

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y
PRODUCCIONES ANIMALES

PATOGENIA DE LA LISTERIOSIS MURINA EXPERIMENTAL

ALBERTO MARCO VALLE

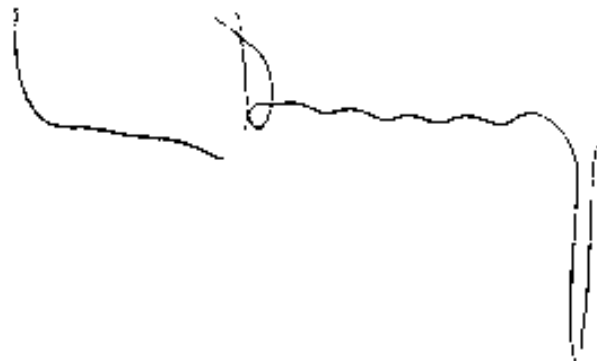


Bellaterra 1990

DON MARIANO DOMINGO ALVAREZ, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y PRODUCCIONES ANIMALES DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral que lleva por título
PATOGENIA DE LA LISTERIOSIS MURINA EXPERIMENTAL,
de la que es autor el Licenciado en Veterinaria
Dn. ALBERTO J. MARCO VALLE, se ha realizado en
los laboratorios de la Unidad de Histología y
Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria
de la Universidad Autónoma de Barcelona bajo mi
dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo
la presente en Bellaterra a 4 de Septiembre de
1990.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Alvarez', is written over a large, faint rectangular stamp or box. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1. Etiología. Consideraciones taxonómicas. Cultivo y aislamiento. Hábitat	3
2.1.1. Taxonomía	3
2.1.2. Características morfológicas y estructurales del género	3
2.1.3. Características de cultivo	4
2.1.4. Producción de hemolisina	5
2.1.5. Aislamiento	6
2.1.6. Hábitat	7
2.2. Patogenia de la infección natural de la listeriosis. Síndrome nervioso, septicémico y abortivo. Otras manifestaciones. Cuadro clínico y lesional	9
2.2.1. Síndrome nervioso	11
2.2.1.1. La encefalitis en la listeriosis	12
2.2.1.1.1. Patogenia	12
2.2.1.1.2. Lesiones anatomopatológicas	13
2.2.1.1.3. Signos y manifestaciones clínicas	14
2.2.1.2. Meningitis listérica	16
2.2.2. Aborto y muerte neonatal en la listeriosis	17
2.2.2.1. Patogenia. Cuadro clínico y lesional	18
2.2.3. Septicemia en la listeriosis	21
2.2.4. Conjuntivitis-Queratoconjuntivitis	24
2.2.5. Mastitis	24
2.2.6. Listeriosis cutánea	26
2.3. Vías de infección	27
2.4. Factores condicionantes de la infección por <u>Listeria</u> <u>spp.</u>	29
2.4.1. Edad	30
2.4.2. Especie	31
2.4.3. Gestación	31
2.4.4. Estado inmunitario	32
2.4.5. Ensilado	33
2.5. Listeriosis murina	34
2.5.1. La listeriosis murina como modelo experimental .	34
2.5.2. Curso y caracterización de la infección listérica	

experimental	35
2.5.2.1. Caracterización de la infección mediante la realización de cultivos microbiológicos de hígado y bazo. Vías intravenosa e intraperitoneal	36
2.5.2.2. Estudio histopatológico de la infección	37
2.5.3. Inmunidad	39
2.5.3.1. Inmunidad inespecífica	40
2.5.3.1.1. Sistema mononuclear fagocítico (SMF)	41
2.5.3.1.2. Polimorfonucleares neutrófilos (PMNNs)	44
2.5.3.1.3. Sistema del complemento	45
2.5.3.1.4. Células asesinas naturales (AN)	46
2.5.3.1.5. Activación plaquetaria por <u>L.monocytogenes</u> .	47
2.5.3.1.6. Valoración de la inmunidad inespecífica en la listeriosis murina y su relación con la displasia tímica congénita y la esplenectomía experimental	48
2.5.3.2. Inmunidad específica	52
2.5.3.2.1. Los Lts T en la infección listérica. Cinética	54
2.5.3.2.2. Interacción Lt T - M0. Activación macrofágica	56
2.5.4. Factores condicionantes de la listeriosis murina experimental	60
2.5.4.1. Dosis del inóculo	60
2.5.4.2. Vía de inoculación	63
2.5.4.3. Estirpe murina	66
2.5.4.3.1. Fundamento de la superioridad del SMP de las estirpes murinas listeria-resistentes	67
2.5.4.4. Especie/Serotipo	71
3. MATERIAL Y METODOS	74
3.1. Material	74
3.1.1. Animales de experimentación	74
3.1.1.1. Ratones	74
3.1.1.2. Conejos	74
3.1.2. Cepas de listeria	74
3.1.3. Inóculo	75
3.1.3.1. Preparación del inóculo	75
3.1.3.2. Dosis de inoculación	75
3.1.4. Antisueros	75
3.2. Métodos	76
3.2.1. Pauta de sacrificio	76
3.2.2. Necropsia	76
3.2.3. Procesamiento de muestras	77
3.2.3.1. Fijación y desmineralización	77
3.2.3.2. Inclusión	78
3.2.3.3. Microtomía	78
3.2.4. Técnicas histológicas	79
3.2.4.1. Hematoxilina-Eosina	79
3.2.4.2. Técnica de Gram	79
3.2.5. Técnicas inmunohistológicas. Técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa	79

3.2.5.1. Titulación del primer antisuero	80
3.2.5.2. Controles de la técnica PAP	81
4. RESULTADOS	82
4.1. Introducción	82
4.1.1. Vía intraperitoneal	82
4.1.2. Vías subcutánea y oral	83
4.1.3. Plan y ordenación de las diferentes experiencias realizadas	84
4.2. Vía intraperitoneal	85
4.2.1. Experiencias de duración reducida	85
4.2.2.1. EXPERIENCIA 1	85
4.2.1.1.1. Bazo	85
4.2.1.1.2. Ganglios linfáticos	86
4.2.1.1.2.1. G.yeyunal	86
4.2.1.1.2.2. Linfocentro lumbar	86
4.2.1.1.2.3. G.gástrico	87
4.2.1.1.2.4. Linfocentro mandibular	87
4.2.1.1.2.5. Linfocentro mediastínico	87
4.2.1.1.3. Placas de Peyer	87
4.2.1.1.4. Timo	88
4.2.1.1.5. Hígado	89
4.2.1.1.6. Páncreas	89
4.2.1.1.7. Peritoneo	90
4.2.1.1.8. Mediastino	90
4.2.1.1.9. Otros órganos	90
4.2.1.2. EXPERIENCIA 2	90
4.2.1.2.1. Bazo	91
4.2.1.2.2. Ganglios linfáticos	92
4.2.1.2.3. Timo	94
4.2.1.2.4. Placas de Peyer	95
4.2.1.2.5. Hígado	95
4.2.1.2.6. Peritoneo	96
4.2.1.2.7. Sistema genital	97
4.2.1.2.8. Páncreas	97
4.2.1.2.9. Otros órganos	97
4.2.2. Experiencias de duración normal	98
4.2.2.1. EXPERIENCIA 3	98
4.2.2.1.1. Bazo	98
4.2.2.1.2. Ganglios linfáticos	99
4.2.2.1.2.1. G.yeyunal	99
4.2.2.1.2.2. Linfocentro lumbar	99
4.2.2.1.2.3. G.gástrico	99
4.2.2.1.2.4. Linfocentro mandibular	99
4.2.2.1.2.5. Linfocentro mediastínico	100

4.2.2.1.3. Placas de Peyer	100
4.2.2.1.4. Timo	100
4.2.2.1.5. Hígado	100
4.2.2.1.6. Sistema cardiorrespiratorio	101
4.2.2.1.7. Peritoneo	101
4.2.2.2. EXPERIENCIA 4	101
4.2.2.2.1. Bazo	101
4.2.2.2.2. Ganglios linfáticos	103
4.2.2.2.2.1. G.yeyunal	104
4.2.2.2.2.2. Gs.renales, ilíacos y gástrico	104
4.2.2.2.2.3. Linfocentro mandibular	104
4.2.2.2.2.4. Linfocentro mediastínico	105
4.2.2.2.3. Placas de Peyer	105
4.2.2.2.4. Timo	105
4.2.2.2.5. Hígado	105
4.2.2.2.6. Sistema cardiorrespiratorio	106
4.2.2.2.7. Peritoneo	106
4.2.2.3. EXPERIENCIA 5	107
4.2.2.3.1. Bazo	108
4.2.2.3.2. Ganglios linfáticos	108
4.2.2.3.2.1. G.yeyunal	108
4.2.2.3.2.2. Linfocentro lumbar	109
4.2.2.3.2.3. G.gástrico	109
4.2.2.3.2.4. Linfocentro mandibular	109
4.2.2.3.2.5. Linfocentro mediastínico	109
4.2.2.3.3. Placas de Peyer	109
4.2.2.3.4. Timo	110
4.2.2.3.5. Hígado	110
4.2.2.3.6. Páncreas	111
4.2.2.3.7. Sistema cardiorrespiratorio	111
4.2.2.3.8. Mediastino	112
4.2.2.3.9. Peritoneo	112
4.2.2.4. EXPERIENCIA 6	113
4.2.2.4.1. Bazo	113
4.2.2.4.2. Ganglios linfáticos	114
4.2.2.4.2.1. G.yeyunal	114
4.2.2.4.2.2. Linfocentro lumbar	115
4.2.2.4.2.3. G.gástrico	115
4.2.2.4.2.4. Linfocentro mandibular	115
4.2.2.4.2.5. Linfocentro mediastínico	116
4.2.2.4.3. Timo	116
4.2.2.4.4. Placas de Peyer	116
4.2.2.4.5. Hígado	117
4.2.2.4.6. Corazón	117
4.2.2.4.7. Pulmones	118
4.2.2.4.8. Páncreas	119
4.2.2.4.9. Sistema genital	119
4.2.2.4.10. Peritoneo	119
4.2.2.5. EXPERIENCIA 7	120
4.2.2.5.1. Bazo	120

4.2.2.5.2. Ganglios linfáticos	121
4.2.2.5.2.1. G.yeyunal	121
4.2.2.5.2.2. Linfocentro lumbar	122
4.2.2.5.2.3. G.gástrico	122
4.2.2.5.2.4. Linfocentro mediastínico	122
4.2.2.5.2.5. Linfocentro mandibular	122
4.2.2.5.3. Timo	123
4.2.2.5.4. Placas de Peyer	123
4.2.2.5.5. Hígado	123
4.2.2.5.6. Corazón	125
4.2.2.5.7. Pulmones	125
4.2.2.5.8. Mediastino	125
4.2.2.5.9. Peritoneo	126
4.2.2.6. EXPERIENCIA 8	126
4.2.2.6.1. Bazo	126
4.2.2.6.2. Ganglios linfáticos	128
4.2.2.6.2.1. G.yeyunal	128
4.2.2.6.2.2. Linfocentro lumbar	129
4.2.2.6.2.3. G.gástrico	129
4.2.2.6.2.4. Gs.mandibulares	129
4.2.2.6.2.5. Gs.mediastínicos	129
4.2.2.6.3. Placas de Peyer	130
4.2.2.6.4. Timo	130
4.2.2.6.5. Hígado	130
4.2.2.6.6. Páncreas	131
4.2.2.6.7. Sistema genital	131
4.2.2.6.8. Peritoneo	132
4.2.2.7. EXPERIENCIA 9	132
4.2.2.7.1. Organos linfoides	133
4.2.2.7.2. Hígado	133
4.2.2.7.3. Otros órganos	134
4.2.3. Drenaje linfático de una suspensión de carbón coloidal (Tinta China) tras inoculación i.p. ...	134
4.3. Vía subcutánea	135
4.3.1. EXPERIENCIA 10	135
4.3.1.1. Bazo	135
4.3.1.2. Ganglios linfáticos	136
4.3.1.2.1. G.yeyunal	136
4.3.1.2.2. Linfocentro lumbar	137
4.3.1.2.3. G.gástrico	137
4.3.1.2.4. Linfocentro mandibular	137
4.3.1.2.5. Linfocentro mediastínico	138
4.3.1.2.6. Gs.inguinales superficiales	138
4.3.1.3. Placas de Peyer	138
4.3.1.4. Timo	139
4.3.1.5. Hígado	139
4.3.1.6. Corazón	140
4.3.1.7. Pulmones	140

4.3.1.8. Sistema genital	140
4.3.1.9. Médula ósea	141
4.3.1.10. Otros órganos	141
4.3.2. EXPERIENCIA 11	141
4.3.2.1. Bazo	142
4.3.2.2. Ganglios linfáticos	143
4.3.2.2.1. G.yeyunal	143
4.3.2.2.2. Linfocentro lumbar	143
4.3.2.2.3. G.gástrico	144
4.3.2.2.4. Linfocentro mandibular	144
4.3.2.2.5. Linfocentro mediastínico	144
4.3.2.2.6. Gs.inguinales superficiales	145
4.3.2.3. Placas de Peyer	145
4.3.2.4. Timo	145
4.3.2.5. Hígado	145
4.3.2.6. Corazón	146
4.3.2.7. Sistema genital	146
4.3.2.8. Peritoneo	147
4.3.2.9. Médula ósea	147
4.3.2.10. Otros órganos	147
4.3.3. EXPERIENCIA 12	148
4.4. Vía oral (intragástrica)	149
4.4.1. EXPERIENCIA 13	149
4.5. Evolución de la infección murina experimental con <u>L.monocytogenes</u> y <u>L.ivanovii</u> mediante el uso de la vía intraperitoneal	151
4.6. Evolución de la infección murina experimental con <u>L.monocytogenes</u> y <u>L.ivanovii</u> mediante el uso de la vía subcutánea	156
5. DISCUSION	162
6. CONCLUSIONES	189
7. BIBLIOGRAFIA	191
8. ANEXO	217
9. AGRADECIMIENTOS	222

1. INTRODUCCION.

La listeriosis ha adquirido una notable relevancia para la salud pública en los últimos años.

Si bien el poder patógeno de L.monocytogenes para individuos inmunodeprimidos era conocido desde hace décadas, han sido los recientes episodios de infecciones alimentarias causadas por esta bacteria, con morbilidad y mortalidad significativas, los que han mostrado que el padecimiento de la enfermedad era también igualmente posible en individuos con sistema inmunitario aparentemente no alterado.

Ello ha motivado la realización de numerosos estudios sobre la epidemiología de la infección, en particular sobre la presencia de bacterias del género Listeria en los alimentos para consumo humano. Desde el punto de vista de la patología comparada, la infección experimental murina ha aportado valiosos datos para el conocimiento de la patogenia de la listeriosis.

La listeriosis murina experimental es pues un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la interacción de los agentes patógenos bacterianos de carácter intracelular y el sistema inmunitario del hospedador. Los estudios realizados con este modelo han colaborado a esclarecer la importancia de los diferentes mecanismos de inmunidad inespecífica y específica en el control y superación de la infección.

A pesar de la extensa utilización para estos estudios inmunológicos del modelo experimental de la listeriosis murina, son escasos los estudios morfológicos que ilustren la relación hospedador-microorganismo. Es sobre todo llamativa la casi total ausencia en la bibliografía de referencias a las alteraciones producidas por la bacteria en los órganos del sistema inmunitario, alteraciones que, en mayor o menor grado, están generalmente presentes en las infecciones por bacterias patógenas de carácter intracelular. Esta ausencia es tanto más relevante, al ser en este caso la listeriosis murina un modelo experimental de estudio de la respuesta inmunitaria en este tipo de infecciones.

El presente trabajo tiene como objetivo principal proporcionar una descripción precisa de las lesiones causadas por L.monocytogenes y L.ivanovii en la infección murina experimental, así como de su existencia y distribución en los diferentes órganos y sistemas, poniendo especial énfasis en los órganos linfoides. Con esta finalidad se hace uso de técnicas histopatológicas rutinarias y de técnicas inmunohistológicas identificadoras de antígenos de las mencionadas especies de listerias en el organismo, aplicadas a diversos experimentos que surgen de

combinar factores condicionantes de la infección como son la vía de inoculación (intraperitoneal, subcutánea e intragástrica), la serovariedad y especies patógenas de listerrias, y la dosis de inoculación empleada.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1. Etiología. Consideraciones taxonómicas. Cultivo y aislamiento. Hábitat.

2.1.1. Taxonomía.

- La Listeriosis es una enfermedad de presentación esporádica, ampliamente distribuida en la naturaleza, que afecta a gran número de mamíferos y especies de aves tanto domésticos como salvajes, así como a la especie humana.

La primera descripción de la bacteria ahora conocida como Listeria monocytogenes, fue realizada por Murray y col. en 1926, quienes la denominaron Bacterium monocytogenes (Citado por GRAY y KILLINGER, 1966). Posteriormente, en 1927, Pirie propondrá con éxito el cambio de su nomenclatura, pasando a denominarse entonces Listerella hepatolytica, en honor del ilustre bacteriólogo Lord Lister. No obstante, y debido a consideraciones puramente taxonómicas surgidas en el Tercer Congreso Internacional de Microbiología de 1939, Pirie, en 1940, sugiere el que será ya definitivo nombre para el género bacteriano que nos ocupa. Esta denominación fue oficial e internacionalmente aceptada en 1954 (Citado por GRAY y KILLINGER, 1966).

Actualmente, el género Listeria se incluye en la familia Corynebacteriaceae y posee siete especies internacionalmente aceptadas: L.monocytogenes, L.ivanovii, L.innocua, L.welshimeri, L.seeligeri, L.grayi y L.murrayi (ROCOURT y SEELIGER, 1985; SEELIGER y JONES, 1986; ROCOURT y col., 1987).

2.1.2. Características morfológicas y estructurales del género.

Las listerias son microorganismos Gram + , no ácido-alcohol resistentes, no esporulados y genéricamente no encapsulados. Poseen una dotación de flagelos peritricos y polares en número variable en función de la especie de listeria y de las condiciones de Tª del medio. La expresión de flagelos es óptima entre 20-25°C, disminuyendo e incluso anulándose la dotación flagelar, así como sus características de motilidad, conforme nos desviamos de dicha Tª (GRAY y KILLINGER, 1966; SEELIGER y JONES, 1986; RISPING y AMTSBERG, 1988). No obstante, "in vivo", las cepas patógenas de L.monocytogenes parecen poseer dotación flagelar, ya que Acs contra Acs H flagelares son constantemente producidos durante la infección (HOF y CHATZIPANAGIOTOU, 1987).

Las bacterias del Género *Listeria*, tradicionalmente descritas como de morfología bacilar (1,5-2 x 0,5 μ m), poseen no obstante cierto grado de pleomorfismo en función de la edad del medio de cultivo y de la procedencia de la *listeria* en cuestión. Así, se observa como usualmente adoptan una morfología cocoide o cocobacilar cuando se procede a su aislamiento de material biológico infectado tanto natural como experimentalmente, o cuando se obtienen de medio de cultivo reciente. En estos casos, su aspecto es muy similar al observado en las especies del género *Streptococcus* (GRAY y KILLINGER, 1966; PRENTICE y NEAVES, 1988).

2.1.3. Características de cultivo.

Las bacterias del género *Listeria* no son microorganismos especialmente exigentes en cuanto a su crecimiento en medios de cultivo artificiales. Según la ya clásica revisión de Gray y Killinger (1966), los medios de agar triptosa y agar sangre son excelentes substratos para el cultivo y preservación de las diferentes especies bacterianas de este género.

Entre sus características de cultivo más relevantes, hay que destacar que se desarrollan adecuadamente en un rango de Tª que puede oscilar entre 3-45°C, presentando un desarrollo óptimo a 30-37°C (GRAY y KILLINGER, 1966; DOYLE, 1988; BISPING y AMTSBERG, 1988).

Proliferan favorablemente en medios de cultivo cuyo pH oscila entre los márgenes 5,0-9,6, siendo incapaces de desarrollarse a valores de pH inferiores a 5,0 (DOYLE, 1988). No obstante, algunos investigadores constatan que el crecimiento de *L.monocytogenes* es posible en medios de cultivo con pH de hasta 4,4 y a 20°C de Tª durante 14 días (GEORGE y col., 1988; LOVETT, 1989). Adicionalmente, son organismos aerobios o microaerófilos, evolucionando hasta en ambientes con un 10% de dióxido de carbono (DOMINGUEZ, 1984; DOYLE, 1988).

En condiciones ambientales adversas, las bacterias del género *Listeria* poseen capacidad para desarrollar formas L "resistentes", desprovistas de protección mural, pero con posibilidad de reversión a la normalidad cuando los parámetros medioambientales son favorables (GRAY y KILLINGER, 1966).

Así por ejemplo, el cultivo en medios artificiales en presencia de suero antilisteria, complemento, lisozima, penicilina o, también, el hecho en sí mismo de infección natural o experimental, han sido descritos como factores de inducción de la forma L de *Listeria* (BREM y EVELAND, 1968).

Desde que Suchanova y col. en 1957 (Citado por DOMINGUEZ, 1984), lograran demostrar por primera vez de manera fiable la inducción de la forma L de *Listeria*, las especulaciones referentes a la importancia y significado que ésta tienen sobre la epidemiología de la enfermedad no han cesado. Por lo demás, todavía no existe evidencia convincente de inducción experimental de la enfermedad mediante la variante L de *Listeria* (GRAY y KILLINGER, 1966; DOMINGUEZ, 1984; SEELIGER y JONES, 1986).

2.1.4. Producción de hemolisina.

Estudios experimentales han demostrado que algunas especies del género *Listeria* tienen capacidad para elaborar una o más hemolisinas (citolisinas) que pueden provocar lisis en eritrocitos de varias especies de mamíferos y también de membranas biológicas de eucariotas en general (GRAY y KILLINGER, 1966; BERCHE y col., 1987a; LEIMEISTER-WACHTER y col., 1987; KATHARIOO y col., 1988; VAZQUEZ-BOLAND y col., 1989; COSSART y MENGAUD, 1989).

Hasta el presente, han sido caracterizadas una citolisina de *L.monocytogenes*, denominada listeriolisina O - cuyo ph de actividad óptima es de 5,5 - (COSSART y MENGAUD, 1989), y dos de *L.ivanovii*, denominadas ivanolisina O y esfingomielinasa C (VAZQUEZ-BOLAND y col., 1989). No obstante, hay indicios fehacientes de la existencia de otras citolisinas de *L.monocytogenes* todavía no bien conocidas (LEIMEISTER-WACHTER y col., 1987).

De la listeriolisina O ha sido caracterizado también recientemente (MENGAUD y col., 1989a) el gen hly A que codifica y regula su síntesis. La existencia de secuencias nucleotídicas homólogas entre el genoma de *L.ivanovii* y *L.seeligeri*, y el gen hly A de *L.monocytogenes* ha evidenciado que las hemolisinas de estas tres especies del género *Listeria* están evolutivamente relacionadas (GORMLEY y col., 1989).

De *Listeria* spp., sólo tres poseen en grado variable actividad hemolítica: *L.ivanovii*, *L.monocytogenes* y *L.seeligeri*.

L.ivanovii es la única que puede ser significativamente diferenciada de otras cepas hemolíticas por la producción de una amplia zona de hemólisis cuando se desarrolla en agar sangre (ROCOURT y SEELIGER, 1987; LOVETT, 1988a; VAZQUEZ-BOLAND y col., 1989; COSSART y MENGAUD, 1989). Esta característica ha sido utilizada reiteradamente como criterio para la diferenciación, con valor diagnóstico, de las diferentes especies de listerias; además es un carácter indicador de patogenicidad (DOMINGUEZ y col., 1986; ROCOURT y SEELIGER, 1987; BERCHE y col., 1987a; KATHARIOO y

col., 1988; LOVETT, 1988a; KAUFMANN, 1988a). Técnicas adicionales como el test de CAMP, son comúnmente empleadas para la confirmación del diagnóstico (MCLAUCHLIN y col., 1986; LOVETT, 1988a; SCHÖNBERG, 1989).

La importancia de la actividad β -hemolítica de L.monocytogenes y L.ivanovii es debida a que tradicionalmente ha sido considerada como factor esencial de patogenicidad y, por tanto, se asocia con su capacidad para producir enfermedad (ROCCOURT y SEELIGER, 1987; BERCHE y col., 1987a y b; SCHLECH, 1988; KHUN y col., 1988; SCHÖNBERG, 1989; MENGAUD y col., 1989b; COSSART y col., 1989; COSSART y MENGAUD, 1989.). No obstante, estudios recientes (KATHARIOO y col., 1988; COSSART y MENGAUD, 1989) parecen evidenciar que dicha capacidad no depende de manera intrínseca de la posesión de actividad hemolítica, si bien si existe una demostrada asociación entre ambas.

De hecho, todas las cepas aisladas de casos clínicos naturales poseen actividad hemolítica cuando son testadas a tal efecto. En concordancia con ello, las cepas no hemolíticas son invariablemente apatógenas cuando se intenta reproducir la infección experimental listérica in vivo (DOMINGUEZ, 1984; BERCHE y col., 1987a; KATHARIOO y col., 1988; KHUN y col., 1988; COSSART y MENGAUD, 1989).

En cualquier caso, no hay que olvidar que L.seeligeri, aun poseyendo actividad hemolítica, no tiene, contrariamente, caracter patógeno. Este hecho no es bien comprendido todavía en la actualidad (ROCCOURT y SEELIGER, 1987; GORMLEY y col., 1989; COSSART y MENGAUD, 1989).

2.1.5. Aislamiento.

Aunque las bacterias del género *Listeria* no son especialmente exigentes en cuanto a medios de cultivo, el aislamiento y detección inicial de las diferentes especies de listerias a partir de material contaminado (heces, ensilado, alimentos de consumo humano, muestras de origen clínico, efluentes y aguas residuales, etc.), supone mayores niveles de dificultad.

Mediante múltiples variaciones y combinaciones de los parámetros de la técnica de cultivo y aislamiento microbiológicos (medios de enriquecimiento, agentes selectivos, T² y tiempo de incubación, etc.), una gran diversidad de protocolos de aislamiento para el género Listeria han sido elaborados y probados en las dos últimas décadas (GRAY y KILLINGER, 1966; DOMINGUEZ y col., 1984; PRENTICE y NEAVES, 1988; DOYLE y SCHOENI, 1986; SLADE y COLLINS-THOMPSON, 1987; DOYLE y SCHOENI, 1987; LOVETT, 1988a; LOVETT, 1989).

El agar triptosa y el agar *Listeria* de McBride, son los medios base de cultivo más generalmente empleados y el ácido nalidíxico el agente selectivo mayoritariamente recomendado (PRENTICE y NEAVES, 1988).

Adicionalmente y con frecuencia en asociación con el ácido nalidíxico, otras sustancias son comúnmente propuestas para optimizar el grado de selectividad del medio: acriflavina, telurito potásico, acetato de talio, tiocianato potásico, cicloheximida, esculina, etc. (DOMINGUEZ y col., 1985; SLADE y COLLINS-THOMPSON, 1987; PRENTICE y NEAVES, 1988; LOVETT, 1988a y b; BISPING y AMTSBERG, 1988; LOVETT, 1989).

