 225–228.

WESLEY I.V. (2007). Listeriosis in animals. *In: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 55–84.

WIEDMANN M., ARVIK T., BRUCE J.L., NEUBAUER J., DEL PIERO F., SMITH M.C., HURLEY J., MOHAMMED H.O. & BATT C.A. (1997). Investigation of a listeriosis epizootic in sheep in New York State. *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 733–737.

WIEDMANN M., BRUCE J.L., KEATING C., JOHNSON A.E., MCDONOUGH P.L. & BATT C.A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.*, **65**, 2707–2716.

*

* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.

7 USDA-FSIS: Departamento de Agricultura de EE.UU. – Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos