

La listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico

Raúl Garza-Velasco*, Teresa Silva-Monzuazo* y Luciano Hernández-Gómez*

*Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

RESUMEN

La listeriosis corresponde predominantemente a una infección alimentaria con importantes índices de mortalidad en adultos inmunocomprometidos, fetos y recién nacidos. *Listeria monocytogenes*, su agente etiológico, puede crecer a la temperatura de refrigeración, tanto como lo hace a 37°C, y es capaz de atravesar la placenta, dos características que explican numerosos casos de cuadros sistémicos y muerte.

Actualmente, la incidencia de listeriosis continúa incrementándose; de hecho, los brotes epidémicos implican a múltiples personas dentro de los nosocomios y fuera de ellos, aunque también ocurren los casos individuales. El microorganismo ha sido detectado en la tierra, agua, plantas, vegetales, carne, leche y sus derivados, así como en las heces de animales y humanos saludables.

El presente trabajo describe las principales formas de la listeriosis, incluyendo su transmisión, terapia, prevención y el peculiar ciclo infeccioso de *L. monocytogenes*.

PALABRAS CLAVE

Listeria monocytogenes, listeriosis, infecciones alimentarias, infecciones perinatales, septicemia, meningitis, meningoencefalitis, entrada a las células del

hospedero, escape del fagosoma y desarrollo intracelular, desplazamiento intracitoplásmico, diseminación célula a célula.

SUMMARY

Listeriosis is frequently a food-borne infection with an important mortality in immunocompromised adults, fetuses and newborns; its etiological agent (*Listeria monocytogenes*) can grow at refrigerator temperatures as well as at 37°C and it can cross the placenta, two characteristics that explain numerous cases of systemic infections and death.

Actually the incidence of listeriosis continues increasing. In fact outbreaks involving multiple cases in the community and in hospitals but it also may occur sporadic cases. The microorganism has been detected in soil, water, plants, vegetables, meat, milk and its derivatives, and in the feces of animals and health humans.

This work describes the major types of listeriosis, including its transmission, therapy, prevention and the peculiar infective process related to *L. monocytogenes*.

KEYWORDS

Listeria monocytogenes, listeriosis, food-borne infections, perinatal infections, septicemia, meningitis, meningoenzephalitis, entry into the cell, lysis of the phagosome and intracellular división, intracellular movement, cell to cell spread.

La listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico

Raúl Garza-Velasco*, Teresa Silva-Monzuazo* y Luciano Hernández-Gómez*

*Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

INTRODUCCIÓN

Si bien es ampliamente conocido que *Listeria monocytogenes* ocasiona patologías graves, en realidad muy pocos laboratorios clínicos latinoamericanos cuentan con alguna metodología que les permita diagnosticar la listeriosis humana, en virtud de la relativamente baja frecuencia de esta enfermedad y de la supuesta gran dificultad que representa la identificación de su agente etiológico mediante los métodos microbiológicos tradicionales.

En tal sentido, es conveniente adoptar gradualmente la práctica diagnóstica correspondiente, habida cuenta que las tasas reportadas de morbi-mortalidad de la listeriosis aluden a países desarrollados¹, en donde los alimentos (la principal fuente de su transmisión) son elaborados, procesados, transportados, almacenados y expendidos al público, en condiciones de mucha mayor higiene y cuidado que las acostumbradas en nuestro medio.

De acuerdo con diversas publicaciones, la listeriosis es más común en los infantes que en los ancianos, predominando en los varones; las mujeres embarazadas con bacteremia debida a *L. monocytogenes* representan un tercio de los casos reportados

¹ Por ejemplo, en EUA, se estima que *L. monocytogenes* provoca anualmente 2,500 casos de enfermedades graves y 500 defunciones.

y, aunque la muerte es poco común en la madre, la transmisión del microorganismo al feto conduce a partos prematuros, a la muerte fetal o al nacimiento de infantes muy afectados. Por otra parte, de 722 casos analizados en Gran Bretaña, 34 % se asociaron a embarazos, 50 % a adultos con enfermedades subyacentes severas y 14 %² a adultos previamente sanos. Finalmente, es oportuno comentar que las infecciones por *Listeria* también se han venido presentando dentro de los hospitales y que el común entre las personas afectadas es la inmunodepresión (1, 2, 3, 4).

El presente trabajo describe las principales entidades clínicas asociadas a la listeriosis humana y los más destacados factores de virulencia de su agente causal, a fin de contribuir a su mayor reconocimiento entre los profesionales del laboratorio clínico.

I. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *L. monocytogenes* EN HUMANOS

i. Panorama general

La listeriosis afecta principalmente a adultos inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, productos en gestación, recién nacidos, granjeros, veterinarios y personas que laboran en los rastros (2, 5).

En el adulto, la enfermedad se manifiesta como bacteriemia y meningoencefalitis, predominando en quienes experimentan depresión de la inmunidad mediada por células; es decir, la mayor incidencia ocurre en las personas de la tercera edad, en las que padecen de SIDA, cáncer, diabetes, cirrosis y en las que reciben medicamentos inmunodepresores o han sido sometidas a transplantes (1, 4, 5).

Por su parte, las mujeres embarazadas también manifiestan propensión a padecer bacteriemia por este microorganismo; la patología suele presentarse durante el tercer trimestre de la gestación, cursando como un simple cuadro pseudogripal. El desenlace fatal es muy poco frecuente en la madre pero, en ausencia de la terapia adecuada, ocurren la amnionitis y la infección fetal; ésta llega a provocar abortos o partos prematuros de neonatos con granulomatosis infantiséptica. Evidentemente, esta última entidad clínica se asocia a infecciones adquiridas intraútero, aunque también existen otros (bacteriemia, meningoencefalitis y cerebritis) que el infante puede adquirir por vía no intrauterina, durante o después del nacimiento (4, 5).