El método de cultivo tradicional de *Listeria* spp. mediante refrigeración a 4°C, durante como mínimo 4-6 semanas (usualmente de 3-6 meses e incluso más), tiende a ser substituido por medios de cultivo selectivos que poseen requerimientos de tiempo muy inferiores y niveles de fiabilidad aceptables (DOYLE y SCHOENI, 1986; LOVETT, 1988a; LOVETT, 1989).

Recientemente se ha desarrollado una técnica de cultivo y aislamiento selectivos, específica únicamente para las especies patógenas del género *Listeria*, *L.monocytogenes* e *L.ivanovii* (BLANCO y col., 1989; DOMINGUEZ y col., 1990).

2.1.6. Hábitat.

En el transcurso de las dos últimas décadas, el progresivo desarrollo de nuevas y más efectivas técnicas de detección de *Listeria* spp. del medio ambiente, ha permitido aumentar ostensiblemente el cúmulo de informaciones referentes tanto a su hábitat, como a las implicaciones que éste tiene respecto de la epidemiología de la enfermedad.

En la actualidad se acepta sin discusión que las especies bacterianas del género *Listeria* son ubicuitarias en el medio ambiente (BRACKETT, 1988). Consecuentemente, en tanto que organismo ubicuo, especies patógenas y apatógenas de este género son aisladas comúnmente del suelo en sentido amplio - incluidas superficies de uso agrícola y ganadero - (ROCCOURT y SEELIGER, 1985), así como de la cobertura vegetal que éste sustenta (WEIS y SEELIGER, 1975. Citado por Roccourt y Seeliger, 1985).

Resultado de la amplia disseminación de *Listeria* spp. en la naturaleza, es también su presencia en otros muchos y variados "ambientes" que incluyen conceptos tan importantes para la epidemiología de la enfermedad como: alimentos destinados a consumo animal y humano, efluentes residuales urbanos y, especialmente, su asociación a numerosas especies animales tanto domésticas como salvajes además de la especie

humana, las cuales constituyen importantes reservorios en relación con el ciclo infeccioso de la enfermedad.

En concreto, en el transcurso de las dos últimas décadas han sido aisladas especies del género Listeria de:

* Alimentos destinados al consumo de aves de granja (SKOVGAARD y MORGEN, 1988) y rumiantes domésticos; incluyendo en este último caso forrajes no conservados, heno, paja y de manera especial, el ensilado (ROCCOURT y SEELIGER, 1985; GITTER, 1985; DIJKSTRA, 1986; FENLON, 1986; SKOVGAARD y MORGEN, 1988; HUSU, 1990).

* Aguas superficiales continentales, efluentes y aguas residuales urbanas (DIJKSTRA, 1986; AL-GHAZALI y AL-AZAWI, 1988). Según estos autores, los efluentes provenientes de las plantas de tratamiento de aguas residuales de las grandes aglomeraciones urbanas, son propensos a estar contaminados por Listeria spp.

Es necesario indicar a este respecto, al menos como posibilidad, el hecho de que dichas aguas residuales puedan ser utilizadas en cultivos agrícolas con destino a la producción de alimentos. Las implicaciones epidemiológicas y de salud son evidentes (SCHLECH, 1984; DIJKSTRA, 1986; HIRD, 1987; SCHÖNBERG, 1988a y b).

* Especies patógenas y apatógenas del género Listeria han sido aisladas de numerosas especies domésticas y salvajes, tanto de mamíferos (GRAY y KILLINGER, 1966; KWANTES e ISAAC, 1974; ROCCOURT y SEELIGER, 1985; SKOVGAARD y MORGEN, 1988; SCHÖNBERG, 1988b; HUSU, 1990; HUSU y col., 1990) como de aves (KWANTES e ISAAC, 1974; BASHER y FOWLER, 1984; FENLON, 1985; SKOVGAARD y MORGEN, 1988; SCHÖNBERG, 1988b) y también de la especie humana (GRAY y KILLINGER, 1966; KWANTES e ISAAC, 1974; ROCCOURT y SEELIGER, 1985; DIJKSTRA, 1986). Merece la pena precisar, que Gray y Killinger (1966) describen la presencia de L.monocytogenes en hasta 37 especies de mamíferos domésticos y salvajes. No obstante, salvo excepciones, anfibios, reptiles e invertebrados no hematófagos, no son considerados reservorios de Listeria spp. (MULLER, 1988).

Respecto de las aves, además del pollo como ave tradicional de producción industrial, se incluyen como posibles portadores de Listeria spp., faisanes, pavos, ánades y gaviotas. Estas últimas potencialmente de alto riesgo por sus hábitos de alimentación, frecuentemente en proximidad de vertederos y residuos urbanos de toda índole (FENLON, 1985).

Rocourt y Seeliger (1985) consideran como reservorio habitual de todas las especies del género Listeria, excepto L.murrayi, al conjunto de especies domésticas y fauna

salvaje. En contraste, consideran que la especie humana es portadora únicamente de L.monocytogenes, L.ivanovii y L.innocua.

El porcentaje de portadores asintomáticos de L.monocytogenes en la especie humana, estimado mediante el estudio de heces y muestras vaginales, oscila significativamente según autores entre 0,6 y 70% (RALOVICH, 1986; MCLAUCHLIN, 1987). Adicionalmente, Munk y Kaufmann (1988) han demostrado recientemente la presencia de clones de Lts T reactivos específicos para diferentes especies de Listeria, tanto patógenas como apatógenas, en sangre periférica de individuos sanos y sin antecedentes de padecimiento de listeriosis.

* Alimentos con destino al consumo humano, incluyendo alimentos de origen vegetal (SCHLECH, 1984; ROCOURT y SEELIGER, 1985; HO y col., 1986), leche y derivados lácteos (FLEMING y col., 1985; DOMINGUEZ y col., 1985; FERNANDEZ y col., 1986; FARBER y col., 1987; BECKERS y col., 1987; BANNISTER, 1987; HOSU y col., 1990), alimentos cárnicos no cocinados, canales aviáres (KWANTES e ISAAC, 1974; GITTER, 1976; DIJKSTRA, 1978; LEE y col., 1987. Citado por Brackett, 1988; CANTONI y col., 1989), y moluscos y peces (GRAY y KILLINGER, 1966).

2.2. Patogenia de la infección natural de la listeriosis. Síndromes nervioso, septicémico y abortivo. Otras manifestaciones. Cuadro clínico y lesional.

En la actualidad, se admite unánimemente que las especies integrantes del género Listeria son siete (ROCOURT y SEELIGER, 1985):

- | | | |
|--------------------------|-----------------------|------------------|
| - <u>L.monocytogenes</u> | - <u>L.seeligeri</u> | - <u>L.grayi</u> |
| - <u>L.ivanovii</u> | - <u>L.welshimeri</u> | |
| - <u>L.innocua</u> | - <u>L.murrayi</u> | |

Sólamente L.monocytogenes y L.ivanovii han sido descritas como causantes de enfermedad en las diferentes especies animales susceptibles y en la especie humana (ROCOURT y SEELIGER, 1985; SEELIGER, 1987; COSSART y MENGAUD, 1989). El resto de las especies de este género no son consideradas bacterias patógenas capaces de producir enfermedad (ROCOURT y SEELIGER, 1985; MACLAUCHLIN, 1987).

En lo referente a la incidencia de L.monocytogenes y L.ivanovii, existe unanimidad en que la primera es la única que afecta a la especie humana, mientras que ambas son capaces de producir enfermedad en diferentes especies animales susceptibles. No obstante, siempre predomina L.monocytogenes sobre L.ivanovii de manera significativa (ROCCOURT y SEELIGER, 1985; MCLAUCHLIN, 1987; COSSART y MENGAUD, 1989).

Por otra parte, Rocourt y Seeliger (1985), excluyen a L.ivanovii como bacteria capaz de producir el síndrome nervioso de la listeriosis, frecuente en las infecciones por L.monocytogenes, mientras que L.ivanovii está particularmente implicada en la infección del útero gestante en la especie ovina (MACLEOD y col., 1974; SEELIGER, 1987; JENSEN y SWIFT'S, 1988).

Serológicamente las bacterias del genero Listeria se clasifican en 16 serotipos en función de la posesión de diferentes Ags somáticos (O) y flagelares (H): 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b, 7 (SEELIGER y JONES, 1986).

Los serotipos aislados más frecuentemente de casos naturales de listeriosis en todas las especies susceptibles, se restringen en su gran mayoría a tres: 1/2a, 1/2b y 4b. Seeliger y Finger (1969) afirman que del orden del 95% de las cepas aisladas de casos naturales pertenecen a los tres serotipos mencionados. A continuación se exponen una serie de citas bibliográficas cuyas estimaciones sobre la casuística de la enfermedad confirman este hecho:

	1/2a.1/2b	4b
* Fleming y col., 1985	-	65,3% (32/49)
* Ho y col., 1986	60% (16/27)	33% (9/27)
* Ortel y Wilhelms, 1986	68% (337/498)	32% (159/498)
* McLauchlin, 1987	32% (229/722)	59% (423/722)
* Schmidt-Wolf y col., 1987	-	66,2% (196/296)
* McLauchlin y col., 1988b	-	71% (152/214)
* Schönberg, 1988b	-	95% (Sin.Ner.)

- En las distintas especies susceptibles, la listeriosis puede manifestarse según una ostensible variedad de signos clínicos. Clásicamente, dichas manifestaciones patológicas se ordenan en tres síndromes principales, además de otras formas clínicas menos frecuentes (GRAY y KILLINGER, 1966; SEELIGER, 1987):

- 1) Síndrome nervioso o neurológico
- 2) Septicemia
- 3) Infección uterina.Aborto.Muerte neonatal.

4) Otras manifestaciones:

- Queratoconjuntivitis
- Mastitis
- Forma cutánea

2.2.1. Síndrome nervioso.

El síndrome nervioso de la listeriosis se manifiesta según dos formas clínicas bien definidas, las cuales, en términos generales, configuran a su vez dos grupos de casuística diferenciados (GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985):

- * Encefalitis (Rombencefalitis). Afección parenquimatosa nerviosa no septicémica.
- * Meningitis, con evolución a meningoencefalitis en el contexto de una septicemia.

En la forma meningítica, predominante y característica de la especie humana, la meningitis es la lesión primaria y la encefalitis si se presenta, resulta de la evolución y complicación de la primera (GRAY y KILLINGER, 1966). El contexto septicémico de esta forma de enfermedad, aunque todavía discutido, se acepta mayoritariamente (HO y col., 1986; MCLAUCHLIN, 1987; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; JOHN, 1988; etc.).

Por el contrario, en los rumiantes, donde el síndrome nervioso es el tipo predominante de expresión de la listeriosis, la afección inicial es invariablemente parenquimatosa (encefalitis); restringiéndose ésta a la base del encéfalo. Sólo secundariamente cursa con afección meníngea, por lo demás no generalizada (GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985; BARLOW y MCGORUM, 1985; JUBB y col., 1985).

Adicionalmente, se describe también en la especie humana una forma de listeriosis extremadamente rara, de la que según Goday y col. (1987) únicamente han sido descritos 18 casos en la bibliografía. Dicha forma clínica, denominada por algunos autores rombencefalitis (BACH y DAVIS, 1987; GODAY y col., 1987) y por otros, encefalitis (GRAY y KILLINGER, 1966; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; PIMENTEL y col., 1989), cursa con lesiones sorprendentemente parecidas a las de la encefalitis listérica de los rumiantes. La afección meníngea es inexistente o no significativa, y no se demuestra la coexistencia de septicemia en su evolución. Así mismo, las lesiones anatomopatológicas observadas también se restringen a la base del encéfalo (GODAY y col., 1987; BACH y DAVIS, 1987; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; JENSEN y col., 1988) y los pares craneales nerviosos que en él se originan.

2.2.1.1. La encefalitis en la listeriosis.

2.2.1.1.1. Patogenia.

En la actualidad, la posibilidad de la vía hematogena como vía de infección en la encefalitis listérica de los rumiantes, ya no es prácticamente considerada. Por el contrario, se admite con unanimidad que esta forma de la listeriosis es consecuencia del establecimiento de infección neurógena ascendente a partir de terminaciones nerviosas de alguno o algunos de los pares craneales que inervan las mucosas de la cabeza (oral, nasal...) u otras estructuras de la misma, como por ej., alveolos dentarios (URBANECK, 1962 y 1963; URBANECK y col., 1963; SCHLEICHER y URBANECK, 1966; URBANECK y col., 1966; CHARLTON, 1977; CHARLTON y GARCIA, 1977; GITTER, 1985; STÖBER, 1985; BARLOW y MCGORUM, 1985; JÜBB y col., 1985; KENT, 1987).

La constante y restringida localización de las lesiones observadas a la base del encéfalo, la invariable inexistencia de otras lesiones sistémicas y el desarrollo en las tres últimas décadas de un amplio soporte experimental mediante estudios de patogenia realizados en la especie ovina, evidencian y confirman esta hipótesis (BORMAN y col., 1960; URBANECK y col., 1963; SCHLEICHER y URBANECK, 1966; SCHLEICHER y SCHNEIDER, 1968; BARLOW y MCGORUM, 1985).

La implicación del nervio trigémino (V) en la patogenia de la encefalitis listérica es invariablemente la más frecuente que cita la bibliografía (URBANECK, 1962; URBANECK y col., 1963; CHARLTON y GARCIA, 1977; BARLOW y MCGORUM, 1985). No obstante, la participación del nervio facial también ha sido considerada (KENT, 1987).

La encefalitis listérica de los rumiantes ha podido ser reproducida experimentalmente mediante infección de los nervios trigémino, facial, glosofaríngeo e hipogloso (BORMAN y col., 1960; URBANECK, 1963; SCHLEICHER y URBANECK, 1966; SCHLEICHER y SCHNEIDER, 1968; SCHLEICHER y col., 1968; BARLOW y MCGORUM, 1985).

La afección del nervio trigémino es también, en coincidencia con lo anterior, la que se asocia con más frecuencia a los raros casos de rombencefalitis descritos en la especie humana (BACH y DAVIS, 1987).

Charlton y García (1977), en coincidencia con los primeros estudios realizados sobre el tema (URBANECK, 1962; SCHLEICHER y URBANECK, 1966), han sugerido que en la encefalitis listérica ovina la infección inicial evoluciona restringidamente por el interior de los fascículos nerviosos. Por otra parte, si la migración centripeta de L. monocytogenes es intraaxonal, mediante el endo y perineuro con su vascularización linfática asociada, o mediante ambas

posibilidades, es algo que se desconoce con certeza (URBANECK, 1962; SCHLEICHER y URBANECK, 1966; CHARLTON y GARCIA, 1977).

2.2.1.1.2. Lesiones anatomopatológicas.

La observación de lesiones macroscópicas es infrecuente en la encefalitis listérica de los rumiantes (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974).

Las lesiones histopatológicas en esta forma de la listeriosis se localizan en la base del encéfalo, ganglios nerviosos y pares craneales, principalmente el nervio trigémino.

En el estudio histopatológico de este nervio es posible evidenciar la existencia de neuritis en grado variable, demostrándose una correlación positiva entre la severidad de dicha neuritis y la existencia de lesiones homolaterales en el ganglio trigémino correspondiente y en la base del encéfalo (URBANECK, 1962; CHARLTON y GARCIA, 1977; BARLOW y MCGORUM, 1985).

Dicha neuritis consiste en acúmulos inflamatorios perineurales e intrafasciculares de intensidad variable, compuestos básicamente por polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), macrófagos (MOs) y también acúmulos linfoplasmocitarios. Algunos autores han observado además la existencia de microabscesos a nivel intrafascicular (BORMAN y col., 1960; CHARLTON y col., 1977; BARLOW y MCGORUM, 1985). Según estos mismos investigadores, las lesiones existentes en el ganglio trigémino no son sino extensión de las descritas para el nervio homónimo, y sus características histopatológicas son equivalentes.

En lo referente a las lesiones de la base del encéfalo, son invariablemente más severas a nivel de la protuberancia y en médula oblongada, disminuyendo su frecuencia e intensidad hacia el mesencéfalo, tálamo e hipotálamo y hacia cerebelo y médula cervical. Dichas lesiones se observan indistintamente tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris, y se caracterizan por la existencia de microabscesos, acúmulos perivasculares de carácter nonuclear y una variable proliferación glial (CORDY y OSEBOLD, 1959; BORMAN y col., 1960; URBANECK y col., 1963; WUILLERET y col., 1969; CHARLTON y GARCIA, 1977;).

La afección inicial es parenquimatosa, siendo la meningitis de carácter mixto, secundaria y asociada a la lesión primaria (CORDY y OSEBOLD, 1959; WUILLERET y col., 1969; CHARLTON y GARCIA, 1977; JUBB y col., 1985).

Inicialmente, la lesión del parénquima se demuestra por la existencia de una importante reacción microglial, que con posterioridad es complicada por la progresiva afluencia de PMNs y desarrollo final de necrosis central y licuefacción. La coalescencia de los microabscesos caracteriza la evolución normal de la lesión (CORDY y OSEBOLD, 1959; GRAY y KILLINGER, 1966; BARLOW y MCGORUM, 1985; MARCO y col., 1988).

Fenómenos de degeneración neuronal y neuronofagia son frecuentes y no necesariamente dependientes de la presencia de listerias en la neurona afectada (CHARLTON y GARCIA, 1977; BARLOW y MCGORUM, 1985; MARCO y col., 1988).

Importantes acúmulos de carácter mononuclear (linfoplasmocitario, macrófagos), son constantes en el área lesionada y su entorno próximo (CORDY y OSEBOLD, 1959; GRAY y KILLINGER, 1966; WUILLERET y col., 1969; CHARLTON y GARCIA, 1977; MARCO y col., 1988).

La existencia de acúmulos perivasculares en el área inflamada, se considera como una lesión secundaria al drenaje hacia los espacios de Virchow-Robin desde las lesiones nerviosas primarias. También se supone que éste es el mecanismo mediante el cual se produce la afectación meníngea (CORDY y OSEBOLD, 1959; CHARLTON y GARCIA, 1977; JUBB y col., 1985).

En general, durante el transcurso de la enfermedad se observa una evolución gradual desde las lesiones agudas de carácter purulento, predominantes y típicas de óvidos y cápridos, hacia lesiones de carácter mixto o no purulentas características de los bóvidos, en los que la enfermedad cursa de manera más crónica (GRAY y KILLINGER, 1966).

Aunque muy infrecuentemente, también han sido descritos casos de listeriosis en la especie ovina en los que a diferencia del patrón lesional encefalítico común, se observa principalmente afectación de médula espinal. Las características lesionales de la mielitis descrita en estos casos son muy similares a las de la encefalitis listérica. Es de reseñar sin embargo, que no coinciden ambas formas clínicas, encefalitis y mielitis en el mismo individuo, aunque sí pueden coincidir en el mismo rebaño. Su patogenia se desconoce (GATES y col., 1967; SCHLEICHER y SCHNEIDER, 1968).

2.2.1.1.3. Signos y manifestaciones clínicas.

Los signos nerviosos de la listeriosis en las distintas especies de ruminantes son cualitativamente similares, derivando todos ellos de la afección, en diverso grado, del mesencéfalo, protuberancia o puente encefálico y médula oblongada o bulbo, estructuras nerviosas conocidas en

conjunto como tronco o base del encéfalo. Por lo demás, en dicha zona anatómica es donde se ubican los núcleos de origen de los pares de nervios craneales habitualmente afectados.

Todos los autores que han estudiado los síntomas y manifestaciones clínicas de la encefalitis listérica de los rumiantes, coinciden plenamente en su descripción y en la explicación de porqué éstos se producen (REBHUN y LAHUNTA, 1982; STOBBER, 1985; WEST y OBWOLO, 1987; KENT, 1987; BLOOD y RADOSTITS, 1989; JENSEN y SWIFT'S, 1988).

Inicialmente, puede observarse fiebre (40 - 42°C), pero suele cesar cuando se instauran las manifestaciones clínicas. Estas se caracterizan porque los animales afectados muestran alteraciones del comportamiento, somnolencia y tienden a aislarse del resto del rebaño. La prehensión, masticación y deglución se observan notable y progresivamente alteradas. La presentación de salivación profusa y babeo no son infrecuentes y, finalmente, puede observarse obnubilación y depresión profunda del sensorio.

Estas manifestaciones clínicas son principalmente consecuencia de la afección uni o bilateral de los diferentes pares craneales implicados en cada caso (REBHUN y LAHUNTA, 1982; KENT, 1987). A saber:

- Trigémino (V): La lesión del n.mandibular o del núcleo motor del n.trigémino, se manifiesta por hipotonía, paresia o parálisis de los músculos de la masticación. Hipoestesia facial se asocia frecuentemente a la afección del V par.

- Facial (VII): La lesión de este nervio tiene como resultado paresia o parálisis facial, normalmente unilateral. Se manifiesta por orejas caídas, ptosis y relajación o flacidez de los labios, y como consecuencia de ello, salivación profusa, babeo, etc.

Por otra parte, queratitis uni o bilateral, ulceración corneal y espasticidad palpebral tras estimulación luminosa o ensayo de amenaza, son frecuentemente observadas.

- Vestibulococlear (VIII): La lesión de este nervio se manifiesta por ataxia, tendencia a realizar movimientos de desplazamiento en círculo (Circling disease) y anomalías posturales de la cabeza coincidentes con el lado afectado. Estrabismo y nistagmus son también manifestaciones frecuentemente descritas.

- Glossofaríngeo (IX) y Vago (X): La disfagia y alteración de la deglución, son manifestaciones de lesión de estos nervios. Síntomas inespecíficos como vómitos, pueden ser consecuencia de disfunción vagal.

- Hipogloso (XII): La protrusión y debilidad de la lengua reflejan probablemente lesión de este nervio. Es frecuente en los bóvidos.

La lesión unilateral de las neuronas motoras de la protuberancia, bulbo y vías de la propiocepción general, puede provocar, en estadios finales, hemiparesia con incapacidad para el movimiento y la estación. Adicionalmente, la lesión bilateral de dichas vías puede causar paresia espástica y ataxia generalizada a las cuatro extremidades, todo ello asociado con postración y decúbito permanente. Los movimientos descontrolados de "pedaleo" también son comunes. Por otra parte, la existencia de temblores, puede ser indicación de afectación cerebelar (REBHUN y LAHUNTA, 1982).

La incidencia en el rebaño no suele ser superior al 10% (GRAY y KILLINGER, 1966; VANDEGRAAFF y col., 1981; STOBER, 1985; BLOOD y RADOSTITS, 1989).

El curso de la enfermedad es normalmente agudo en óvidos y cápridos, oscilando entre 4-96 horas e incluso hasta 7 días después de iniciada la sintomatología (GRAY y KILLINGER, 1966; WUILLERET y col., 1969; VANDEGRAAFF y col., 1981; GITTER, 1985; BLOOD y RADOSTITS, 1989). La mortalidad es del orden del 60% según Schonberg (1988b). Los animales afectados que sobreviven manifiestan en general secuelas permanentes, por lo que se suele proceder a su eutanasia.

En los bóvidos, el curso tiende a ser subagudo, entre 2-15 días (GRAY y KILLINGER, 1966; REBHUN y LAHUNTA, 1982; GITTER, 1985; BLOOD y RADOSTITS, 1989). La recuperación espontánea es frecuente, pero la persistencia de secuelas nerviosas también.

2.2.1.2. Meningitis listérica.

Excluido el grupo de los neonatos (edad inferior a 1 mes), la manifestación clínica más frecuente de la listeriosis en la especie humana es la meningitis (GRAY y KILLINGER, 1966; MCLAUCHLIN, 1987; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; SCHMIDT-WOLF y col., 1987; JOHN, 1988).

Atendiendo a su casuística, dos grupos de edad son particularmente susceptibles a esta forma de la enfermedad: los neonatos y las personas con un rango de edades comprendidas entre 40-60 años (GRAY y KILLINGER, 1966; FLEMING y col., 1985; MCLAUCHLIN, 1987; SCHMIDT-WOLF y col., 1987; MARTIN, 1988; JOHN, 1988). Según Gray y Killinger (1966), hasta un 90% aproximadamente de todos los casos de listeriosis en la especie humana se manifiestan como meningitis.

El contexto clínico de la enfermedad en el individuo adulto, aún cuando evolucione hacia meningoencefalitis, es el de una bacteriemia o septicemia según los casos, en la que no suelen observarse otros síntomas que no sean los característicos del síndrome meníngeo; por lo demás no diferenciables en primera instancia de accesos de meningitis observables en otras enfermedades (GRAY y KILLINGER, 1966; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; HANSEN y col., 1987; MARTH, 1988; NELSON y col., 1989).

Por su parte, la listeriosis del periodo neonatal es considerada actualmente consecuencia de infección transplacentaria (intra-útero), principalmente en el último 1/3 de la gestación, o durante el parto y postparto inmediato (GRAY y KILLINGER, 1966; DEGEN, 1972; KLATT y col., 1986; MULDER y ZANEN, 1986; MCLAUCHLIN, 1987; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; VOLPE, 1987; MARTH, 1988; NELSON y col., 1989). En estos casos, las manifestaciones de meningitis causadas por L.monocytogenes, se integran normalmente en el esquema de una septicemia generalizada, con existencia en grado variable de lesiones miliarenses granulomatosas típicas y microabscesos en diversos órganos: hígado, pulmones, bazo, tracto gastrointestinal, riñones, glándulas adrenales, esófago, etc. (GRAY y KILLINGER, 1966; DEGEN, 1972; KLATT y col., 1986; MARTH, 1988; NELSON y col., 1989).

La tasa de mortalidad observada varía ostensiblemente entre 17-70%, según la bibliografía consultada. Circunstancias tales como instauración o no de tratamiento, estado inmunitario del paciente y edad, influyen de manera importante sobre la tasa de mortalidad (GRAY y KILLINGER, 1966; DEGEN, 1972; FLEMING y col., 1985; MULDER y ZANEN, 1986; MCLAUCHLIN, 1987; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; VOLPE, 1987; SEELIGER, 1987; MARTH, 1988; JOHN, 1988; NELSON y col., 1989; COX, 1989).

2.2.2. Aborto y muerte neonatal en la listeriosis.

Las primeras noticias que hacen alusión a L.monocytogenes como agente capaz de inducir aborto, se producen ya en la década de los treinta, tanto en lo referente a la especie humana (BURN, 1933. Citado por GRAY y KILLINGER, 1966), como a los ruminantes domésticos (PATERSON, 1939, citado por GRAY y KILLINGER, 1966).

Excepto en algunos importantes pero excepcionales episodios, como el relatado por Gray y Killinger (1966) en la ciudad de Halle de la Alemania Oriental de la postguerra, la listeriosis como causa de aborto en la especie humana se considera que no posee incidencia significativa en la actualidad. No obstante, los últimos casos de listeriosis habidos como consecuencia de toxoinfecciones alimentarias, han vuelto a constatar la posibilidad de que la infección

con L.monocytogenes curse con presentación de abortos y mortinatos, además de los más frecuentes síndromes nervioso y septicémico (FLEMING y col., 1985; MCLAUCHLIN, 1988).

Mayor entidad posee sin embargo la infección uterina de la listeriosis para las especies de ruminantes domésticos; aspecto sobre el que se han acumulado gran cantidad de observaciones en las últimas décadas, tanto en lo referente a comunicaciones de casos espontáneos (JELEFF y DJUROV, 1968; NJOKU y DENNIS, 1972; MACLEOD y col., 1974) y exhaustivas revisiones (JONES y WOODBINE, 1961; GRAY y KILLINGER, 1966; MACDONALD y col., 1972), como en lo referente a una abundante producción de trabajo experimental (GRAY y col., 1956; MOLELLO y JENSEN, 1964; SMITH y col., 1968; SMITH y col., 1970; NJOKU y col., 1972; NJOKU y DENNIS, 1973; NJOKU y col., 1973; NJOKU y DENNIS, 1979; GITTER y col., 1986a; CAMPERO y col., 1986).

