



MESA REDONDA SOBRE “ACTUALIDAD DE LA LISTERIOSIS”

Listeriosis alimentaria

Prof. Javier Hernández Haba

Catedrático de Microbiología
Académico de Número de la RAMCV



Listeria monocytogenes



Es el agente productor de una serie de manifestaciones clínicas en el hombre y muchos animales que reciben el nombre de listeriosis, que es una enfermedad infecciosa **causada por el consumo de alimentos contaminados**.

Es más común y severa en mujeres embarazadas y sus recién nacidos, en adultos mayores de 65 años y en personas con el sistema inmunitario debilitado.

Listeria monocytogenes

- 1926 – Murray, Webb & Swann
Sepsis epidémica en conejos.
La denominan *Bacterium monocytogenes*
(gran incremento de monocitos en sangre)
- 1936 – Burn, C.G.
1^{er} caso de infección perinatal humana
- 1940 – Harvey Pirie
Propone género *Listeria*
(en honor a Lord Joseph Lister
1827-1912)



Joseph Lister utilizando un difusor de fenol como antiséptico en un quirófano

SCIENTIFIC REPORT



APPROVED: 19 November 2018

doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control
(EFSA and ECDC)

CASOS NOTIFICADOS DE ZONOSIS EN UNIÓN EUROPEA							
	2.017	2.016	2.015	2.014	2.013	2.012	2.011
<i>Campylobacter</i>	246.158	246.307	229.213	236.818	217.779	214.316	223.998
<i>Salmonella</i>	91.662	94.530	94.625	92.007	85.268	90.883	96.682
<i>Listeria</i>	2.480	2.536	2.206	2.242	1.771	1.644	1.551
<i>ST-E.coli</i>	6.073	6.378	5.901	5.903	6.112	5.680	9.487
<i>Brucella</i>	378	516	434	461	390	372	481
<i>Yersinia</i>	6.823	6.861	7.202	6.619	6.498	6.506	7.002

CASOS NOTIFICADOS DE ZONOSIS EN ESPAÑA*							
	2.017	2.016	2.015	2.014	2.013	2.012	2.011
<i>Campylobacter</i>	18.860	14.856	13.227	11.481	7.064	5.548	5.469
<i>Salmonella</i>	9.426	9.819	9.045	6.633	4.537	4.224	3.786
<i>Listeria</i>	287	362	207	161	140	109	91
<i>ST-E.coli</i>	86	51	86	50	28	32	20
<i>Brucella</i>	68	37	33	56	94	62	43
<i>Yersinia</i>	585	485	432	436	243	221	264

*Spain: estimated population coverage of 25 % in 2009-2012, 30% in 2013 and 45% in 2014-16

Listeria monocytogenes

Europa, 2017



Año 2017	Fallecimientos (%)
<i>Campylobacter</i>	45 (0.04%)
<i>Salmonella</i>	156 (0.25%)
<i>Listeria</i>	225 (13,8%)
<i>ST E.coli</i>	20 (0.50%)
<i>Brucella</i>	1 (0.78%)
<i>Yersinia</i>	3 (0.07%)

Listeriosis

- Es una de las infecciones transmitidas por los alimentos con mayor tasa de letalidad y mayor carga de morbilidad, en relación con las secuelas que puede originar.
- Hasta un 30% de las infecciones por listeriosis transmitidas por los alimentos pueden ser **fatales en personas con el sistema inmunitario debilitado**
- En los años noventa, los brotes de listeria estuvieron vinculados principalmente al consumo de alimentos crudos y carnes procesadas, como embutidos y salchichas.
- Recientemente se han vinculado al consumo de productos lácteos, sobre todo, quesos blandos no pasteurizados, y también al consumo de frutas y verduras.

Listeriosis

- En 2014, hubo **un brote causado por el consumo de salmón y trucha ahumados** que afectó a cinco países europeos.
- El pasado mes de abril, en Francia, hubo un brote causado por el consumo de quesos no pasteurizados.
- En junio, en el Reino Unido, seis personas enfermaron por comer sándwiches de pollo contaminados por esta bacteria.
- El mayor brote registrado hasta la fecha se produjo en Sudáfrica en 2017, con más de 1.000 casos confirmados y más de 200 personas fallecidas. Fue probablemente un procesado cárnico listo para el consumo el causante del brote

