

LISTERIA MONOCYTOGENES

RESUMEN

La listeriosis es una de las enfermedades más importantes de transmisión por alimentos. Las manifestaciones de la enfermedad en el hombre comprenden septicemia, meningitis (o meningoencefalitis) y encefalitis, habitualmente precedidas de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. En mujeres gestantes, las infecciones intrauterinas o cervicales pueden provocar abortos espontáneos o nacidos muertos. También se ha asociado Listeria monocytogenes con manifestaciones gastrointestinales acompañadas de fiebre. Aunque la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la mortalidad de la enfermedad sistémica/encefálica puede ser muy alta, con valores cercanos al 30%. Los ancianos, las mujeres gestantes, los recién nacidos y los individuos inmunodeprimidos se consideran de alto riesgo de contraer la enfermedad.

Una amplia variedad de especies animales puede infectarse con L. monocytogenes, pero la listeriosis clínica es esencialmente una enfermedad de ruminantes, con casos esporádicos y ocasionales en otras especies. Las manifestaciones clínicas principales de la listeriosis animal son encefalitis, septicemia y aborto, y la enfermedad es fundamentalmente de transmisión alimentaria. Los hallazgos post-mortem y la histopatología dependen de la presentación clínica.

Se han identificado varios determinantes moleculares y celulares de la virulencia de este 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 organismo para producir enfermedad. Por tanto, todas las cepas de L. monocytogenes se consideran patógenas potenciales.

Identificación del agente: *se dispone de una variedad de métodos convencionales y rápidos para la detección e identificación de L. monocytogenes en muestras de alimentos y en muestras clínicas procedentes de animales con listeriosis. Los métodos convencionales siguen siendo el "patrón de oro" con el que se comparan los restantes métodos. Habitualmente son muy sensibles. Estos métodos utilizan agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento para reducir el número de microorganismos contaminantes y permitir la multiplicación de L. monocytogenes.*

Aunque no se necesite con fines reglamentarios, se dispone de diferentes niveles de tipificación de las cepas de L. monocytogenes, entre los que se incluyen el serotipado, el fagotipado, la electroforesis de enzimas multilocus, los patrones de digestión del ADN mediante enzimas de restricción (mediante electroforesis convencional o electroforesis en gel de campo pulsado [PFGE]), la tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).

Pruebas serológicas: *las pruebas serológicas no se han utilizado tradicionalmente para el diagnóstico de la listeriosis. Se han probado varios formatos y todos han demostrado ser poco fiables, carentes de sensibilidad y de especificidad. Los ensayos serológicos experimentales basados en la detección de anti-listeriolisina O se han empleado en algunas investigaciones epidemiológicas y como apoyo al diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central con resultado de cultivo negativo.*

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: *se ha comprobado que es muy difícil desarrollar vacunas efectivas contra L. monocytogenes que, al ser un organismo intracelular, necesita la participación de los linfocitos T efectoros para desencadenar una respuesta inmune efectiva. Se han estudiado vacunas experimentales utilizando animales de laboratorio con el fin de conferir protección frente a la infección por L. monocytogenes mediante una serie de diferentes*

aproximaciones, incluyendo 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 y IL-12.

A. INTRODUCCIÓN

Aunque *Listeria monocytogenes* se ha considerado durante muchos años un patógeno de animales, su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos sólo se hace evidente a partir de 1980, cuando comienzan a aparecer en la literatura informes documentados de brotes de listeriosis, detectados por consumo de alimentos contaminados (45). Hoy en día, *L. monocytogenes* se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria. Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos como un asunto del máximo interés de Salud Pública comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad (ancianos, gestantes, recién nacidos, inmunodeprimidos) (42, 49).

Una amplia variedad de especies animales puede infectarse por *L. monocytogenes*, entre las que se encuentran mamíferos, aves, peces y crustáceos, aunque la mayoría de casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes; los cerdos raras veces desarrollan la enfermedad y, generalmente, las aves son portadoras subclínicas del microorganismo. La mayor parte de las infecciones en animales son subclínicas, pero la listeriosis puede producirse esporádicamente o de forma epidémica. Además del impacto económico de la listeriosis en animales, existe una conexión entre los animales y su papel como fuente de infección para el hombre, bien sea como resultado del contacto directo con animales infectados, especialmente durante el parto de vacas u ovejas, o bien después del consumo de productos de origen animal contaminados (54). Sin embargo, la importancia relativa de la transmisión zoonótica de la enfermedad al hombre no está clara y aparentemente es más relevante para la Salud Pública la contaminación a partir del ambiente en el que se procesan los alimentos (41).

La manifestación primaria de la listeriosis en el hombre puede incluir la presencia de septicemia, meningitis (o meningoencefalitis) y encefalitis, habitualmente precedida de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. También se presentan manifestaciones gastrointestinales acompañadas de fiebre. A pesar de que la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la mortalidad puede alcanzar valores de alrededor del 30%. En embarazadas, la infección puede dar lugar a abortos, nacidos muertos o nacimientos prematuros (42, 47).

En los animales, las manifestaciones clínicas de la listeriosis incluyen encefalitis, septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas. La forma septicémica es relativamente poco común y por lo general, pero no de manera invariable, se produce en el recién nacido. Se caracteriza por depresión, inapetencia, fiebre y muerte. La forma encefalítica se denomina a veces “enfermedad en círculo” debido a la tendencia a dar vueltas en una dirección, y es la manifestación más común de la enfermedad en los rumiantes. Los síntomas comprenden depresión, anorexia, caída de la cabeza o torcimiento de la cabeza hacia un lado, parálisis facial unilateral y queratoconjuntivitis bilateral. El aborto se produce, por lo general, en la última etapa (después de 7 meses en vacas y 12 semanas en ovejas) (26, 53). Normalmente sólo tiene lugar una forma clínica de listeriosis en un grupo particular de animales. También se ha descrito la oftalmítis ovina (52). Asimismo, se asocia la mastitis de rumiantes con la infección por *L. monocytogenes*. Cuando se produce listeriosis en cerdos, la manifestación primaria es septicemia, son menos frecuentes los casos de encefalitis y raros los abortos. Aunque las aves son portadoras subclínicas habituales, se han descrito casos esporádicos de listeriosis, siendo más frecuente la septicemia y mucho menos común la aparición de meningoencefalitis. La listeriosis aviar puede ser el resultado de una infección secundaria en condiciones de enfermedad vírica y salmonelosis (54).