Respecto de otras especies, salvo roedores y lagomorfos, principalmente a nivel experimental (OSEBOLD e INOUE, 1954a), esta forma de presentación de la listeriosis no es valorada como de riesgo habitualmente. No obstante, dicha posibilidad ha sido considerada en algunas revisiones sobre el tema, en la especie porcina (LADDS y col., 1974; JUBB y col., 1985) y en équidos (LADDS y col., 1974).

2.2.2.1. Patogenia. Cuadro clínico y lesional.

Cuando la infección listérica afecta al útero gestante, la presentación de abortos en la segunda mitad o último 1/3 de la gestación, de mortinatos, o bien de septicemia neonatal grave con alta mortalidad, son las manifestaciones clínicas más comunes en las especies susceptibles (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974; GITTER, 1985; MCLAUCHLIN, 1987; SCHMIDT-WOLF y col., 1987; MARTH, 1988; NELSON y col., 1989).

En todos los casos se considera que la infección uterina se produce por vía sanguínea y precedida por una bacteriemia de curso asintomático, o bien con existencia de una serie de síntomas generales inespecíficos y transitorios; dichos síntomas de carácter leve, reconocidos en la especie humana como "manifestaciones similares a accesos gripales", pasan normalmente desapercibidos en el resto de las especies (GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985; MCLAUCHLIN, 1987; SEELIGER, 1987; MARTH, 1988; JOHN, 1988). Sólo esporádicamente se ha descrito algún caso en el que se observan manifestaciones sistémicas en la madre gestante (MCLAUCHLIN, 1987).

Más frecuentes son, sin embargo, las complicaciones asociadas al postparto. Estas varían ostensiblemente en función del periodo de la gestación en el que se produce la

infección. Si dicha infección acontece aproximadamente hacia la mitad o durante el último 1/3 de la gestación, el aborto es su consecuencia inevitable, y la madre gestante únicamente mostrará, de manera esporádica, retención placentaria y metritis leve transitoria, observándose una rápida recuperación del útero afectado (GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985; JUBB y col., 1985). Schönberg (1988b) habla de hasta un 70% de retenciones placentarias en casos de vacas que han padecido aborto listérico.

Por el contrario, si la infección ocurre en la proximidad del parto, cuando el feto está a término, mayores complicaciones pueden ser observadas. Estas consisten en posibilidad de parto distócico, metritis grave con riesgo de septicemia y, muy raramente, retención fetal también con septicemia grave adicional (GRAY y col., 1956; GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985; JUBB y col., 1985).

No existe evidencia concluyente de que la infección listérica tenga algún tipo de influencia negativa sobre el desarrollo posterior de la función reproductiva. De hecho, sucesivas gestaciones son comúnmente observadas sin complicaciones (GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985).

Las lesiones ocasionadas por la listeriosis en la placenta han sido minuciosamente descritas en los óvidos, como consecuencia del abundante material experimental acumulado en esta especie. La aplicación, por extensión, de estos hallazgos a otras especies, debe realizarse con las debidas reservas, dados los diferentes sistemas de placentación existentes.

En conjunto, las lesiones placentarias de la listeriosis no pueden considerarse específicas y por lo tanto, son en principio indistinguibles de las observadas en otras enfermedades (GRAY y KILLINGER, 1966).

Las lesiones más comunes consisten en intenso edema, inflamación difusa predominantemente purulenta, vasculitis del corioalantoides y existencia de zonas necróticas de gravedad variable en el epitelio coriónico, observables incluso macroscópicamente. La presencia de importantes aglomeraciones de listerias en las lesiones previamente descritas es constante (MOLELLO y JENSEN, 1964; SMITH y col., 1970; NJOKU y DENNIS, 1973; MACLEOD y col., 1974; LADDS y col., 1974; CAMPERO y col., 1984). Dichas lesiones son particularmente intensas en los placentomas, en los cuales además de la constante existencia de necrosis, son frecuentes procesos de mineralización de las vellosidades cotiledonarias (NJOKU y DENNIS, 1973; CAMPERO y col., 1986).

Es de destacar que varios autores enfatizan la importancia que en la patogenia del aborto listérico supone el desarrollo de lesiones vasculares graves en los

placentomas. Estas incluyen vasculitis, trombosis e infartos, como consecuencia directa de la proliferación del agente causal en los mismos; y además, constituyen el modo de acceso de las listerias a la circulación fetal (MOLELLO y JENSEN, 1964; GRAY y KILLINGER, 1966; NJOKU y DENNIS, 1973).

Respecto del feto, además de la importante autolisis observada en la generalidad del aborto listérico, todos los autores coinciden en señalar que las lesiones más conspicuamente observadas, lo son en el hígado; lo cual confirmaría por sí mismo la diseminación hematógena de la infección, vía vena umbilical. Dichas lesiones, invariablemente necróticas, se distribuyen por todo el órgano y poseen siempre un grado variable de reacción inflamatoria asociada en función de la edad de la lesión (MOLELLO y JENSEN, 1964; GRAY y KILLINGER, 1966; JELEFF y DJUROV, 1968; SMITH y col., 1970; NJOKU y col., 1972; NJOKU y DENNIS, 1973; LADDS y col., 1974; NJOKU y DENNIS, 1979; CAMPERO y col., 1986).

Lesiones de características similares son observables también en pulmones (aspiración de líquido amniótico contaminado), bazo, riñones, corazón, adrenales, etc.; siendo demostrable en todas ellas activa proliferación bacteriana. Edema subcutáneo intenso, ascitis, hidropericardias e hidrotorax suelen ser también hallazgos constantes (GRAY y KILLINGER, 1966; JELEFF y DJUROV, 1968; SMITH y col., 1970; NJOKU y col., 1972; LADDS y col., 1974; NJOKU y DENNIS, 1979; CAMPERO y col., 1986).

Los estudios experimentales citados, muestran que el intervalo infección - aborto oscila entre los límites de 3-20 días en función de la vía de inoculación empleada (oral, intraamniótica, intrafetal o endovenosa), pero lo usual según la mayoría de los autores, es de 5-10 días (GRAY y col., 1956; MOLELLO y JENSEN, 1964; SMITH y col., 1970; NJOKU y col., 1972; NJOKU y DENNIS, 1973; NJOKU y col., 1973; LADDS y col., 1974; NJOKU y DENNIS, 1979; GITTER y col., 1986a; CAMPERO y col., 1986).

La placentitis necrotizante descrita varía en función de la gravedad y progresión de la infección pero, invariablemente, su repercusión más inmediata es el fracaso circulatorio de la conexión materno - fetal y la instauración de un estado de hipoxia grave en el feto. Adicionalmente y en combinación con la lesión placentaria, el concurso simultaneo de septicemia fetal constituye el factor que, en última instancia, hacen de la infección por Listeria del útero gestante una enfermedad grave de curso letal (MOLELLO y JENSEN, 1964; SMITH y col., 1970).

Smith y col. (1970), apoyados por Gitter y col. (1986a), sugieren que la muerte fetal probablemente precede a la degeneración de la placenta, y el intervalo entre ambos

sucesos, es lo que explica el grado variable de autólisis siempre observable en el feto.

En condiciones naturales, si bien tanto el síndrome nervioso de la listeriosis como el abortivo pueden acontecer simultáneamente en la misma explotación o rebaño, el hecho suele ser excepcional. En cualquier caso, nunca coinciden en el mismo individuo (GITTER, 1985; JUBB y col., 1985). La causa de porque esto es así no se conoce, pero ha sido ampliamente confirmado de manera experimental por todos los autores previamente citados que han estudiado el problema.

Las dos especies de listerias con poder patógeno para el útero gestante, L.monocytogenes y L.ivanovii, provocan una infección de curso similar, no observándose diferencias significativas en su patogenia y efectos sobre la gestación, tal y como se desprende de las referencias bibliográficas citadas previamente respecto de ésta forma de la enfermedad.

En el grupo de los rumiantes, que es el más profundamente estudiado y, a la vez, el más susceptible, la incidencia de abortos y mortinatos en una misma explotación oscila ampliamente entre el 2-50% (LADDS y col., 1974; MACLEOD y col., 1974; JUBB y col., 1985; SCHÖNBERG, 1988b; BLOOD y RADOSTITS, 1989).

Existen muy pocos estudios sobre la incidencia de la listeriosis como causa de aborto en la especie bovina. A este respecto, Cottin y col. (1986) comunican que en 1981 L.monocytogenes fue aislada en un 6,6% (440/2438) de casos de abortos habidos en esta especie (Département Maine-Loira, Francia). El 75,9% de los aislamientos correspondió al serotipo 1/2a, el 20,7% al 4b, y el 3,4 % al 1/2b.

2.2.3. Septicemia en la listeriosis.

Aunque la forma septicémica de la listeriosis puede observarse también en el individuo adulto, ésta es típica y característica del periodo neonatal (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974; GITTER, 1985; PRENTICE y NEAVES, 1988; SCHMIDT-WOLF y col., 1987; NELSON y col., 1989).

Como ya ha sido mencionado previamente, en la actualidad se asume que la infección transplacentaria del feto se produce por existencia previa en la madre gestante de lo que Gray y Killinger proponen denominar "septicemia listérica de bajo grado". Esta no es sino una bacteriemia que cursa habitualmente de manera asintomática o con episodios transitorios similares a "accesos gripales" en la especie humana (MARTH, 1988).

En contraste con la suave afección materna, en todas las especies susceptibles la listeriosis del neonato cursa

con septicemia grave, a menudo fatal, y con sintomatología poco significativa o inespecífica (GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985).

En la especie humana, el pronóstico depende en gran medida del estadio de la gestación en el que se produce la infección. Así, se considera que durante los primeros 2/3 del embarazo, la existencia de abortos, mortinatos o bien de parto prematuro con infección y muerte perinatal durante la primera semana de vida, son muy probables (VOLPE, 1987; SEELIGER, 1987; FARBER y LOSOS, 1988; NELSON y col., 1989).

La manifestación clínica de este periodo es invariablemente la septicemia, con presencia o no de meningitis asociada en el contexto de un cuadro lesional generalizado (DEGEN, 1972; MULDER y ZANEN, 1986; VOLPE, 1987; SCHMIDT-WOLF y col., 1987; NELSON y col., 1989).

Por el contrario, si la infección se produce hacia el final de la gestación, durante el parto o en el post-parto inmediato, normalmente el pronóstico es más favorable, manifestándose entonces como síndrome meníngeo predominante, o en conjunción con septicemia (DEGEN, 1972; MULDER y ZANEN, 1986; VOLPE, 1987; SCHMIDT-WOLF y col., 1987; FARBER y LOSOS, 1988; NELSON y col., 1989).

Estos periodos de "manifestación temprana" y "tardía" de la enfermedad, bien caracterizados en la especie humana, no han sido aplicados hasta el momento a la listeriosis de las especies domésticas. No obstante, la evolución general de la infección es similar (MARTH, 1988).

La existencia de septicemia es la manifestación de la enfermedad con menor incidencia en el individuo adulto, tanto en las especies de ruminantes domésticos como en la especie humana (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974). En ésta última, la listeriosis septicémica se asocia con individuos que presentan estados de inmunodepresión, padecen enfermedades crónicas o neoplasias que provocan consunción orgánica, y con mujeres gestantes o en el puerperio que han sufrido complicaciones derivadas de la enfermedad (GRAY y KILLINGER, 1966; FLEMING y col., 1985; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; ABADIE y col., 1987; MCLAUCHLIN, 1987; MARTH, 1988; SOTO-HERNANDEZ y col., 1988; JOHN, 1988; COX, 1989).

En los ruminantes domésticos, las descripciones de casos de listeriosis septicémica en la edad adulta son raras. Gray y Killinger (1966) indican que estos son más frecuentes en la especie ovina y se asocian a complicaciones existentes en el puerperio e incluso, últimamente, al consumo de ensilado mal conservado (GITTER, 1985).

Respecto de las lesiones observadas en la forma septicémica de la listeriosis cabe decir que son muy



similares, si no equivalentes, a las mencionadas para la etapa fetal. No en vano se asume en la actualidad que, exceptuando las infecciones producidas durante el parto o post-parto inmediato, la listeriosis del neonato no es sino continuación de una infección adquirida "intra útero" durante la gestación (GITTER, 1985; KLATT y col., 1986; VOLPE, 1987; NELSON y col., 1989).

En general y en lo referente a las especies susceptibles, la bibliografía es coincidente y unánime respecto de la relación de órganos más frecuentemente afectados. Además del hígado, como órgano invariablemente citado, se han descrito lesiones en: pulmones, bazo, ganglio linfático mesentérico, riñones, glándulas adrenales, meninges, esófago, tonsilas, mucosa gastrointestinal, y corazón (GRAY y KILLINGER, 1966; BUSCH y col., 1971; LADDS y col., 1974; RAPP y KERSTEN, 1985; HIGGINS y col., 1987; MARTH, 1988).

Histopatológicamente, dichas lesiones están constituidas por acúmulos inflamatorios mixtos bien definidos con predominio de PMNs y también MØs y linfocitos (Lts), estos últimos los menos significativos. Conforme la lesión evoluciona, el componente necrótico de la misma progresa y se hace evidente. Las bacterias del género Listeria suelen ser observables en la periferia de tales lesiones con técnicas convencionales (H-E, Gram). No obstante, la lesión primaria con carácter de microabsceso e inflamatorio-necrótica, se transforma de manera gradual en una lesión de tipo esencialmente granulomatoso conforme se procede a la eliminación de la infección (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974).

Todo lo referido anteriormente respecto de la descripción de las lesiones de la listeriosis septicémica, así como de los órganos más comúnmente afectados, puede aplicarse en general al conjunto de especies de mamíferos susceptibles a esta enfermedad. Con variaciones no significativas tales lesiones se han descrito en las especies humana, porcina, equina, carnívoros, ruminantes domésticos, roedores y lagomorfos. La existencia o no de meningitis es lo que suele presentar mayor variabilidad (OSEBOLD e INOUE, 1954b; GRAY y KILLINGER, 1966; BUSCH y col., 1971; LADDS y col., 1974; DEGEN, 1972; GITTER, 1985; KLATT y col., 1986; MCLAUCHLIN, 1987; HIGGINS y col., 1987; MARTH, 1988).

En aves, además de la afección hepática y esplénica, la lesión más característica es la grave miocarditis y pericarditis, a menudo con extensas áreas de degeneración miocárdica. No obstante, dicha lesión no es constante y puede no observarse. La afección del SNC es posible pero poco frecuente y cursa como una meningoencefalitis (SEASTONE, 1935; PATERSON, 1937; COLE, 1941; LUCAS y col.,

1955; MALEWITZ y col., 1957; GRAY, 1958; GRAY y KILLINGER, 1966; BASHER y FOWLER, 1984; COOPER, 1987; RAMOS y col., 1988).

2.2.4. Conjuntivitis / Queratoconjuntivitis.

En la especie humana han sido descritos varios casos de conjuntivitis y queratoconjuntivitis provocados por L.monocytogenes, pero su incidencia es casi insignificante en el contexto general de la listeriosis (GRAY y KILLINGER, 1966). Normalmente, este tipo de afección se asocia a otras manifestaciones clínicas de la enfermedad, pero también puede presentarse aisladamente como resultado de contagio por contacto con material contaminado. Como ejemplo de este hecho, cabe señalar que canales aviares de un matadero industrial de aves han sido consideradas responsables del contagio de un caso de conjuntivitis listérica (GRAY y KILLINGER, 1966).

En el ganado vacuno, la infección ocular por L.monocytogenes se observa generalmente asociada a otros síndromes principales, especialmente encefalitis y meningoencefalitis (GITTER, 1985).

No obstante, Morgan (1977) describe dos interesantes casos de queratoconjuntivitis causados por L.monocytogenes serotipo 1/2a, ambos asociados al consumo de ensilado bien elaborado y conservado, y en ausencia de cualquier otra sintomatología, especialmente nerviosa. Otras lesiones observadas en tales casos fueron, además de conjuntivitis catarral, oftalmítis, hidroftalmos, hipopion e iridociclitis. Excepto en un caso, las lesiones tuvieron carácter unilateral y respondieron bien al tratamiento con antibioterapia.

En aves, esta forma ocular de la listeriosis es considerada secundaria y poco significativa (GRAY, 1958).

Experimentalmente, la conjuntivitis listérica ha sido desarrollada por diversos autores, principalmente en roedores y lagomorfos (OSEBOLD e INOUE, 1954a; AGARWAL y col., 1977; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985).

2.2.5. Mastitis.

Las descripciones de mastitis por L.monocytogenes son un hallazgo muy infrecuente en la bibliografía de la enfermedad. Todos los casos comunicados hasta la fecha se restringen a la especie bovina.

Los casos de mastitis listérica descritos en la bibliografía varían ostensiblemente en cuanto a sus

características. Se describen casos de curso agudo, crónico o subclínico, y afectando a un sólo cuarterón o a toda la ubre (BINDSEIL y col., 1979; GITTER y col., 1980).

Anatomopatológicamente, las descripciones existentes informan de lesiones múltiples de ámbito lobular y no de afección glandular extensa o generalizada. El carácter de tales lesiones es predominantemente purulento, siendo destacable el alto índice de eosinófilos presentes en las mismas. Adicionalmente, un importante infiltrado celular mixto (linfocitos, plasmocitos, macrófagos y, de manera ocasional, células gigantes) es constante. Entre otras lesiones descritas pueden citarse intensa alveolitis descamativa, áreas nodulares con reacción fibrosa, atrofia del parénquima glandular y mastitis intersticial (BINDSEIL y col., 1979; GITTER y col., 1980).

Siendo obvio que la mastitis listérica no tiene una incidencia clínica significativa, es no obstante de crucial importancia, sobre todo si se consideran sus implicaciones epidemiológicas (GITTER y col., 1980; HIRD, 1987; BRACKETT, 1988).

La primera descripción documentada de transmisión de la listeriosis por consumo de leche de vaca infectada en la especie humana, es realizada por Potel en 1953 (Citado por HIRD, 1987). Este autor recoge la posible asociación entre un caso de mastitis bovina y un episodio de listeriosis humana en el que una mujer, que había ingerido leche cruda de dicha vaca, vio frustrarse su embarazo por la existencia de gemelos mortinatos. L.monocytogenes de idéntico serotipo fue aislada tanto de la vaca en cuestión, como de los mortinatos.

A este respecto, Gitter (1985) sugiere la posibilidad de que L.monocytogenes esté presente en los tanques de refrigeración de leche procedente de efectivos bovinos aparentemente sanos, con mucha mayor frecuencia de la habitualmente supuesta; argumentando que lo más probable es que su detección escape a los exámenes laboratoriales de rutina.

En consecuencia con ello Hird (1987), en una exhaustiva revisión del tema, menciona que además de en los documentados casos existentes de mastitis, L.monocytogenes ha sido frecuentemente aislada de leche procedente de granjas cuyos efectivos bovinos se observan clínicamente sanos.

Por su parte, Gray y col. en 1956, ya informan de la eliminación de dicho microorganismo en la leche tras infección experimental por vía oral en la especie ovina. Hird (1987), confirma este hecho ampliándolo también en lo referente a la especie caprina.

Adicionalmente, los últimos episodios de listeriosis humana asociada al consumo de productos lácteos y derivados, si bien son todavía objeto de discusión, mantienen con plena vigencia e importancia la posibilidad de eliminación de L.monocytogenes en la leche de los animales domésticos como origen y vía de transmisión de la enfermedad en cuanto que toxiinfección alimentaria (PRENTICE y NEAVES, 1988; HIRD, 1987; DOYLE, 1988; LOVETT, 1988; KAUFMANN, 1988a).

2.2.6. Listeriosis cutánea.

La listeriosis cutánea es una forma de presentación de la enfermedad realmente infrecuente, y sólo observable en la especie humana. Los casos descritos en la bibliografía se restringen a personas cuyo trabajo se relaciona directamente con la ganadería, especialmente en lo relativo al ganado vacuno.

En concreto, Gray y Killinger (1966) señalan tres casos habidos en Holanda, Alemania Federal y E.E.U.U., en los cuales las personas afectadas fueron veterinarios que habían asistido sendos partos de terneros infectados con L.monocytogenes.

Más recientemente, Cain y col. (1986), recogen un bien documentado caso en el que la persona afectada era un granjero que igualmente había asistido un parto en su explotación bovina.

En todos los casos, entre 48 - 72h. post exposición a L.monocytogenes se desarrollaron manifestaciones de fiebre ligera (38,5 °C), malestar general y múltiples erupciones eritematosas en ambas manos y antebrazos que evolucionaron hacia lesiones vesículo-papulosas y, finalmente, a lesiones pustulares (GRAY y KILLINGER, 1966; CAIN y col., 1986).

En tres de los casos citados, el serotipo de L.monocytogenes obtenido fue el mismo tanto para las personas afectadas, como para el material procedente de los fetos infectados. La respuesta a la antibioterapia fue en todos los casos satisfactoria.

URBANECK, 1966; SCHLEICHER y SCHNEIDER, 1968; BARLOW y MCGORUM, 1985).

En lo referente al modo de penetración de Listeria spp. vía oral a través del epitelio gastrointestinal, existen estudios que abogan por las placas de Peyer intestinales como los "puntos" de penetración más importantes en la etapa previa al establecimiento de bacteriemia transitoria asintomática o diseminación septicémica típicas de la listeriosis (MACDONALD y CARTER, 1980). En contraste con lo anterior, la hipótesis del acceso directo de L.monocytogenes y L.Ivanovii a los enterocitos del epitelio intestinal ha sido propuesta como modelo de infección más probable en esta enfermedad por Gaillard y col. (1987) y por Racz y col. (1972), si bien estos últimos investigadores trabajando con otra especie de roedores como son los cobayos.

Gaillard y col. (1987), trabajando "in vitro" con células de la línea Caco-2 (células de origen carcinomatoso de colon humano), atribuyen capacidad de penetración en dichas células y, por extensión, en enterocitos del epitelio intestinal en condiciones normales, únicamente a las especies patógenas L.monocytogenes e L.Ivanovii. Por el contrario, L.seeligeri, L.welshimeri e L.innocua no poseerían dicha aptitud invasiva según los mismos autores.

Resultado de los estudios de M.E. en los que se basa su trabajo, estos investigadores proponen el mecanismo de endocitosis como la manera mediante la cual las especies patógenas del género Listeria acceden al interior de las células epiteliales intestinales.

Por otra parte, y también según estos mismos autores, la posibilidad de replicación y proliferación de las listerias patógenas en el interior del enterocito o de una célula fagocítica, depende significativamente de su capacidad para sintetizar citolisina-s. Estos factores citolíticos permiten a las especies L.monocytogenes y L.Ivanovii lisar la vacuola fagosómica y acceder libremente al citoplasma, provocando, en última instancia, la lisis de la célula infectada. Las especies apatógenas y no hemolíticas carecen de dicha capacidad.

Por su parte, Racz y col (1972), mediante experimentos "in vivo" con un lote de cobayos "pretratados" para hacerlos más susceptibles a la infección oral (neutralización del pH gástrico e inhibición de la motilidad intestinal mediante inoculación i.p. de tintura de opio), demuestran la capacidad de L.monocytogenes para penetrar por endocitosis en enterocitos del intestino delgado.

En el interior de estas células, L.monocytogenes fue observada frecuentemente en vacuolas fagosómicas y también en disposición libre en el citoplasma de la célula

hospedadora. Interesantemente, estos autores no observan lesiones epiteliales significativas, y sólo raramente, necrosis de enterocitos en esta fase inicial de la infección, lo cual sugiere que L.monocytogenes es capaz de atravesar el epitelio, y, frecuentemente, multiplicarse en los enterocitos sin generar lesiones inflamatorias de importancia. Posteriormente, cuando dichas listerias abandonan los enterocitos mediante exocitosis a nivel de su zona basal, son ávidamente fagocitadas por PMNNs y M0s que se acumulan rápidamente en la lámina propia de la mucosa. La proliferación intracelular de L.monocytogenes en estas células fagocíticas, y su necrosis y lisis posterior, con liberación de productos lisosomales al exterior, es el hecho fundamental de la patogenia de las lesiones intestinales observadas en fases más tardías de la infección.

Curiosamente, estos investigadores también demuestran la diseminación "célula a célula" de L.monocytogenes en el epitelio intestinal sin acceder al espacio extracelular. Este hecho es posible porque, frecuentemente, L.monocytogenes se localiza en el citoplasma de los enterocitos en el interior de vacuolas con doble membrana plasmática, lo cual permite a esta bacteria un eficaz mecanismo de exocitosis-endocitosis capaz de atravesar el espacio extracelular, siempre protegida en el interior de una vacuola.

Mediante infección vía oral, diversos autores señalan la existencia de lesiones inflamatorias intestinales de muy diversa consideración en experimentos con roedores de laboratorio (MILLER y BURNS, 1970; RACZ y col., 1972; CZUPRYNSKI y BALISH, 1981; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985) y en la especie ovina (OSEBOLD e INOUYE, 1954b).

Una vez superada la barrera epitelial intestinal, la diseminación linfática vía ganglios mesentéricos parece ser la vía de generalización inicial de la listeriosis en el organismo (MACDONALD y CARTER, 1980; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985; CZUPRYNSKI y col., 1989).

2.4. Factores condicionantes de la infección por Listeria spp.

Diversos autores enfatizan el hecho de que la listeriosis es una enfermedad en la que la existencia de infección subclínica en las distintas especies animales y en la especie humana es más importante de lo que su incidencia, entendida como índice anual de nuevos casos clínicos, haría suponer (GRAY y KILLINGER, 1966; GRÖNSTOL, 1979; GITTER, 1985; RALOVICH, 1986).

Desde este punto de vista, el concepto de "portador inaparente", caracterizado tanto por el padecimiento asintomático de la enfermedad, como por la recuperación clínica de la misma, adquiere una gran relevancia en la epidemiología de la listeriosis (SEELIGER, 1987; SCHÖNBERG, 1988b; KAUFMANN, 1988a; COX, 1989; LOVETT, 1989).

La presencia de especies patógenas y apatógenas de listerias en heces, ha sido confirmada por numerosos estudios coprológicos en la especie humana. El rango de variación oscila de 0,6 a 70%, este último porcentaje en profesiones de riesgo (GRAY y KILLINGER, 1966; KWANTES e ISAAC, 1974; ROCOURT y SEELIGER, 1985; RALOVICH, 1986; BLENDEN y col., 1987). Sumariamente, y comparando varias series de datos aportadas por diferentes investigadores, Ralovich (1987) concluye que la tasa de portadores fecales en la especie humana es del orden del 3,8% (Citado por Lovett, 1989). De manera coincidente, el mismo hecho ha sido demostrado ampliamente en distintas especies animales afectadas (GRONSTOL, 1979; ROCOURT y SEELIGER, 1985; DIJKSTRA, 1986; SKOVGAARD y MORGEN, 1988; SCHÖNBERG, 1988b).