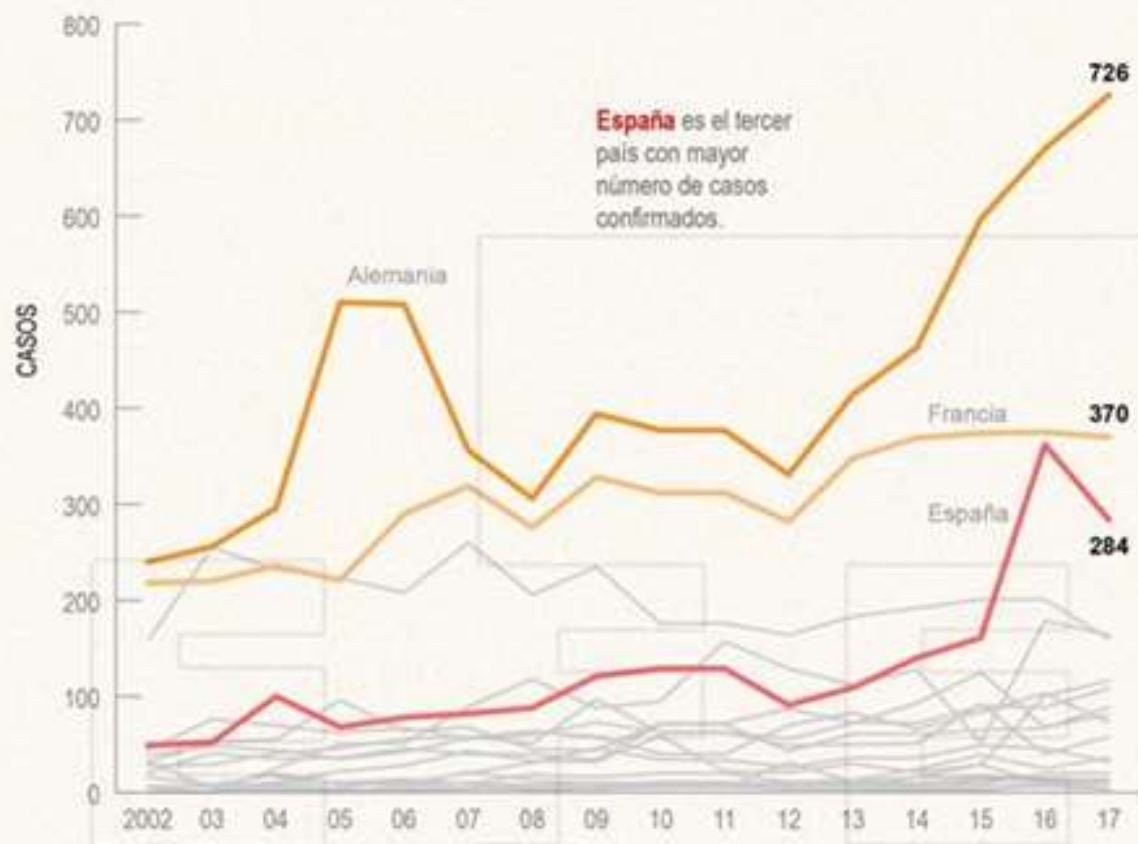
Table 22: Summary of statistics of human invasive *L. monocytogenes* infections and *L. monocytogenes* occurrence in the major RTE food categories in the EU, 2013–2017

	2017	2016	2015	2014	2013	Data source
Humans						
Total number of confirmed cases	2,480	2,509	2,183	2,217	1,883	ECDC
Total number of confirmed cases/100,000 population (notification rates)	0.48	0.47	0.43	0.46	0.40	ECDC
Number of reporting MS	28	28	28	27	27	ECDC
Infection acquired in the EU	1,635	1,532	1,450	1,498	1,298	ECDC
Infection acquired outside the EU	4	6	7	6	9	ECDC
Unknown travel status or unknown country of infection	841	971	726	713	576	ECDC
Total number of food borne outbreaks	10	5	15	13	9	EFSA
Number of outbreak-related cases	39	25	233	94	56	EFSA

Listeriosis en España y Europa

Los casos mantienen una tendencia creciente en los últimos años.

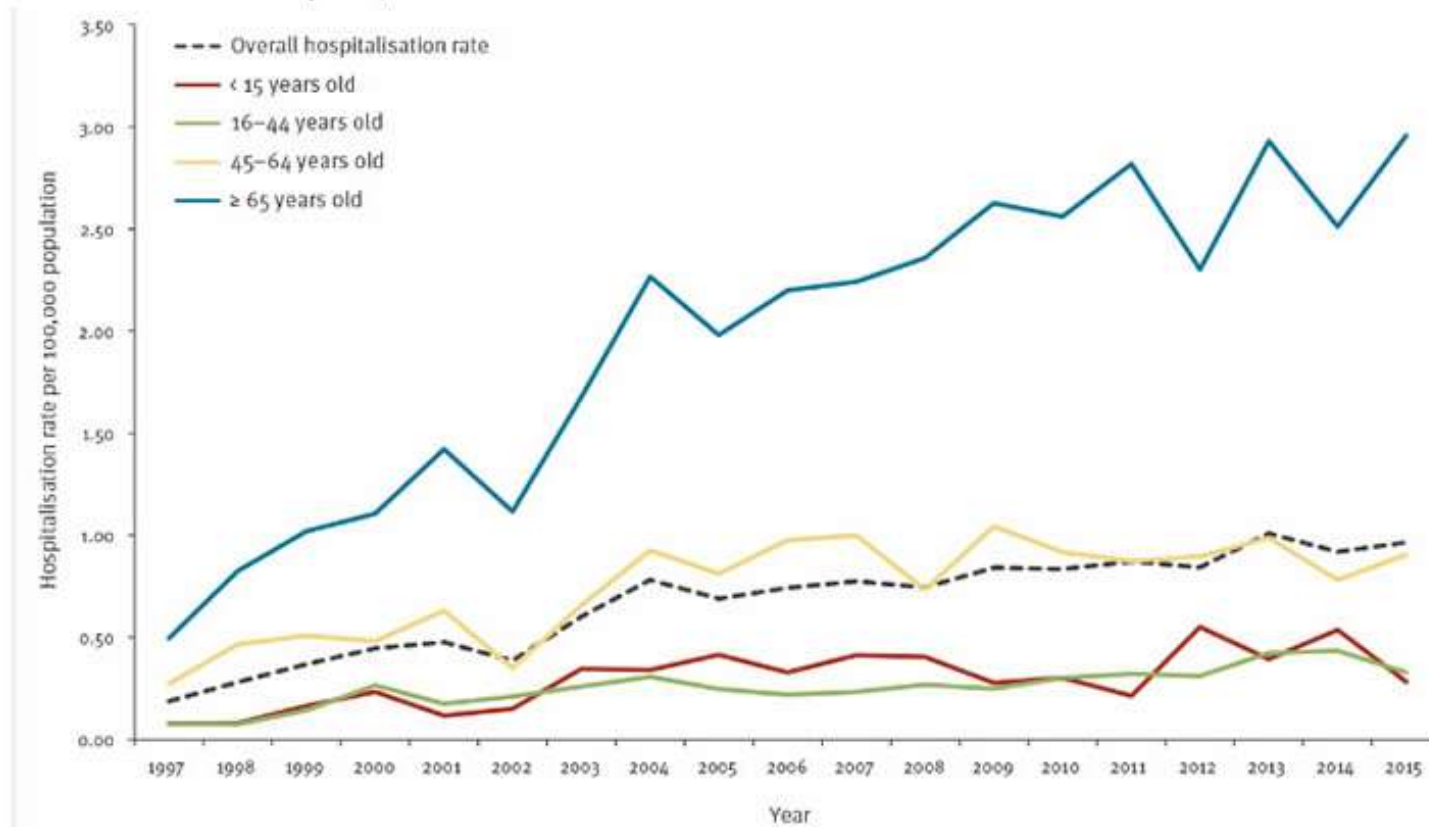
Casos confirmados de listeriosis en Europa