Finalmente, las infecciones focales (oftalmías, abscesos cerebrales, cuadros cutáneos, afecciones pleuropulmonares, etc.) ocurren en raras ocasiones, después de la listeremia o de la granulomatosis infantiséptica (2, 4, 5, 6).

ii. Principales entidades clínicas

L. monocytogenes ocasiona una amplia variedad de síndromes (tabla 1), los cuales fluctúan desde una enfermedad leve similar a la influenza -como en el caso de las mujeres embarazadas- hasta la listeriosis neonatal fulminante asociada a tasas de mortalidad de 54 a 90 %. En el adulto, las principales entidades clínicas son la meningitis (55 %), bacteriemia primaria (25 %), endocarditis (7 %) y las infecciones no meníngeas del sistema nervioso central (6 %). En tal contexto, más de la mitad de los de pacientes padece otras enfermedades previas o se encuentra recibiendo fármacos inmunosupresores (2, 4, 5, 6).

² Cifra cada vez mayor.

Tabla 1. Principales síndromes debidos a *Listeria monocytogenes* (1, 5).

Síndrome clínico	Hospedero: gravedad
Infecciones durante el embarazo	Mujeres embarazadas: enfermedad febril a enfermedad severa
Granulomatosis infantiséptica	Neonatos: infección intraútero/grave, enfermedad temprana
Septicemia	Neonatos o adultos: enfermedad moderada a severa
Meningoencefalitis, cerebritis, romboencefalitis	Neonatos o adultos: enfermedad moderada a severa
Infecciones focales*	Adultos o niños: por contacto directo o bacteriemia.

CLAVE: * = Incluye infecciones cutáneas, oculares, endocarditis, hepatitis osteomielitis, absesos cerebrales y hepáticos, peritonitis y gastroenteritis.

Infecciones durante el embarazo. Éstas se adquieren más frecuentemente en el tercer trimestre (coincidiendo con la mayor declinación de la inmunidad celular) y, en general, las pacientes presentan síntomas transitorios, inespecíficos, leves a moderados, que incluyen fiebre, cefalea, dorsalgia y trastornos gastrointestinales tales como náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea. En tal sentido, es común que la enferma no acuda a consulta médica (4, 5).

Cuando la infección tiene lugar al inicio del embarazo, el aborto ocurre durante el quinto o sexto mes; sin embargo, también existe la posibilidad de que la gestación llegue a su término, a pesar de que son más frecuentes los nacimientos prematuros. En todo caso, el producto suele salir sin vida o manifestar una granulomatosis generalizada, aunque algunos reportes hacen referencia a cierta cantidad de niños saludables provenientes de madres infectadas que no recibieron tratamiento alguno. Por otra parte, se han publicado trabajos en los que se alude a la persistencia del

microorganismo (después de la terapéutica) en los genitales de la mujer, situación que puede conducir a abortos reiterados (5, 7).

Granulomatosis infantiséptica. En los neonatos, *L. monocytogenes* es causa de sepsis en 2 modalidades clínicas: la primera, con un periodo de incubación de 1.5 días, se origina en el útero y se traduce en abortos, alumbramiento de productos muertos o partos prematuros asociados a neonatos que padecen de granulomatosis infantiséptica, grave afección ocasionada exclusivamente por *L. monocytogenes*. La segunda modalidad se presenta después de la primera semana de vida, casi siempre como una meningitis sin características clínicas específicas; es decir, se adquiere a partir de la madre, pero durante o después del nacimiento (no intraútero) (4).

En la granulomatosis infantiséptica el infante presenta abscesos diseminados y/o granulomas en múltiples órganos internos, incluyendo hígado, bazo, pulmones, riñón y cerebro; además, el niño nace en estado de muerte aparente, con rinitis purulenta, erupción cutánea y hasta nódulos faríngeos. Este tipo de infección se observa dentro de los primeros cuatro días de vida, suele asociarse a meningitis y su pronóstico es malo, con tasas de mortalidad cercanas al 100 % (4, 8).

Septicemia. La septicemia afecta a neonatos y adultos, quienes evidencian notables episodios de escalofrío y fiebre. En los adultos, la mayoría de los casos se relaciona con personas inmunocomprometidas, en quienes a menudo cursa en forma fulminante; por su parte, los neonatos empiezan a manifestarla después de los 3 días de edad con un cuadro inespecífico, por lo cual se corre el riesgo de tratarla empíricamente sin eficacia terapéutica alguna (1, 8).

Meningoencefalitis, cerebritis y romboencefalitis. En años recientes *L. monocytogenes* se ha erigido en una de las principales causas de meningitis, afectando sobre todo a neonatos y adultos inmunocomprometidos; corresponde a una patología supurativa aguda, en la cual la linfocitosis del LCR y los signos clínicos llegan a sugerir una meningitis tuberculosa. La enfermedad con frecuencia cursa como meningoencefalitis y rara vez como encefalitis (8).

Clínicamente, la meningoencefalitis se caracteriza por fiebre, cefalea y alteraciones de la conciencia; la aparición de los síntomas suele ser abrupta y la rigidez de nuca está ausente en casi la mitad de los pacientes, particularmente cuando se trata de personas muy ancianas o inmunocomprometidas. Con frecuencia se observan convulsiones y otros signos tales como ataxia, hemiparesia y parálisis de los pares craneales, manifestaciones que reflejan una romboencefalitis; ésta corresponde a la afectación del tronco cerebral y suele coexistir con la inflamación meníngea (6).

La meningoencefalitis incide en el adulto joven y en el anciano, aunque la edad promedio es de 50 a 60 años; su pronóstico es variable y, si bien la mortalidad global es cercana al 40 %, esta cifra disminuye a 10 % en menores de 20 años y se incrementa hasta 55 % en quienes sobrepasan los 60 años. Por obvio, el enfermo puede manifestar secuelas neurológicas graves (8).

En cuanto a la cerebritis y romboencefalitis, la primera puede evolucionar originando uno o más abscesos cerebrales, que tienden a crecer progresivamente, por lo que el tratamiento debe ser oportuno; el paciente experimenta cefalea, fiebre y hasta algún grado de parálisis. Por su parte, en la romboencefalitis (afectación del

tronco cerebral), además de los síntomas anteriores, destaca un vómito continuo debido a la parálisis progresiva (8).

Infecciones focales. Las infecciones cutáneas debidas a *L. monocytogenes* parecen relacionarse más frecuentemente con la granulomatosis infantil y los veterinarios. Las lesiones ulcerativas no se distinguen de las de otros orígenes, por lo cual es necesario el cultivo de las muestras para establecer el diagnóstico (5).