No obstante, y en contraste con estos resultados, la listeriosis es una enfermedad esporádica en el conjunto de especies susceptibles. A modo de ejemplo y dado que la especie humana es la única de la que se disponen datos fiables, puede reseñarse que la estimación de su incidencia en el Reino Unido (1965-1985) es del orden de 0,3-0,4 x 100.000 para el total de la población y de 1 x 20.000 en el caso de la listeriosis neonatal (MCLAUCHLIN, 1987; MCLAUCHLIN y col., 1988b). En Holanda (1976-1982), se estima una incidencia de la meningitis listérica neonatal del orden de 1 x 100.000 y en U.S.A. la incidencia anual de la listeriosis se ha incrementado desde 0,9 por millón en 1970, hasta 3,7 por millón de 1980 a 1982 (JOHN, 1988).

Así pues, se asume en la actualidad que la infección subclínica por especies patógenas del género *Listeria*, la existencia de portadores inaparentes y la contaminación de alimentos de uso tanto animal como humano por dichas especies, son hechos cuantitativamente más frecuentes y de mayor importancia de lo que su incidencia haría suponer (GRAY y KILLINGER, 1966; COX, 1989). Por ello, numerosos estudios han sido realizados en orden a averiguar el conjunto de factores que predisponen e influyen en el padecimiento de la enfermedad. En general, se acepta que dichos factores son:

- * Edad
- * Estado inmunitario
- * Especie
- * Consumo de ensilado
- * Gestación

2.4.1. Edad.

Aunque la listeriosis puede presentarse en todas las edades, sea cual sea la especie afectada, su incidencia es significativamente superior en determinados grupos de edades, particularmente en el periodo neonatal.

En la especie humana, los grupos de edad en los que se observa más frecuentemente la listeriosis son aquellos cuya edad es inferior a 1-2 m. de vida (neonatos) o superior a 40-50 años (GRAY y KILLINGER, 1966; FLEMING y col., 1985; RALOVICH, 1986; HO y col., 1986; MCLAUCHLIN, 1987).

En todas las especies domésticas en general, una vez más el periodo neonatal se señala como el de mayor incidencia en el padecimiento de la listeriosis, en concreto su forma septicémica (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974).

Respecto de los ruminantes en particular, la mayor incidencia de la forma encefalítica de la listeriosis se observa durante los tres primeros años de vida, disminuyendo luego ostensiblemente conforme progresa la edad adulta (GRAY y KILLINGER, 1966; JUBB y col., 1975; JENSEN y SWIFT'S, 1988).

2.4.2. Especie.

Además de la especie humana, las especies animales más sensibles se acepta que son los ruminantes, predominando, de entre ellos, los óvidos. También se cita a los lagomorfos y distintas especies de roedores (NILSSON y col., 1959; JONES y col., 1961; GRAY y KILLINGER, 1966; MACDONALD y col., 1972; GITTER, 1985).

Entre las especies susceptibles de contraer la enfermedad esporádicamente, se consideran los équidos, la especie porcina y aves de granja o producción industrial (JONES y WOODBINE, 1961; GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974; GITTER, 1985; HIGGINS y col., 1987).

En el grupo de las especies consideradas como más resistentes a la infección listérica estarían los carnívoros domésticos, especialmente el gato común; a quien se supone la especie menos sensible de aquellas en que habitualmente es posible realizar un diagnóstico fiable (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974; DECKER y col., 1976).

2.4.3. Gestación.

Independientemente de la especie afectada, tipo de placentación y vía de exposición o infección, lo cierto es que las especies patógenas del género *Listeria* demuestran

gran tropismo por el útero gestante o, más concretamente por la placenta (GRAY y KILLINGER, 1966).

Numerosos estudios de casos naturales y experimentales, principalmente en la especie ovina, demuestran que la placenta no opone una resistencia significativa a su invasión por listerias patógenas y que, adicionalmente, ésta constituye el primer punto activo de infección y proliferación bacteriana (MOLELLO y JENSEN, 1964; SMITH y col., 1970; NJOKU y DENNIS, 1973; MACLEOD y col., 1974; LADDS y col., 1974; CAMPERO y col., 1984).

En contraste con esto, la afección uterina, exceptuando casos esporádicos que presentan complicaciones adicionales (retención fetal etc.), es principalmente de carácter leve; cursando de manera habitual como una endometritis transitoria y, en una mayoría significativa de casos, sin existencia de secuelas que indiquen trastorno de la función reproductora en gestaciones sucesivas. Esto es válido tanto para ruminantes como para la especie humana (GRAY y KILLINGER, 1966; GITTER, 1985; MCLAUCHLIN, 1987; SEELIGER, 1987; JENSEN y SWIFT'S, 1988). No obstante, la detección de listerias en el sistema genital (cérvix, vagina...) puede persistir hasta por lo menos 1 m. después del parto o aborto (GRAY y KILLINGER, 1966).

Además, del orden del 25% de las vacas que han abortado por listeriosis eliminan listerias en heces durante 3-12 m. post-aborto y, aproximadamente el 16%, excretan listerias en la leche entre 1-12m. En la especie ovina estos valores son "grosso modo" del 40-50% y del 40% respectivamente (SCHÖNBERG, 1988b). A este respecto, es interesante citar que alrededor del 40% de las vacas infectadas con antecedentes de aborto listérico excretan en la leche una cantidad de listerias tan reducida, que son normalmente necesarios medios de cultivo selectivos y técnicas de enriquecimiento para su detección (SCHÖNBERG, 1988b).

2.4.4. Estado inmunitario.

En la especie humana, el padecimiento de la listeriosis se ha asociado frecuentemente a la concurrencia en el individuo afectado de deficiencias del sistema inmunitario, tratamientos inmunosupresores (transplante de órganos) o antineoplásicos, y enfermedades crónicas consuntivas como neoplasias, diabetes, y alcoholismo, etc. (GRAY y KILLINGER, 1966; FLEMING y col., 1985; HO y col., 1986; ABADIE y col., 1987; MARTIN y PODZAMEZER, 1987; MCLAUCHLIN, 1987; RONCORONI y col., 1987; HANSEN y col., 1987; MARTH, 1988; SCHLECH, 1988; SOTO-HERNANDEZ y col., 1988; JOHN, 1988; RIDGWAY y BROWN, 1989).

Sin embargo, tras los últimos episodios de listeriosis, calificados como toxiinfecciones alimentarias, y en los que sólo se han demostrado parcial e inconstantemente causas predisponentes, se ha procedido a cuestionar la realidad de este supuesto (BLENDEN y col., 1987; MCLAUCHLIN, 1987; SCHLECH, 1988; KAUFMANN, 1988a; CZUPRYNSKI y col., 1989; COX, 1989).

A este respecto, Blenden (1987) arguye que, manteniendo el hecho demostrado de la existencia de deficiencias del sistema inmunitario como causa predisponente de la listeriosis, el padecimiento de la enfermedad por un individuo aparentemente sano estaría condicionado simplemente por el factor dosis, al igual que en la mayoría de otros agentes infecciosos. Por su parte, Cox (1989) sugiere la posibilidad de infección concurrente de L.monocytogenes con otros agentes patógenos gastrointestinales (Salmonella enteritidis), que al actuar sinérgicamente con ella, favorecería la infección listérica y el padecimiento clínico de la enfermedad.

En lo relativo a las especies domésticas habitualmente afectadas de listeriosis, existen muy pocos datos que aporten información sobre esta cuestión. Gitter (1985) no obstante, observa la existencia de enfermedades concurrentes en varios episodios listéricos en las mismas explotaciones o rebaños e incluso en los mismos animales afectados. Entre ellas cabe mencionar leptospirosis, BVD y brucelosis como causa de aborto en el ganado vacuno, y meningitis bacterianas de variada etiología, scrapie y necrosis cerebro cortical en la especie ovina.

Gray y Killinger (1966) por su parte, revisan varios casos en los que se demostró la existencia de listeriosis y rabia simultáneamente en la especie bovina. Respecto de las aves, estos mismos autores recogen numerosas comunicaciones en los que la listeriosis como enfermedad oportunista, se asocia a muchos otros procesos morbosos: salmonelosis, enfermedad de Newcastle, peste aviar, coriza, coccidiosis, infestaciones parasitarias, etc.

2.4.5. Ensilado.

La ya tradicional asociación entre el consumo de ensilado, normalmente de preparación defectuosa, y el padecimiento de la enfermedad, es uno de los hechos más generalmente reconocidos respecto de la listeriosis. Diversos autores han confirmado este hecho ampliamente (GRÖNSTOL, 1979; GITTER, 1985; FENLON, 1985; DIJKSTRA, 1986; GITTER y col., 1986b; FENLON, 1986).

No obstante y según Gitter (1985), la manera exacta de como el consumo de ensilado permite o predispone al

padecimiento de listeriosis clínica, no está suficientemente explicada. Además, y también según este mismo autor, es un hecho establecido la existencia de listeriosis en explotaciones en las que la alimentación con ensilado no es practicada.

La idea más firmemente aceptada de porqué el consumo de ensilado predispone al padecimiento de listeriosis, se basa, en la existencia en el mismo, de valores de pH anormalmente elevados que permiten la proliferación de Listeria spp. (FENLON; 1985; DIJKSTRA, 1986; GITTER, 1985).

A este respecto, se asume en general que valores de pH inferiores a 5,0 son incompatibles con el crecimiento y proliferación de Listeria spp. (DOYLE, 1988). Cualquier circunstancia, tanto por su preparación como por su mantenimiento, que suponga deterioro de la calidad del ensilado y, por lo tanto, elevación del pH por encima de dicho valor "crítico", se supone permite la proliferación de Listeria spp. en el mismo. Tales listerias, dada su ubicuitaria distribución en el ambiente, cabe pensar que ya permanecían inicialmente, contaminándolo, en el forraje base del ensilado (FENLON, 1985; DIJKSTRA, 1986; GITTER, 1985).

No obstante, la comunicación de casos de listeriosis en los que han sido aisladas Listeria spp. de muestras de ensilado cuyos valores eran inferiores a 5,1, no permiten interpretaciones concluyentes sobre el tema (GRÖNSTOL, 1979; FENLON, 1985).

2.5. Listeriosis murina.

2.5.1. La listeriosis murina como modelo experimental.

Según Gray y Killinger (1966), el estudio sistemático de la infección experimental murina, dadas las dificultades que hasta la última década suponía el aislamiento de Listeria spp. de muestras infectadas o contaminadas, surgió como un método biológico complementario del diagnóstico de la listeriosis.

Independientemente de estas consideraciones, el hecho de que la patogenia y evolución de las lesiones histopatológicas en la listeriosis murina sean de la misma índole que la observada en otras especies susceptibles, - incluida la especie humana - constituye el argumento más importante en cuanto a justificar su desarrollo y estudio

como modelo experimental de la enfermedad (WIRSING von KOENIG y FINGER, 1986; MARTH, 1988; KAUFMANN, 1988a).

Consecuentemente, fue mediante el desarrollo de este modelo experimental como se estableció que uno de los mecanismos de defensa fundamentales que el individuo afectado opone a la infección con Listeria spp., es una respuesta inmunitaria de base celular mediada por linfocitos T, y no de tipo humoral o B-dependiente mediante producción de anticuerpos específicos (MACKANESS, 1962). Desde entonces y hasta la actualidad, la sucesión de estudios experimentales de base predominantemente inmunológica sobre la listeriosis murina, ha sido ininterrumpida. No obstante, la finalidad preponderante de esta importante actividad investigadora, no ha sido tanto la patogenia de la enfermedad en cuanto que infección, como el estudio de los fenómenos inmunológicos que intervienen en el establecimiento de inmunidad durante el transcurso de la misma.

Por otra parte, la constatación particularmente evidente en roedores de laboratorio y en la especie humana, de que el padecimiento de la listeriosis puede depender significativamente de la integridad del sistema inmunitario del individuo (WIRSING von KOENIG, 1986), ha supuesto el desarrollo de otro de los grandes campos de estudio de la enfermedad basados en la listeriosis murina como modelo experimental. A saber: que factores condicionan la incidencia y evolución de la infección listérica y cuales son los mecanismos o procesos que permiten explicar su influencia. En este sentido, la caracterización de las relaciones entre Listeria spp. y el sistema inmunitario son de primordial importancia en orden a averiguar la patogenia de la enfermedad.

2.5.2. Curso y caracterización de la infección listérica experimental.

La caracterización de la infección listérica experimental se ha realizado mediante el uso de técnicas de cultivo microbiológico de los órganos principalmente afectados, hígado y bazo, y mediante el estudio secuencial histopatológico de las lesiones observadas en el transcurso de la misma.

En la tipificación de la cinética de la infección así como para su evaluación histopatológica, dos vías de inoculación han sido usadas principalmente como vías de elección: intravenosa (i.v.) e intraperitoneal (i.p.). A dosis letal media (DL50), cualquiera de las dos tiene

invariablemente como resultado el establecimiento de una grave septicemia, aspecto este que por su constancia y reproductibilidad ha permitido tipificar el curso de la infección y otorgar a la listeriosis murina un gran valor como modelo experimental (MACKANESS, 1962; GRAY y KILLINGER, 1966; NORTH, 1970; MANDEL y CHEERS, 1980; WIRSING von KOENIG y col., 1983; SELBITZ y col., 1986; etc.).

Aunque existe coincidencia en que dichas vías de inoculación son las más fiables en cuanto a la reproducción experimental de la listeriosis septicémica, no son las únicas vías posibles. Es importante indicar que exceptuada la vía epiconjuntival (GRAY y KILLINGER, 1966; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985), el resto de las vías de inoculación experimental habituales, como son la vía oral, la instilación nasal y la vía subcutánea, son también capaces de inducir el tipo de enfermedad septicémica ya descrita; si bien con mayor variabilidad respecto de la tasa de mortalidad y frecuencia e importancia de las lesiones observadas (GRAY y KILLINGER, 1966; MILLER y BURNS, 1970; LEFFORD y col., 1979; MACDONALD y CARTER, 1980; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985). La vía oral parece ser la más inconstante en cuanto a sus resultados (GRAY y KILLINGER, 1966; WIRSING von KOENIG y col., 1983).

2.5.2.1. Caracterización de la infección mediante la realización de cultivos microbiológicos de hígado y bazo. Vías intravenosa e intraperitoneal.

Primeramente Mackaness en 1962 y después otros investigadores (GRAY y KILLINGER, 1966; SELBITZ y col., 1986), han establecido que tras inoculación intravenosa de DL50 de L.monocytogenes se observa una bacteriemia transitoria, de manera que en un lapso aproximado de 5-30 m., ya no es posible su detección en sangre periférica.

En relación con ello y a 10 m.p.i., del orden del 90% de las listerias inoculadas son "captadas" por el hígado, y prácticamente todo el resto del inóculo es "captado" por el bazo. En ambos casos las células responsables del "aclaramiento" del inóculo son células pertenecientes al sistema mononuclear fagocítico (SMF) de dichos órganos (MACKANESS, 1962; MITSUYAMA y col., 1978).

A 6-12 h.p.i. (i.v.), el nº de bacterias viables en el hígado desciende entre un 50 y un 90% según autores (MACKANESS, 1962; SADARANGANI y col., 1980), lo cual indica que este órgano posee una gran actividad listericida en la fase inicial de la infección. Esta importante capacidad de aclaramiento del inóculo se atribuye a la fagocitosis y

actividad microbicida inespecífica de las células de Kupffer hepáticas (NORTH, 1970; MITSUYAMA y col., 1978).

No obstante, las listerias que logran sobrevivir y superar esta primera fase de defensa del organismo, inician durante las 48 h. siguientes una etapa de crecimiento y proliferación logarítmicas en el interior de las células del SMP infectadas, de manera que ambos órganos, hígado y bazo, son objeto de un morboso proceso de colonización bacteriana cuyo máximo se observa a 2-3 d.p.i. (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970; CHEERS y col., 1978; WIRSING von KOENIG y col., 1983; MAINOU-FOWLER y col., 1986).

En lo referente a la inoculación vía i.p., la cinética de esta primera fase de la infección es muy similar a la descrita para la vía i.v. (WIRSING von KOENIG y col., 1983; SELBITZ y col., 1986). Es de destacar, que por esta vía a 2 h.p.i., únicamente del orden del 10-20% del inóculo empleado es recuperado del hígado. Los MOs residentes peritoneales, y los MOs inflamatorios y PMNs que se acumulan progresivamente en el peritoneo, son en este caso considerados la primera barrera de defensa contra la infección (MIYATA y col., 1982; WIRSING von KOENIG y col., 1983).

2.5.2.2. Estudio histopatológico de la infección.

Las lesiones más conspicuamente observadas en el transcurso de la infección se restringen al hígado y al bazo básicamente.

En el hígado, dichas lesiones a 24 h.p.i. consisten en múltiples acúmulos focales de PMNs, los cuales evolucionan a microabscesos con tendencia a presentar una zona de necrosis central, variable según el tamaño y edad de la lesión. Es habitual la observación de necrosis incipiente de hepatocitos en la periferia de la lesión y en coincidencia con ello, presencia de cantidades variables de listerias también en la zona adyacente a la misma. Estas son fácilmente detectables por los métodos convencionales de tinción de H-E y Gram (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970; MANDEL, y CHEERS; 1980) o con técnicas más específicas de tipo inmunohistológico; bien sean estas de inmunofluorescencia (SMITH y METZGER, 1963; MCLAUCHLIN y col., 1988a), o bien de peroxidasa-antiperoxidasa (DOMINGO y col., 1986).

Hacia el día 3-4 p.i. y coincidiendo con la instauración de la fase de resistencia específica T-dependiente, las lesiones hasta ahora predominantemente purulentas y con carácter de microabscesos se transforman de manera gradual en lesiones típicas granulomatosas

(MACKANESS, 1962; WIRSING von KOENIG, 1983; MANDEL y CHEERS, 1980; MAINOU-FOWLER y col., 1988). Paralelamente, conforme transcurre la infección, la presencia de listerias en las lesiones disminuye también de manera progresiva hasta no ser ya detectables a 9-10 d.p.i. (NORTH, 1970). La completa resolución de las lesiones sin proceso de cicatrización aparente, es constatable a 2 semanas p.i. (NORTH, 1970; MANDEL y CHEERS, 1980).

Respecto del bazo, la primera lesión observada hacia las 24-48 h.p.i., consiste en una depleción variable de la población linfoide periarteriolar de la pulpa blanca. Dicha depleción, coincide en la presencia en la misma zona de gran cantidad de PMNs con tendencia a formar microabscesos y lesiones inflamatorias de extensión variable, principalmente alrededor de la arteriola central. No obstante, la zona más periférica de la pulpa blanca con sus folículos linfoides característicos, es preservada relativamente bien en el transcurso de la infección (MANDEL y CHEERS, 1980).

El proceso de inflamación y depleción linfoide descrito, afecta principalmente a la población linfoide T-dependiente de la pulpa blanca y es máximo a 3-4 d.p.i.; momento en el que la población de linfocitos T detectada oscila entre el 0 y el 10% en comparación con el 35-40% que es el valor normal de Lts T respecto del total de Lts de la pulpa blanca (CHAN y CHEERS, 1982a).

Transcurrido el 4. d.p.i., la recuperación gradual de la lesión es evidente, observándose un gran aumento de la población T linfoide que hacia el 5.-6. d.p.i. alcanza valores normales y posteriormente, de 8.-10. d.p.i. supone una cantidad de Lts T de hasta tres veces el valor normal inicial previo a la infección. Mayoritariamente, este proceso no implica migración de linfocitos T desde otros órganos linfoides sino que se debe a intensos fenómenos de linfoproliferación "in situ" (CHAN y CHEERS, 1982b), coincidiendo además con el progresivo incremento de M0a de aspecto epitelióide por todo el órgano (MACKANESS, 1962).

En los folículos linfoides o zonas B-dependientes de la pulpa blanca la población de Lts B es ya normal hacia los días 4.-5. p.i., pero al igual que los linfocitos T, continúan proliferando hasta 10-12 d.p.i., resultado de lo cual es la hiperplasia linfoide característica de esta fase (MANDEL y CHEERS, 1980).

La pulpa roja, hiperémica, no presenta en conjunto lesiones de importancia comparable a las descritos en la pulpa blanca. No obstante, la presencia de acúmulos de PMNs que evolucionan a microabscesos, son frecuentes. Se sugiere que tales lesiones son consecuencia de las más importantes existentes en la pulpa blanca (MANDEL y CHEERS, 1980).

En el periodo álgido de la infección, entre 2-4 d.p.i., la presencia de listerias en el bazo mediante la técnica de Gram se observa indistintamente en pulpa blanca y en pulpa roja, no pudiéndose constatar una preferencia especial por alguna de las dos zonas principales del bazo (MANDEL y CHEERS, 1980).

En lo referente a otros órganos, de manera mucho más esporádica se han descrito lesiones en timo (MANDEL y CHEERS, 1980), pulmones (MILLER y BURNS, 1970; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985), ganglio mesentérico (DOMINGO y col., 1986) y en la mucosa intestinal (MILLER y BURNS, 1970).

Respecto del timo, Mandel y Cheers (1980) en estudios experimentales con ratones de la estirpe BALB/c vía i.v., observaron que a 24-48 h.p.i. se producía una súbita depleción linfoide del córtex tímico, la cual persistía hasta la 2ª semana p.i.. A partir de ese momento, la recuperación gradual de los timocitos corticales y el retorno a la normalidad eran evidentes. Estos autores, al comprobar que la depleción cortical tímica era dependiente de la dosis y de la estirpe murina utilizada, atribuyeron el hecho al stress inducido por la infección.

Trabajos posteriores realizados por este mismo equipo de investigadores, en los cuales demostraron que cuando se procedía a la realización de adrenalectomía previa a la infección con DL50 se prevenía la depleción cortical mencionada, confirman esta hipótesis. Complementariamente, estos mismos autores demostraron que la lesión podía ser inducida de manera experimental mediante administración de cortisona.

En cuanto a las lesiones respiratorias mencionadas por Miller y Burns (1970) y Pohjanvirta y Huttunen (1985), consistieron en neumonías intersticiales de tipo mixto, inicialmente de carácter más exudativo con importante participación de PMNs y posteriormente con predominio de Lts y M0s.

2.5.3. Inmunidad.

En una primoinfección, la resistencia contra la listeriosis se desarrolla según dos fases o modalidades de respuesta inmune bien caracterizadas. La primera etapa o de inmunidad inespecífica T-independiente se activa de manera inmediata con el inicio de la infección y las células comprometidas en la misma son principalmente PMNs, células de Kupffer, M0s y células asesinas naturales (AN). La activación del sistema del complemento, en cuanto que necesaria para el desarrollo eficaz de la actividad

fagocítica de PMNNA y M0s, es fundamental a este respecto. Por otra parte, la demostrada actividad procoagulante de L.monocytogenes implica indirectamente también a las plaquetas como elementos efectores de resistencia inespecífica en esta primera fase de la infección.

La segunda fase o de inmunidad específica T-dependiente se inicia hacia el 2º-3º d.p.i., y su fundamento consiste en la interacción entre Lts T y M0s, resultado de la cual es la "activación" de estos últimos. La activación macrofágica es mediada por factores solubles o linfocinas producidas por subpoblaciones de linfocitos T, y tiene como consecuencia fundamental la capacitación de los M0s como células efectoras con una poderosa actividad listericida.

Finalmente, una vez superada la infección, el establecimiento de un eficaz mecanismo de protección inmunitaria de base celular, es decir, mediado por Lts T y no por anticuerpos específicos, es el principal método para la consecución de resistencia adquirida contra una posible reinfección por L.monocytogenes.

2.5.3.1. Inmunidad inespecífica.

Que en última instancia la resistencia contra la infección listérica es ejercida por M0s activados y que dicha activación es mediada por Lts T sensibilizados Ag-específicos, es un hecho incontrovertible inicialmente descrito por Mackaness en 1962 y más tarde ratificado por todos los autores que han trabajado sobre el tema. Ahora bien, para que la instauración de este eficaz mecanismo de resistencia específica sea posible, es necesario previamente el concurso de otros mecanismos inespecíficos que no por ser más "ineficaces", en cuanto que listericidas, son menos importantes (PETIT y UNANUE, 1974; KRATZ y KURLANDER, 1988).

En este sentido, la función primordial de los mecanismos inespecíficos de inmunidad durante la fase inicial de la infección (24-48 h.), es impedir la excesiva proliferación bacteriana - de consecuencias fatales para el organismo - antes de que los mecanismos de resistencia T-dependientes puedan ser instaurados de una manera eficaz (SELBITZ y col., 1986; KRATZ y KURLANDER, 1988).

Confirmación adicional de este aspecto la proporciona el hecho de que el grado de susceptibilidad a la infección, que permite clasificar las estirpes murinas como "resistentes" o "susceptibles" a la enfermedad, está controlado por un gen autosómico dominante no relacionado con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). La expresión fenotípica de este gen se manifiesta por una

ostensible superioridad funcional, referida a la capacidad listericida del SMF de las estirpes resistentes respecto de las susceptibles para esta especie bacteriana (CHEERS y MCKENZIE, 1978; STEVENSON y col., 1981).

2.5.3.1.1. Sistema mononuclear fagocítico (SMF).

Como ya ha sido expuesto en el punto anterior, tras la inoculación mediante vía i.v. de una DL50 de *L.monocytogenes* la mayor parte del inóculo es captado por M0s "fijos" del SMF, particularmente las células de Kupffer hepáticas (NORTH, 1970; MITSUYAMA y col., 1978; NEWBORG y NORTH, 1980; LEPAY y col., 1985) y durante las primeras 6 h., del orden del 50% de las bacterias inoculadas son destruidas por el SMF hepatoesplénico (MACKANESS, 1962).

Para intentar neutralizar y eliminar el resto del inóculo no destruido, que inicia ahora una intensa etapa de proliferación en ambos órganos colonizados, hígado y bazo, se procede a una gran movilización de células pertenecientes a la estirpe granulomonocítica. El resultado es que en las primeras 24 h., PMNNs liberados del compartimento de reserva de la médula ósea y a partir de las 48 h.p.i., monocitos circulantes, acuden en gran cantidad a los órganos infectados; ubicándose entonces tanto en los puntos de colonización bacteriana, como al azar por los sinusoides del hígado y del bazo (NORTH, 1970; MANDEL y CHEERS, 1980).

La afluencia de células precursoras de M0s (monocitos) al hígado es ya detectable a pocas horas post-infección, se incrementa significativamente entre 24 y 48 h. y alcanza su máximo a 72-96 h.p.i., lo cual, grosso modo, coincide con la gradual transformación de las lesiones de carácter purulento iniciales, en lesiones de tipo granulomatoso. De hecho, el acúmulo progresivo de M0s en los focos de infección tiene lugar a expensas de la reducción gradual de PMNNs en los mismos. Es también importante indicar a este respecto, que la tasa de acumulación de M0s en las lesiones y la tasa de crecimiento y proliferación bacterianas en el hígado, están inversamente relacionadas (NORTH, 1970).

Otro aspecto interesante de esta primera fase de la infección, es el hecho de que las células de Kupffer muestran una importante tasa de proliferación entre 24 y 72 h.p.i.. Esto indica que en la listeriosis murina, el hígado infectado incrementa ostensiblemente su población de células del SMF de dos maneras: mediante mitosis de las células de Kupffer existentes por los sinusoides de todo el órgano y por afluencia de células precursoras de M0s desde la circulación. Estas últimas se ubican tanto en los focos de infección, como distribuidas al azar por los sinusoides

hepáticos, transformándose entonces en células indistinguibles morfológicamente de las células de Kupffer iniciales (NORTH, 1970).