Listeriosis

- **En la Unión Europea, la listeriosis sigue una tendencia ascendente desde 2008**, con unas tasas de mortalidad más altas que las de otros patógenos transmitidos por alimentos.
- Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), podría ser **una enfermedad emergente en Europa y estar infradiagnosticada**.
- En España, no entró en el catálogo de enfermedades de declaración obligatoria (EDO) hasta el año 2015

Tasa de hospitalización por listeriosis, según la edad. España, 1997-2015



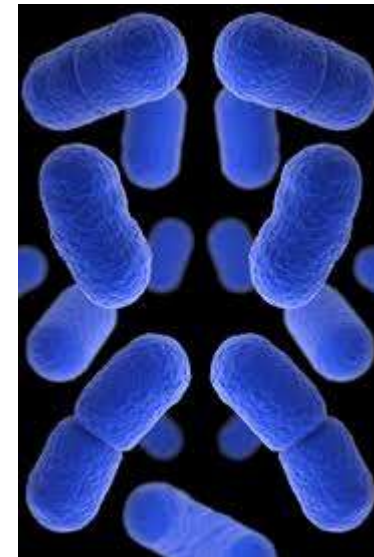
- En un estudio del Instituto de Salud Carlos III y el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, se describen retrospectivamente las hospitalizaciones relacionadas con listeriosis acaecidas entre 1997 y 2015.

Listeriosis

- Se produjeron **5.696 hospitalizaciones relacionadas con listeriosis**
- **El grupo de edad de mayores de 65 años fue el más afectado (50%)**
- Las mujeres embarazadas y los recién nacidos representaron el 7% y el 4% de las hospitalizaciones, respectivamente
- El 56,4% presentaba alguna causa de inmunosupresión de base, siendo las más frecuentes:
 - cáncer (22,8%)
 - diabetes mellitus (16,6%)
 - enfermedad hepática crónica (13,1%).
- La mortalidad media fue del 17%
 - en los mayores de 65 años (67,5%)
 - en los pacientes que desarrollaron sepsis (39,9%)
 - en pacientes con meningoencefalitis (19,2%)

Listeria monocytogenes características microbiológicas

- Son bacilos cortos, con extremos redondeados
- Gram positivos
- Se disponen aislados o en cortas cadenas
- Son móviles a 25°C por 1-5 flagelos peritricos
- Anaerobios facultativos
- Hidrolizan la esculina
- Fermentan la ramnosa, pero no la xilosa
- Temperatura óptima 30-35°C.
- Psicrótrofas, pueden crecer a 4°C
- 13 serotipos: 98% de casos producidos por serotipos 1/2a, 1/2b y 4b



Listeria monocytogenes **distribución en la naturaleza**

- Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, principalmente en el suelo y en la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprófito.
- También se encuentra en las aguas residuales, lodos, comida animal, desechos de mataderos y en el tracto digestivo del hombre y animales asintomáticos.
- Aproximadamente el 5% de la población humana pueden transportar *L.monocytogenes* en sus heces. Se ha aislado en heces del 30% de las personas que trabajan con pollos, y en el 75% de los individuos que trabajan con este microorganismo.
- Debido a su amplia distribución, tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la cadena alimentaria.
- Importancia de las biopelículas

Listeria monocytogenes

transmisión

- La listeriosis es una enfermedad invasiva que puede presentarse en casos esporádicos o en brotes
- En ambos casos, los principales vehículos de transmisión son los alimentos contaminados (99%), especialmente aquellos listos para su consumo (RTE):
 - verduras (lavadas, peladas, cortas y envasadas) y ensaladas (combinadas)
 - pescados (atún, salmón, trucha, bacalao) y mariscos (crudos o ahumados)
 - leche y derivados (quesos blandos preparados con leche cruda, yogur, helados)
 - carnes (crudas o procesadas), patés, salchichas, embutidos, fiambres.
- Su capacidad de crecer a T^a de refrigeración hace que ésta bacteria pueda contaminar los alimentos refrigerados.