Los hallazgos *post mortem* y la histopatología, en la listeriosis animal, dependen de la presentación clínica. En la forma encefalítica, el fluido cerebroespinal puede estar turbio y los vasos meníngeos congestionados. Son raras las lesiones patológicas globales del cerebro. En ocasiones, la médula muestra áreas de reblandecimiento. Sin embargo, la enfermedad muestra una histopatología característica que consiste en focos de células inflamatorias con manguito perivasculares adyacentes, predominando linfocitos e histiocitos, células plasmáticas y ocasionalmente neutrófilos. Los microabscesos en el tronco cerebral son frecuentemente unilaterales y pueden mostrar licuefacción del neuropilo. La mayoría de las veces están implicadas la médula y la protuberancia. 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 globales, pero puede producirse autólisis si el feto estuvo retenido antes de su expulsión (38, 53).

Las evidencias indican que la listeriosis animal es sobre todo una enfermedad de transmisión alimentaria, siendo el medio ambiente la fuente principal de contaminación de los alimentos. El ensilado es la fuente más frecuente de listeriosis transmitida por alimentos (22, 55). La mucosa intestinal es la vía de entrada principal, después de la ingestión oral, en el caso de una listeriosis septicémica/abortiva. El periodo de incubación puede ser tan corto

como de 1 día. Aunque la patogénesis de la listeriosis encefalítica está en controversia, parece que los microorganismos pueden entrar en las terminaciones nerviosas a través de abrasiones de la mucosa bucal, los labios, los orificios de la nariz, la conjuntiva o los dientes y, a continuación, migran centrípetamente hasta causar una infección del sistema nervioso central. Una ruta alternativa de infección para esta forma de listeriosis puede ser hematógena. El periodo de incubación de la forma encefalítica es normalmente de 2–3 semanas y el curso de la enfermedad es corto; 1–4 días (41).

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram-positivo responsable de la mayor parte de las infecciones por *Listeria* que afectan al hombre, aunque se han publicado algunos casos raros de infección debidos a *L. ivanovii* y *L. seeligeri*. En animales, *L. monocytogenes* es responsable de la mayoría de las infecciones, pero en ovejas el 10–15% de los casos de septicemia listérica se deben a *L. ivanovii*.

Aunque *L. monocytogenes* posee un potencial zoonótico evidente, también es un importante contaminante medioambiental, de relevancia a nivel de salud pública.

Se dispone de una tipificación de cepas de *L. monocytogenes* establecida mediante una variedad de métodos y con fines de investigación epidemiológica, pero aún no ha sido resuelta la cuestión de si todas las cepas de *L. monocytogenes* son o no capaces de causar enfermedad (23, 33, 35, 36).

Se han identificado diversos determinantes moleculares de virulencia que juegan un papel en la infección celular por *L. monocytogenes* y el hecho de que todavía no sea conocido 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 comprenden, entre otros, las internalinas, la listeriolisina O (LLO), la proteína Act A, dos fosfolipasas, una metaloproteasa y una hidrolasa de sales biliares (16, 19). A pesar de que existe polimorfismo entre diferentes cepas de *L. monocytogenes* respecto a algunos de estos determinantes de virulencia, este hecho no puede correlacionarse con la capacidad o la incapacidad del organismo para producir enfermedad (33).

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* en muestras de alimentos y en muestras procedentes de listeriosis animal. Los métodos bacteriológicos convencionales son importantes por varias razones: su empleo permite obtener el microorganismo en cultivo puro, lo que será útil con propósitos reglamentarios. Siguen siendo el “patrón de oro” frente a los cuales se comparan y validan otros métodos. Normalmente estos métodos son muy sensibles y no requieren equipamiento sofisticado o caro. Algunas desventajas de este grupo de métodos incluyen el periodo de tiempo relativamente largo que se necesita para finalizar los protocolos, la experiencia práctica que se precisa en varias manipulaciones, la necesidad de productos químicos, reactivos y medios muy diferentes, la posibilidad de que algunos microorganismos contaminantes enmascaren la presencia de las bacterias diana, incluyendo una posible falta de detección de variantes atípicas del organismo diana y la subjetividad relativa que supone la interpretación del crecimiento bacteriano en placas de agar con un medio selectivo y diferencial (1).

El aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* a partir de alimentos, muestras medioambientales y muestras clínicas procedentes de animales, 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 los primeros tiempos de la bacteriología clínica listeriana, se utilizaba regularmente el enriquecimiento en frío (24), explotando la capacidad del microorganismo de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, mientras que las bacterias contaminantes no se desarrollarían bajo 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, tanto 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 la cicloheximida, colistina, cefotetan, fosfomicina, cloruro de litio, ácido nalidíxico, acriflavina, feniletanol, ceftazidima, polimixina B y moxalactam (2, 3, 7, 27, 31, 51).

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 de enriquecimiento y, en paralelo, el empleo de la técnica de “enriquecimiento en frío”, con subcultivos semanales durante 12 semanas (24, 40, 53). 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.

A pesar de los avances conseguidos en el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos, todavía existe la posibilidad de mejorar en diversas áreas. Ningún procedimiento se puede considerar lo suficientemente sensible para detectar *L. monocytogenes* a partir de todos los tipos de alimentos (17). Además, pueden encontrarse células de *L. monocytogenes* en estado subletal en alimentos procesados debido a la refrigeración, calentamiento, acidificación y otros tipos de tratamientos físicos o químicos. Estas bacterias en estado subletal necesitan condiciones especiales de cultivo para reparar el daño, antes de poderse detectar en el cultivo.

a) Métodos de cultivo

Los métodos convencionales para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos que han ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales son el método de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (27), el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC) (7), los Estándares ISO 11290 (31, 32), el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses (2, 3).

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, un método particular puede ser más adecuado que otro. El Comité Técnico de la Organización Internacional para la Estandarización ISO/TC 34, Subcomité SC 9, Microbiología, de Productos Agroalimentarios, afirma que el Estándar ISO 11290, partes 1 y 2 (31, 32) puede utilizarse para la detección de *L. monocytogenes* en una gran variedad de alimentos y productos alimenticios. Aunque reconocen que este estándar puede no ser el más apropiado en ciertos casos, recomiendan que se lleve a cabo el máximo esfuerzo para aplicar este método, en lo posible.

Los métodos de la FDA y de la AOAC pueden utilizarse para el análisis de la leche y los productos lácteos. El método del USDA-FSIS se recomienda para la carne roja y carne de ave (cruda o lista para comer), huevos y derivados y muestras medioambientales.

El procedimiento 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 (24, 40, 53). 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, pero el aislamiento es difícil, sin embargo, cuando el microorganismo está presente en número reducido, como sucede en el caso de la forma encefálica o si las muestras están fuertemente contaminadas con otros microorganismos. La comparación de la eficacia de la siembra directa en placa, el enriquecimiento en frío y el método de la AOAC, ha establecido claramente la superioridad de este último sobre los otros dos, para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de una amplia variedad de material procedente de la necropsia animal, tanto en términos de tiempo requerido para el aislamiento e identificación del microorganismo como en tasas de aislamiento (20).