Las tasas aproximadas de ambas subpoblaciones del SMF a 4 d.p.i., son de 30-40% para M0s no residentes o inmigrantes y de 60-70% para células de Kupffer o M0s residentes. En total, la población de células fagocíticas mononucleares a este tiempo p.i., es aproximadamente el doble de la existente inicialmente (LEPAY y col., 1985).

Sorprendentemente, North demuestra ya en 1970 que la supresión mediante irradiación local de este importante proceso de proliferación de las células de Kupffer a 24-72 h.p.i., no reduce significativamente la capacidad del hígado para oponer una adecuada resistencia a la infección. Por el contrario, la irradiación de la médula ósea induce una supresión completa de dicha resistencia. De estos hallazgos, North (1970) concluye que la función de las células de Kupffer, aun siendo de crucial importancia para el control de la bacteriemia inmediatamente posterior a la infección o contra una posible reinfección por L.monocytogenes, no es esencial en el desarrollo de resistencia a la enfermedad una vez esta ya se ha instaurado en el organismo. Esta importante función corresponde a M0s inflamatorios presentes en los focos de infección hepáticos, cuyo poder listericida es significativamente superior al de las células de Kupffer (NORTH, 1970; CAMPBELL y col., 1974; LEPAY y col., 1985; KRATZ y KURLANDER, 1988).

Según lo anteriormente expuesto, la capacidad de la médula ósea para la producción y urgente movilización de monocitos hacia los órganos donde se desarrolla la infección, es un hecho fundamental en el establecimiento de inmunidad contra la listeriosis durante la fase inicial de la enfermedad (NORTH, 1970; CAMPBELL y col., 1974; BENNETT y BAKER, 1977). En concordancia con esto, se demuestra como los requerimientos y el acuciante ritmo de producción de monocitos inducido por la infección, provocan un estado de depleción transitoria en el compartimento de células precursoras de la serie en la médula ósea (unidades formadoras de colonias monocíticas o UFC-M). Este es del orden del 60% respecto del valor normal siendo dicha depleción ostensible hasta el 4. d.p.i.. La recuperación de la normalidad se observa hacia la segunda semana p.i. (WING y col., 1984).

Paralelamente, se observa como la concentración sérica de factores estimulantes de colonias (FECs) - necesarios para la proliferación y maduración de los estadios precursores de monocitos y PMNNs - es máxima hacia las 24 h.p.i., se mantiene durante aproximadamente 7 días y retorna gradualmente a niveles normales hacia el catorceavo d.p.i. (WING y col., 1984).

Estudios más recientes sobre este tema han revelado que el máximo nivel sérico de FECs observado es dosis-dependiente y se debe de manera predominante a dos de sus fracciones constituyentes: FEC-M (monocitos) y FEC-G (granulocitos/PMNNs). La fracción FEC-GM (gránulo-monocítica) por el contrario, fue poco significativa (CHEERS y col., 1988).

Estos mismos autores han demostrado que la síntesis de FEC-M - elaborado por fibroblastos, células endoteliales etc. - es máxima en órganos tales como bazo, hígado, pulmones y glándulas salivares ya a 24 h.p.i.. A este respecto, no debe eliminarse la posibilidad de que la IL-1 secretada por M0s presentadores de Ag que han fagocitado listerias, sea inductora en gran medida del mantenimiento y amplificación del proceso. Adicionalmente, Lts T activados secretan FEC-GM y Multi-FECs (IL-3) en los puntos de infección durante la fase de inmunidad específica a 3-5 d.p.i. (CHEERS y col., 1988; MAGEE y WING, 1988).

Las informaciones relativas a la existencia de monocitosis, son variables y poco concluyentes. Factores que la condicionan son el tiempo post-infección y la susceptibilidad o resistencia a la listeriosis de la estirpe murina empleada (MANDEL y CHEERS, 1980; WING y col., 1984). A este respecto, Galsworthy (1987) informa de la existencia de un factor denominado de "Activación de la Producción de Monocitosis" (MPA) en la listeriosis murina. Dicho factor se caracterizaría según este autor por:

- Actuar específicamente sobre la línea monocítica reduciendo el tiempo de generación de las células precursoras
- No producir la activación de M0s o Lts "in vivo" o "in vitro"
- Aumento del nº de UFC-M en médula osea, bazo y sangre

Finalmente, es interesante señalar que la mayoría de los M0s inflamatorios que migran al hígado afectado en el auge de la infección, residen en él solo transitoriamente. Así, del orden de las 2/3 partes de dichos M0s desaparecen del hígado entre 5 y 12 d.p.i.. Coinciden con este hecho una gradual "restitutio ad integrum" de las lesiones, la eliminación de L.monocytogenes del órgano y, en definitiva, la superación de la enfermedad (NORTH, 1970). También la tasa de células de Kupffer, aumentada durante las primeras 72 h.p.i., disminuye ahora lentamente a partir de las dos semanas post-infección hasta adoptar valores de normalidad un mes más tarde de la misma (NORTH, 1970).

2.5.3.1.2. Polimorfonucleares neutrófilos (PMNNs).

La verdadera importancia de los PMNNs en la inmunidad contra la infección listérica, todavía no está suficientemente bien definida. Aunque la totalidad de los investigadores que han estudiado la listeriosis murina, confirman la constante participación de los PMNNs en la primera fase de resistencia contra la infección (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970; CHAN y col., 1977; MANDEL y CHEERS, 1980; DOMINGO y col., 1986; HANDA y col., 1987; etc.), su verdadera contribución en cuanto que poseedores de capacidad listericida al aclaramiento y eliminación de las listerias del organismo, continua siendo un tema objeto de discusión (MANDEL y CHEERS, 1980; RUDNICKA y col., 1988).

Sin embargo, a diferencia de por ejemplo los trabajos más clásicos de Mackaness (1962) y North (1970), los cuales no consideraban al PMNN como célula capaz de inducir un grado de resistencia significativo contra la infección listérica, estudios recientes de Kratz y Kurlander (1988), aportan una serie de datos que revalorizan notablemente la función de esta célula durante la primera fase de la infección.

Estos autores, tomando el bazo como órgano de referencia demuestran que la actividad listericida esplénica se incrementa del orden de 4-5 veces su valor inicial durante los dos primeros d.p.i., hecho este que coincide con una afluencia a dicho órgano de una cantidad de PMNNs aproximadamente 10 veces superior a la de la observada en condiciones normales. Por el contrario, el aumento gradual de M0s inflamatorios en el bazo únicamente comienza a ser significativo hacia el 3. d.p.i.. Consecuentemente, postulan estos investigadores que el incremento de la actividad listericida descrito es atribuible a la importante afluencia de PMNNs durante las primeras 48 h.p.i. y no a los M0s inflamatorios, cuya presencia a ese tiempo post-infección es todavía poco significativa. Estudios complementarios, realizados por Dlugonska y col. (1988) con células del exudado inflamatorio peritoneal durante la fase inicial de la infección listérica, avalan esta opinión.

Por otra parte, la actividad listericida esplénica disminuye transitoriamente hacia el 3. d.p.i., coincidiendo también en esta ocasión con un significativo descenso de la cantidad de PMNNs en el bazo. Esta disminución de la actividad anti-listeria, presumiblemente ejercida por PMNNs, es atribuida al agotamiento del pool de reserva de estas células en la médula ósea (KRATZ y KURLANDER, 1988).

2.5.3.1.3. Sistema del complemento.

La capacidad para movilizar urgentemente a PMNNs y M0s hacia los focos de infección, es fundamental con objeto de lograr unas mayores posibilidades de superación de la enfermedad. En este sentido, el significado principal del sistema del complemento consiste en que su activación procura los factores quimiotácticos y de opsonización necesarios para que PMNNs y M0s ejerzan eficazmente su función fagocítica (JUNGI y MCGREGOR, 1977; BAKER y col., 1977; PETIT, 1980; JUNGI y PEPYS, 1981; MIYATA y col., 1982; BORTOLUSSI y col., 1986).

Diversos estudios experimentales sobre la listeriosis murina han demostrado que la infección por L.monocytogenes activa el sistema del complemento mediante la vía alternativa (BAKER y col., 1977; GÖTZE y col., 1979; KESSEL y col., 1981; KLERX y col., 1985).

El factor C5 del complemento es considerado el principal agente quimiotáctico para PMNNs y M0s (BAKER y col., 1977; PETIT, 1980; JUNGI y PEPYS, 1981). En consecuencia, la realización de estudios comparativos entre estirpes murinas C5-deficientes y C5-normales mediante infección experimental con L.monocytogenes, ha demostrado una mayor y significativa susceptibilidad de las primeras a la infección (LAWRENCE y SCHELL, 1978; PETIT, 1980; JUNGI y PEPYS, 1981). No obstante, este hecho es únicamente válido en aquellos casos en los que no ha habido inmunización previa. Cuando existe preinmunización, la infección con L.monocytogenes no demuestra diferencias de susceptibilidad entre estirpes C5-normales o C5-deficientes (JUNGI y PEPYS, 1981).

Por su parte Petit (1980), en una serie de estudios sobre la función del complemento en la infección listérica, observa que la menor capacidad de las cepas C5-deficientes para controlar e impedir la progresión fatal de la infección, no es compensada por transferencia de plasma con contenido normal en C5. Complementariamente, la depleción sérica del factor C5 por tratamiento con "veneno de cobra", no deteriora ni disminuye la resistencia de las estirpes C5-normales a la infección con L.monocytogenes. De estos y otros experimentos adicionales, este autor concluye que en las cepas C5-deficientes, el problema de poseer una mayor susceptibilidad a la infección por L.monocytogenes no es tanto un problema ligado a una deficiencia del suero, sino mas bien un problema asociado a una deficiencia genética de los M0s de esta estirpe para sintetizar dicho factor C5.

En definitiva, la ventaja de las cepas C5-normales respecto a las deficientes consiste en la capacidad de sus M0s para elaborar y excretar, o bien liberar tras la muerte

celular, factor C5. Proteasas lisosomales inespecíficas activarían entonces el C5a, el cual al actuar como poderoso factor quimiotáctico para PMNNs y M0s, induce una rápida afluencia de estas células inflamatorias al foco de la infección (PETIT, 1980).

2.5.3.1.4. Células "asesinas naturales" (AN).

Diversos autores han demostrado la participación de células AN en el establecimiento de inmunidad inespecífica contra L.monocytogenes durante la primera fase de la infección (BENETT y BAKER, 1977; HOLMBERG y col., 1981; KEARNS y LEU, 1984; NAKANE y MINAGAWA, 1984).

En la infección experimental por L.monocytogenes, la actividad AN - definida por los parámetros de cantidad de células AN en los órganos linfoides y exudado peritoneal, así como por su capacidad para lisar células diana específicas - se incrementa ya a las 12 h.p.i. y es máxima entre 24-72 h. en todos los órganos linfoides y en el exudado peritoneal (HOLMBERG y col., 1981; KEARNS y LEU, 1984).

No obstante, la actividad AN varía significativamente en función del órgano considerado. Así, en el bazo y médula ósea, el máximo nivel de actividad AN se observa en el 3. d.p.i. y se aproxima a la normalidad hacia el 7. d.p.i.. Sin embargo, la estimación de dicha actividad en sangre y ganglios linfáticos, aunque es máxima también al 3. d.p.i., permanece ostensiblemente elevada hasta los días 7-10 p.i.. Finalmente, en el exudado peritoneal, el máximo de actividad AN se detecta también en el 3. d.p.i., permaneciendo con niveles significativamente elevados hasta el día 60 p.i. (KEARNS y LEU, 1984).

La inducción de actividad AN varía en función de las características de la cepa de *Listeria* empleada. Así, Kearns y Leu (1984) demuestran como la inoculación i.p. de preparados antigénicos derivados de una cepa de L.monocytogenes patógena, es capaz de inducir actividad AN concentración-dependiente. Por el contrario, la repetición del experimento con una cepa de L.monocytogenes apatógena, proporcionó siempre resultados negativos independientemente de la concentración empleada.

En la listeriosis murina, la actividad del SMF en respuesta a la infección por L.monocytogenes está genéticamente controlada por un gen, *Lr*, no ligado al CMH (STEVENSON y col., 1981), cuyas características fenotípicas definen la existencia de estirpes murinas "resistentes" y "susceptibles" a la infección listérica. Pues bien, la infección experimental mediante L.monocytogenes de ambos

tipos de estirpes, no demuestra diferencias significativas en los niveles de actividad AN inducidos. Se deduce de este hecho, que la actividad AN no es regulada por el gen Lr (KEARNS y LEU, 1984).

La infección experimental con L.monocytogenes induce en las células AN la producción de interferón (IFN) - α / β , el cual es detectable ya entre las 18 y 72 h.p.i., y cuya cinética de producción sigue un curso similar o paralelo al del crecimiento y proliferación bacteriana en hígado y bazo descrito en el apartado 2.5.2.1. (NAKANE y MINAGAWA, 1984; FUJIKI y TANAKA, 1988). Contrariamente, la inoculación experimental de derivados purificados de L.monocytogenes o incluso de listerias inactivadas no viables, no es capaz de inducir su producción (NAKANE y MINAGAWA, 1984).

Aunque el IFN - α / β no participa directamente en la eliminación de L.monocytogenes del organismo, la supresión de su actividad por tratamiento con antisuero específico, inhibe tanto la producción de IFN - gamma por Lts T activados, como la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado T-dependiente típica de esta enfermedad (NAKANE y MINAGAWA, 1984). Complementariamente, se ha demostrado que el IFN - β es capaz de promover la activación de M0s inflamatorios mediante la potenciación de sus mecanismos bactericidas oxígeno-dependientes (FUJIKI y TANAKA, 1988).

2.5.3.1.5. Activación plaquetaria por L.monocytogenes.

En la infección experimental por L.monocytogenes de diversas estirpes de ratas de laboratorio, se ha demostrado que esta bacteria posee actividad procoagulante, y que en el curso del proceso de activación y agregación plaquetaria inducido por ella, se libera serotonina y un factor de resistencia denominado "listericidina" al que se ha caracterizado como una β - lisina (CZUPRYNSKI y BALISH, 1981a y b; DAVIES y col., 1981).

Tal listericidina posee acción listericida "in vitro", pero su actividad anti L.monocytogenes "in vivo" no ha sido demostrada concluyentemente. Además, a diferencia de las experiencias previamente citadas así como en los lagomorfos, no ha podido ser detectada en otras especies de roedores como son: ratón, cobayo, hamster, ni en perros de raza Beagle o la especie humana (CZUPRYNSKI y BALISH, 1981b).

Por otra parte, L.monocytogenes solo es capaz de inducir agregación plaquetaria en presencia de un "cofactor plasmático" cuya naturaleza no está bien caracterizada todavía (CZUPRYNSKI y BALISH, 1981a). No obstante, ya que las plaquetas tienen capacidad de adsorber a su glicocalix

factores del complemento (KLEIN, 1982) y L.monocytogenes activa este sistema por la vía alternativa, y puesto que Czuprynski y Balish (1981) han demostrado "in vitro" la capacidad de esta bacteria para adherirse también a la superficie plaquetaria, estos autores han sugerido que quizás sea el sistema del complemento el cofactor plasmático requerido para la inducción de agregación plaquetaria y por tanto mediador de la actividad procoagulante de L.monocytogenes.

El significado que la actividad procoagulante de L.monocytogenes posee respecto de la patogenia de la infección, consiste básicamente en que la reacción de degranulación plaquetaria libera importantes mediadores de acción proinflamatoria tales como aminas vasoactivas (serotonina/histamina) y factores quimiotácticos para M0s y PMNNs, además de amplificar el proceso de activación del complemento. Todo ello, presumiblemente, en los puntos concretos donde se desarrolla la infección y en los que la proliferación de L.monocytogenes debe ser más contundentemente combatida durante la primera fase de la enfermedad (CZUPRYNSKI y BALISH, 1981a).

2.5.3.1.6. Valoración de la inmunidad inespecífica en la listeriosis murina y su relación con la displasia tímica congénita y la esplenectomía experimental.

Tal y como ha sido descrito por diversos autores, la cinética de la infección en la listeriosis murina puede ser subdividida en dos fases o etapas relativamente bien definidas en función de los diferentes mecanismos de inmunidad implicados en ellas (MACKANESS, 1962; MITSUYAMA y col., 1978; KRATZ y KURLANDER, 1988).

En la primera fase de la enfermedad (1-3 d.p.i.), únicamente mecanismos de defensa inespecíficos son empleados en el establecimiento de resistencia contra la infección, siendo las células que primaria y principalmente ejercen esta función PMNNs y M0s no activados. La segunda fase, que se inicia a partir del 3-4 d.p.i., permite la instauración de un eficaz mecanismo específico de resistencia T-dependiente que propicia una rápida y gradual eliminación de la infección. Las células efectoras de esta fase son M0s activados de gran poder listericida, cuya activación es consecuencia de un proceso de cooperación celular con Lts T sensibilizados. El resultado final de todo ello es la superación virtual de la infección aproximadamente a 7-8 d.p.i. (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970; MANDEL y CHEERS, 1980; SELBITZ y col., 1986; KRATZ y KURLANDER, 1988).

Evolutivamente, los mecanismos inespecíficos de inmunidad constituyen un conjunto heterogéneo de "estrategias" de defensa contra una variedad indefinida de microorganismos potencialmente patógenos. Por esta razón, la inmunidad Ag-inespecífica contra todo tipo de microorganismos y/o sus productos metabólicos, se activa rápidamente tras el inicio de la infección con la función "urgente" de inhibir o interferir la proliferación y diseminación del agente infeccioso en el organismo. Se posibilita así un intervalo de tiempo suficiente como para permitir la posterior y plena instauración de mecanismos más eficaces de inmunidad Ag-específicos y T-dependientes, los cuales son ya capaces de superar la infección durante la segunda fase de la enfermedad o de inmunidad específica (PETIT y UNANUE, 1974; NEWBORG y NORTH, 1980; SELBITZ y col., 1986; KRATZ y KURLANDER, 1988).

En las estirpes murinas susceptibles a la infección por L.monocytogenes, la investigación de los mecanismos de inmunidad inespecífica se ha realizado - además de por los estudios ya citados sobre la actividad del sistema del complemento, MØs, PMNns, células AN y plaquetas - mediante el desarrollo de cuatro planteamientos experimentales básicos:

- * Utilización de estirpes con displasia tímica congénita ("ratones desnudos").
- * Depleción completa de Lts T: timectomía + irradiación con dosis letal de todo el organismo + reconstitución de médula ósea por transferencia de células tratadas con suero anti-theta y complemento.
- * Esplenectomía.
- * Utilización de mitógenos de Lts B.

En el transcurso de las últimas décadas, numerosos investigadores observaron que el SMF de ratones con displasia tímica congénita y, por tanto, con ausencia completa de Lts T, poseía una capacidad microbicida inespecífica de índole superior a las de las estirpes con desarrollo normal del timo (CHEERS y WALLER, 1975; HEYMER y col., 1976; EMMERLING y col., 1977; NICKOL y BONVENTRE, 1977; NEWBORG y NORTH, 1980; WENTWORTH y ZIEGLER, 1987b). Emmerling y col. (1977) observaron que en la infección con L.monocytogenes, la DL50 obtenida para las estirpes con displasia tímica fue del orden de 4-20 veces superior que la de las estirpes normales. Por otra parte, planteamientos experimentales basados en la provocación de una completa depleción de Lts T de los órganos linfoides y posterior infección con L.monocytogenes, obtuvieron resultados similares (CHAN y col., 1977).

Como consecuencia de la demostración y valoración conjunta de estos hallazgos, se impuso la conclusión de que

en la listeriosis murina la resistencia primaria contra L.monocytogenes no depende necesariamente del establecimiento de inmunidad específica mediada por Lts T, si bien, en condiciones normales, ambos procesos se desarrollan cronológicamente asociados (CHAN y col., 1977).

No obstante, la superioridad de las estirpes de ratones con displasia tímica respecto de su mayor poder listericida, constituye una ventaja ciertamente transitoria, ya que es únicamente válida durante la primera fase de la infección. En realidad, estas estirpes no logran superar nunca la enfermedad y desarrollan una infección crónica que finaliza con la muerte hacia el 1º o 2º mes post-inoculación. Por el contrario, las estirpes de ratones con desarrollo tímico normal, aunque a una DL50 inferior, una vez han logrado establecer un estado de inmunidad específica T-dependiente, superan con relativa facilidad la infección (HEYMER y col., 1976; EMMERLING y col., 1977; NEWBORG y NORTH, 1980).

Diversos autores han sugerido que el fundamento de este tipo de inmunidad T-independiente se basa parcialmente en la existencia durante la fase inicial de la infección de varios mecanismos alternativos de "activación" del SMF. En concreto, la capacidad de activación inespecífica del SMF es atribuida principalmente a dos tipos celulares bien definidos: Lts B (PETIT y UNANUE, 1974; NICKOL y BONVENTRE, 1977; NEWBORG y NORTH, 1980) y células AN (NICKOL y BONVENTRE, 1977; WENTWORTH y ZIEGLER, 1987a).

El importante efecto mitógeno policlonal que diversos productos derivados de L.monocytogenes tienen sobre el compartimento de Lts B de los órganos linfoides, ha sido también relacionado con la activación inespecífica de M0s peritoneales en la fase inicial de la infección (PETIT y UNANUE, 1974; MEDINA y col., 1975; COHEN y col., 1975; MCGREGOR y col., 1978; NEWBORG y NORTH, 1980; HETHER y col., 1983; RUDNICKA y col., 1985; PAQUET y col., 1986; WENTWORTH y ZIEGLER, 1987a).

Respecto de las células AN, su actividad en la primera fase de la infección se fundamenta básicamente en su capacidad de secreción de IFN - α/β . Se postula que IFN - α y β inducen la síntesis de IFN - gamma por Lts T activados en la segunda etapa de la infección (NAKANE y MINAGAWA, 1984). Además promueve junto con FECs la secreción de IL-1 por parte de M0s inflamatorios, linfocina que a su vez estimula la liberación de IFN - β y FECs por fibroblastos (FUJIKI y TANAKA, 1988).

Adicionalmente, Havell (1986) ha demostrado - mediante técnicas "in vitro" - la secreción de IFN - α y β por fibroblastos embrionarios murinos tras la infección con L.monocytogenes. Actualmente, se acepta que el IFN - α/β es capaz de inhibir, "in vitro", la proliferación intracelular

en células no fagocíticas de una variedad amplia de agentes patógenos no víricos como son algunas bacterias Gram (-), y algunas clamidias y rickettsias (HAVELL, 1986).

Otro factor implicado en el establecimiento de resistencia contra la infección durante la fase de inmunidad inespecífica, es el factor de necrosis tumoral (FNT- α) (KRATZ y KURLANDER, 1988; NAKANE y col., 1988). El FNT- α es secretado principalmente por M0s, alcanza sus valores máximos en sangre hacia el primer d.p.i. (NAKANE y col., 1988) y ejerce importantes funciones en relación con la infección listérica como son:

- * Propicia la adhesividad de las células inflamatorias al endotelio vascular.
- * Potencia la función de M0s y PMNNs.
- * Promueve la síntesis y secreción de FECs por las células endoteliales.
- * Acción sinérgica con IFN - gamma durante la segunda fase de la infección.

La expresión e importancia de estas funciones se demuestra mediante tratamiento con un Ac específico contra TNF- α , lo que disminuye significativamente la capacidad de resistencia contra la infección con dosis subletal de L.monocytogenes (Nº de listerias/gr/bazo e hígado) durante los dos primeros días p.i.. Este efecto deja de ser ostensible a partir del 3^{er} d.p.i. (NAKANE y col., 1988; KRATZ y KURLANDER, 1988).

En otro orden de cosas, diversos estudios sobre la importancia del bazo en la infección listérica han demostrado que la realización de esplenectomía previa a la infección con L.monocytogenes, permitía el uso de una DL50 hasta 100 veces superior respecto de los ratones control a los que únicamente se practicaba una "falsa" esplenectomía (SKAMENE y CHAYASIRISIBHON, 1977).

Este incremento de la resistencia contra la infección por L.monocytogenes provocado por la esplenectomía es independiente de la dosis infectiva empleada (PIETRANGELI y col., 1983) y el hecho de que sea ya constatable durante las primeras 48 h.p.i. - periodo en el que la inmunidad específica T-dependiente no ha podido establecerse todavía - demuestra que su inducción es de índole inespecífica y no mediada por Lts T (SKAMENE y CHAYASIRISOBHON, 1977; SKAMENE Y col., 1978; PIETRANGELI y col., 1983).

En experimentos realizados mediante inoculación por vía i.v. de L.monocytogenes, se ha demostrado que el tipo celular responsable de este incremento en la resistencia contra la infección es la célula de Kupffer hepática (SKAMENE y CHAYASIRISOBHON, 1977; SKAMENE y col., 1978; PIETRANGELI y col., 1983). La importancia de los PMNNs en

este tipo de experimentos no ha podido ser definida, pero la evidencia existente sugiere que su función no es determinante en el incremento de la resistencia contra la infección con L.monocytogenes (SKAMENE y col., 1978).

En relación con lo anteriormente expuesto, debe señalarse que la superior capacidad de los lotes de ratones esplenectomizados respecto de los controles para superar la infección con DL50 de L.monocytogenes es transitoria, disminuyendo esta gradual y espontáneamente hacia el 3^{er} mes post-excisión del bazo. Además, este incremento de la resistencia inespecífica puede ser abolido por transferencia de un pool de células esplénicas procedentes de un donador normal (SKAMENE y CHAYASIRISOBON, 1977).

Todos los investigadores que han estudiado la importancia y el significado del bazo en el desarrollo de la infección listérica experimental, coinciden en postular que este órgano ejerce en condiciones normales una relativa acción "supresora" sobre la actividad de las células de Kupffer. El hecho de que tal actividad "supresora" es eliminada por esplenectomía, unido a que la superior capacidad de los lotes de ratones esplenectomizados respecto de los controles para superar la infección, puede ser abolida por transferencia de un pool de células esplénicas provenientes de los bazos extirpados previamente, confirman esta hipótesis (SKAMENE y CHAYASIRISOBON, 1977; SKAMENE y col., 1978; POIROT y MYERS, 1980; PIETRANGELI y col., 1983; YAMAMOTO y col., 1985).

Finalmente, estos mismos investigadores basándose en estos experimentos y otros estudios complementarios sobre la función inmunorreguladora del bazo (GERSHON y col., 1974), sugieren que las células esplénicas responsables de la actividad supresora antes descrita son Lts T "supresores" residentes en dicho órgano en condiciones normales.

Por otra parte, Hutchison y Myers (1987), que demuestran la producción de PGE₂ por un "pool de células adherentes" esplénicas, proponen a esta prostaglandina como uno de los factores inmunoreguladores e inductores de supresión de la resistencia contra la infección listérica. Según estos autores, la influencia todavía no bien comprendida de PGE₂ - producida principalmente por células del SMF, pero susceptible de actuar sobre Lts T y B - , tendría como consecuencia la interferencia en la activación macrofágica y, en última instancia, en la disminución de la capacidad listericida del SMF.

2.5.3.2. Inmunidad específica.

El hecho más sobresaliente en el establecimiento de inmunidad específica contra la infección con L.monocytogenes, es que dicha inmunidad no es de carácter humoral y por tanto B-dependiente, sino que es de base celular y mediada por Lts T Ag-específicos en cooperación con células efectoras del SMF (MACKANESS, 1962; MACKANESS y col., 1968; LANE y UNANUE, 1972).