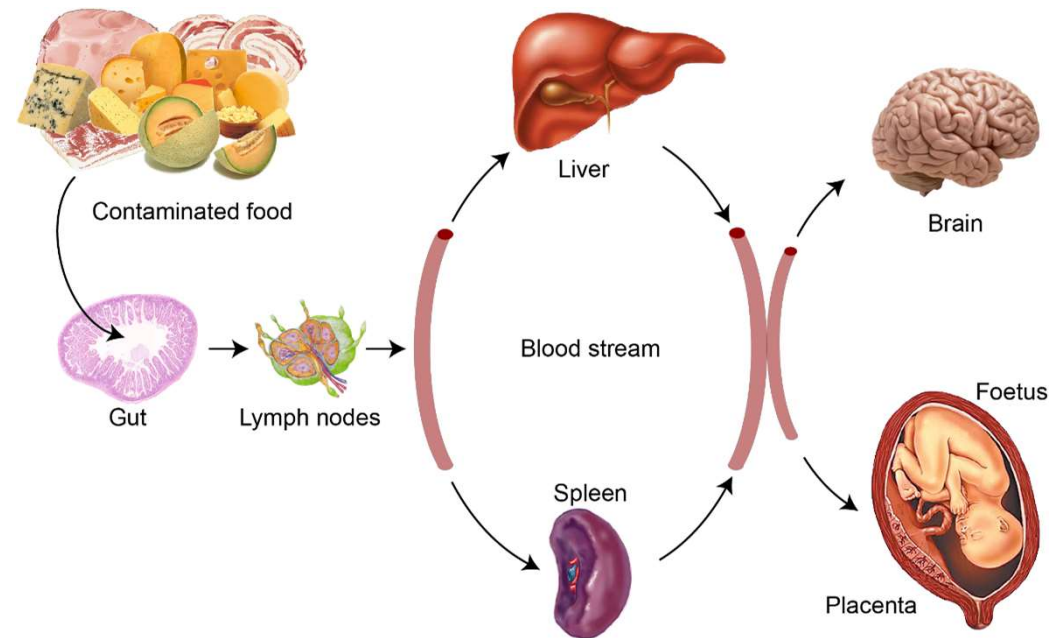
Listeria monocytogenes **factores que afectan al crecimiento**

Límites de crecimiento		
Factor	Óptimo	Rango
Temperatura (°C)	35-37	0 - 42
pH	7	4,5 - 9,5
Actividad de agua a_w	0,98	0,92 - 0,99

- Crecen entre 0 y 42°C
- Sobrevive en alimentos a -18°C durante varias semanas
- Tiempo de generación a 5°C: 19 h
- Tiempo de generación a 8°C: 9 h
- No resisten un calentamiento a:
 - 60°C durante 30 min ($D_{63}=20''$)
 - 72°C durante 15 seg ($D_{72}=1''$)
- Crece en presencia de: 10% NaCl, 40% bilis

Listeria monocytogenes poder patógeno

- *L.monocytogenes* es un patógeno oportunista, capaz de sobrevivir en múltiples hospedadores animales o en el hombre, donde se multiplica intracelularmente (macrófagos, células epiteliales y hepatocitos)
- Coloniza el intestino, cruza la barrera intestinal, la hemato-encefálica y la materno-fetal