Para la enumeración de *L. monocytogenes* se aplica el Estándar ISO 11290, parte 2 (32) tanto como los protocolos opcionales mencionados en los métodos de la FDA y del USDA-FSIS (27, 51).

i) Aislamiento

Las muestras utilizadas en el análisis deben ser representativas del alimento, incluyendo la superficie externa e interna. En el caso de la listeriosis animal, las muestras deberían 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; fluido espinal, protuberancia y médula, en el caso de la forma encefálica; y placenta (cotiledones), contenido abomasal fetal y/o secreciones uterinas, en el caso de aborto. Se deben emplear temperaturas de refrigeración (4°C) para la manipulación, conservación y transporte de muestras. Si la muestra ya está congelada, se debería mantener congelada hasta su análisis.

Todos los medios de cultivo preparados tienen que someterse a un control de calidad y ser capaces de mantener el crecimiento del microorganismo objeto de la prueba a partir de un inóculo pequeño. La cepa de referencia debería cultivarse en paralelo a las muestras sospechosas para asegurar que las pruebas se están realizando correctamente.

Estos métodos de cultivo convencional conllevan un procedimiento de enriquecimiento basado en la utilización de medios de cultivo líquidos que contengan agentes selectivos. La naturaleza de los medios y los agentes selectivos varían con el método. Los métodos de la FDA (27) e ISO incluyen una etapa de pre-enriquecimiento para tratar de recuperar las células de *L. monocytogenes* en estado subletal, mientras que en los métodos del USDA-FSIS (51) y de la AOAC (7) las muestras se procesan directamente en caldo de enriquecimiento. En el caso del método de la FDA, el pre-enriquecimiento se lleva a cabo a 30°C durante 4 horas en caldo tripticasa-soja con extracto de levadura (TSB YE) sin agentes selectivos. El protocolo ISO

emplea un “enriquecimiento primario” durante 24 horas a 30°C en presencia de agentes selectivos, pero a la mitad de concentración (“caldo Fraser a la mitad”). Cuando se trabaja con muestras clínicas, procedentes de listeriosis animal, la cantidad de tejido animal disponible para el análisis podría no ser suficiente para utilizar la misma cantidad de inóculo que se recomienda para el enriquecimiento de las muestras de alimento (25 g o ml). Si este es el caso, se emplea tanto material de muestra como sea posible (inténtese 10–25 g ó ml) (20).

Las muestras se enriquecen durante 24–72 horas a 30°C, 35°C ó 37°C, dependiendo del método. El método de la FDA emplea TSB YE con acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida. El método del USDA-FSIS utiliza dos etapas de enriquecimiento: el enriquecimiento “primario” se realiza en medio de la Universidad de Vermont (UVM) y contiene ácido nalidíxico y acriflavina; el enriquecimiento “secundario” se lleva a cabo en caldo Fraser con ácido nalidíxico, cloruro de litio y acriflavina. El estándar ISO indica el caldo Fraser para el enriquecimiento “secundario” con agentes selectivos a la concentración normal, mientras que el enriquecimiento “primario” se lleva a cabo en “caldo Fraser a la mitad”, como se indica anteriormente. El método EOAC considera el enriquecimiento selectivo en caldo triptona de soja que contenga acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida (“medio de enriquecimiento selectivo”).

Después de el enriquecimiento selectivo, los cultivos se siembran en placas de agar con un medio selectivo/diferencial para el aislamiento de las colonias presuntivas de *L. monocytogenes*. Todos los métodos utilizan el agar de Oxford, a excepción del método del USDA-FSIS, que emplea una fórmula modificada del agar de Oxford (MOX). El agar de Oxford contiene cloruro de litio, cicloheximida, colistina, acriflavina, cefotetan y fosfomicina como agentes selectivos, y las colonias de *Listeria* spp. son pequeñas, negras y rodeadas de un halo negro. Además del agar de Oxford, el método de la FDA incluye cloruro de litio/feniletanol/moxalactam (LPM) o agar PALCAM y el estándar ISO incluye este último, que contiene cloruro de litio, polimixina B, acriflavina y ceftazidima. El agar MOX, empleado en el método del USDA-FSIS, contiene cloruro de litio, colistina y moxalactam.

ii) *Identificación*

Las colonias típicas de *Listeria* spp., una vez crecidas en el medio selectivo/diferencial, se seleccionan para su identificación a nivel de especie, utilizando una batería de pruebas. Estas pruebas comprenden la reacción a la tinción de Gram, la catalasa, los ensayos de movilidad (en una muestra en fresco observada por microscopía de contraste de fases y después de su inoculación en un medio de prueba de movilidad), de hemólisis y de utilización de carbohidratos. Algunos protocolos emplean pruebas convencionales y no convencionales disponibles comercialmente, p. ej., el Vitek, el API, el MICRO-ID, los kits de enzimoimmunoensayo (ELISA) y los kits de ensayo de ácidos nucleicos que ayudan en la identificación de *L. monocytogenes*.

La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de *Listeria* spp a partir de los aislamientos. Se emplea en los protocolos ISO y de la AOAC y se considera opcional en los métodos de la FDA y del USDA-FSIS. La 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) formando unas únicas líneas rectas y paralelas, en una placa de agar sangre de oveja o en una placa por la técnica de la 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 de *Listeria* de prueba y de control se puedan sembrar perpendicularmente, entre los dos organismos 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 doble capa de agar), se considera una reacción positiva la aparición de una zona destacada de β-hemólisis en la intersección de las cepas de prueba/control con las cepas indicadoras.

Cuadro 1. Diferenciación de especies de *Listeria*

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	–	+	–
<i>L. innocua</i>	–	V	–	–	–
<i>L. ivanovii</i>	+	–	+	–	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	–	+	(+)	–
<i>L. welshimeri</i>	–	V	+	–	–
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Grayi</i>	–	–	–	–	–
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Murrayi</i>	–	V	–	–	–

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

La serología, la tipificación lisogénica y el ensayo de patogenicidad en ratones inmunodeprimidos se consideran opcionales en algunos de estos métodos.

b) Métodos de identificación rápida

i) *MICRO-ID* *Listeria*

El *MICRO-ID Listeria* es un sistema disponible comercialmente (Organon Teknika Corp., 100 Akzo Ave., Durham, NC 27712, EE.UU.) que ha sido validado por la AOAC (método 992.18) (4) para la identificación presuntiva de las especies de *Listeria* aisladas a partir de muestras medioambientales y de alimentos. Supone una alternativa a las pruebas bioquímicas convencionales de los aislados de *Listeria* spp. mediante los métodos de la FDA y del USDA-FSIS. Se basa en el principio de que el inóculo de la prueba contiene enzimas preformadas que pueden detectarse después de 24 horas de incubación a 37°C. La diferenciación de las especies de *Listeria* se basa en un derivado del código octal después de introducir los valores numéricos de cada grupo de tres pruebas y en las reacciones obtenidas a partir de la prueba CAMP y las características de hemólisis, que se ensayan por separado.