Con respecto a las infecciones oculares, éstas pueden ser consecuencia de la granulomatosis infantiséptica, o derivadas de la presencia del microorganismo en la vagina materna o en el líquido amniótico. Por su parte, la peritonitis bacteriana espontánea (PBE) corresponde a una grave complicación que afecta a los pacientes con descompensación hídrica asociada a cirrosis hepáticas de diferentes etiologías. La PBE es muy rara y sólo afecta a pacientes inmunocomprometidos con enfermedades subyacentes (5).

iii. Epidemiología

La distribución de *L. monocytogenes* es mundial y se ha logrado aislar a partir de muestras de tierra, polvo, materia vegetal en descomposición, comida para consumo humano –tanto fresca como procesada, destacando las carnes y vegetales–, alimentos para animales, aguas residuales, desechos de los mataderos, productos lácteos y numerosos animales o humanos asintomáticos. Respecto a los animales en los cuales el microorganismo se ha detectado, aquéllos incluyen a 42 especies domésticas, mamíferos silvestres, aves, peces, moscas y crustáceos (1, 5).

L. monocytogenes es habitante natural de la tierra y la materia vegetal en descomposición, elementos que fungen como sus principales reservorios; el humano y los animales pueden contactarla a partir de diversas fuentes, destacando la materia fecal y los alimentos. Aún cuando existe la lógica transmisión directa a veterinarios y granjeros, la mayor parte de las infecciones ocurre en personas ciudadinas que ingieren alimentos contaminados, incluidos la ensalada de col, quesos suaves, carne de aves, salchicha de pavo, champiñones, leche y lengua de cerdo en jalea (1, 3, 5).

Evidentemente, dicha información se ha obtenido estudiando diversos brotes; uno de ellos, surgido en Nova Scotia, Canadá (1981), comprendió 41 casos asociados a una ensalada de coles: en la granja productora se habían registrado varios casos de listeriosis en ovejas, cuyo estiércol se empleó para fertilizar la col. En Massachussets (1983), un brote involucró a una particular marca de leche pasteurizada; el análisis condujo a establecer que la pasteurización elimina al microorganismo y que los productos implicados pueden contaminarse posteriormente. En Los Ángeles (1985) tuvo lugar un gran brote de 142 casos, con 45 defunciones, relacionado con el consumo de una marca de queso estilo mexicano. Sin embargo, en EUA, las salchichas vienasas crudas y el pollo mal cocido explican la mayor parte de los casos de listeriosis (1, 5, 9).

Más recientemente, han continuado reportándose casos de listeriosis humana: en Finlandia (1998-1999), la ingesta de manteca contaminada se tradujo en 25 enfermos con 6 decesos; 20 padecieron de sepsis, 4 de meningoencefalitis y 1 de abscesos en el hígado. En Francia (2000), fueron afectados 26 individuos, 7 de los cuales murieron; en un inicio, se pensó que ello se debió a la ingesta de carne de

cerdo pero, finalmente, el brote se atribuyó a una contaminación cruzada, originada por cuchillos utilizados previamente para rebanar otros productos. Al papel de la contaminación cruzada ya se le había descrito desde 1992, para explicar otra epidemia francesa con 279 enfermos, 63 defunciones y 20 abortos (2, 7, 9).

Cabe mencionar que la relevancia del portador asintomático es aún desconocida, aunque se sabe que aproximadamente el 1 % de los adultos saludables excreta *L. monocytogenes* en la materia fecal; esta cifra contrasta con la de 4.8 % en quienes laboran en los rastros y mataderos, y con la de 26 % en los pacientes sintomáticos. Sin embargo, es muy probable que la verdadera incidencia de portadores sea bastante mayor, debido a la gran dificultad que representa el aislamiento del microorganismo a partir de la materia fecal. En otras palabras, la única vía plenamente comprobada de transmisión interhumana es la transplacentaria y la estimación de 2 a 8 casos anuales de listeriosis por cada 100.000 habitantes podría ser una falacia; de hecho, las publicaciones de los últimos 30 años también se han referido al aumento de la frecuencia de listeriosis en personas sanas (1, 3, 6).