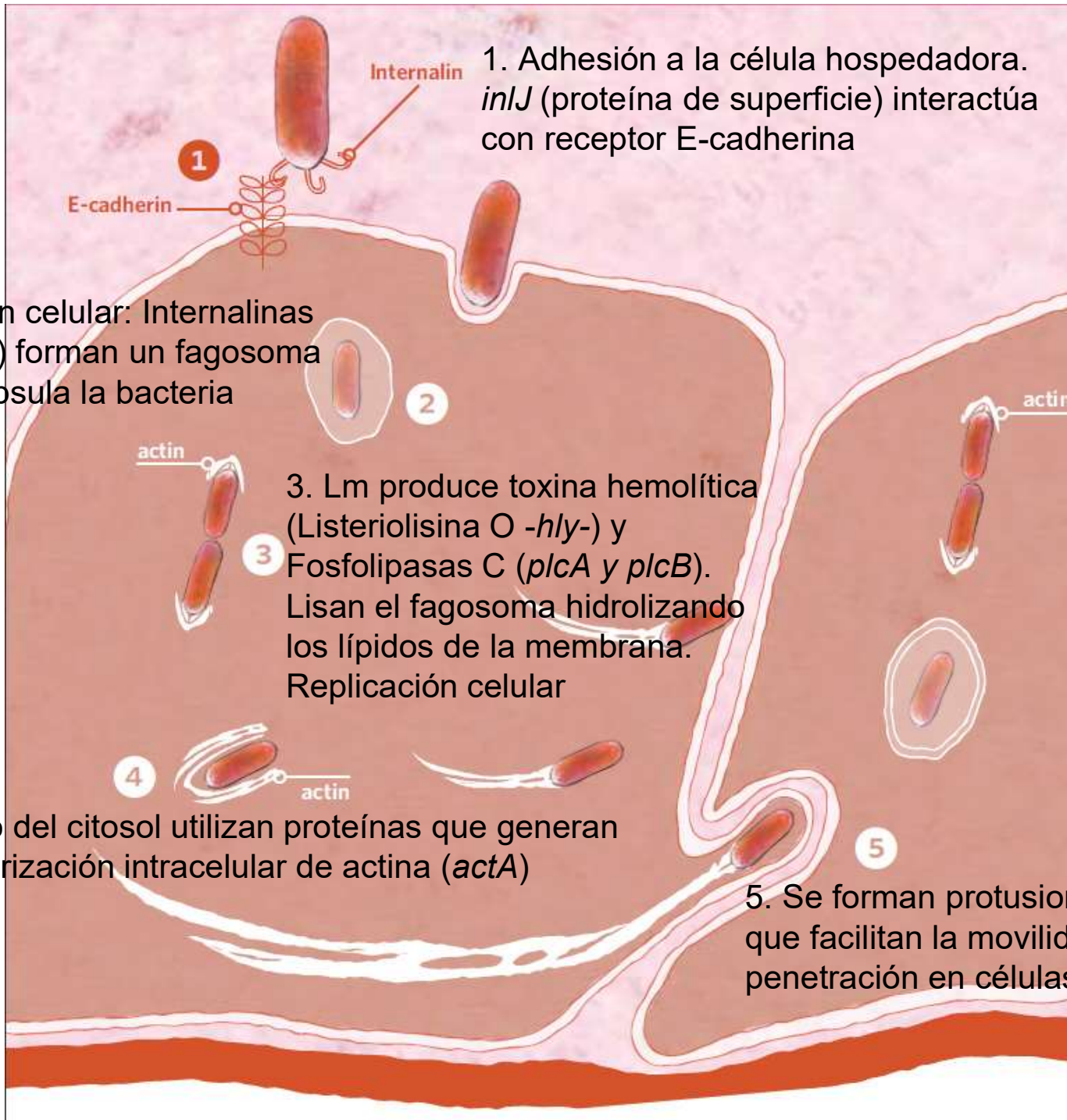
Ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes*

Principales factores de virulencia de *L. monocytogenes* involucrados en el ciclo intracelular

Locación cromosoma	Gen	Producto del gen	Función	Referencia
LIPI- 1	<i>hly</i>	Listeriolisina O (LLO)	Lisis del fagosoma	1,13,34
	<i>plcA</i>	Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI- PLC)	Lisis del fagosoma	13,15,35,36
	<i>plcB</i>	Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC- PLC)	Lisis del fagosoma	13,15,35,36
	<i>mpl</i>	Precursor zinc metaloproteasa (Mpl)	Procesa al precursor PC- PLC a su forma madura	1,13
	<i>prfA</i>	Factor regulador positivo A (PrfA)	Requerida para la expresión de los factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>	1,13,38
	<i>actA</i>	Proteína inductora de ensamblaje actina	Participa en la movilidad intra- intercelular	1,13,38,41
Exterior LIPI- 1	<i>hpt</i>	Proteína transportadora de hexosa fosfato	Requerido para el crecimiento intracelular	1,13,45
	<i>inlA</i>	Internalina A (InlA)	Participa en la invasión celular	1,13,22,23,24
	<i>inlB</i>	Internalina B (InlB)	Molécula señalizadora y participa en la invasión celular	1,13,22,23,24
	<i>inlC</i>	Internalina C (InlC)	Proteína secretada, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i>	1,22
	<i>inlJ</i>	Internalina J (InlJ)	Adhesión celular, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i>	13,20

prfA es el regulador de la expresión de los genes involucrados en la virulencia

Responde a señales ambientales y endógenas y permite cambiar de un estado avirulento a otro virulento dentro del hospedador