ii) *Sistema de identificación microbiana automatizada* Vitek (*Vitek Automicrobic System*)

El *Vitek Automicrobic System* (bioMérieux Vitek, Inc., 595 Anglum Dr., Hazelwood, MO, EE.UU.) es un sistema automatizado de identificación microbiana que puede emplearse para la identificación presuntiva de las especies de *Listeria* de transmisión alimentaria y para la detección de aislados diferentes a *Listeria*. La AOAC lo ha validado como método 992.19 (5). El sistema utiliza una cámara incubadora con un lector óptico, una unidad de llenado/sellado para la inoculación del kit de la prueba y un ordenador. Cada tarjeta de identificación de las bacterias Gram-positivas (GPI) y de las Gram-negativas (GNI+) contiene 30 pruebas bioquímicas. Los cambios se analizan mediante el ordenador, que asigna al microorganismo problema un género y/o una especie. La identificación de las especies de *Listeria* requiere la utilización de una tarjeta GPI y dos reacciones con la tarjeta GNI+. Sin embargo, para la identificación de algunas listerias el análisis debe llevarse a cabo mediante la prueba CAMP, el ensayo de hemólisis y/o la prueba de reducción de nitratos, como se describe en el método de la FDA.

Los microorganismos situados en la categoría "LM" se identifican como *L. monocytogenes* o *L. innocua*; en la categoría "LI", como *L. ivanovii* o *L. seeligeri*; en la categoría "LW", como *L. welshimeri*; y en la categoría "LG", como *L. grayi* o *L. murrayi* (una subespecie de *L. grayi*). Los microorganismos de la categoría O se clasifican como especies no-*Listeria*. Se deben realizar pruebas posteriores para identificar las especies dentro de cada categoría de acuerdo con el método de la FDA.

Otros métodos disponibles comercialmente para la identificación de especies de *Listeria* incluyen el API LISTERIA (bioMérieux), el MICROBACT 12L (Microgen), el Sistema *MicroLog* (Biolog.), el Sistema de Identificación Microbiana *Sherlock* (MIS) (*Microbial ID*; basado en patrones de ácidos grasos) y el Sistema *Walk/Away* (*MicroScan*).

iii) *Métodos inmunológicos de detección rápida*

Se han desarrollado varios métodos inmunológicos para identificar *L. monocytogenes* en alimentos y los siguientes métodos disponibles comercialmente están validados por uno o más sistemas oficiales de validación (18, 46).

- **Enzimoimmunoensayo colorimétrico monoclonal (*Listeria*-Tek)**

El *Listeria*-Tek es el método oficial 994.03 de la AOAC (8) y se ha diseñado para la detección de *Listeria* spp. en productos lácteos, carnes y mariscos. Como en la prueba se utilizan anticuerpos monoclonales (MAbs) pueden producirse reacciones cruzadas con otras *Listeria* spp., por tanto, la prueba no es confirmatoria para *L. monocytogenes*.

El kit comercial se puede adquirir a partir de Organon Teknika Corp., 100 Akzo Ave, Durham, NC 27704, EE.UU.

Los cultivos de enriquecimiento que den positivo siguiendo este método se siembran por estría en medios selectivos y las colonias sospechosas se identificarán mediante pruebas bioquímicas como *L. monocytogenes* según el método de la FDA. Sólo será válido un resultado positivo, si los controles negativo y positivo dan unas lecturas de absorbancia aceptables.

- **Método colorimétrico de detección mediante un enzimoimmunoensayo policlonal (TECRA® *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA])**

El TLVIA es el método oficial 995.22 de la AOAC (9) y se ha diseñado para la detección de *Listeria* spp. en productos lácteos, mariscos, carne de ave y carnes (excepto carne cruda picada) y verduras de hoja.

El kit comercial está disponible a partir de TECRA International Pty Ltd, P.O. Box 788, Willoughby, NSW, Australia.

Los cultivos de enriquecimiento que den positivo deben inocularse en medios selectivos y las colonias sospechosas se identificarán de acuerdo a los criterios especificados en los métodos de la FDA y del USDA.

- **Método Assurance® de enzimoimmunoensayo policlonal**

El enzimoimmunoensayo Assurance® *Listeria* es el método oficial 996.14 de la AOAC (10) y puede utilizarse para la detección de *Listeria* spp., incluyendo *L. monocytogenes*, en productos lácteos, carnes rojas, cerdo, productos avícolas, frutas, frutos secos, mariscos, pastas, verduras, quesos, piensos, chocolate y huevos.

Las lecturas por encima del valor de corte se consideran presuntos positivos y a continuación los cultivos enriquecidos se confirman mediante los procedimientos de cultivo e identificación que se describen en el método de la FDA.

El kit comercial se puede adquirir a partir de BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd St., Bellevue, WA 98005, EE.UU.

- **Ensayo visual de inmunoprecipitación (VIP™)**

El ensayo VIP™ es el método oficial 997.03 de la AOAC (11). Puede utilizarse para la detección de *L. monocytogenes* y otras *Listeria* spp. en productos lácteos, carnes rojas, cerdo, aves y productos derivados, mariscos, frutas, verduras, frutos secos, pastas, chocolate, huevos y harina de huesos.

La prueba se lleva a cabo con un cultivo enriquecido de las muestras problema. Las pruebas con resultado presunto positivo deben confirmarse mediante los procedimientos de cultivo e identificación que se describen en el método de la FDA.

Las unidades VIP las comercializa BioControl Systems, Inc., 12822 SE 32nd St., Bellevue, WA 98005, USA.

- **Método de detección mediante ensayo VIDAS LIS**

Este enzimoimmunoensayo fluorescente (ELFA) es el método oficial 999.06 de la AOAC (12). También ha sido validado por la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) y por el Plan de Evaluación de los Métodos Microbiológicos Europeos (EMMAS) (13). Se emplea para la detección de productos lácteos, verduras, marisco, carnes crudas y de ave, así como para la detección de antígenos de *Listeria* spp. en carnes procesadas y de ave.

Este inmunoensayo se realiza con un instrumento automatizado VIDAS®. El ordenador compara el valor obtenido con un patrón y se genera un informe positivo o negativo. Los resultados positivos deben confirmarse mediante métodos de cultivo estándar como se describe en el método de la FDA.