Fue Mackaness en 1962 quien primero demostró la significativa correlación temporal existente entre el establecimiento de resistencia adquirida (RA) contra la infección a 3-4 d.p.i. y el desarrollo de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR); ambos procesos como manifestaciones diferentes de un único proceso inmunológico de base celular, dependiente de la activación Ag-específica de Lts T por L.monocytogenes en el transcurso de la infección.

La demostración de que la transferencia de inmunidad contra la infección con L.monocytogenes entre un donante previamente inmunizado y un receptor susceptible a la misma, solo era posible mediante el uso de Lts T activados de manera Ag-específica y no por transferencia pasiva de suero inmune, confirmó plenamente esta hipótesis (MACKANESS, 1962; MIKI y MACKANESS, 1964; MACKANESS y HILL, 1969; BLANDEN y col., 1969; NORTH, 1973).

A este respecto, Nomoto y colaboradores (1983) mediante realización de timectomía a 24 h. post-nacimiento, observaron que la "capacitación" de los Lts T para mediar los procesos de RA y HTR en la infección listérica era ya constatable en el primer día de edad. Concluyeron de este hecho que en la listeriosis murina el timo es imprescindible para el establecimiento de inmunidad únicamente durante la etapa fetal.

Cuando experimentalmente se procede a la infección con DL50 de L.monocytogenes, la duración del estado de resistencia adquirida contra la infección (RA) - entendida como la capacidad para impedir la fase de proliferación logarítmica de L.m. en organismo infectado - es de 2-3 semanas como máximo a partir de la administración del inóculo. Las células efectoras responsables de este hecho son M0s activados que todavía persisten en los órganos que padecieron la infección (MACKANESS, 1962; NORTH, 1973).

Es importante mencionar que la presencia de estos M0s inflamatorios en los órganos infectados declina drásticamente hacia la 2ª semana p.i.; hecho que coincide con la eliminación prácticamente completa de L.monocytogenes del organismo (NORTH, 1973; NORTH y DEISSLER, 1975). Es por esta razón por lo que la RA contra la infección, ejercida principalmente por dichos M0s inflamatorios, disminuye también acusadamente en este mismo periodo de tiempo (NORTH y DEISSLER, 1975).

No obstante, si bien la RA contra la infección declina rápidamente hacia la 2ª-3ª semana p.i., un estado de protección inmunológica contra una posible reinfección se mantiene efectivo al menos hasta 60-90 d.p.i.. En este caso, las células capaces de conferir protección contra la reinfección con L.monocytogenes son Lts T de "memoria" (MACKANESS, 1962; NORTH, 1975; NORTH y DEISSLER, 1975).

Por otra parte, e independientemente de la vía de inoculación elegida, diversos investigadores han demostrado que en la listeriosis murina el establecimiento de protección inmunológica sólo es posible cuando la inmunización se realiza con cepas o especies patógenas viables de listerias y no mediante cepas apatógenas o L.monocytogenes inactivada (MACKANESS, 1962; MIKI y MACKANESS, 1964; WIRSING von KOENIG y col., 1982; KAUFMANN, 1984; SELBITZ, 1986; BERCHE y col., 1987b; KOGA y col., 1987; MUNK y KAUFMANN, 1988).

2.5.3.2.1. Los Lts T en la infección listérica. Cinética.

En la listeriosis murina la instauración de RA contra la infección con L.monocytogenes logra su máxima efectividad entre 4 y 10 d.p.i. aproximadamente (NORTH, 1975; NORTH y DEISSLER, 1975; KOSTIALA y MCGREGOR, 1975). Esta etapa coincide significativamente con la detección a 4 d.p.i. de linfoblastos T en la linfa del conducto torácico, y con la presencia de Lts T en las lesiones y focos activos de infección existentes en el organismo (MCGREGOR y LOGIE, 1974).

Se ha demostrado que los Lts T susceptibles de reconocimiento inmunológico por L.m., se transforman en linfoblastos T con especificidad antigénica para dicha bacteria en el bazo (NORTH y DEISSLER, 1975) y en los ganglios linfáticos activados por la infección (MCGREGOR y LOGIE, 1974; KOSTIALA y MCGREGOR, 1975; JUNGI y JUNGI, 1981).

En el caso del bazo, estos Lts T mediadores de inmunidad anti-listeria son ya detectables (infección vía i.v.) al 2º d.p.i., su producción es máxima hacia el día 6 p.i. y luego su nº declina rápidamente conforme se procede a la completa eliminación de L.monocytogenes del organismo. No obstante, un "retén" de Lts T detentadores de memoria inmunológica siempre permanece en el bazo durante por lo menos 2-3 meses p.i. (NORTH, 1975; NORTH y DEISSLER, 1975).

En cuanto a los ganglios linfáticos, los linfoblastos T son liberados en fase S ("síntesis") vía linfáticos eferentes al conducto torácico y por su mediación a la

circulación sanguínea. Desde la sangre estas células migran entonces hacia los diferentes órganos afectados donde existe activa proliferación bacteriana (MCGREGOR y LOGIE, 1974; KOSTIALA y MCGREGOR, 1975).

La capacidad para migrar desde la circulación a los puntos concretos del organismo donde evoluciona la infección es propia de los linfoblastos, pero no de los Lts "pequeños" observables en las lesiones; células en las que dicha capacidad es mucho menos significativa. La existencia en la fase inmunoblástica de receptores específicos de membrana capaces de interactuar con el endotelio ha sido sugerida como posible explicación de este hecho (MCGREGOR y LOGIE, 1974; KAUFMANN, 1983).

Desde este punto de vista, se supone que los linfocitos T "pequeños" con especificidad antigénica presentes en los exudados inflamatorios y en las lesiones con carácter progresivamente granulomatoso, no son sino la progenie de los inmunoblastos T que en el inicio de la fase de inmunidad específica migraron hacia los diferentes órganos afectados por la infección (MCGREGOR y LOGIE, 1974; MCGREGOR y col., 1978; JUNGI y JUNGI, 1981).

La consecuencia más importante de este hecho es que la cooperación celular Lt T - M0, con objeto de promover la activación de estos últimos, se realiza "in situ" en los puntos concretos del organismo en los que se desarrolla la infección. La mayor eficacia que esto comporta es evidente (MCGREGOR y LOGIE, 1975; KOSTIALA y MCGREGOR, 1975; MCGREGOR y col., 1978; RHODES y col., 1979; FARR y col., 1979a y b; KAUFMANN, 1983; KAUFMANN y BRINKMANN, 1984).

Una vez superada la enfermedad, la persistencia de inmunidad es mediada por Lts T de "memoria", los cuales son también una fracción de la progenie de los linfoblastos observables a 3-6 d.p.i. en conducto torácico durante la segunda fase de la infección. En esta fase, tales linfoblastos se distribuyen profusamente por todo el organismo, tanto en órganos lesionados como como en los no afectados, pero predominantemente en los primeros. Los Lts T descendientes de aquellos adoptan entonces el carácter de "residentes" en sus órganos de ubicación y por lo tanto, no recirculantes (JUNGI, 1980; JUNGI y JUNGI, 1981).

La atracción y progresivo acúmulo de M0s inflamatorios en los puntos de implantación y colonización bacteriana es promovida de manera importante por Lts T activados mediante la secreción de factor quimiotáctico para M0s (FQM) (JUNGI y MCGREGOR, 1977; MIYATA y col., 1982; KOGA y col., 1987; HANDA y col., 1987). Tal actividad quimiotáctica T-dependiente es de carácter mixto, tanto para PMNNs como para M0s, y es detectable hacia el 4º d.p.i. coincidiendo con la afluencia de linfoblastos T Ag-específicos y M0s

inflamatorios a los puntos donde se desarrolla la infección (JUNGI y MCGREGOR, 1977; HANDA y col., 1987).

La subpoblación linfocítica secretora de FQM ha sido identificada por diversos autores como L_{yt} 1⁺, lo cual caracteriza a la subpoblación de Lts T "cooperadores" y mediadores de HTR (HANDA y col., 1987; KOGA Y COL., 1987).

Adicionalmente, la producción y secreción de factor de inmovilización de M0s por Lts T activados del exudado inflamatorio, actúa sinérgicamente con el FQM al promover y aumentar las posibilidades de cooperación Lt T - M0 con objeto de lograr la activación de los M0s inflamatorios (MACKANESS, 1969; KOSTIALA y MCGREGOR, 1975).

2.5.3.2.2. Interacción Lt T - M0. Activación macrofágica.

En lo relativo a los complejos fenómenos de cooperación celular Lt T - M0, fundamento de la activación macrofágica, la primera fase del proceso consiste en la "presentación del Ag" a los Lts T susceptibles de reconocer Ags de L.monocytogenes. Esta función es desempeñada por las células presentadoras de Ag (CPA) entre las que se incluyen algunos M0s, y se produce en los órganos linfoides activados por la infección (ZIEGLER y UNANUE, 1981; JUNGI y JUNGI, 1982; ALLEN y col., 1984).

En concreto, el proceso de presentación antigénica incluye dos fases: (ZIEGLER y UNANUE, 1981; JUNGI y JUNGI, 1982; ALLEN y col., 1984)

A) La primera supone la interacción listeria-CPA mediante Ags receptores propios de listeria o tras su opsonización, mediante receptores Fc/C3 de la CPA. Esta interacción promueve su fagocitosis así como la consiguiente formación del fagosoma y lisosoma secundario habituales.

B) La siguiente etapa o de "procesamiento antigénico", es el resultado de la catabolización lisosómica de listeria junto con la expresión posterior de "múltiples fragmentos" derivados de su degradación en la membrana plasmática de la CPA. Estos últimos en asociación con moléculas H-2 del complejo mayor de histocompatibilidad murino (CMH).

Una vez iniciado el proceso, la expresión de Ag H-2 en la superficie del M0 es promovida y aumentada principalmente por la secreción de IFN-gamma por parte de M0s y Lts T activados previamente (NAKANE y MINAGAWA, 1984; KAUFMANN, 1987).

La expresión conjunta en la membrana plasmática de la CPA de Ag listérico en asociación con el complejo H-2 , permite el reconocimiento del mismo por parte de los Lts T específicos para dichos Ags (ZIEGLER y UNANUE, 1981; ALLEN y col., 1984).

Todo el proceso tiene como resultado la activación Ag-específica de los Lts T clonalmente "seleccionados", lo cual se manifiesta por su inmediata transformación en inmunoblastos y posterior migración hacia los puntos del organismo donde se localiza la infección (MCGREGOR y LOGIE, 1974; MCGREGOR y LOGIE, 1975; MCGREGOR y col., 1978), momento en el que, tras la iniciación de una etapa de proliferación "in situ", se originarán los clones de Lts T mediadores de resistencia específica contra L.monocytogenes (MCGREGOR y LOGIE, 1974).

La amplificación y el aumento de eficacia de los mecanismos de inmunidad, precisamente en los puntos en los que se desarrolla la infección, son las consecuencias más importantes de todo el proceso (MCGREGOR y LOGIE, 1975; MCGREGOR y col., 1978; KAUFMANN, 1983).

La proliferación de Lts T mediadores de resistencia contra la infección es Ag-específica (MACKANESS, 1969; BLANDEN y col., 1969; LANE y UNANUE, 1972; KAUFMANN y HAHN, 1982), y es inducida y amplificada por la secreción de interleucina 1 y 2 (IL-1/IL-2) por parte de los M0s-CPA y de los Lts T activados respectivamente (KAUFMANN y col., 1982; KAUFMANN, 1987).

Respecto de la activación de los macrófagos inflamatorios presentes en las lesiones, hay que señalar que esta es producida por la secreción de linfocinas que actúan sobre el metabolismo celular de dichos M0s potenciando su capacidad microbicida (MACKANESS, 1969; MCGREGOR y LOGIE, 1975; RHODES y col., 1979). El IFN-gamma, secretado principalmente por Lts T activados, es la linfocina mejor caracterizada hasta el momento, habiéndose demostrado su participación en la activación macrofágica por diversos autores (NAKANE y MINAGAWA, 1984; KAUFMANN y BRINKMANN, 1984; BUCHMEIER y SCHREIBER, 1985; Van DISSEL y col., 1987; KAUFMANN, 1987; MAGEE y WING, 1988; CAMPBELL y col., 1988).

En experimentos "in vitro" en otras especies de roedores (cobayo) también ha sido descrita la secreción de factores solubles listericidas al medio extracelular por M0s activados (MIDDLEBROOK y col., 1974; BAST y col., 1974).

Uno de los hechos más significativos de la activación macrofágica es que si bien dicho proceso de activación es inducido por Lts T Ag-específicos, la ulterior activación de los M0s efectores es de índole inespecífica. Es decir, la Ag-especificidad es una propiedad de los Lts T, mientras que

los M0s activados ejercen su función efectora inespecíficamente contra diferentes agentes patógenos de carácter intracelular, independientemente de cual sea en concreto el que origine la activación inicial de los Lts T (MACKANESS, 1964; BLANDEN y col., 1969; MIDDLEBROOK y col., 1974; YOSHIKAI y col., 1980; KAUFMANN, 1983). Estudios complementarios sobre inmunidad "concomitante" entre infección experimental con L.monocytogenes y establecimiento de inmunidad antineoplásica, confirman, ampliándolo, este hecho (SPITALNY y NORTH, 1977; NORTH y KIRSTEIN, 1977).

A pesar de estar bien establecido que el proceso de activación macrofágica mediado por Lts T activados Ag-específicamente es el fundamento de la RA contra la infección con L.monocytogenes, que subpoblación o posibles subpoblaciones de Lts T son las responsables de la misma, es una cuestión debatida todavía en la actualidad (KOGA y col., 1987; MIELKE y col., 1988).

Por una parte, diversos autores sugieren que la subpoblación de Lts T responsable del establecimiento de inmunidad específica contra la infección con L.monocytogenes, son Lts T de fenotipo Lyt 1⁻ 2, 3⁻ con restricción inmune por la región H-2 Ia del CMH murino. Dicho fenotipo se corresponde con los Lts T "cooperadores/inductores", y manifestaciones inmuno-específicas como son la RA contra la infección y la HTR, serían según estos autores, inducidas por esta única subpoblación de Lts T como consecuencia de su activación por L.monocytogenes (ZINKERNAGEL y col., 1977; KAUFMANN y HAHN, 1982; KAUFMANN y BRINKMANN, 1984; MAGEE y WING, 1987).

En contraposición con este planteamiento diversos investigadores han constatado que tanto la reacción de HTR como la RA contra la infección, son fenómenos susceptibles de ser reproducidos experimentalmente de manera independiente (WOAN y col., 1985; KOGA y col., 1987; CZUPRYNSKI y BROWN, 1987; MIELKE y col., 1988).

De esta disociación entre ambos fenómenos, numerosos investigadores deducen que el establecimiento de inmunidad específica contra la infección con L.monocytogenes es consecuencia de la cooperación y acción sinérgica de Lts T Lyt 1⁺, 2, 3⁻ y Lyt 1⁻, 2, 3⁺; fenotipos pertenecientes a Lts T "cooperadores/inductores" y "citotóxicos/supresores" respectivamente. Estos últimos poseen restricción inmune regulada por Ags H-2 K y H-2 D del CMH murino (DUSTOOR y BLAZKOVEC, 1978; WOAN y MCGREGOR, 1981; WOAN y col., 1981a y b; JUNGI y JUNGI, 1982; WOAN y MCGREGOR, 1984; WOAN y col., 1985; WOAN y col., 1986; CZUPRYNSKI y BROWN, 1987; KOGA y col., 1987; KAUFMANN, 1987; KAUFMANN, 1988a; MIELKE y col., 1988).

Según este planteamiento, los Lts T Lyt 1⁺,2,3⁻ regulados por Ags H-2 Ia, serían los mediadores de la reacción de HTR y responsables del acúmulo de M0s inflamatorios y PMNNs en los puntos donde se desarrolla la infección (JUNGI y JUNGI, 1982; WOAN y MCGREGOR, 1984; WOAN y col., 1985; CZUPRYNSKI y BROWN, 1987; KOGA y col., 1987; MIELKE y col., 1988). Por su parte, Lts T Lyt 1⁻,2,3⁻ controlados por Ags H-2 K y H-2 D del CMH murino, se supone son las células T mediadores de la RA contra la infección con L.monocytogenes, pero su mecanismo concreto de acción se desconoce actualmente (WOAN y col., 1985; WOAN y col., 1986; CZUPRYNSKI y BROWN, 1987; MIELKE y col., 1988).

A este respecto, Czuprynski y Brown (1987) sugieren que los Lts T mediadores de actividad citotóxica (Lyt 1⁻,2,3⁻) podrían encargarse de lisar "M0s residentes infectados". Puesto que dichos M0s poseen un potencial microbicida poco significativo, su lisis por Lts T citotóxicos permitiría la exposición de las listerias a la acción de PMNNs y M0s inflamatorios de mayor poder listericida, además de promover "in situ" el proceso de activación de dichos macrófagos.

Por otra parte, según Mielke y colaboradores (1988) la cooperación y el sinergismo entre Lts T de ambos fenotipos citados, consistiría en la secreción de IL-2 por parte de Lts Lyt 1⁻,2,3⁻, linfocina que sería necesaria para potenciar la actividad y proliferación de Lyt 1⁻,2,3⁺ en los focos de infección. Estos últimos por su parte, promoverían la activación de los M0s inflamatorios existentes en las lesiones mediante la secreción de IFN-gamma.

Hasta ahora la explicación más satisfactoria del sinergismo funcional de ambas subpoblaciones linfocíticas es la propuesta por Kaufmann (1987) y Kaufmann (1988b). Según este autor, tanto los Lts T Lyt 1⁺,2,3⁻ como Lyt 1⁻,2,3⁺, son necesarios para inducir un estado de protección inmune contra la infección con L.monocytogenes; siendo ambas subpoblaciones, a su vez, capaces - mediante secreción de IFN-gamma - de promover la activación macrofágica. No obstante, los Lts T Lyt 1⁻,2,3⁺ (citotóxicos) necesitan para ello de una estimulación previa con IL-2, la cual es secretada por Lts Lyt 1⁺,2,3⁻ (cooperadores) activados, todo ello en los puntos donde se desarrolla la infección.

Además de la función de activación macrofágica, ambos tipos de linfocitos T son también capaces de ejercer una función citolítica contra diferentes células "diana", hecho este condicionado por la clase del Ag del CMH que posean dichas células. Así, este autor demuestra como Lts T Lyt 1⁻,2,3⁺, son capaces de destruir cualquier célula infectada del organismo que exprese en su membrana plasmática Ags listéricos en asociación con Ag de clase I del CMH. Complementariamente, Lts T Lyt 1⁺,2,3⁻ son capaces de lisar células - principalmente M0s - que expresen Ags listéricos

asociados a Ag de clase II del CMH. El significado de ambas posibilidades sería el de impedir la proliferación bacteriana intracelular y la exposición de las listerias en el medio extracelular - más "hostil" - a la acción de M0s activados con gran poder listericida.

Finalmente, una tercera subpoblación de Lts T de fenotipo $Lyt\ 1,2,3^-$ capaz de inducir HTR y RA contra la infección ha sido caracterizada en la infección experimental con L.monocytogenes. Se ha emitido la hipótesis de que esta subpoblación T pudiera ser precursora de los otros dos tipos de Lts, estos últimos ya funcionalmente diferenciados (KAUFMANN y col., 1979; WOAN y MCGREGOR, 1984).

2.5.4. Factores condicionantes de la listeriosis murina experimental.

2.5.4.1. Dosis del inóculo.

La dosis es el principal parámetro del que depende la evolución de la infección listérica experimental, siendo su manifestación más importante la tasa de mortalidad observada en cada experiencia dada.

Los factores que condicionan el valor de la dosis a emplear en cada experiencia particular son:

- a) Especie/Serotipo
- b) Patogenicidad de la cepa empleada
- c) Estirpe murina
- d) Vía de inoculación

a) Especie/Serotipo:

De como la dosis varía en función de la especie de listeria considerada, puede ejemplificarse comparando las especies L.monocytogenes y L.innocua, respecto del valor de la dosis de inoculación necesaria para producir una tasa de mortalidad del 50%.

Así, según Wirsing von Koenig y col. (1983), la DL50 para una cepa de L.monocytogenes serotipo 4b por vía i.p. es del orden de 10^4 m.o./ml, mientras que la DL50 de L.innocua serotipo 6b es del orden de 10^{12} m.o./ml (Estirpe murina NMRI/Han). Similarmente, estos mismos investigadores observan también importantes variaciones en la DL50 en función del serotipo considerado. Así, en la misma

experiencia en la que determinaron una DL50 de 10^4 m.o./ml para el serotipo 4b de L.monocytogenes, obtuvieron una DL50 de 10^7 , 10^{12} y 10^{11} m.o./ml para los serotipos 1/2b, 3a y 4d respectivamente, todos ellos también pertenecientes a la especie L.monocytogenes. Mainou-Fowler y col. (1988) obtuvieron resultados muy similares respecto de la DL50 trabajando con serotipos de especies patógenas y apatógenas.

b) Patogenicidad de la cepa empleada:

No obstante estar bien establecida la clasificación del género Listeria en especies patógenas y apatógenas, la existencia de importantes variaciones de patogenicidad en el seno de una misma especie e incluso un mismo serotipo, como por ejemplo L.monocytogenes 1/2a, son posibles (EMODY y col., 1979; HOF, 1984; KAUFMANN, 1984). El origen mutacional de estas variaciones de patogenicidad está claramente establecido (BERCHE y col., 1987a).

Por otra parte, aceptando que el mantenimiento indefinido de una cepa bacteriana en medio de cultivo artificial tiene como consecuencia la atenuación progresiva de la patogenicidad de dicha cepa, resulta de este hecho otro de los factores que pueden modificar de manera importante la DL50 requerida para el estudio de la infección listérica experimental. No en vano, ya Mackaness (1962) observó como la DL50 de una cepa de L.monocytogenes 1/2a no reactivada previamente, fue de 6×10^7 m.o./ml, mientras que esta misma cepa redujo el valor de su DL50 a $2,8 \times 10^5$ m.o./ml tras la reactivación de su patogenicidad mediante pases sucesivos.

c) Estirpe murina:

La clasificación de las diferentes estirpes murinas en "resistentes" y "susceptibles" respecto de la infección con L.monocytogenes, se fundamenta en la existencia de un gen autosómico y dominante Lr, no ligado al CMH/H-2 (CHEERS y MCKENZIE, 1978; STEVENSON y col., 1980).

Una de las manifestaciones más directas de este hecho, es la ostensible diferencia entre el valor de la DL50 para una estirpe resistente y para otra susceptible. Así por ejemplo, Cheers y McKenzie (1978) hallaron que la DL50 de estirpes resistentes tales como C57Bl/6, B10.A y B10.D₂, era del orden de 100 veces superior a la obtenida para las estirpes BALB/c, CBA y A/J, estas últimas susceptibles. Mainou-Fowler y col. (1988) confirman estos resultados.

d) Vía de inoculación:

En la listeriosis murina, la dosis infectiva medida como DL50, varía significativamente en función de la vía de inoculación empleada. Así, para la vía i.v., según la

mayoría de los autores la DL50 oscila entre los valores 10^3 y 10^5 m.o./ml, dependiendo del serotipo y patogenicidad de la cepa, y de la estirpe murina empleada (MACKANESS, 1962; GRAY y KILLINGER, 1966; SELBITZ y col., 1986; etc.).

Mediante el uso de la vía i.p., la DL50 oscila entre 10^4 y 10^7 m.o./ml en función también de las características de la cepa empleada (GRAY y KILLINGER, 1966; EMODY y col., 1979; WIRSING von KOENIG y col., 1983; SELBITZ y col., 1986; SCHONBERG, 1989).

Respecto de la vía oral, los valores de la dosis empleada para provocar la infección murina experimental oscilan entre 10^6 y 10^{12} m.o./ml (MILLER y BURNS, 1970; ZACHAR y SAVAGE, 1979; MACDONALD y CARTER, 1980; AUDURIER y col., 1981; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985; CZUPRYNSKI y col., 1989).

Finalmente, en lo relativo a la vía subcutánea las referencias bibliográficas son escasas. En los trabajos consultados la dosis infectiva oscila entre 10^3 y 10^5 m.o./ml.

En última instancia, el efecto de la dosis sobre la evolución de la infección listérica experimental, se basa en la correlación existente entre aquella y la tasa de mortalidad observada. Desde este punto de vista, una dosis infectiva será letal cuando la tasa de proliferación listérica en el organismo durante la fase inicial de la enfermedad, supere las posibilidades defensivas de los mecanismos inespecíficos de inmunidad; en particular del SMF (Consultar punto 2.5.3.).

Según Selbitz y col., (1986), el órgano que mejor refleja la tasa de proliferación listérica en el organismo es el bazo. Estos investigadores establecieron el nivel letal de proliferación de L.monocytogenes en el bazo en 10^8 m.o./gr aproximadamente.

También según estos mismos autores, la causa última de la superación de los mecanismos inespecíficos de inmunidad por la infección listérica, no se fundamenta en el "agotamiento" de dichos mecanismos, sino en la capacidad de una fracción del inóculo para sobrevivir y proliferar en el interior de células fagocíticas. Es decir, es consecuencia del hecho de que siempre hay un porcentaje del inóculo "invulnerable" a los mecanismos microbicidas de PMNs y M0s.

Si este porcentaje de listerias es suficiente como para lograr durante la fase inicial de la infección, una tasa de proliferación en el bazo del orden de 10^8 m.o./gr, se producirá la muerte del organismo infectado. En caso contrario, si los mecanismos inespecíficos de inmunidad son capaces de contener la proliferación listérica en el

organismo hasta la instauración de la fase de inmunidad específica (3-6 d.p.i.) mediada por Lts T y M0s activados, entonces las posibilidades de supervivencia dependerán únicamente de la gravedad de las lesiones provocadas por la infección (SELBITZ y col., 1986).

2.5.4.2. Vía de inoculación:

En el estudio de la listeriosis experimental, mediante el uso de diferentes especies de roedores como animales de experimentación, las vías de inoculación empleadas han sido múltiples (GRAY y KILLINGER, 1966):

- | | |
|----------------------------|--------------------|
| ♦ Vía intravenosa (i.v.) | ♦ Vía aerógena |
| ♦ " intraperitoneal (i.p.) | ♦ " intracardiaca |
| ♦ " oral (intragástrica) | ♦ " epiconjuntival |
| ♦ " subcutánea (s.c.) | ♦ " vaginal |

En concreto, en la listeriosis murina tal y como ha sido expuesto en el punto 2.5.2., las vías de inoculación más frecuentemente utilizadas han sido en primer lugar las vías i.v. e i.p. y, secundariamente, la vía oral (MILLER y BURNS, 1970; ZACHAR y SAVAGE, 1979; MACDONALD y CARTER, 1980; AUDURIER y col., 1981; WIRSING von KOENIG y col., 1983; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985) y la vía subcutánea (AUDURIER y col., 1981; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985). Las demás vías de inoculación mencionadas no poseen una entidad significativa en el estudio experimental de la enfermedad y su empleo ha sido muy poco importante en la práctica.

Las vías i.v. e i.p. han sido las más frecuentemente utilizadas por permitir la reproducción del curso septicémico de la enfermedad de manera regular y constante. Esto ha permitido la caracterización de la infección experimental y la aceptación general de estas vías como referencia necesaria para el estudio de otras vías de inoculación, como por ejemplo, la oral y la subcutánea.