1. Adhesión a la célula hospedadora. *inlJ* (proteína de superficie) interactúa con receptor E-cadherina

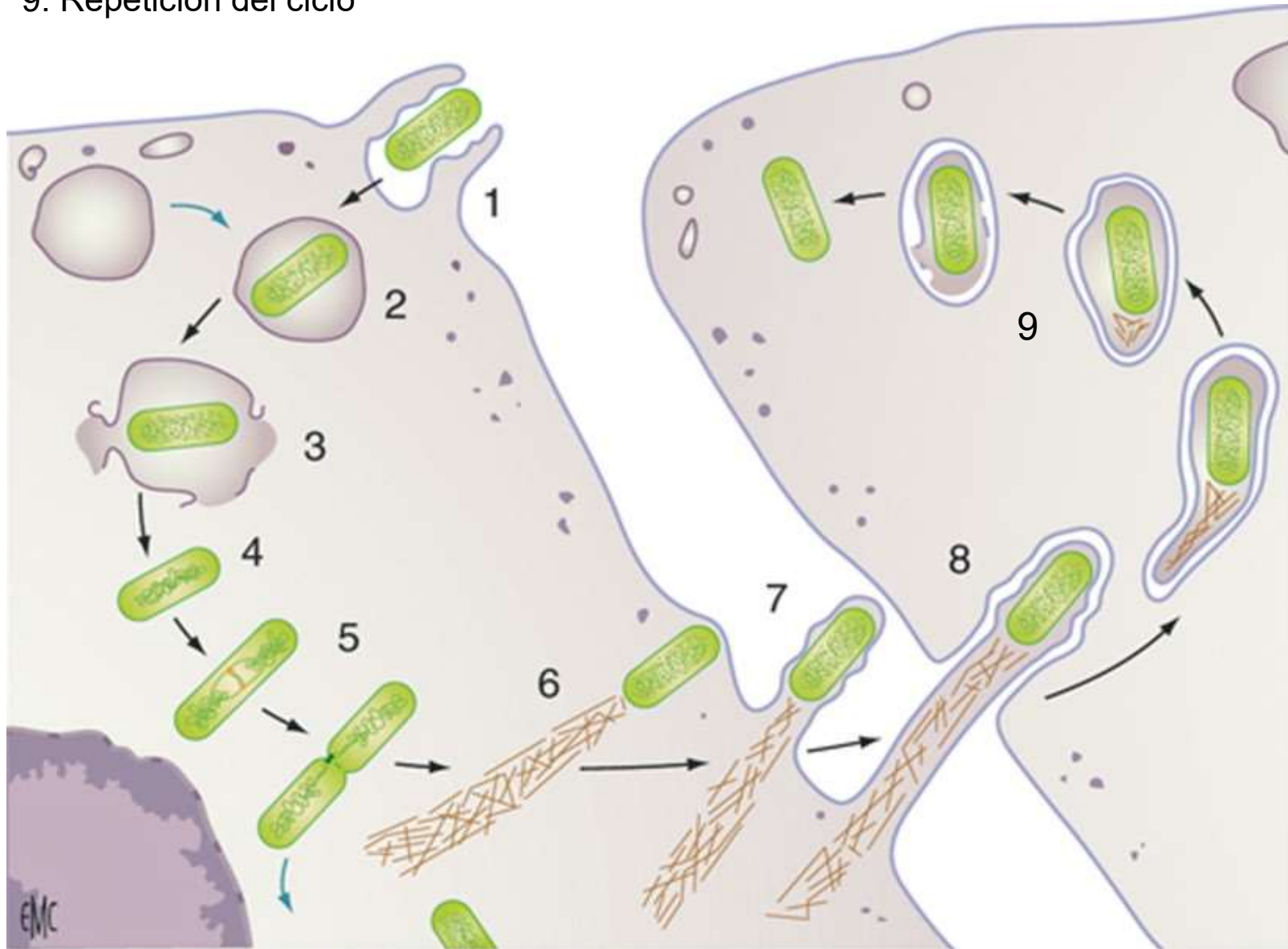
2. Invasión celular: Internalinas (*inlA*, *inlB*) forman un fagosoma que encapsula la bacteria

3. Lm produce toxina hemolítica (Listeriolisina O -*hly*-) y Fosfolipasas C (*plcA* y *plcB*). Lisan el fagosoma hidrolizando los lípidos de la membrana. Replicación celular

4. Dentro del citosol utilizan proteínas que generan la polimerización intracelular de actina (*actA*)

5. Se forman protusiones (filópodos) que facilitan la movilidad intracelular y penetración en células adyacentes

1. Adhesión e internalización
2. Fagocitosis
3. Lisis fagolisoma LLO y PLC
- 4-5. Proliferación
6. Movimiento basado en la polimerización intracelular de actina
7. Filópodos movilidad intracelular
8. Penetración en células adyacentes
9. Repetición del ciclo



Listeria monocytogenes

formas clínicas

A. Listeriosis gastrointestinal no invasiva

- Forma clínica más habitual
- Puede aparecer entre las primeras 24 h hasta **6-8 semanas** después de la ingesta del alimento contaminado, lo cual hace difícil obtener información precisa de datos epidemiológicos
- Cursa problemas gastrointestinales (fiebre, náuseas, vómitos)
- Los síntomas suelen remitir generalmente a los 2 días
- Los pacientes se pueden convertir en portadores asintomáticos
- La OMS estima una DL_{50} de $1,9 \times 10^6$ ufc para el hombre

Listeria monocytogenes formas clínicas

B. Listeriosis neonatal

- El neonato adquiere la infección a través de la placenta o durante el parto con las secreciones maternas.
- Puede surgir durante los 4 primeros días de vida del niño en forma de septicemia ("granulomatosis infantiséptica") o a partir de la 1ª semana de vida cursando como una meningitis.
- Es frecuente la hidrocefalia persistente
- Tasa de mortalidad elevada (22%).



Listeria monocytogenes

formas clínicas

C. Listeriosis meningoencefálica

- Aparece en adultos mayores de 60 años y en individuos inmunocomprometidos, diabéticos, con trasplantes renales, cirrosis hepática, etc.
- Cursa como una meningitis o meningoencefalitis.
- Elevada mortalidad (40%)

Listeria monocytogenes formas clínicas

D. Listeriosis en la mujer embarazada

- Cursa generalmente con fiebre y muy pocos síntomas acompañantes.
- Varias semanas después de la infección puede sufrir una bacteriemia con síntomas pseudogripales y gastrointestinales que se resuelven espontáneamente.
- Se puede producir un aborto al 4º o 5º mes.
- Si se infecta en el 3^{er} trimestre, la infección perinatal es muy severa pudiendo causar aborto. El parto puede llegar a término, pero lo normal es que el niño nazca muerto, o con una gravísima granulomatosis generalizada.