El sistema VIDAS lo comercializa bioMérieux, Inc., 595 Anglum Rd., Hazelwood, MO 63042, EE.UU.

Otros métodos inmunológicos disponibles comercialmente han conseguido la validación mediante sistemas oficiales entre los que se encuentra el VIDAS *Listeria monocytogenes* (LMO) ELISA (bioMérieux), validado por la AFNOR; el Transia Plate *Listeria* ELISA (Transia, Diffchamb Ltd), validado por la AFNOR; el EIAFOSS *Listeria* automatized ELISA (Foss Electric), validado por el Instituto de Investigación de la AOAC; el método inmunocromatográfico REVEAL para *Listeria* (Neogen Corporation), validado por el Instituto de Investigación de la AOAC; el método inmunocromatográfico Clearview *Listeria* Rapid Test (Oxoid), validado por la AFNOR, el EMMAS y el Instituto de Investigación de la AOAC, y la prueba Listertest (Vicam) basada en la separación inmunomagnética validada por el Instituto de Investigación de la AOAC (13).

Otros métodos inmunológicos disponibles comercialmente son el Transia Plate *Listeria monocytogenes* ELISA (Transia, Diffchamb Ltd), la prueba con Dynabeads anti-*Listeria* (DynaL Ltd) basada en la separación inmunomagnética, el *Listeria* UniQue™ ELISA (TECRA), la prueba Microscreen *Listeria* de aglutinación en latex (Microgen BioProducts Ltd), y el ensayo *Listeria* Rapid Test EIA (Oxoid).

iv) *Métodos de reconocimiento de los ácidos nucleicos*

Se han desarrollado varios métodos basados en el reconocimiento de los ácidos nucleicos para identificar *L. monocytogenes* en alimentos. Algunos se han validado mediante uno o más sistemas oficiales de validación y están disponibles comercialmente (39).

- **Ensayo GENE-TRAK para *Listeria***

El ensayo GENE-TRAK para *Listeria* es un método colorimétrico de hibridación del ADN para la detección de las secuencias de *Listeria*, que ha sido validado por la AOAC como método 993.09 (6) para ser utilizado con productos lácteos, carnes y mariscos. La AFNOR también ha validado este ensayo. Debido a que existe la posibilidad de reacciones falso-positivas, las muestras positivas deben confirmarse mediante métodos de cultivo estándar.

Las partes de la prueba que den resultado positivo en el ensayo de hibridación del ADN deben confirmarse mediante la siembra por estría en placa de una suspensión microbiana en tampón fosfato salino empleando un medio selectivo para *Listeria*, seguido de la identificación bioquímica de los aislados presuntos *Listeria*, como se describe en el método de la FDA.

El ensayo GENE-TRAK para *Listeria* se puede adquirir a partir de GENE-TRAK™ Systems, 94 South Street, Hopkinton, MA 01748, EE.UU.

- **Sistema BAX®**

El USDA-FSIS ha adoptado el sistema BAX® basado en la PCR (Qualicon) (50) como su nuevo método de detección de *L. monocytogenes* en muestras enriquecidas de carne roja y de ave. Este método consigue reducir el tiempo del resultado de las muestras negativas verdaderas en 24 horas y reduce los resultados falsos-positivos, con un límite de detección superior a 1 ufc/g en 25 g de muestra. A continuación todas las muestras que se identifiquen como presunto-positivas para *L. monocytogenes* se deben confirmar mediante cultivo según el método convencional.

- **Prueba GENE-TRAK para *Listeria monocytogenes***

La prueba GENE-TRAK para *L. monocytogenes* (GENE-TRAK™ Systems) es un método basado en la hibridación con una sonda que ha sido validado por la AFNOR (13).

- **Prueba confirmatoria Gen-Probe (AccuProbe®) para *Listeria monocytogenes***

La prueba Gen-Probe (AccuProbe®) *Listeria monocytogenes Confirmatory Test* (Gen-Probe) es otro método basado en la hibridación con una sonda que ha sido validado por la AFNOR (13).

- **Método AD713**

La FDA utiliza el método AD713 (25) para detectar *L. monocytogenes* que consiste en una combinación de sondas: para el gen de la proteína asociada a la invasión y para el de la hemolisina (hly). Este método combina la detección del gen de la hemolisina (también llamada listeriolisina O) de *L. monocytogenes* utilizando el oligonucleótido sonda AD13 y la detección del gen de la proteína asociada a la invasión mediante una sonda sintética, la AD07. Ambas sondas se utilizan en combinación (se denomina AD713) para evitar los resultados falsos-negativos debidos a las mutaciones "silenciosas" en el gen (cambios de nucleótidos que afectan a la capacidad de unión de la sonda al ADN pero no modifican la función del gen). Las muestras positivas deben confirmarse mediante procedimientos convencionales como se describe en el método de la FDA.

Otros métodos disponibles comercialmente y que están basados en el reconocimiento de los ácidos nucleicos son el ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Foodproof® *Listeria monocytogenes* (Bioteccon Diagnostics) y el ensayo de la PCR PROBELIA™ (*L. monocytogenes*) (Sanofi Diagnostics). Se ha desarrollado la aplicación de la PCR en tiempo real como método de detección cuantitativo y específico para *L. monocytogenes* (28) demostrando tener un buen potencial para ser utilizado en análisis de rutina. El Cuadro 2 recoge algunos de los sistemas comerciales rápidos para la detección y la confirmación de *Listeria*.

Cuadro 2. Algunos sistemas comerciales rápidos para la detección y la confirmación de *Listeria*¹

Prueba	Nivel ID	Principio	Tiempo aproximado de la prueba ²	Compañía	Utilización principal
MICRO-ID <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes/innocua</i> complejo	Reacción enzimática	24 horas	Organon Teknika	Confirmación
Vitek System	<i>L. monocytogenes/innocua</i> complejo	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
API <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
MicroLog System	<i>L. monocytogenes</i>	Uso de sustratos como fuente de carbono	4 o 24 horas	Biolog	Confirmación
MICROBACT 12L	<i>L. monocytogenes</i>	Utilización de carbohidratos y prueba de microhemólisis	4–6 o 24 horas	Microgen	Confirmación
Sherlock Microbial Identification System (MIS)	<i>L. monocytogenes/innocua</i> complejo	Patrones de ácidos grasos	90 minutos	Microbial ID	Confirmación
Gen-Probe (AccuProbe)	<i>L. monocytogenes</i>	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas	30 minutos	Gen Probe	Confirmación
Microscreen	<i>Listeria</i> spp.	Agglutinación con latex	1 minuto	Microgen BioProducts	Confirmación
<i>Listeria</i> Tek	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Organon Teknika	Detección
TECRA <i>Listeria</i> Visual Immunoassay (TLVIA)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	TECRA	Detección
Assurance <i>Listeria</i> EIA	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	BioControl Systems	Detección
VIP <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	2 minutos (después del enriquecimiento)	BioControl Systems	Detección
VIDAS <i>Listeria</i> (LIS)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> (LMO)	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
Foodproof <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Biotecon Diagnostics	Detección
Transia Plate <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
Transia Plate <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
Dynabeads anti- <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Separación inmunomagnética	48–72 horas	Dynal	Detección
EIAFOSS <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA automatizado	48 horas	Foss Electric	Detección