Las manifestaciones clínicas y el curso de la infección mediante las vías i.v. e i.p. han sido descritos en el apartado 2.5.2., por lo que únicamente comentaremos ahora lo referente a las vías oral y subcutánea.

* Vía oral:

La característica más frecuentemente señalada en la bibliografía sobre esta vía de inoculación es su inconstancia e impredecibilidad respecto de la existencia y

gravedad de las lesiones observadas (GRAY y KILLINGER, 1966; AUDURIER y col., 1981; WIRSING von KOENIG y col., 1983).

Por otra parte, uno de los aspectos más importantes y controvertidos de la vía oral respecto de la inducción de la enfermedad experimental, es el mecanismo de penetración de Listeria spp. en el organismo hospedador. A este respecto, dos hipótesis fundamentales son actualmente consideradas:

A) Macdonald y Carter (1980) sugieren que son las placas de Peyer (PP) del intestino delgado los "puntos especializados" de penetración de Listeria spp. al organismo hospedador. Desde las PP, mediante la vía linfática aferente accederían a los ganglios mesentéricos y desde aquí, vía conducto torácico, a la circulación general.

Según estos autores, para lograr la infección experimental por esta vía las dosis empleadas deben ser del orden de 10^{8-9} m.o./ml. Dosis inferiores de entre 10^6 y 10^7 m.o./ml, solamente inducen la infección experimental esporádicamente.

B) Por el contrario, otra hipótesis propugna que son los enterocitos del epitelio intestinal las células mediante las cuales Listeria spp. accede al interior del organismo hospedador (RACZ y col., 1972; GAILLARD y col., 1987).

Respecto de las lesiones observadas en la infección listérica experimental mediante la vía oral, las informaciones existentes en la bibliografía son algunas veces contradictorias y en general heterogéneas e inconcretas:

- Tracto gastrointestinal: Miller y Burns (1970) describen la presencia de un infiltrado difuso de células mononucleares en la submucosa del intestino delgado hacia el 7 d.p.i.. A 14 d.p.i observaron la existencia de una moderada enteritis ulcerativa focal en todos los lotes de ratones empleados. De los demás autores consultados en la bibliografía, casi ninguno aporta informaciones adicionales precisas al respecto. No obstante, Czuprynski y Balish (1981c), estudiando la listeriosis experimental en ratas gnotobióticas describen la existencia de colitis ulcerativa "autolimitante" entre 3-14 d.p.i. por vía oral. Según estos autores, el intestino delgado no se observó afectado.

En coincidencia con estos últimos investigadores, Zachar y Savage (1979) estudiando la colonización por L.monocytogenes del tracto intestinal de ratones gnotobióticos, observaron que dicha colonización, si bien es generalizada en todo el intestino, es significativamente más importante en el ciego y, sobre todo, en el colon, donde alcanza valores de hasta 10^9 m.o./gr.

Por su parte, Rácz y col. (1972) sólo observaron enteritis en sus experiencias con cobayos infectados vía oral, cuando éstos eran sometidos a un "pretratamiento" para tal fin. El lote de cobayos no "pretratados" se mostró resistente a la infección con L.monocytogenes vía oral.

- Hígado y bazo: El curso de la infección listérica mediante la vía oral también evoluciona hacia una generalización sistémica de la enfermedad, resultado de lo cual es la demostración de L.monocytogenes en hígado y bazo tanto histopatológicamente (MILLER y BURNS, 1970; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985), como mediante técnicas microbiológicas (MILLER y BURNS, 1970; MACDONALD y CARTER, 1980; AUDURIER y col., 1981; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985). No obstante, la afección de estos órganos es siempre más inconstante y esporádica mediante la utilización de la vía oral que cuando son empleadas las vías i.v., i.p. o s.c. (MACDONALD y CARTER, 1980; AUDURIER y col., 1981; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985).

- Otros órganos: El ganglio mesentérico (yeyunal) ha sido señalado por diversos autores como una etapa previa a la generalización sistémica de L.monocytogenes mediante infección vía oral (MACDONALD y CARTER, 1980; AUDURIER y col., 1981; CZUPRYNSKI y col., 1989). Sin embargo; en la bibliografía consultada no han sido halladas referencias sobre la existencia o no de lesiones en este ganglio.

La afección cardíaca sólo ha sido descrita esporádicamente, habiéndose diferenciado dos tipos de lesiones principales: epicarditis y miocarditis (POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985).

Lesiones pulmonares son principalmente señaladas por Miller y Burns (1970), quienes observan la existencia de neumonía intersticial hasta en el 60% de los casos estudiados y en un periodo de tiempo máximo de 14 días. Por su parte, Pohjanvirta y Huttunen (1985) también señalan la existencia de neumonía intersticial en lotes de ratones infectados experimentalmente con L.m. vía oral.

Lesiones uterinas sólo son observadas por Miller y Burns (1970) en hembras gestantes, existiendo en estos casos una panmetritis purulenta y necrotizante, así como una grave placentitis que tiene como consecuencia muerte fetal y abortos. Por el contrario, en hembras no gestantes no observaron lesión alguna.

- En la listeriosis murina experimental mediante infección por vía oral la instauración de inmunidad específica se observa entre el 3º y el 7º d.p.i.. La protección inmunológica conferida de esta manera es sistémica, siendo eficaz contra la reinfección con

L.monocytogenes tanto por vía i.v. como por vía oral (MACDONALD y CARTER, 1980).

Es también interesante precisar que el establecimiento de resistencia adquirida contra la infección con L.monocytogenes, vía oral, y el desarrollo de HTR, no coinciden cronológicamente. Así, la HTR comienza a ser evidente sólo hacia los días 6-7 p.i., siendo dependiente de la respuesta inmune mediada por Lts T esplénicos y no por el desarrollo de inmunidad específica local a nivel gastrointestinal (MACDONALD y CARTER, 1980).

* Vía subcutánea:

La vía subcutánea como tal, ha sido muy poco empleada en el estudio de la listeriosis experimental. La mayoría de los investigadores que la emplean lo hacen colateral o secundariamente en el contexto más general de la investigación de la respuesta inmune de base celular. Por ello, la información obtenible de la bibliografía es fragmentaria e inconcreta.

No obstante, según la bibliografía consultada puede afirmarse que también mediante esta vía de inoculación es posible la generalización sistémica de la infección y, consecuentemente, el establecimiento de la forma septicémica de la enfermedad (GRAY y KILLINGER, 1966; AUDURIER y col., 1981; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985).

Pohjanvirta y Huttunen (1985) informan de la afección constante de hígado y bazo en el curso de la septicemia y esporádicamente de epicarditis y encefalitis no purulenta.

2.5.4.3. Estirpe murina:

La existencia de estirpes murinas "resistentes" o "susceptibles" a la infección por L.m. está controlada por un gen autosómico dominante (Lr), no ligado al CMH/H-2. El efecto principal de este gen se manifiesta durante la primera fase de la infección listérica o de inmunidad inespecífica y su fundamento consiste en una ostensible superioridad funcional del SMF de las cepas "resistentes" respecto de las "susceptibles" (CHEERS y MCKENZIE, 1978; SKAMENE y KONGSHAVN, 1979; SKAMENE y col., 1979; STEVENSON y col., 1980).

Este gen Lr, además de no ser regulado por el CMH/H-2 se ha demostrado que tampoco está ligado a ninguno de los locus siguientes (CHEERS y MCKENZIE, 1978):

* H-1 (Complejo menor de histocompatibilidad/CmH)

- * H-3 (CmH)
- * H-4 "
- * H-7 "
- * H-8 "
- * Hc (Síntesis del factor C5 del complemento)
- * Ig (Alotipo de inmunoglobulina)
- * Thy-1 (Ag de Lts T)
- * c (Albinismo)
- * B (Capa de coloración oscura-negra/"Black")

El fundamento de la resistencia o susceptibilidad de las diferentes estirpes murinas se basa en la dicotomía muerte-supervivencia respecto de una dosis de referencia a determinar en cada experimento concreto. Según esto, algunas de las estirpes murinas habitualmente empleadas en investigación experimental se clasifican como sigue: (CHEERS y MCKENZIE, 1980; STEVENSON y col., 1980)

Resistentes	Susceptibles
■ C57Bl/6	■ BALB/c
■ C57Bl/10Sc Sn	■ DBA/1J
■ B10.D2/Sn	■ CBA/H
■ B10.A/Sn Sg	■ C3H.OB/Sf
■ (B10.A x A)F ₁	■ C3H/He J
■ NZB/WEHI	■ C3H.OJ/Sf
■ B6.C-H-2d By	■ A/J
■ SJL/WEHI	■ LP.R III
■ B6.PL (74NS)/Cy	■ WB/Re
■ B6.C-H-2ab ByJ	■ 129/J
■ SJL	■ DBA/2J
■ B10.A	■ DBA/1J
■ Swiss	

2.5.4.3.1. Fundamento de la superioridad del SMF de las estirpes murinas listeria-resistentes.

La superioridad funcional que confiere la posesión del gen Lr a las estirpes listeria-resistentes respecto de las susceptibles, se manifiesta a diferentes niveles durante la primera fase de la infección experimental. A saber:

1.- Las estirpes listeria-resistentes poseen una mayor capacidad para la movilización y acúmulo de monocitos/MOs y PMNs en los puntos donde se desarrolla la infección (STEVENSON y col., 1980; MANDEL y CHEERS, 1980; SADARANGANI y col., 1980; CZUPRYNSKI y col., 1985; WOOD y col., 1986; DLUGONSKA y col., 1988).

Esto no solamente implica una superioridad de tipo "cualitativo" en la movilización de MOs inflamatorios, sino

que también supone una mayor precocidad en el acúmulo de MØs inflamatorios en las lesiones (MANDEL y CHEERS, 1980).

Este hecho se manifiesta por la existencia de una monocitosis precoz detectable ya a 24 h.p.i., la cual mantiene valores significativos hasta los días 3-4 p.i.. Por el contrario, en las estirpes susceptibles (BALB/c) se observa sólo un máximo importante hacia el 4º d.p.i., siendo interesante el hecho de que a diferencia de las cepas resistentes (C57Bl/10), desarrollan una importante granulocitosis a este mismo tiempo post-infección (MANDEL y CHEERS, 1980; YOUNG y CHEERS, 1986).

Histopatológicamente, todo ello supone que en las estirpes resistentes la cantidad de las lesiones observadas en órganos tales como hígado y bazo es inferior a la existente en cepas susceptibles (C57Bl/10 versus BALB/c); presentando además un carácter típicamente granulomatoso ya a 48 h.p.i. en contraste con las lesiones predominantemente purulentas (microabscesos) observables en las estirpes susceptibles. En estas últimas, el inicio de la fase granulomatosa es apreciable más tardíamente, hacia 3-5 d.p.i. (MANDEL y CHEERS, 1980). No obstante, Mainou-Fowler y col. (1988) no observan diferencias histopatológicas significativas en lesiones hepáticas de estirpes resistentes (C57Bl/6) y susceptibles (BALB/c) tras infección experimental con L.monocytogenes y L.ivanovii.

2.- Las estirpes listeria-resistentes (C57Bl/10) poseen una población de células precursoras del linaje monocítico superior a la de las cepas susceptibles (BALB/c) (STEVENSON y col., 1980; YOUNG y CHEERS, 1986).

A este respecto, Young y Cheers (1986) destacan que en condiciones normales, la médula ósea de la estirpe resistente C57Bl/10 posee aproximadamente el doble de UFC-Ms que la estirpe susceptible BALB/c. Paralelamente, el bazo de la primera posee del orden de tres veces más UFC-Ms que la segunda.

Sin embargo, cuando se procede a la infección experimental con L.monocytogenes, se observa una drástica disminución de UFC-Ms y células con receptores específicos para FECs-1 a 24-48 h.p.i. en médula ósea (YOUNG y CHEERS, 1986; CHEERS y STANLEY, 1988). Estos autores relacionan el hecho con la existencia de monocitosis a este mismo tiempo p.i., interpretando que lo que ocurre no es sino una importante migración de monocitos vía circulación sanguínea hacia los puntos del organismo donde se desarrolla la infección. Cepas listeria-susceptibles como la BALB/c no muestran este hecho según los citados investigadores.

En contraste con lo anterior, no se observa correlación entre resistencia contra la infección con L.monocytogenes y

nivel sérico de FEC (M) en el transcurso de la misma (CHEERS y STANLEY, 1988).

Curiosamente, la realización y el estudio experimental de quimeras a este respecto ha demostrado que el gen Lr se expresa fenotípicamente a nivel del "ambiente" de la médula ósea - que regula la proliferación y maduración de las células precursoras de la serie monocítica - más que en función de las características propias o particulares de los M0s "per se" (KONGSHAVN y col., 1980).

3.- El SMF de las estirpes resistentes (C57Bl/10) posee una mayor capacidad listericida que el de las estirpes susceptibles (BALB/c) (CHEERS y col., 1978; SKAMENE y KONGSHAVN, 1979; MANDEL y CHEERS, 1980; CZUPRYNSKI y col., 1985; WOOD y col., 1986).

Mandel y Cheers (1980) informan de que, a 24 h.p.i., con dosis subletal de L.monocytogenes, la cantidad de

UFC-listeria recuperadas del hígado de la estirpe resistente C57Bl/10 es siempre inferior como mínimo en un factor de 10 respecto de la obtenida para la cepa susceptible BALB/c. Similares diferencias son observadas entre estirpes C57Bl/6 y A/J (SKAMENE y KONGSHAVN, 1979).

En concreto, la superioridad del SMF de las estirpes listeria-resistentes versus listeria-susceptibles, es atribuida a M0s inflamatorios que migran y se acumulan precozmente en los puntos de infección activa más que a M0s residentes, cuya capacidad bactericida inespecífica es menos significativa (CHEERS y col., 1978; SKAMENE y KONGSHAVN, 1979; STEVENSON y col., 1980; MANDEL y CHEERS, 1980; WOOD y CHEERS, 1986). A este respecto, Wood y Cheers (1986) observan como la cantidad de M0s residentes peritoneales de ambas estirpes, resistentes (C57Bl/10) y susceptibles (BALB/c), es equiparable en condiciones normales. Contrariamente, Stevenson y col. (1980) constatan una cantidad significativamente menor de M0s peritoneales en la cepa susceptible A/J respecto de la resistente B10.A.

La respuesta quimiotáctica de los M0s inflamatorios mediada por el factor C5a, probablemente depende de las estirpes murinas empleadas en cada experimento. Así, M0s inflamatorios de las estirpes C57Bl/10-resistente y BALB/c-susceptible no muestran variaciones significativas en su comportamiento frente a la estimulación con C 5a a 24 h.p.i. (WOOD y CHEERS, 1986). Contrariamente, M0s inflamatorios de la estirpe resistente B10.A son capaces de desarrollar una respuesta quimiotáctica notablemente más eficaz que la desarrollada por la cepa susceptible A/J (STEVENSON y col., 1980). La capacidad quimiotáctica de PMNs de las estirpes B10.A y A/J no ofrece variaciones significativas (STEVENSON y col., 1980).

La capacidad listericida atribuida a los PMNNs presentes en el exudado inflamatorio peritoneal permanece todavía como tema de controversia y discusión. Así, algunos autores como Wood y Cheers (1986) no atribuyen a los PMNNs una función listericida significativa en la primera fase de la infección. Por el contrario, Czuprynski y col. (1985) conceden a estas células un importante protagonismo junto con los M0s inflamatorios en el aclaramiento del inóculo durante las primeras 24 h.p.i..

4.- En las estirpes listeria-resistentes se observa una mayor precocidad en la instauración de inmunidad específica T-dependiente contra la infección con L.monocytogenes. Este hecho se demuestra que ocurre entre 24 y 48 h antes en la estirpe resistente C57Bl/6 que en la susceptible BALB/c (CHEERS y col., 1988).

Si ello es influenciado por las características intrínsecas del SMF y/o de los Lts T de ambos tipos de estirpes, o bien depende de la interacción Lts T-M0s inflamatorios, es algo que todavía está por precisar (CHEERS y col., 1988).

A este respecto, Goossens y col. (1988) informan de que entre 24 y 48 h post-infección con L.monocytogenes, la afluencia de Lts T listeria-específicos al hígado fue del orden de 10 veces superior en la estirpe resistente C57Bl/6 que en la susceptible CBH/He. Consecuentemente, este hecho es precedido por un máximo a 24 h.p.i. de Lts T reactivos en sangre periférica. Por el contrario, en el bazo no se observaron diferencias significativas a 48 h.p.i. en la presencia de Lts T Ag-específicos comparando ambas estirpes (GOOSSENS y col., 1988).

No obstante, es interesante mencionar que una vez establecido el estado de resistencia adquirida contra la infección con L.monocytogenes en ambos tipos de estirpes (C57Bl/6, BALB/c), no se observa diferencia alguna en su capacidad para superar una reinfección (CHEERS y col., 1988).

En resumen, el fundamento de la resistencia o la susceptibilidad a la infección con L.monocytogenes, se basa en que las estirpes murinas listeria-resistentes poseen una capacidad superior para interferir e impedir, entre 24 y 72 h.p.i., la fase de proliferación logarítmica bacteriana en hígado y bazo (CHEERS y col., 1978). Ello es posible porque la posesión del gen Lr confiere una mayor capacidad para la movilización y acúmulo precoces de M0s inflamatorios en los puntos de activa proliferación listérica. La actividad microbicida de tales M0s inflamatorios es inespecífica (WOOD

y CHEERS, 1986). Adicionalmente, el pool de UFC-Ms es significativamente superior en estirpes listeria-resistentes que en listeria-susceptibles. Por otra parte, en las estirpes listeria-resistentes se observa una mayor precocidad en la instauración de inmunidad específica T-dependiente contra la infección con L.monocytogenes.

2.5.4.4. Especie/Serotipo.

La mayoría de las experiencias sobre la listeriosis murina experimental han utilizado siempre cepas patógenas de los serotipos 1/2a y 4b, por otra parte los más frecuentemente aislados en casos de enfermedad naturales (Consultar punto 2.2.).

Las informaciones existentes en la bibliografía sobre serotipos de L.monocytogenes diferentes de 1/2a y 4b son

básicamente escasos, fragmentarios y heterogéneos (WIRSING von KOENIG, 1983; KAUFMANN, 1984; MAINOU-FOWLER y col., 1988). En general, los investigadores que trabajan con más de un serotipo lo hacen comparando la infección listérica experimental entre cepas de listeria patógenas y apatógenas (GAILLARD y col., 1986; BERCHE y col., 1987; HOF y CHATZIPANAGIOTOU, 1987; ROCOURT y SEELIGER, 1987; VAZQUEZ-VOLAND y col., 1989), pero apenas existen estudios sistemáticos sobre la listeriosis murina mediante el empleo de un panel amplio de especies y serotipos del género Listeria (KAUFMANN, 1984).

Tal y como ha sido expuesto en el punto 2.2., en la actualidad se consideran especies patógenas del género Listeria a L.monocytogenes y L.ivanovii, mientras que L.welshimeri, L.seeligeri, L.innocua, L.murrayi y L.grayi son consideradas apatógenas (ROCOURT y SEELIGER, 1985; GAILLARD y col., 1987; SCHÖNBERG, 1989). Sin embargo, no todas las cepas de L.monocytogenes se comportan como patógenas en la infección experimental (HOF, 1984; KAUFMANN, 1984).

Diversos investigadores han demostrado como cepas mutantes de L.monocytogenes pierden su carácter patógeno cuando el efecto mutagénico afecta su capacidad para la producción de hemolisina (Listeriolisina O) (HOF, 1984; GAILLARD y col., 1986; KUHN y col., 1988). La incapacidad para la síntesis de listeriolisina O se expresa por una drástica disminución de su capacidad para sobrevivir en el citoplasma de M0s peritoneales "in vitro" (HOF, 1984; GAILLARD y col., 1987; KUHN y col., 1988).

Variaciones en las características de superficie de L.monocytogenes, como en el caso de variantes "lisas" y "rugosas", también han sido implicadas como factores capaces de influir sobre la patogenicidad de una cepa dada. Así, variantes rugosas de L.monocytogenes muestran un grado de patogenicidad intermedio respecto de sus congéneres lisas de la misma especie. Adicionalmente, la inmunidad inducida por las variantes rugosas es siempre deficiente en relación a la proporcionada por cepas lisas (HOF, 1984).

Respecto de la posible patogenicidad de L.monocytogenes en función del Serotipo, ésta ha sido atribuida en grado variable a cepas hemolíticas de los serotipos:

- * 1/2a (MACKANESS, 1962; EMODY y col., 1979; HOF, 1984; KAUFMANN, 1984; KUHN y col., 1988; MAINOU-FOWLER y col., 1988; etc.)
- * 1/2b (WIRSING von KOENIG y col., 1983)
- * 1/2c (KAUFMANN, 1984)
- * 3b (MAINOU-FOWLER y col., 1988)
- * 4a (KAUFMANN, 1984)
- * 4b (AUDURIER y col., 1981; WIRSING von KOENIG y col., 1983; KAUFMANN, 1984; HOF, 1984; MAINOU-FOWLER y col., 1988)
- * 4c (AUDURIER y col., 1981; KAUFMANN, 1984)
- * 4d (WIRSING von KOENIG y col., 1983)
- * 3a (KAUFMANN, 1984; HOF y CHATZIPANAGIOTOU, 1987)

No obstante, tal y como ha sido expuesto previamente, también existen variantes mutagénicas no hemolíticas y apatógenas de L.monocytogenes. En concreto, de 1/2a han sido descritas frecuentemente (HOF, 1984; KAUFMANN, 1984; KUHN y col., 1988).

En lo referente al serotipo 5, correspondiente a L.ivanovii, todos los autores coinciden en atribuirle carácter patógeno en la listeriosis murina experimental, si bien su grado de patogenicidad es menor que el de L.monocytogenes (AUDURIER y col., 1981; HOF, 1984). Además, su tendencia en la infección experimental a colonizar básicamente el hígado y no el bazo, le confiere un carácter diferencial adicional respecto de L.monocytogenes (HOF, 1987).

De las especies no patógenas, L.innocua ha sido la más estudiada por la mayoría de investigadores que han trabajado sobre este tema (AUDURIER y col., 1981; WIRSING von KOENIG y col., 1983; KAUFMANN, 1984; MAINOU-FOWLER y col., 1988).

La característica fundamental de la infección experimental con L.innocua, es su incapacidad para la colonización de los órganos "diana" habituales en la listeriosis murina como son el hígado y el bazo (WIRSING von KOENIG y col., 1983; KAUFMANN, 1984). Consecuencia de ello,

es su rápida eliminación del organismo hospedador (bazo) ya en las primeras 24 h.p.i. y a dosis de hasta 10^7 m.o./ml. Cuando se emplean dosis tan elevadas como 10^{8-9} m.o./ml, su presencia en el organismo se reduce drásticamente a niveles no significativos hacia el tercer d.p.i. (WIRSING von KOENIG y col., 1983; KAUFMANN, 1984).

Histopatológicamente, este hecho se manifiesta por la presencia de lesiones inflamatorias leves en hígado y bazo. Tales lesiones tienen carácter de microabscesos, los cuales desaparecen de dichos órganos hacia la semana p.i. sin mostrar nunca carácter granulomatoso en su evolución (WIRSING von KOENIG y col., 1983).

La infección experimental con L.welshimeri y L.seeligeri provoca resultados similares a los descritos para L.innocua según Mainou-Fowler y col. (1988).

3. MATERIAL y METODOS.

3.1. Material.

3.1.1. Animales de experimentación.

3.1.1.1. Ratones.

Los ratones utilizados en las diferentes experiencias de este trabajo doctoral pertenecían a la estirpe Swiss y fueron proporcionados por Interfauna, S. Feliu de Codines (Barcelona). Se usaron ratones machos y hembras, indistintamente, de aproximadamente 20 gr. de peso, los cuales se mantuvieron en jaulas separadas en razón del sexo hasta el momento de la inoculación. La alimentación fue a base de pienso (Sanders S-10) y agua ad libitum. La cama, de viruta esterilizada (Biocentre), era renovada semanalmente.

No se detectó en ninguno de los lotes empleados mortalidad espontánea, ni signos clínicos o lesiones de enfermedades infecto-contagiosas que pudiera alterar la valoración de los experimentos realizados.

Para la realización de los experimentos se distribuyeron según 13 lotes de 12, 16 o 20 ratones/lote, en función de la especie o serotipo de Listeria, y en función de la dosis de inoculación empleadas.

3.1.1.2. Conejos.

Los conejos empleados para la obtención de sueros hiperinmunes específicos de cada cepa de Listeria, fueron hembras de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 1,5 Kg. de peso al inicio del experimento. Fueron alojados en jaulas independientes, y con agua y pienso (Sanderscuni) ad libitum. Se les distribuyó en lotes de dos/jaula y serotipo de Listeria.

3.1.2. Cepas de Listeria.

Las cepas de Listeria empleadas en este trabajo doctoral fueron suministradas por el Departamento de microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Especie	Serotipo	Referencia
♦ L.monocytogenes	1/2a	NCTC 7973
♦ "	3a	NCTC 5105
♦ "	4b	NCTC 10527
♦ L.ivanovii	5	ATCC 19119

NCTC: National Culture Type Collection

ATCC: American Type Culture Collection

3.1.3. Inóculo.

3.1.3.1. Preparación del inóculo.

Para la preparación de cada uno de los diferentes inóculos empleados, las cepas consignadas en el apartado 3.1.2. se sembraron en medio de cultivo específico para recuento, a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, y previo control de la pureza del cultivo - mediante reconocimiento de la morfología característica de las colonias de Listeria con lupa binocular -, se prepararon las correspondientes suspensiones bacterianas en solución de Ringer hasta obtener la dosis deseada.

Con objeto de controlar posibles errores en la dosis del inóculo, su concentración se verificaba posteriormente mediante nefelometría - comparando con la escala de MacFarland - y mediante recuento en placa. Este último método se realizaba siguiendo un sistema de diluciones decimales y sembrando 0,2 ml de la dilución correspondiente en medio de cultivo de recuento. Las placas de Petri sembradas se incubaban entonces a 37°C durante 48 h., y posteriormente se procedía a la cuantificación de las colonias así obtenidas.

3.1.3.2. Dosis de inoculación.

En experiencias previas se calculó la DL50 para las distintas cepas patógenas de Listeria utilizadas. Dicha DL50 fue empleada como dosis de referencia en la elección de la dosis de inoculación de cada experiencia concreta.

3.1.4. Antisueros.

Los antisueros empleados en esta Tesis Doctoral fueron elaborados por inmunización, vía endovenosa (vena marginal de la oreja), de lotes de conejos hembras de raza Nueva Zelanda a razón de dos/serotipo de Listeria.

La dosis de inoculación inicial fue del orden de 10^6 m.o./ml y de 10^{8-9} m.o./ml en las siguientes. Entre cada dos inoculaciones sucesivas se dejaban transcurrir 10 días, practicándose 7 días después de cada inoculación una extracción de sangre y un control del título del suero obtenido mediante la técnica de microaglutinación en placa. El nº de inoculaciones practicado fue variable, considerándose que el nivel de inmunización era adecuado cuando el título de los sueros era como mínimo de 1/1280.