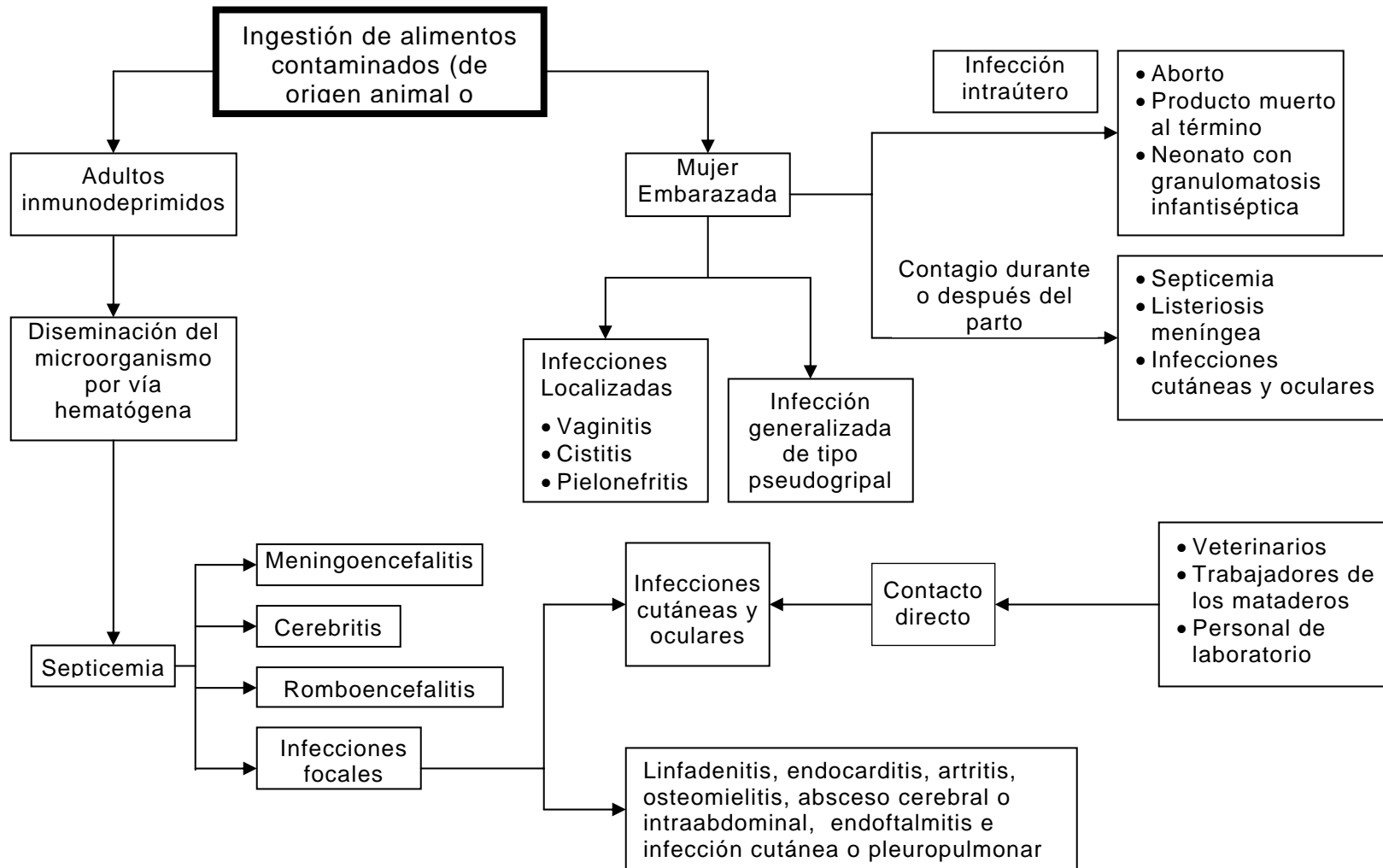
Por ejemplo, en un estudio de 74 casos, el 22 % de los pacientes presentaba alguna malignidad hematológica, el 8 % otro tipo de cánceres, el 15 % *diabetes mellitus*, el 14 % eran recién nacidos, el 8 % mujeres embarazadas, el 7 % alguna enfermedad vascular del colágeno y sólo el 14 % eran adultos previamente saludables. La baja incidencia de listeriosis en personas con SIDA, se debe probablemente al uso rutinario del cotrimoxazol en los individuos con VIH; de cualquier modo, la frecuencia de aquella enfermedad en pacientes con SIDA es 65 a 145 veces más alta que en la población general (1, 6).

iv. Tratamiento

L. monocytogenes es susceptible a la acción de múltiples antimicrobianos y su resistencia es muy ocasional, excepto en lo tocante a las tetraciclinas. No obstante, se ha comprobado que el microorganismo puede adquirir genes de resistencia procedentes de *Enterococcus spp.*, *Streptococcus* y otros, lo cual llega a aportarle tolerancia a gentamicina, estreptomina, eritromicina y sulfametoxazol (10).

Por lo general, las penicilinas, glucopéptidos, aminoglucósidos, macrólidos, el trimetoprim-sulfametoxazol y algunas quinolonas son efectivas contra *L. monocytogenes*. Cabe señalar que algunas publicaciones subrayan la ineficacia de la penicilina, pero los reportes sólo están basados en fracasos terapéuticos; de hecho, los fármacos más utilizados para tratar la listeriosis son ésta y la ampicilina: la combinación penicilina–gentamicina logra efectos sinérgicos contra el microorganismo, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo cual representa el tratamiento estándar de la listeriosis humana. Adicionalmente, diversos autores recomiendan la asociación ampicilina-cotrimoxazol, subrayando que es aún superior a la anterior, ya que reduce la mortalidad y las secuelas cerebrales (5, 10).

Diagrama 1. Patogenia asociada a la infección por *Listeria monocytogenes*.



En las situaciones clínicas comunes, *L. monocytogenes* se comporta principalmente como patógeno extracelular, lo cual sugiere que los antibióticos activos *in vitro* provocan una importante reducción de los bacilos. Sin embargo, el microorganismo también invade y sobrevive en el interior de diversos tipos celulares, lo que impacta en el aspecto terapéutico: la rifampicina, quinolonas, cotrimoxazol y ampicilina, ejercen su papel antimicrobiano en el ambiente intracelular, aunque la primera contrarresta la acción de la ampicilina contra las listerias extracelulares (11).

En cuanto a la duración apropiada del tratamiento, ésta no se ha logrado aclarar: tras dos semanas de terapia, diversos pacientes inmunocomprometidos han experimentado recurrencias, lo que ha conducido a sugerir regímenes de 3 a 6 meses para esos casos. Por otra parte, dos semanas parecen resultar suficientes para las bacteriemias, mientras que las meningitis requieren de lapsos más prolongados (10).

iv. Prevención

L. monocytogenes ha venido representando un problema cada vez mayor en el campo de la elaboración de alimentos; por ello, resultan indispensables las buenas prácticas industriales en todas las fases de la producción: procesamiento, empaquetamiento y almacenamiento. Puesto que no existen vacunas antilisterianas, las medidas vigentes de prevención y control corresponden a precauciones simples aplicables contra cualquier enfermedad de origen alimentario: la higiene personal y la adecuada higienización, cocción y almacenamiento de los alimentos. Los principios específicos incluyen (1, 5):

a) Evitar la contaminación cruzada. Antes de preparar alimentos, la persona debe lavarse bien las manos y limpiar los utensilios y las superficies destinados a picar y preparar los alimentos; es conveniente emplear un utensilio para cada alimento. La verdura, los mariscos y la carne cruda de res, cerdo, aves, pescados, etc., no deben colocarse en los sitios destinados a los alimentos cocinados.

Los alimentos deben almacenarse en refrigeración, aunque no durante lapsos muy prolongados, ya que éstos no impiden las infecciones alimentarias.

b) Destruir las bacterias potencialmente dañinas. La carne roja, aves y mariscos deben cocerse completamente para eliminar a la mayor parte de los microorganismos presentes. Las verduras deben lavarse bien y desinfectarse.

c) Otras medidas generales. No es conveniente ingerir leche bronca ni sus respectivos derivados. Además, es preciso lavar las tablas y otras superficies asociados a la preparación y manejo de los alimentos crudos.