1: Adaptado y extendido a partir de la ref. 13

2: Cuando se emplea para confirmación, la duración indicada de la prueba incluye el tiempo de enriquecimiento y aislamiento en placas de agar

Cuadro 2 cont. Algunos sistemas comerciales rápidos para la detección y la confirmación de *Listeria*¹

Prueba	Nivel ID	Principio	Tiempo aproximado de la prueba ²	Compañía	Utilización principal
Gene Trak <i>Listeria</i> Assay	<i>Listeria</i> spp.	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas	50 horas	Gene Trak	Detección
Gene Trak test for <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Hibridación de ácidos nucleicos con sondas	50 horas	Gene Trak	Detección
REVEAL for <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	43 horas	Neogen	Detección
Clearview <i>Listeria</i> (Oxoid <i>Listeria</i> Rapid Test)	<i>Listeria</i> spp.	Immuno-cromatografía	43 horas	Oxoid	Detección
BAX for screening <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Qualicon	Detección
BAX for screening <i>Listeria</i> Genus	<i>Listeria</i> spp.	PCR	48 horas	Qualicon	Detección
PROBELIA	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Sanofi Diagnostics Pasteur	Detección
<i>Listeria</i> UniQue	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	32 horas	TECRA	Detección
Listertest	<i>Listeria</i> spp.	Separación inmunomagnética	24–48 horas	Vicam	Detección
SwabCheck System	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	24 horas	Biopath	Detección

1: Adaptado y extendido a partir de la ref. 13

2: Cuando se emplea para confirmación, la duración indicada de la prueba incluye el tiempo de enriquecimiento y aislamiento en placas de agar.

v) Tipificación

La identificación reglamentaria de *L. monocytogenes* no exige ninguna tipificación específica de los aislados. Sin embargo, los esquemas de tipificación pueden ser de utilidad en las investigaciones epidemiológicas, en el seguimiento de los casos medioambientales y en la vigilancia de los casos de salud pública.

Listeria monocytogenes puede tipificarse mediante diferentes aproximaciones incluyendo el serotipado, el fagotipado, la electroforesis de enzimas multilocus (MEE), 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 pulsado [PFGE] para separar los fragmentos), tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).

Se recomienda que la tipificación de los aislados 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. Se puede encontrar una lista de centros internacionales y métodos de tipificación en la ref. 14 (pp. 258–259).

• Serotipado

Las cepas de *Listeria* pueden asignarse a 13 serotipos diferentes, basándose en su combinación de antígenos somático (O) y flagelar (H). Aunque todas ellas se consideran patógenos potenciales, la mayoría (>95%) de los aislados clínicos humanos, pertenecen a tres serotipos: 1/2a, 1/2b, y 4b. Comparado con otros métodos de tipificación, el serotipado presenta un poder de discriminación bajo, pero puede proporcionar una información valiosa para facilitar el descarte de aislados que no forman parte del brote. Frecuentemente, los aislados procedentes de alimentos o de fuentes medioambientales no son tipificables con los antisueros de tipificación estándar.

- **Fagotipado**

La tipificación por bacteriófagos es una técnica con un buen poder de discriminación y que puede utilizarse para tipificar un gran número de aislados. Sin embargo, las colecciones de fagos disponibles en la actualidad no pueden tipificar una proporción alta de cepas (20–51% en el caso de la colección internacional de tipificación de fagos). Debido a los requisitos rigurosos de estandarización y a la naturaleza biológica de los reactivos, esta técnica se practica sólo en laboratorios especializados de referencia nacionales e internacionales y está sujeta a una considerable variabilidad experimental y biológica. A pesar de estos problemas, la tipificación con fagos sigue siendo el método más práctico y adecuado de aplicación en casos de brotes agudos y extensos (23).

- **Electroforesis de enzimas multilocus**

Esta técnica se basa en las diferencias en la secuencia de nucleótidos que provocan distintas movilidades electroforéticas de ciertos enzimas metabólicos seleccionados en geles de almidón y puede emplearse en la tipificación de cepas bacterianas relacionadas. Sin embargo, la MEE sólo es moderadamente discriminatoria cuando se utiliza en investigaciones epidemiológicas que involucran a *L. monocytogenes*. Algunas cepas pueden carecer de ciertas actividades enzimáticas y, por tanto, la técnica puede resultar complicada. Debido precisamente a su naturaleza, los resultados procedentes de diferentes laboratorios son muy variables (23).

- **Análisis del ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción**

El análisis del ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción (REA) es un método útil de tipificación 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 dactilares” específicas para cada una de las distintas cepas 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 multicentro de la Organización Mundial de la Salud (WHO), las más utilizadas fueron *HaeIII*, *HhaI* y *CfoI* (23). Sin embargo, debido al número elevado de sitios potenciales de reconocimiento enzimático en el genoma bacteriano, a veces las huellas dactilares complejas se desarrollan 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 (23).

Cuando se combina el REA con un análisis de hibridación de tipo *Southern*, que emplee sondas cromosómicas marcadas, sólo se detectarán los fragmentos de restricción específicos asociados con los *loci* cromosómicos correspondientes, por lo que se analizará un número significativamente reducido 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 RNA ribosómicos, se detectan únicamente los fragmentos de restricción concretos asociados con los *loci* cromosómicos de los ARNr. Esta técnica se denomina ribotipado y se utiliza ampliamente en la tipificación de *L. monocytogenes*, principalmente con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Sin embargo, esta técnica tiene un poder de discriminación menor que el fagotipado, el REA o la MEE. La compañía Qualicon ha diseñado un sistema de ribotipado automático, el RiboPrinter, que genera, analiza y almacena los patrones de huellas de ribotipado de diversas bacterias, incluida *Listeria*.