- Antibiótico de elección: ampicilina.
- En casos de meningitis es aconsejable administrar conjuntamente con un aminoglicósido (gentamicina) o cotrimoxazol.
- Cefalosporinas no son activas.

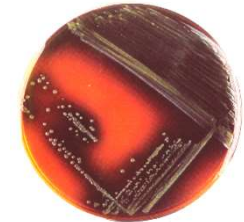
Listeria monocytogenes detección y enumeración

- Las listerias crecen en la mayoría de los medios comunes originando un típico olor a mantequilla.



- Medios de cultivo selectivos:
 - Caldo Fraser de enriquecimiento (peptona, triptona, esculina, LiCl, NaCl, ácido nalidíxico y acriflavina)
 - Agar **Palcam** (manitol, glucosa, cloruro de litio, rojo de fenol, polimixina, ceftacidina y acriflavina)
 - Medio de **Oxford** (esculina, LiCl, ácido nalidíxico y acriflavina)
 - Medio cromogénico **Ottaviani-Agosti** (ALOA detecta β -glucosidasa y fosfolipasa C)

Detección de *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1:2017



Palcam



ALOA



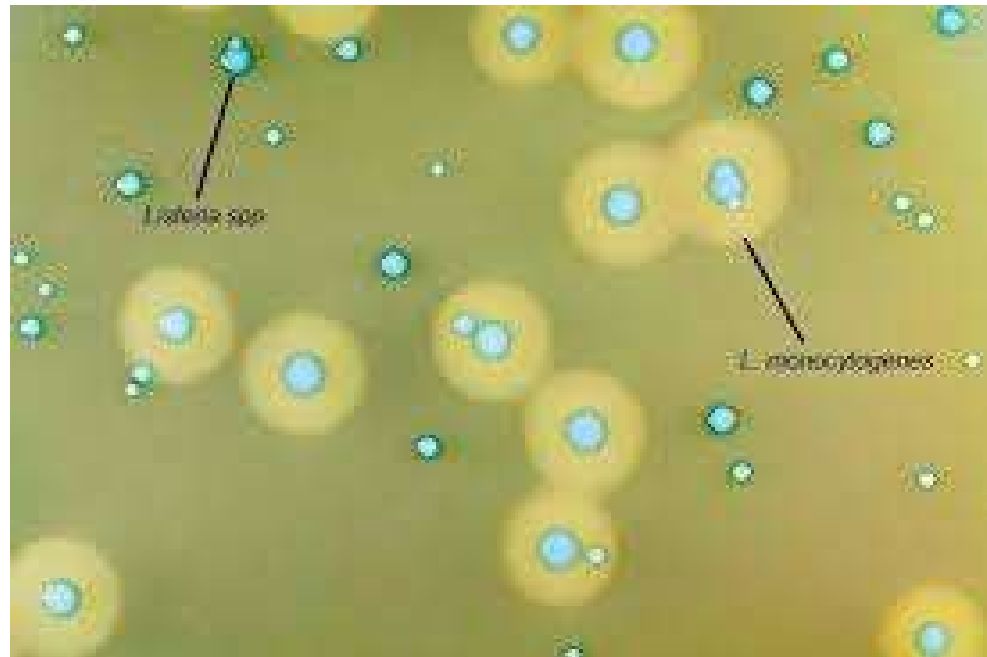
TSYEA

Confirmación del género *Listeria*:

* Inoculación en TSYEA (5 colonias por placa) e incubación a 37°C ± 1°C.	*Reacción de la Catalasa.
* Tinción de Gram.	*Movilidad si es necesario.

Confirmación de la especie *Listeria monocytogenes*:

*Hemólisis.	*Test de Camp.	+ -
* Utilización de glúcidos: Ramnosa y Xilosa.		



A. Agar Listeria (AL) Agar (Ottaviani and Agosti medium)[176]*



Enzymatic Activity

Fosfolipasa C
β-glucosidasa



L. monocytogenes



Listeria spp.