II. EL CICLO INFECTIVO DE *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes arriba al tracto gastrointestinal, previa ingestión de alimentos contaminados y, una vez en el intestino, crece eficazmente dentro de los enterocitos y mononucleares, lo cual permite que parte de su población alcance la circulación sanguínea y se disemine por vía hematológica. La patogenia correspondiente se ha logrado estudiar *in vitro*, debido principalmente a que el bacilo es capaz de reproducirse en el interior de macrófagos y células intestinales indiferenciadas cultivados en el laboratorio (12).

El ciclo infeccioso de *L. monocytogenes* inicia con su internalización a la célula hospedera, ya sea por fagocitosis –en el caso de los macrófagos– o por fagocitosis inducida (invasión) en los fagocitos no profesionales³. En todo caso, es el propio microorganismo el que promueve su ingreso, asegura su libertad en el citosol de la célula eucarionte, prolifera eficazmente y se desplaza hacia el exterior, para inducir su ingreso a las adyacentes, sin que ello represente su exposición a la acción defensiva de anticuerpos, complemento y polimorfonucleares (PMNs) (13, 14). En concreto, los eventos implicados en el proceso infeccioso global, son (12, 14):

- i. Entrada a las células del hospedero
- ii. Escape del fagosoma y desarrollo intracelular
- iii. Desplazamiento intracitoplásmico
- iv. Diseminación célula a célula

i. Entrada a las células del hospedero

Evidentemente, la forma en que el microorganismo ingresa a las células no fagocíticas es semejante a la clásica fagocitosis, ya que implica la interacción del ligando del primero con el receptor de las segundas y toda una serie de reestructuraciones en la membrana de la célula “blanca”, las cuales se revierten mediante un mecanismo similar al cierre de los *zipper* (12, 15).

En el intestino, *L. monocytogenes* se adhiere a la mucosa intestinal, la cual posteriormente invade. Al parecer, los enterocitos y las células M ubicadas en las

³ Se clasifica como fagocitos no profesionales a todas las células del organismo que, pudiendo

Placas de Peyer representan el primer sitio de invasión pero, posteriormente, el bacilo es englobado por los macrófagos residentes, dentro de los cuales puede sobrevivir y proliferar, antes de diseminarse –por las vías linfática y sanguínea– hacia el hígado y el bazo, en donde la mayoría de su población es eliminada. No obstante lo anterior, algunas listerias sobreviven e infectan a las células adyacentes, hasta provocar cuadros sistémicos. En otras palabras, después de la invasión de la barrera intestinal, los dos tipos de células hospederas que resultan críticas en el proceso infeccioso son los macrófagos y los hepatocitos (16).

Proteínas listerianas que participan en la internalización

Las internalinas A y B y otros miembros de la familia Inl. La entrada de *L. monocytogenes* a las células epiteliales se ha estudiado ampliamente, lo que ha permitido identificar a la internalina A (InlA), proteína de 80 kDa que media la entrada bacilar a las células del epitelio intestinal humano (línea Caco-2) y a algunas otras células epiteliales. La InlA está codificada por el gen *InlA* que, a su vez, forma parte de una familia de multigenes llamada *Inl*, a la cual también pertenece el gen de la InlB, molécula proteica de 67 kDa que promueve el ingreso listeriano a los hepatocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y a otras líneas celulares, epiteliales o de fibroblastos, incluidas las HeLa, HEp-2, L2 y Vero (12, 15, 17).

Proteína p60. Esta proteína de 60 kDa se localiza en la superficie bacteriana y, además de resultar trascendental para el crecimiento celular, también participa en la invasión intestinal por *L. monocytogenes*; se trata de una mureína-hidrolasa ajena al

internalizar microorganismos, el proceso no conduce a la destrucción o inactivación de estos últimos.

regulador central de virulencia *prfA*, presente en todas las cepas virulentas. Cuando el gen que codifica para la p60 es afectado, las mutantes con bajos niveles de la proteína son filamentosas y manifiestan una pequeña o nula capacidad para invadir a las células hospederas (12).

ClpC ATPasa. Ésta pertenece a la familia de proteínas Clp (100 kDa) de shock térmico, implicadas en la tolerancia al estrés de varios microorganismos procarióticos y eucarióticos. Su papel en la invasión es el de promover el escape bacteriano del compartimiento fagosómico de los macrófagos pero, además, favorece la invasión *in vivo* de los hepatocitos, junto con la InlA, InlB y ActA (18).

Las 2 vías de internalización de *L. monocytogenes*

Ingreso mediado por la InlA. Esta vía de internalización también implica al receptor de la InlA: la caderina-E, la cual corresponde a una glicoproteína transmembranal (110 kDa) dependiente de Ca^{2+} , que se expresa principalmente en los tejidos epiteliales, incluido el del tracto digestivo. Dicha proteína sustenta la adhesión célula-célula a través de las interacciones homofílicas de sus dominios extracelulares, aunque también desempeña un papel crítico en la diferenciación de las células y en el mantenimiento de la cohesión y arquitectura del tejido (17, 19).

Al margen de la InlA, el único ligando heterofílico que reconoce a dicha caderina es la integrina humana $\alpha_E\beta_7$, que media la adhesión entre los linfocitos intraepiteliales y los enterocitos. En las células epiteliales polarizadas, la caderina-E se localiza principalmente en la membrana basolateral y se concentra en las uniones adherentes; de acuerdo con ello, el ingreso bacteriano mediado por la InlA ocurre

fundamentalmente a través de la cara basolateral (posterior) de las células epiteliales. La región extracelular de la caderina-E consta de 5 módulos, en el primero de los cuales se encuentra una secuencia (HAV), necesaria en las interacciones homofílicas (14, 19).

Los estudios recientes indican que la adhesión de *L. monocytogenes* a las células epiteliales depende de las LRRs⁴ de la InIA, las cuales reaccionan con el dominio extracelular de la caderina-E; adicionalmente, el dominio citoplásmico de esta última se asocia a las cateninas, mismas que interactúan con la actina del citoesqueleto. Es decir, la región citoplásmica de la caderina-E no interactúa con la InIA, pero se requiere para la internalización bacilar (19).