Si se emplean endonucleasas de restricción con baja frecuencia de corte para digerir ADN cromosómico íntegro, tales como los enzimas *Apal*, *SmaI*, *NotI* o *AscI*, 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 diferencias de tamaño. Esta técnica se conoce como electroforesis en gel de campo pulsado (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 los aislados del serotipo 4b, los cuales no se tipifican de forma satisfactoria mediante la mayor parte de los métodos de tipificación disponibles. Las principales desventajas de la PFGE son el tiempo de 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 (23). El Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de los EE.UU. ha establecido la PulseNet, una red informática de laboratorios reguladores de alimentos y de salud pública que tipifica de manera rutinaria mediante PFGE las bacterias patógenas de transmisión alimentaria. Los laboratorios de la PulseNet emplean protocolos estandarizados rigurosos que pueden comparar rápidamente los patrones obtenidos por PFGE procedentes de lugares diferentes, vía Internet. *Listeria monocytogenes* se incorporó a la red PulseNet en 1999 (49).

- **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 se presenta como una metodología de tipificación muy prometedora para este microorganismo. Este enfoque se ha descrito para un grupo reducido de otros microorganismos y se conoce como tipificación basada en la secuencia multi locus (MLST) (48). Se han utilizado con un buen grado de discriminación entre las cepas analizadas la amplificación directa y la secuenciación de nucleótidos (15, 44) así como una aproximación alternativa que apunta a los cambios genéticos variables directamente en un formato de micromatriz de ADN (43). Debido a que la MLST se basa en la secuencia de nucleótidos, es muy discriminatorio y proporciona resultados precisos.

Los elementos de secuencia corta repetitiva están ampliamente distribuidos entre las bacterias y las unidades palindrómicas, conocidas como palíndromos extragénicos repetitivos (REP), constituyen la familia mejor caracterizada de secuencias bacterianas repetitivas. Los elementos REP están presentes en *L. monocytogenes* y se ha utilizado con éxito una PCR basada en la secuencia de estos elementos (rep-PCR) para tipificar cepas de dicho microorganismo. Los cuatro principales grupos de cepas identificados por este método coincidieron con el origen de su aislamiento (34).

- **Amplificación aleatoria del ADN polimórfico**

Cuando en la PCR se emplean cebadores seleccionados de forma arbitraria bajo condiciones de baja estringencia, con ADN cromosómico de *L. monocytogenes* como molde, los perfiles de los productos de la amplificación generados son útiles para la tipificación de las cepas. La RAPD es una alternativa viable al fagotipado y presenta un grado elevado de discriminación. Sin embargo, a pesar de su simplicidad relativa y su capacidad discriminatoria, su desventaja principal es la reproducibilidad irregular de los perfiles. Las condiciones de baja estringencia para templar los cebadores provoca una polimerización con eficiencias diversas y, por tanto, las cantidades de ADN producidas pueden variar ampliamente entre los diferentes productos de la amplificación procedentes de un aislado concreto, lo que dificulta la comparación e interpretación de los perfiles de la RAPD. La técnica requiere un gran acuerdo de estandarización y regularidad para obtener resultados fiables (23).

Basándose en los resultados del estudio multicentro de tipificación de *L. monocytogenes* de la WHO (21), que compara diversos métodos de tipificación diferentes mediante la utilización de una colección bien definida de aislados, se seleccionaron para la estandarización en Fase II, el serotipado, el fagotipado, el REA, la PFGE y la RAPD. Finalmente este esfuerzo debería resultar en una colección seleccionada de métodos estandarizados de tipificación de *L. monocytogenes* (23).

2. Pruebas serológicas

Tradicionalmente las pruebas serológicas no se han utilizado para diagnosticar la listeriosis. Han sido poco fiables, carentes de sensibilidad y de especificidad. Se han intentado sin éxito varios formatos, incluyendo la técnica ELISA, la fijación del complemento y la microaglutinación, en 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 Gram-positivos. 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 una tasa algo mayor durante la estación de estabulación en comparación con la de pastoreo de los animales (29,30).

El descubrimiento reciente de que la hemolisina de *L. monocytogenes*, la listeriolisina O (LLO), es el principal factor 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 afectados en el sistema nervioso central, con líquido cerebro espinal 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 (37). Sin embargo, la LLO está relacionada antigénicamente con varias citolisinas, entre ellas la estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus pyogenes*, la pneumolisina 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 presentados por pacientes con listeriosis. La absorción de los antiseros que se van a diagnosticar con la SLO es sólo parcialmente efectiva para eliminar la reactividad cruzada completa. Estos ensayos experimentales se han utilizado en algunas investigaciones epidemiológicas y como apoyo al diagnóstico de infecciones del sistema nervioso central con resultado negativo en cultivo. Las formas recombinantes de la LLO se han probado como

alternativas a la LLO de tipo silvestre como antígeno de diagnóstico en ensayos de inmunoelectrotransferencia. Actualmente éste es un campo en evolución y todavía tendremos que esperar para conseguir el desarrollo de pruebas serológicas validadas y fiables para el diagnóstico de la listeriosis.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Se ha comprobado que es muy difícil desarrollar vacunas efectivas contra *L. monocytogenes* que, al ser un microorganismo intracelular, necesita de la participación de los linfocitos T efectores para desencadenar una respuesta inmune efectiva. Se han estudiado vacunas experimentales utilizando animales de laboratorio con el fin de conferir protección frente a la infección por *L. monocytogenes* mediante una serie de diferentes aproximaciones, pero éstas todavía se encuentran lejos de estar disponibles para ser utilizadas en el hombre o en los animales domésticos. Estos enfoques experimentales comprenden 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* se está considerando como un vector efectivo vacunal para la expresión, secreción y transporte intracelular de antígenos extraños para inducir respuestas inmunes 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 sólo reducen el riesgo de adquirir listeriosis, sino que también contribuyen a la prevención de otras infecciones comunes 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 el manejo de alimentos no cocinados y evitar leche no pasteurizada o sus productos derivados. Las personas inmunodeprimidas, mujeres gestantes y otros grupos de alto riesgo de contraer la listeriosis deberían evitar los alimentos que se han asociado epidemiológicamente a esta enfermedad, p. ej. quesos frescos y paté. Estos individuos deberían 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, significa que el control de la listeriosis en animales es 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, es inevitable la contaminación del ensilado y de los alimentos. Por tanto, se tendría que reducir la probabilidad de multiplicación del microorganismo, lo que sucede con más frecuencia a valores de pH mayores 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 y con la contaminación mínima de tierra o heces. Debería seleccionarse el mejor ensilado para la alimentación, especialmente en el caso de las ovejas, evitando obviamente el material enmohecido y que proceda de las pocas pulgadas superficiales del manojó. Se tendrían que eliminar las sobras del ensilado (38).

REFERENCIAS

1. ANDREWS W. (2002). Current State of Conventional Microbiological Methodology for the Examination of Food. En: Workshop 102–15. Microorganisms in Foods: Now What? American Society for Microbiology, Washington, DC, EE.UU.
2. AFNOR¹ (1997). Norme Française NF V 08-055. Microbiologie des aliments. Recherche de *Listeria monocytogenes*. Méthode de Routine. Paris, Francia.
3. ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) (2000). Normalisation Française XP V 08-062. Microbiologie des aliments. Méthode de dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Méthode de Routine. Paris, Francia.