Non-Listeria

+

-

-

+

+

-

B. RAPID' L.mono Agar [177] *



L. monocytogenes



L. ivanovii



L. innocua



L. welshimeri

Fosfolipasa C

+

+

-

-

Fermenta xilosa

-

+

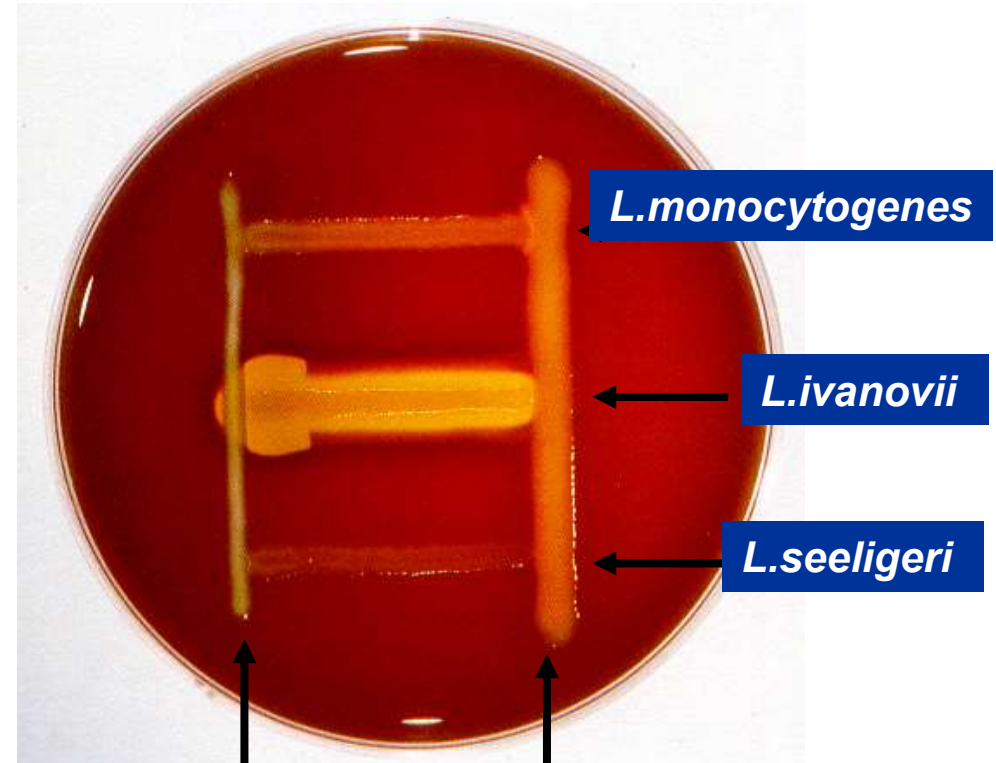
-

+

Listeria monocytogenes test de CAMP



Listeria monocytogenes
 β -hemolisis
de sangre de caballo



Rhodococcus equi

Staphylococcus aureus

Detection of *Listeria monocytogenes*
NF VALIDATION according to ISO 16140
N° BRD 07/10-04/05
AOAC-RI approved N° 010802*
NordVal approved N° 037
All food stuffs and environment



Sample



⁽¹⁾ **Listeria Special Broth (LSB)** or ⁽²⁾ **Fraser 1/2 Broth**



30°C
23 hrs ± 1 hr ⁽¹⁾
or 25 hrs ± 1 hr ⁽²⁾

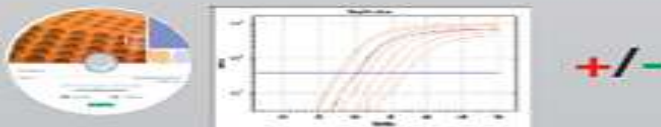
Bacterial Lysis & DNA Extraction
Standard (Fraser 1/2 and LSB) or Easy (LSB)



Real-time PCR amplification and detection with
iQ-Check *Listeria monocytogenes* II



Automatic result analysis and interpretation



Confirmation of positive with **RAPID[®]L.mono**

* Please refer to AOAC certificate for validated matrices

Enumeración de *Listeria monocytogenes* ISO 11290-2:2017

Suspensión inicial: 9 x g. ó 9 x ml. de disolvente para su preparación.
Utilizamos agua de peptona tamponada o medio base semi-FRASER.

Revivificación: durante 1 hora a 20°C

Inoculación: en superficie de Agar Ottaviani-Agosti. (ALOA)

Incubación: 37°C ± 1°C de 24 h. a 48 h.

Identificación y recuento: especies de *Listeria*.

Confirmación del género *Listeria*:

- Inoculación en TSYEA (5 colonias por placa) e incubación a 37°C ± 1°C. *Reacción de la Catalasa.
- Tinción de Gram. *Movilidad si es necesario.

Confirmación de la especie *Listeria monocytogenes*:

- *Hemólisis.
- *Test de Camp.
- * Utilización de glúcidos: Ramnosa y Xilosa.

Esto es todo lo que debes saber sobre la listeriosis

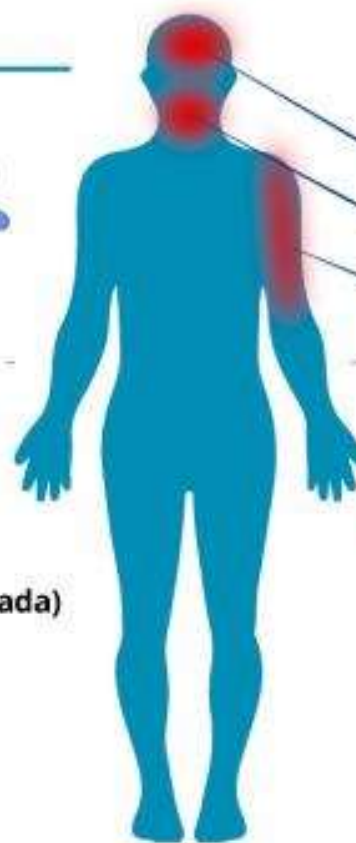
¿Qué es?

- La listeriosis es una infección causada por la bacteria *L. monocytogenes*.
- Se suele enfermar después de consumir alimentos contaminados.



¿Cuáles son sus síntomas?

- Fiebre
- Rigidez de cuello
- Dolores musculares
- Confusión
- Debilidad



5 alimentos que hay que evitar en riesgo

- Quesos blandos.
- Alimentos refrigerados listos para consumir.
- Pescados y mariscos ahumados refrigerados sin cocinar.
- Leche cruda (no pasteurizada)
- Verduras congeladas sin cocción previa.

¿Quién tiene más riesgo?

- Sistemas inmunitarios debilitados
- Mujeres embarazadas
- Personas mayores
- Recién nacidos