Internalización mediada por la InIB. Otro mecanismo mediante el cual *L. monocytogenes* ingresa a las células eucariontes está basado en la interacción de la InIB⁵ con su receptor gC1q-R⁶, lo que –a su vez- promueve otras reacciones trascendentales que conducen a la reestructuración de la actina del citoesqueleto. Cabe señalar que el enlace de la InIB al gC1q-R⁷ depende de la presencia de cationes divalentes y que la región N-terminal altamente ácida de este último parece contener al “blanco” de la primera. Una vez ocurrida la reacción internalina-receptor, ocurre lo siguiente (13, 14, 15):

⁴ LRRs = repeticiones ricas en leucina.

⁵ De hecho, la entrada de la bacteria a la mayoría de las líneas celulares empleadas *in vitro* no es promovida por la InIA, sino por la InIB

⁶ gC1q-R se expresa en un amplio rango de tipos celulares, incluidos los linfocitos, neutrófilos, hepatocitos y las células endoteliales.

⁷ gC1q-R debe su nombre al hecho de que antes se le identificaba como una molécula que enlazaba al componente C1q del complemento. Actualmente, se sabe que corresponde a una proteína multifuncional afín a múltiples ligandos.

- Se fosforila la tirosina de tres proteínas del hospedero: Gab1, Cb1 y Shc, con lo cual éstas activan a la 3-cinasa fosfatidil-inositol (3-cinasa PI); dicha enzima representa una de las proteínas de señalización que promueve la internalización bacteriana.
- La proteína p85 interactúa con proteínas tirosín-fosforiladas, lo que activa a las p85-p110, incrementando los niveles de fosfatidilinositol 3,4-difosfato y de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. Ambas fosfoinositidinas funcionan como segundos mensajeros y su elevada concentración afecta la curvatura de la bicapa lipídica membranosa, facilitando la internalización listeriana.

ii. Escape del fagosoma y desarrollo intracelular

Una vez que *L. monocytogenes* ha ingresado a la célula hospedera, lleva a cabo la lisis de la membrana vacuolar, con base en la acción de una potente toxina formadora de poros: la listeriolisina O (LLO), la cual promueve el escape del microorganismo antes de que ocurra la fusión fagolisosomal (20).

Sin embargo, otros factores que participan en el proceso, son: la fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC) y la ClpC ATPasa -un miembro de la familia Clp-ATPasa de proteínas de estrés que promueve el escape del fagosoma en los macrófagos-. Adicionalmente, *L. monocytogenes* produce catalasa y superóxido dismutasa, dos enzimas que la protegen de la oxidación fagolisosómica. Una vez que concretada la lisis del fagosoma, el microorganismo se libera al citosol, en donde se multiplica con un tiempo de generación de 50 minutos, lo que se considera una alta velocidad de crecimiento para un patógeno intracelular (14, 21)

Listeriolisina O (LLO). La LLO es una exoproteína antigénica (60 kDa) codificada por el gen *hly* (por *hemolysin*) y perteneciente a una gran familia de citolisinas formadoras de poros activadas por grupos sulfhidrilo, cuyo prototipo es la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*. La LLO se enlaza al colesterol de la membrana celular e inserta y oligomeriza 20 a 80 monómeros que inducen la aparición de poros (21).

Sin embargo, la LLO es, entre las citolisinas, la única producida por una bacteria intracelular, además de ser activa a bajos pHs, como los que imperan en el interior del fagolisosoma. Además, esta hemolisina es responsable de la hemólisis tipo β que caracteriza a las colonias de *L. monocytogenes* en agar sangre. A este respecto, diversos trabajos han demostrado que las escasas cepas no hemolíticas de este patógeno suelen ser avirulentas debido a que, aunque llegan a ser invasivas, son incapaces de escapar de la vacuola fagocítica (20).

Dado que la LLO presenta una actividad máxima a pH = 5 y es inactiva a pH = 7, origina escasos efectos dañinos sobre la membrana celular cuando la bacteria se encuentra libre en el citosol; su vida media es muy corta en dicho ambiente, ya que se degrada rápidamente al ser fosforilada en tres sitios de su secuencia conocida como PEST⁸ (por prolina, ácido glutámico, serina y treonina) (21).

Por último, la LLO induce la apoptosis, estimula a diversas cinasas y promueve la expresión de moléculas de adhesión y la generación de mediadores lipídicos en las células endoteliales infectadas (14, 20).

⁸ Fosforilación que no ocurre dentro de la vacuola fagocítica.

iii. Desplazamiento intracitoplásmico

En términos prácticos, puede señalarse que el microorganismo también manipula los componentes del citoesqueleto de la célula hospedera para poder transitar intracelular e intercelularmente⁹. Esta particular forma de locomoción ha recibido gran atención de la comunidad científica, debido a su similitud con diferentes eventos celulares, tales como la migración de los neutrófilos hacia los sitios de infección o la metástasis de las células cancerígenas (14, 16).

La movilidad de *L. monocytogenes* se sustenta en el hecho de que, durante el proceso de internalización, la superficie bacteriana adsorbe varios filamentos cortos de actina (situados originalmente en la membrana de la célula “blanco”), merced a la afinidad de ésta por la proteína listeriana ActA, la cual presenta una distribución polar sobre el bacilo; de esta manera, la morfología del microorganismo muestra estructuras (actínicas) semejantes a la cola de un cometa. Consecuentemente, la polimerización de la actina aporta la fuerza locomotora para que *Listeria* transite en el ambiente intracelular a velocidades de 0.05 a 0.3 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (22, 23).

En general, las colas propulsoras se constituyen por filamentos de 0.2 μm , integrados por 73 monómeros de actina interconectados entre sí y, por obvio, de la polimerización actínica dependen la fuerza y rapidez del desplazamiento bacteriano. Cabe señalar que la actina representa uno de los componentes proteicos más abundantes del citoesqueleto hospedero, y que se asocia al Ca^{2+} y a una molécula de ATP cuyo fosfato terminal se hidroliza cuando cada molécula se suma a otra (durante la polimerización) (14).