1 AFNOR: Asociación Francesa de Normalización

4. AOAC² OFFICIAL METHOD 992.18. (2000). *Listeria* species. Biochemical Identification Method (MICRO-ID *Listeria*). *En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 141–144.*
5. AOAC OFFICIAL METHOD 992.19. (2000). *Listeria* species. Biochemical Identification Method (Vitek GPI and GNI+). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 144–147.*
6. AOAC OFFICIAL METHOD 993.09. (2000). *Listeria* in Dairy Products, Seafoods, and Meats. Colorimetric Deoxyribonucleic Acid Hybridization Method (GENE-TRAK *Listeria* Assay). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 147–150.*
75. AOAC OFFICIAL METHOD 993.12. (2000). *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products. Selective Enrichment and Isolation Method. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 138–141.*
8. AOAC OFFICIAL METHOD 994.03. (2000). *Listeria monocytogenes* in Dairy Products, Seafoods, and Meats. Colorimetric Monoclonal Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method (*Listeria*-Tek). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 150–152.*
9. AOAC OFFICIAL METHOD 995.22. (2000). *Listeria* in Foods. Colorimetric Polyclonal Enzyme Immunoassay Screening Method (TECRA[®] *Listeria* Visual Immunoassay [TLVIA]). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 152–155.*
10. AOAC OFFICIAL METHOD 996.14. (2000). *Listeria monocytogenes* and Related *Listeria* Species Detection in Selected Foods. Assurance[®] Polyclonal Enzyme Immunoassay Method. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 155–158.*
11. AOAC OFFICIAL METHOD 997.03. (2000). *Listeria monocytogenes* and Related *Listeria* spp. in Selected Foods. Visual Immunoprecipitate Assay (VIPTM). *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 158–160.*
12. AOAC OFFICIAL METHOD 999.06. (2000). *Listeria* in Foods. Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay (ELFA). VIDAS LIS Assay Screening Method. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. En: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, Volumen I, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, Horwitz W., ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 160–163.*
13. BAYLIS C. (2000). The Catalogue of Rapid Microbiological Methods, Fourth Edition, Review No. 1, Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Gloucestershire, UK.
14. 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.
15. CAI S., KABUKI D.Y., KUAYE A.Y., CARGIOLI T.G., CHUNG M.S., NIELSEN R. & WIEDMANN M. (2002). Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3319–3325.
16. COSSART P. & PORTNOY D.A. (2000). The cell biology of invasion and intracellular growth by *Listeria monocytogenes*. *En: Gram-Positive Pathogens, Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A. & Rood J.A., eds. ASM Press, Washington, DC, EE.UU., 507–515.*
17. DONNELLY C.W. (1999). Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. *En: Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, New York, NY, EE.UU., 225–260.*

2 AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analistas

18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. FARBER J.M., ED. (1996). Molecular typing of *Listeria*. *Int. J. Food Microbiol.*, Special Issue, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 251–355.
22. FENLON D.R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.*, **59**, 537–543.
23. GRAVES L.M., SWAMINATHAN B. & HUNTER S. (1999). Subtyping *Listeria monocytogenes*. *En: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, New York, NY, EE.UU., 279–297.
24. 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.
25. HILL W.E., DATTA A.R., FENG P., LAMPEL K.A. & PAYNE W.L. (2001). Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes: *Listeria monocytogenes*: combination of invasion-associated protein (*iap*) and hemolysin (*hly*) gene probes – AD713. *En: Bacteriological Analytical Manual Online*, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-24.html>, 24.16 – 24.17.
26. HIRD D.W. & GENIGEORGIS C. (1990). *In: Listeriosis in Food Animals: Clinical Signs and Livestock as a Potential Source of Direct (Nonfoodborne) Infection for Humans*, Miller A.J., Smith J.L. & Somkutti G.A., eds. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos, 31–39.
27. HITCHINS A.D. (1998). *Listeria monocytogenes*. *En: Bacteriological Analytical Manual*, US Food and Drug Administration, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, EE.UU., 10.01–10.11
28. HOUGH A.J., HARBISON S.A., SAVILL M.G., MELTON L.D. & FLETCHER G. (2002). Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *J. Food Prot.*, **65**, 1329–1332.
29. 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.
30. 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.
31. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (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.
32. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (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, Suiza.
33. JACQUET C., GOUIN E., JEANNEL D., COSSART P. & ROCOURT J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 616–622.
34. JERSEK B., GILOT P., GUBINA M., KLUN N., MEHLE J., TCHERNEVA E., RIJSENS N. & HERMAN L. (1999). Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 103–109.
35. 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.
36. 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.
37. 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.

38. LOW J.C. & DONACHIE W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet. J.*, **153**, 9–29.
39. NORTON D.M. (2002). Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.*, **85** (2), 505–515.
40. QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby International, Edimburgo, Escocia, Gran Bretaña.
41. ROBERTS A.J. & WIEDEMANN M. (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 904–918.
42. ROCOURT J. & BILLE J. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Stat. Q.*, **50**, 67–73.
43. RUDI K., KATLA T. & NATERSTAD K. (2003). Multi locus fingerprinting of *Listeria monocytogenes* by sequence-specific labeling of DNA probes combined with array hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.*, **220**, 9–14.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. SLUTSKER L. & SCHUCHAT A. (1999). Listeriosis in humans. *En: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, New York, NY, EE.UU., 75–95.
48. 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.
49. SWAMINATHAN B. (2001). *Listeria monocytogenes*. *En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Second Edition, Doyle M.P., Beuchat L.R. & Montville T.J., eds. ASM Press, Washington, DC, EE.UU., 383–409.
50. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS) (2002). Procedure for the Use of *Listeria monocytogenes* BAX Screening Test, Effective April 29, 2002. *En: Microbiology Laboratory Guidebook On Line*, <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>, MLG 8A.00, 1–4.
51. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS) (2002). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples, Revision 03, April 29, 2002. *En: Microbiology Laboratory Guidebook On Line*, <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgbook.htm>, MLG 8.03 pp 1–20.
52. WALKER J.K. & MORGAN J.H. (1993). Ovine ophthalmitis associated with *Listeria monocytogenes*. *Vet. Rec.*, **132**, 636.
53. WALKER R.L. (1999). *Listeria*. *En: Veterinary Microbiology*, Hirsh D.C. & Zee Y.C., eds. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, EE.UU., 225–228.
54. WESLEY G.N. (1999). Listeriosis in animals. *En: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Ryser E. & Marth E., eds. Marcel Dekker, Nueva York, NY, EE.UU., 39–73.
55. 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.

*
* *