Acta. Esta proteína superficial de *L. monocytogenes* (90 kDa) se integra por 610 aminoácidos, está codificada por el gen *ActA* y consta de tres dominios (14, 23):

- El dominio N-terminal (de 1 a 234 aminoácidos), es fundamental para la polimerización de la actina en el citosol de la célula hospedera.
- Un dominio central (de 235 a 395 aminoácidos), que no es indispensable, pero actúa como estimulador de la movilidad, debido a que contiene una región con 4 pequeñas repeticiones ricas en prolina, las cuales actúan como sitios de enlace para la proteína VASP¹⁰.
- El dominio C-terminal hidrofóbico (de 396 a 610 aminoácidos), con el cual la actina reacciona para quedar fija a la superficie bacteriana.

La ActA comparte similitudes con algunas proteínas eucarióticas relacionadas con la actina del citoesqueleto: su dominio N-terminal presenta secuencias homólogas a la región C-terminal¹¹ de la vinculina, proteína humana que se asocia a las fibras de tensión y a adherencias focales (23).

Adicionalmente, el dominio N-terminal de la ActA forma homodímeros, lo cual también representa un paso crítico en la polimerización de la actina; al parecer, cada dímero se une a otro de actina y, gracias a ello, la cercanía entre los monómeros actínicos estimula el proceso de polimerización (22).

⁹ Al ingresar a la célula hospedera, *L. monocytogenes* pierde sus flagelos.

¹⁰ A su vez, la VASP se enlaza a otra molécula hospedera, la profilina, y ambas proteínas influyen en la velocidad de polimerización de la actina

¹¹ La región C-terminal de la vinculina es la encargada de enlazarse a la actina.

ActA y su interacción con proteínas hospederas. El hecho de que la ActA predomine en uno de los polos bacterianos y sea muy escasa en el opuesto, determina la dirección del movimiento. Evidentemente, para promover el desplazamiento bacilar, dicha molécula no sólo interactúa con la actina, sino con otras diversas proteínas del citoesqueleto hospedero, destacando la VASP, la profilina y las Arp2/Arp3 (por proteínas relacionadas con la actina), a todas las cuales se les ha logrado detectar formando parte de las colas actínicas, cercanas a la superficie de *Listeria* (12, 22).

La VASP (46-50 kDa) se enlaza a la región central de la ActA y, al mismo tiempo, lo hace a la profilina, con lo cual contribuye a una eficaz polimerización de la actina; en cuanto a la profilina (15 kDa), se une a los monómeros de actina y regula el ensamble de los filamentos actínicos. Por su parte, al complejo Arp2/Arp3 (43 kDa y 50 kDa, respectivamente) se ha localizado, tanto cerca de la superficie bacteriana como a lo largo de la cola de actina y, al parecer, se encarga de llevar a cabo la interconexión de los filamentos, a través de pequeñas ramificaciones (22).

Lógicamente, la continuidad de la polimerización actínica durante el tránsito intracelular de *L. monocytogenes* requiere de la secuencial despolimerización de los filamentos para el permanente reciclaje de las subunidades monoméricas. En tales eventos sobresale la participación de otras proteínas del hospedero, sobresaliendo la gelsolina, el factor despolimerizador de actina (ADF) y la cofilina.

La gelsolina se adhiere a los extremos (+) de los filamentos de actina¹² y los escinde en pequeños fragmentos y monómeros, lo cual –a su vez– incrementa la velocidad de ensamble de las colas y la propia migración intracelular de la bacteria, debido a que contribuye eficazmente al óptimo reciclaje de los monómeros actínicos. En cuanto al ADF y la cofilina, su papel es análogo al de la gelsolina, aunque lo desempeñan uniéndose a los extremos (–) de los filamentos de actina (12).

iv. Diseminación célula a célula

Incuestionablemente, la adquisición de movilidad asociada a filamentos actínicos tiene como su principal propósito el de que *Listeria* pueda invadir a otras células del hospedero; en concreto, una vez que ha proliferado en el citosol de su primer “blanco”, los bacilos se desplazan hacia la membrana celular de éste y la “empujan” progresivamente (con base en la polimerización actínica de las colas que ha adsorbido), provocando que produzca prolongaciones alargadas, llamadas filópodos o protrusiones, desde cuyo interior continúan ejerciendo presión; de esta manera, dichas proyecciones terminan siendo “fagocitadas” por la célula adyacente¹³, con lo cual la bacteria volverá a quedar encerrada dentro de un fagosoma (secundario), esta vez de doble membrana, del cual procederá a escapar y a repetir los eventos que protagonizó anteriormente (14, 16).

Cabe señalar que, tanto en la formación de las protrusiones como en el propio englobamiento de estas últimas por parte de la célula adyacente, es posible que la

¹² Cada filamento se integra por 2 cadenas de monómeros de actina enrollados en espiral y sólo crece en su extremo (+), obedeciendo a la localización de la molécula de ATP asociada al monómero de más reciente incorporación.

¹³ Otra célula epitelial, macrófago o hepatocito.

ActA desempeña alguna función primaria aún desconocida. Sin embargo, el papel indirecto de dicha proteína es inobjetable ya que, durante la formación de las protrusiones, las colas actínicas ligadas al microorganismo vuelven a insertarse, vía su región (+), a la membrana celular del primer “blanco”; en otras palabras, a partir de ese momento y hasta su escape del fagosoma de la célula adyacente, el bacilo se encuentra acoplado a la membrana eucarionte (22, 23).

Adicionalmente, tampoco se ha logrado identificar a las moléculas de superficie que median la interacción “célula hospedera–célula hospedera” durante el proceso que engloba a la protrusión, ni si aquélla incluye algún proceso activo o pasivo dependiente de la célula que fungirá como receptora de listerias. Por el contrario, recientemente se han reconocido 3 factores bacterianos implicados en la lisis de la vacuola de doble membrana: dos fosfolipasas (la lecitinasa y la PI-PLC) y una metaloproteasa (Mpl) (24, 25).

Lecitinasa. También conocida como fosfolipasa C fosfatidilcolina-específica (PC-PLC), ésta corresponde a una exoproteína codificada por el gen *plcB* que, en su forma activa, provoca la destrucción de la vacuola de doble membrana, vía la hidrólisis de los lípidos de membrana tales como la fosfatidilcolina (PC). Su actividad óptima se manifiesta a pH de 5.5 a 7, actúa sobre un amplio rango de sustratos, particularmente sobre la PC, y se puede ligar a una gran variedad de fosfolípidos, incluidos la esfingomielina, la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina y los liposomas (24).

La lecitinasa es secretada como un precursor inactivo (proPC-PLC) de 33 kDa, a partir del cual una escisión proteolítica en su región N-terminal genera la forma activa. Dicha activación puede ocurrir por alguno de dos mecanismos: el primero depende precisamente de la Mpl, dependiente de zinc, en tanto que, el segundo, es mediado por una proteasa de cisteína (24).

Fosfolipasa C fosfatidilinositol-específica (PI-PLC). A diferencia del mecanismo lítico utilizado por la LLO, esta enzima (33 kDa) afecta a la membrana celular de las células hospederas hidrolizando al lípido de membrana PI (fosfatidilinositol). Además, está codificada por el gen *plcA*, desempeña un papel importante en el escape bacilar de las vacuolas de doble-membrana y su actividad catalítica es necesaria en otras numerosas funciones intracelulares de *L. monocytogenes* (25).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acheson D.: Foodborne Listeriosis, Clin Infec Dis, 2000; 31: 770-775.
2. Dorozynski A.: Seven die in French *Listeria* outbreak, BMJ, 2000; 320:601.
3. Miettinen M.K., Siitonen A., Heiskanen P., Haajanen H., Björkroth K.J. and Korkeala H.: Molecular Epidemiology of an Outbreak of febrile Gastroenteritis Caused by *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Rainbow Trout, J Clin Microbiol, 1999; 37: 2358-2360.
4. Payán A. y Astudillo M.: Listeriosis neonatal: ¿enfermedad poco frecuente o no diagnosticada? Enfoque Microbiológico, Colombia Médica, 1994; 25: 69-72.
5. Hof H., Nichterlein T. and Kretschmar M.: Management of Listeriosis, Clin Microbiol Rev, 1997; 10: 345-357.
6. Julián A., Jiménez A., Góngolas M., Fernández R. y Fernández M.L.: Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante, Enferm Infec Microbiol Clin, 2001; 19 :297-303.
7. Lyytikäinen O., Autio T., Maijala R., Ruutu P., Honkanen B.T., Miettinen M., Hatakka M., Mikkola J., Anttila V.J., Johansson T., Rantala L., Aalto T., Korkeala H. and Siitonen A.: An Outbreak of *Listeria monocytogenes* Serotype 3a Infections from Butter in Finland, J Infect Dis, 2000; 181: 1838-1841.

8. Mirón M., Feraz S., Mellado J.M., Vidal F., Veloso S. y Richard C.: Coma vigil tras meningitis por *Listeria monocytogenes*, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2002; 127-128.
9. Monge R. and Arias-Echandi M.L.: Presence of *Listeria monocytogenes* in fresh salad vegetables, *Rev Biomed*, 1999; 10: 29-31.
10. Charpentier E. and Courvalin P.: Antibiotic Resistance in *Listeria spp*, *Antimicrob Ag Chemother*, 1999; 43: 2103-2108.
11. Morse R., O'Hanlon K., Virji M. and Collins M.D.: Isolation of Rifampin-resistant Mutants of *Listeria monocytogenes* and their Characterization by *rpoB* Gene Sequencing, temperature Sensitivity for Growth, and Interaction with an Epithelial Cell Line, *J Clin Microbiol*, 1999; 37: 2913-2919.
12. Ireton K. and Cossart P.: Host-Pathogen Interactions During Entry and Actin-Based movement of *Listeria monocytogenes*; *Annu Rev Genet*, 1997; 31: 113-138.
13. Braun L., Ghebrehiwet B. and Cossart P.: gC1-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*, *EMBO*, 2000; 19: 1458-1466.
14. Cossart P. and Lecuit M.: Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling, *EMBO*, 1998; 17: 3797-3806.
15. Ireton K., Payrastra B. and Cossart P.: The *Listeria monocytogenes* Protein InlB is an Agonist of Mammalian Phosphoinositide 3-Kinase, *J Biol Chem*, 1999; 274: 17025-17032.
16. Robbins J.R., Barth A.I., Marquis H., Hostos E.L., Nelson W.J. and Theriot J.A.: *Listeria monocytogenes* Exploits Normal Host Cell Processes to Spread from Cell to Cell, *J Cell Biol*, 1999; 146: 1333-1349.
17. Lecuit M., Ohayon H., Braun L., Mengaud J. and Cossart P.: Internalin of *Listeria monocytogenes* with an Intact Leucine-Rich Repeat Region is Sufficient to Promote Internalization, *Infec Immun*, 1997; 65: 5309-5319.
18. Nair S., Milohanic E. and Berche P.: ClpC ATPase is Required for Cell Adhesion and Invasion of *Listeria monocytogenes*, *Infec Immun*, 2000; 68: 7061-7068.
19. Lecuit M., Dramsi S., Gottardi C., Fedor-Chaiken M., Gumbiner B. and Cossart P.: A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*, *EMBO*, 1999; 18: 3956-3963.
20. Dubail I., Berche P., The European *Listeria* Genome Consortium and Charbit A.: Listeriolysin O as a Reporter to Identify Constitutive and In Vivo-Inducible Promoters in the Pathogen *Listeria monocytogenes*, *Infec Immun*, 2000; 68: 3242-3250.

21. Decatur A.L., and Portnoy D.A.: A PEST-like Sequence in Listeriolysin O Essential for *Listeria monocytogenes* Pathogenicity, *Science*, 2000; 290: 992-995.
22. Cameron L.A., Footer M.J., Oudenaarden Van A. and Theriot J.A.: Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization, *Proc Natl Acad Sci*, 1999; 96: 4908-4913.
23. Cicchetti G., Maurer P., Wagener P. and Kocks C.: Actin and Phosphoinositide Binding by the ActA Protein of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*, *J Biol Chem*, 1999; 274: 33616-33626.
24. Marquis H., Goldfine H. and Portnoy D.A.: Proteolytic Pathways of Activation and Degradation of Bacterial Phospholipase C during Intracellular Infection by *Listeria monocytogenes*, *J Cell Biol*, 1997; 137: 1381-1392.
25. Bannam T. and Goldfine H.: Mutagenesis of Active-Site Histidines of *Listeria monocytogenes* Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C: Effects on Enzyme Activity and Biological Function, *Infect Immun*, 1999; 67: 182-186.