Una vez logrados títulos séricos aceptables se procedía a la práctica de varias sangrías de 40-45 ml, espaciadas por lapsos de tiempo de 10 días con objeto de permitir la recuperación del animal donante. Tras procederse al desuerado y, previas dos centrifugaciones para eliminar elementos formes residuales, el suero así obtenido era identificado y congelado a - 20°C.

3.2. Métodos.

3.2.1. Pauta de sacrificio.

La pauta precisa de sacrificio desarrollada en cada experiencia, ha sido consignada en la introducción correspondiente a cada una de ellas en el capítulo de resultados. En general, salvo en las experiencias 1 y 2, en las que por los motivos aducidos en el apartado 4.1.1. se emplearon intervalos de tiempo entre sacrificios consecutivos de 8 h., la pauta básica empleada en las experiencias con las vías i.p. y oral, fue de dos ratones cada 24 h. a partir del momento de inoculación. En las experiencias con la vía subcutánea, la pauta inicial fue de dos sacrificios cada 12 h. durante los tres primeros d.p.i. y de dos cada 24 h. en los días siguientes.

La pauta de sacrificio establecida en cada experiencia se intentó mantener, en la medida de lo posible, independientemente de los casos de muerte observados a causa de la infección. Esta decisión tenía como principal objetivo conceder preeminencia al estudio y valoración secuencial de las lesiones observadas, más que a la mortalidad obtenida en cada experiencia. De esta manera fue posible comparar la evolución de la infección experimental, tanto en los casos espontáneos de mortalidad, como en los que se procedía al sacrificio, a un tiempo post-infección similar.

3.2.2. Necropsia.

Todas las necropsias realizadas en el transcurso de este trabajo doctoral fueron sistemáticas ordenadas y completas. Los métodos de sacrificio empleados fueron la dislocación de vértebras cervicales y el sacrificio con éter.

A continuación se expone la relación precisa de órganos recogidos en cada una de las experiencias para su posterior estudio histopatológico:

- I. delgado (Mínimo de 3-4 muestras/caso)
- I. grueso (Ciego y colon)
- Estómago (Glandular y no glandular)
- Riñones/uréteres/vejiga de la orina

- Utero/ovario
- Testículos
- Hígado
- Bazo
- Gs. renales e ilíacos
- G. gástrico
- Placas de Peyer
- Corazón
- Timo
- Tráquea/esófago
- Encéfalo
- G. inguinal superficial (Vía subcutánea)
- Médula ósea (Vía subcutánea)
- Punto de inoculación (Vía subcutánea)
- Páncreas
- G. yeyunal
- Glandulas adrenales
- Mesenterio
- Pulmones
- Gs. mediastínicos
- Gs. mandibulares

En la experiencia vía oral, dada la importancia que suponía el estudio del sistema gastrointestinal en relación a la patogenia de la infección por esta vía, la cantidad de muestras recogidas de dicho sistema fue muy superior a la del resto de experiencias realizadas. Así, se valoró del orden del 40-50% del tracto gastrointestinal, y entre 2 y 6 placas de Peyer por caso.

3.2.3. Procesamiento de las muestras.

3.2.3.1. Fijación y desmineralización.

Las muestras recogidas durante la necropsia eran inmediatamente fijadas en una solución tamponada de formol al 10%. La duración de la etapa de fijación era como mínimo de 24 h. Posteriormente, se procedía a independizar los diferentes órganos y a su tallado en piezas de inclusión. En el caso concreto de los ganglios linfáticos, excepto el G. yeyunal, se tallaban de manera que permanecieran asociados a otros órganos fácilmente reconocibles y de mayor tamaño que ellos; esto tenía como objeto evitar su pérdida y permitir una cómoda identificación microscópica de los mismos. Una vez talladas, las muestras eran introducidas en cassettes de inclusión, identificadas con la clave correspondiente a cada experiencia, y sometidas nuevamente a fijación durante un periodo de entre 12 y 24 h.

Una etapa adicional de desmineralización fue necesaria para el procesamiento de la médula ósea en las experiencias vía subcutánea. En estos casos, las muestras (Columna lumbar) ya talladas e introducidas en cassettes de inclusión, eran sometidas a la acción del ácido fórmico al 10% durante un periodo de como mínimo 72h.

3.2.3.2. Inclusión.

El proceso de inclusión en parafina se realizó según la técnica detallada a continuación:

1. Alcohol etílico 70% I	4,30 h
2. Alcohol etílico 70% II	2h
3. Alcohol etílico 80%	1h
4. Alcohol etílico 96%	3h
5. Alcohol etílico 100% I	1h
6. Alcohol etílico 100% II	1h
7. Benzoato de metilo	30 m
8. Benceno I	45 m
9. Benceno II	30 m
10. Paraplast I	2 h
11. Paraplast II	3,30 h
12. Paraplast III	1 h

El medio de inclusión empleado (Paraplast) tenía un punto de fusión de 55-57º C. La inclusión se realizó de manera automática con un incluser Histokinette (British American Optical).

La confección de los bloques de parafina se realizó mediante una unidad Histostat 8035 (Reichert Jung).

3.2.3.3. Microtomía.

Las piezas incluidas en parafina (Paraplast) fueron cortadas con un microtomo de rotación Biocut/1130 (Reichert Jung) al que se acoplaron cuchillas desechables R35 (Feather). El grosor de las secciones histológicas fue de 4-6 µm.

Una vez obtenidos del microtomo, las secciones histológicas eran depositadas sobre un baño caliente, a 37º C, con objeto de distenderlos. Posteriormente, eran recogidos en portas desengrasados y previamente recubiertos con alguna de las sustancias adhesivas siguientes:

* Albúmina glicerizada de Mayer. Adhesivo utilizado en las preparaciones procesadas rutinariamente y teñidas con H-E.

* Poli-L-lisina. Adhesivo utilizado en las preparaciones inmunohistológicas.

Finalmente, una vez montadas, las preparaciones eran secadas en estufa a 37º C durante al menos 12 h.

3.2.4. Técnicas histológicas.

3.2.4.1. Hematoxilina-eosina (H-E).

1. Desparafinar en xileno (10 m, x2)
2. Hidratar en batería de alcoholes de graduación decreciente
3. Lavar en agua corriente (5 m)
4. Hematoxilina de Mayer (3 m)
5. Lavar en agua corriente (10 m)
6. Eosina Y al 1% (1 m)
7. Deshidratación en alcohol etílico de 96% y 100% (5 m, x2)
8. Aclaramiento en xileno (5 m, x2)
9. Montaje de las secciones histológicas con Eukitt

3.2.4.2. Técnica de Gram.

1. Desparafinado e hidratación de las secciones histológicas
2. Solución cristal violeta-oxalato (30 s)
3. Enjuagar con agua
4. Solución de Weigert (20 s)
5. Enjuagar con agua
6. Decolorar con acetona (5 s)
7. Enjuagar con agua
8. Tinción de contraste con rojo neutro al 1% (1 m)
9. Lavar en agua y secar las preparaciones con papel de filtro
10. Deshidratación en acetona I y II
11. Aclaramiento en xileno
12. Montaje con Eukitt

3.2.5. Técnicas inmunohistológicas. Técnica de la Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP).

Esta técnica fue utilizada para detectar la presencia de antígeno (Ag) listérico en secciones tisulares de los lotes de ratones infectados experimentalmente, según se expuso en el apartado 3.1.3.. El protocolo de la técnica empleado en estos experimentos fue el descrito originalmente por Sternberger (1979), posteriormente adaptado a la demostración de *Listeria spp.* por Domingo y col. (1986):

1. Desparafinado e inmersión de las preparaciones en alcohol etílico 100%
2. Inhibición de la peroxidasa endógena: Solución de metanol y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0,05% durante 30 m.
3. Lavar en TBS (3 m, x3)
4. Circundar las secciones con silicona (Panreac) y añadir TBS

5. Substituir el TBS por suero normal porcino (10 m)
6. Incubación del primer antisuero: suero antilisteria. Su dilución se hacía en TBS adicionado con 20% de suero normal porcino (SNP). El volumen de antisuero empleado era de 150-200 μ l/sección histológica, y el tiempo de incubación de 30 m
7. Lavar en TBS (3 m, x3)
8. Incubación del segundo antisuero: suero anti IgG de conejo. Dilución 1:150 en TBS/20% de SNP. Tiempo de incubación: 30 m. Volumen de antisuero de 150-200 μ l/sección
9. Lavar en TBS (3 m, x3)
10. Incubación del tercer antisuero: complejo PAP/conejo diluido a 1:300 en TBS/20% de SNP. Tiempo de incubación de 30 m y volumen de antisuero empleado de 150-200 μ l/sección
11. Lavar en TBS (3 m, x3)
12. Revelado: Inmersión (agitación) de las preparaciones en una solución de diaminobenzidina (DAB) en tampón imidazol más la adición del sustrato, H₂O₂, durante 3-5 m
13. Lavar en TBS (3 m, x2) y agua corriente (5 m, x1)
14. Tinción de contraste con hematoxilina (3 m)
15. Lavar en agua corriente durante 10 m
16. Deshidratación, aclaramiento y montaje igual al de la técnica de H-E

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

3.2.5.1. Titulación del primer antisuero.

Las diferentes diluciones de trabajo de los antisueros empleados en estas experiencias, es decir, sueros anti 1/2a, 3a, 4b y 5, fueron establecidas en experimentos previos. Para ello, se realizaron diluciones crecientes de cada suero hiperinmune: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000. Una vez obtenidas las mencionadas diluciones se realizó la técnica de PAP según el protocolo especificado en 3.2.5., utilizando para ello preparaciones con la presencia - demostrada previamente - de Ag listérico en dichas preparaciones. Estas pruebas se realizaron de manera que el antisuero a titular y el Ag presente en la sección histológica, fueran homólogos, es decir, haciendo reaccionar a cada serotipo, 1/2a, 3a, 4b y 5, con su correspondiente antisuero específico (e.g. Ag 1/2a con suero anti 1/2a).

Para la elección del título de cada antisuero se valoró conjuntamente la obtención del máximo de reacción (+) y la ausencia de reacción inespecífica, todo ello a la dilución más alta posible. Los títulos de los antisueros así

establecidos y empleados ya de manera constante en todas las experiencias, fueron los siguientes:

- Suero anti 1/2a ----- 1:1000
- Suero anti 3a ----- 1:500
- Suero anti 4b ----- 1:500
- Suero anti 5 ----- 1:500

3.2.5.2. Controles de la técnica PAP.

Para comprobar la especificidad de la técnica inmunohistológica se realizaron pruebas complementarias de control de la reacción inmunológica. Estas pruebas o controles de especificidad fueron:

- * Control de reacción específica del primer As:
Para ello se utilizaba un suero normal o suero no inmune, perteneciente a la misma especie en la que se había elaborado el primer As. La ausencia de reacción (+) indicaba la inexistencia de reacción inespecífica dependiente de dicha especie.
- * Control de reacción específica del segundo As:
Para la detección de posible inespecificidad dependiente del segundo As se realizaba la técnica de PAP según el protocolo descrito pero sin la adición de primer As. En este caso la reacción (-) indicaba ausencia de inespecificidad de dicho As.
- * Control de reacción específica del complejo PAP:
Para el control de especificidad del complejo PAP se realizaba el protocolo habitual de la técnica pero sin la adición del segundo As. La reacción (-) obtenida indicó la ausencia de inespecificidad.
- * Control de la peroxidasa endógena:
Este control se verificaba mediante incubación de una preparación representativa con solución de revelado pero a la que no se había sometido previamente a la acción de la solución inactivadora de peroxidasa endógena.

Una vez eliminada la posibilidad de reacciones inespecíficas o no deseables debidas a los antisueros empleados, se utilizó únicamente en todos los casos de cada experiencia el denominado control negativo, consistente en substituir el primer As por un suero no inmune de la misma especie en la que se obtuvo dicho As.

4. RESULTADOS.

4.1. Introducción.

El planteamiento genérico de este trabajo doctoral consistió en el estudio de la patogenia y descripción secuencial de las lesiones observadas en la Listeriosis murina experimental. Para la consecución de este objetivo se emplearon tanto técnicas histológicas convencionales (H-E y Gram) como inmunohistológicas (PAP).

El conjunto del trabajo experimental se estructuró en función de una serie de parámetros o factores condicionantes básicos del curso de la infección, tal y como se consideró que era aconsejable tras consultar la bibliografía existente sobre el tema. Dichos factores fueron:

- ♦ Vía de inoculación
- ♦ Especie y serotipo de *Listeria*
- ♦ Dosis del inóculo

La vía de inoculación se consideró que era el principal factor condicionante del curso de la infección experimental. Por este motivo se consideró lo más adecuado estructurar todo el trabajo experimental, así como la interpretación de los resultados, en función de este parámetro; supeditando a él los otros dos factores condicionantes, es decir, la dosis y la especie o serotipo de *Listeria* empleado.

4.1.1. VIA INTRAPERITONEAL (i.p.).

El estudio de la listeriosis murina mediante el uso de la vía de inoculación i.p., constituye el núcleo central del planteamiento experimental de esta tesis doctoral. Esta vía es a su vez considerada la vía de referencia para la valoración y discusión del curso de la infección experimental según las restantes vías empleadas: subcutánea y oral.

El fundamento de esta elección se basa en que la vía i.p., junto con la vía i.v., son consideradas las vías más apropiadas para la reproducción de la infección experimental con un nivel de fiabilidad y constancia suficientes como para permitir el estudio de la patogenia de la enfermedad. Este aspecto aparece bien documentado en la bibliografía existente sobre el tema (GRAY y KILLINGER, 1966; MACKANESS, 1962; WIRSING von KOENIG, 1983; SELBITZ, 1986).

Por otra parte, y dado que en la listeriosis murina el desarrollo de la infección experimental se considera clásicamente dividido en dos fases, una fase inicial o de inmunidad inespecífica y una fase de inmunidad específica, (MACKANES, 1962; NORTH, 1970; MITSUYAMA y col., 1978)

decidimos estructurar el estudio de la enfermedad según dos tipos de experiencias que permitieran profundizar y caracterizar con mayor precisión la evolución de los acontecimientos durante cada una de las etapas de la infección. Así, se realizaron:

A) Experiencias de duración reducida:

Estas experiencias se centraron sobre la patogenia de las lesiones en la etapa inicial de la infección experimental. Su estudio se restringió a los días 1-2 p.i., periodo que cronológicamente se corresponde con la activación de los mecanismos inespecíficos de inmunidad.

B) Experiencias de duración normal:

Se interpreta como "duración normal", el lapso de tiempo comprendido entre el momento de la inoculación y la superación o curación aparente de la enfermedad. Este lapso de tiempo oscila entre 6-7 d.p.i. (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970).

El estudio de la infección experimental mediante la vía i.p. se subdividió en varias experiencias, cada una de las cuales pretendía analizar la posible influencia que sobre el curso de la infección ejercen:

- Dosis de inoculación empleada respecto de DL50.
- Especie de Listeria, incluyendo únicamente especies patógenas.
- Serotipo.

4.1.2. VIA SUBCUTANEA Y ORAL.

Las vías subcutánea y oral, fueron elegidas como vías de inoculación para el estudio de la listeriosis experimental por ser las más asimilables al desarrollo espontáneo de la enfermedad en condiciones naturales. Esto es particularmente importante en lo referente a la vía oral, ya que excepto en la encefalitis listérica típica de los rumiantes (Apartado 2.2.1.1.), la vía oral es la vía de contagio más importante en las diferentes especies susceptibles a esta enfermedad (GRAY y KILLINGER, 1966; ZACHAR y SAVAGE, 1979; MACDONALD y CARTER, 1980; CZUPRYNSKI y BALISH, 1981; GAILLARD y col., 1987).

4.1.3. PLAN Y ORDENACION DE LAS DIFERENTES EXPERIENCIAS REALIZADAS.

A continuación se expone la relación de experiencias realizadas, cada una de ellas con su numeración correspondiente:

4.2. Vía intraperitoneal

4.2.1. Experiencias de duración reducida

4.2.1.1. Experiencia 1. L.monocytogenes 1/2a

4.2.1.2. Experiencia 2. L.monocytogenes 4b

4.2.2. Experiencias de duración normal

4.2.2.1. Experiencia 3. L.monocytogenes 1/2a: 10^4 m.o./ml

4.2.2.2. Experiencia 4. L.monocytogenes 1/2a: 10^6 m.o./ml

4.2.2.3. Experiencia 5. L.monocytogenes 1/2a: 10^8 m.o./ml

4.2.2.4. Experiencia 6. L.monocytogenes 4b: 10^5 m.o./ml

4.2.2.5. Experiencia 7. L.monocytogenes 4b: 10^7 m.o./ml

4.2.2.6. Experiencia 8. L.monocytogenes 3a

4.2.2.7. Experiencia 9. L.ivanovii 5

4.3. Vía subcutánea

4.3.1. Experiencia 10. L.monocytogenes 1/2a

4.3.2. Experiencia 11. L.monocytogenes 4b

4.3.3. Experiencia 12. L.ivanovii 5

4.4. Vía oral. Experiencia 13. L.monocytogenes 1/2a

4.2. Vía intraperitoneal

4.2.1. Experiencias de duración reducida

4.2.2.1. EXPERIENCIA 1

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 1/2aDOSIS INOCULACION : 3×10^7 m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal (i.p.)

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo p.i.	4h	12h	20h	28h	35h	44h	50h
	R1	R3	R5	R7	R9*	R13	R14*
	R2	R4	R6	R8	R10*		R15
					R11		R16
					R12		

(*) mortalidad

4.2.1.1.1. BAZO.

En esta experiencia, hasta las 20 h.p.i. (R5 y R6) no se observaron lesiones aparentes, pero sin embargo si pudo detectarse mediante la técnica de PAP, la presencia de listerias fagocitadas en PMNNs y M0s de la ZM en R1, R3 y R4 (Figura 1).

En R5 y R6, los hallazgos más notables consistieron en depleción linfoide incipiente e inflamación PAP (+) del PALS, activación de la ZM con abundantes fagocitos PAP (+) y restos de células necróticas, y diversos acúmulos inflamatorios mixtos (PMNNs y M0s) PAP (+) en la pulpa roja.

A partir de las 24 h.p.i., en R7 y R8, la gravedad de las lesiones descritas en R5 y R6 aumentó progresivamente, tendiendo a su vez a adquirir carácter necrotizante y a generalizarse por todo el órgano. En ambos casos, a diferencia de la rápida inflamación y necrosis del PALS, los folículos linfoides fueron las estructuras de la PB que más tardíamente se afectaron (Figuras 2 a 7).

Posteriormente, a partir de las 35 h.p.i., de R9 a R14 la desorganización estructural y las lesiones necróticas

apreciables por todo el órgano fueron graves y masivas. La existencia de trombos fue frecuente (Figuras 8 a 11).

En R15 y R16 por el contrario, se pudo observar el desarrollo de una potente respuesta inflamatoria con ausencia de lesiones necrotizantes en el órgano. Lo más relevante en estos dos casos fue la evidente depleción e inflamación observada en la PB (Figura 12), y el que la presencia de listerias, demostrada mediante las técnicas de PAP y Gram, fue mínima.

4.2.1.1.2. GANGLIOS LINFATICOS.

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	16/16
■ Gs. renales e ilíacos (linfocentro lumbar) --	14/16
■ G. gástrico -----	7/16
■ Gs. mandibulares (linfocentro) -----	12/16
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	8/16

4.2.1.1.2.1. G. yeyunal.

Los hallazgos más notables observados en este ganglio, consistieron en una importante depleción linfoide del paracórtex, constatable ya a 12 h.p.i. en R4, y también en la presencia de acúmulos inflamatorios mixtos PAP (+) en córtex interfolicular y paracórtex a partir de las 24 h.p.i..

La depleción linfoide, observada primeramente en R4, fue PAP (-) y afectaba a la práctica totalidad de la zona paracortical y córtex interfolicular. Este hallazgo fue ya constante en el transcurso de toda la experiencia.

En lo que respecta a las lesiones inflamatorias y/o inflamatorio-necróticas, se observaron inicialmente hacia las 28 h.p.i. (R7 y R8), localizándose en paracórtex y córtex interfolicular principalmente (R7 a R16). En R9, R10, R13 y R14 las lesiones fueron particularmente graves, teniendo éstas carácter necrotizante (Figura 13). La intensidad de las lesiones observadas en este ganglio se muestra en la Gráfica 1.

4.2.1.1.2.2. Linfocentro lumbar.

Estos ganglios comenzaron también a observarse afectados en R4 a 12 h.p.i., mostrando entonces el tipo de depleción linfoide ya descrito para el G. yeyunal. Por lo demás, las lesiones inflamatorias observadas fueron siempre PAP (+), siendo el patrón lesional sugestivo del acceso de L.monocytogenes al ganglio tanto por vía linfática aferente, como por vía sanguínea (Figuras 14 y 15). En R10, R13 y R14 las lesiones tuvieron un importante carácter necrótico.

4.2.1.1.2.3. G. gástrico.

Independientemente de que el nº de casos de los que pudo obtenerse este ganglio es poco significativo, es importante el hecho de que la afección de los mismos hacia las 24-48 h.p.i. fue bastante grave.

Son de destacar los casos R10 y R14 en los que, al igual que en otros ganglios abdominales, se observó tanto una depleción linfoide importante (R10) como lesiones inflamatorias y necróticas graves (R14); éstas últimas restringidas fundamentalmente a la periferia ganglionar. Todo parece indicar que el origen principal de la afección de este ganglio son las múltiples lesiones inflamatorias observadas en la serosa y capas musculares subyacentes, constantes desde las 24 h.p.i. en esta experiencia.

4.2.1.1.2.4. Linfocentro mandibular.

Lo más característico de la afección de estos ganglios en esta experiencia fue la depleción linfoide del paracórtex, observada ya, al igual que en el ganglio yeyunal, hacia las 12 h.p.i. en R4. Posteriormente, a partir de las 20 y 28 h.p.i., acúmulos inflamatorios mixtos PAP y Gram (+) en paracórtex y córtex interfolicular fueron detectados en el transcurso de toda la experiencia (Figura 16), variando únicamente la gravedad de las lesiones observadas (Gráfica 1).

4.2.1.1.2.5. Linfocentro mediastínico.

Los primeros casos en que se observaron lesiones fueron R3 y R4 a 12 h.p.i. (Gráfica 1). En toda la experiencia el patrón lesional observado fue característico del acceso de L.monocytogenes a estos ganglios mediante la vía linfática aferente, es decir, caracterizado por la existencia de lesiones inflamatorias con abundantes MOs y PMNNs PAP (+) restringida o predominantemente en la zona de los senos subcapsular, corticales y medulares de dichos ganglios (Figuras 17 y 18). No obstante, conforme transcurría la infección y aumentaba la gravedad de las lesiones, la existencia de linfadenitis de aspecto progresivamente necrotizante, con substitución de la población linfoide normal por predominantemente PMNNs PAP (+) y abundante cariorrhexis y cariolisis, fue el hallazgo más característico (Figuras 19 y 20).

4.2.1.1.3. PLACAS de PEYER.

Hacia las 20 h.p.i., en R6, se observó lo que parecía ser "penetración activa" de listerias a través del mesotelio que cubre las placas de Peyer, hecho este, que no dejó ya de observarse en toda la experiencia (Figura 21).

La cantidad de listerias presentes en la serosa fue por lo general reducida, y se observó asociada a PMNNS y M0s PAP (+) adheridos a la misma. No obstante, también se detectaron libres tanto sobre el mesotelio, como en la capa muscular subyacente. Una vez en el interior de las placas de Peyer, las listerias generaron una reacción inflamatoria mixta, demostrándose acúmulos de PMNNS y M0s PAP (+) bien definidos tanto en la serosa, como en los folículos linfoides, zona interfolicular y la zona cúpula de algunas de dichas placas (R9 y R14).

Es de destacar, que aunque también existían acúmulos inflamatorios PAP (+) en otras zonas de la serosa intestinal, éstos eran significativamente menores que los observados en la serosa de las placas de Peyer. A menudo, la reacción PAP (+) incluso se observó únicamente sobre el mesotelio de la placa de Peyer, no existiendo, por el contrario, reacción en sus márgenes.

Hacia las 30 h.p.i. y, hasta el final de la experiencia (R9 a R16), se observó también una depleción linfoide variable pero importante en todos los casos (Figura 22).

En R15 y R16, las lesiones observadas fueron significativamente menores que las halladas en el resto de los casos de esta experiencia.

4.2.1.1.4. TIMO.

Hacia las 20 h.p.i., en R6 y R7 fue ya manifiesta una importante depleción del córtex y algunos acúmulos inflamatorios mixtos PAP (+) relativamente bien definidos.

En R10 (35 h.p.i.), la reacción inflamatoria observable en la serosa tímica periférica fue importante, pero, paradójicamente, el córtex - excepción hecha de la depleción linfoide - sólo mostró algunas zonas inflamadas PAP (+); aunque con una cantidad ostensible de listerias en las mismas. En contraste con esto, R13 y R14 mostraron una reacción inflamatorio-necrótica PAP (+) bastante importante en amplias zonas del córtex tímico.

De estos resultados puede deducirse que aun siendo evidente la existencia de lesiones inflamatorio-necróticas PAP (+) en el córtex tímico, este hecho no se corresponde en

intensidad e importancia con la depleción linfóide cortical generalizada observable en este órgano en el transcurso de la experiencia. Es interesante remarcar que en los casos en que se constataron lesiones inflamatorias PAP (+) importantes en el córtex, también estas fueron demostrables en la zona mediastínica adyacente a las mismas. La relación de causalidad entre ambas parece bastante posible.

4.2.1.1.5. HIGADO.

En esta experiencia, en el hígado, si bien no se observaron lesiones inflamatorias hasta las 20-28 h.p.i., si que fue posible por el contrario demostrar la fagocitosis de listerias por células de Kupffer, ya desde las primeras 4 h.p.i., mediante la técnica de PAP (Figura 23).

En general, las lesiones observadas en esta experiencia no mostraron la gravedad apreciada en la experiencia homóloga con L.monocytogenes de serotipo 4b. Tales lesiones consistieron en acúmulos inflamatorios mixtos (PMNs, MÓs) PAP y Gram (+), que no excedieron, en general, de las 100-150 μ m de diámetro. No se observó además la existencia de lesiones necróticas en ningún caso.

Es de destacar la inexistencia de lesiones en R15 y la prácticamente no significativa afección de este órgano observada en R16, ambos casos a 50 h.p.i.; hecho este coherente con la también leve afección del bazo en estos mismos casos.

4.2.1.1.6. PANCREAS.

La afección del páncreas en esta experiencia se observó a partir de las 35 h.p.i., siendo máxima en R13 y R14 hacia el final del segundo día post-infección.

Las lesiones observadas se caracterizaron por restringirse a acinis o grupos de acinis próximos bien definidos y por mostrar, normalmente, reacción PAP (+) intensa. Es interesante resaltar que no se apreciaron lesiones de este órgano en R15 y R16.

El hecho de que se afectasen predominantemente acinis superficiales y en contacto con zonas de la serosa - por lo demás frecuentemente inflamada - indica con toda probabilidad que la infección se diseminaba a partir de esta última (Figura 24).

4.2.1.1.7. PERITONEO.

Al igual que en otras experiencias en las que se empleó la vía de inoculación i.p., las serosas mesentérica y peritoneales en sentido amplio, mostraron lesiones inflamatorias PAP y Gram (+) de manera constante en el transcurso de toda la experiencia.

Las serosas más afectadas fueron las serosas génitourinaria, mesentérica, gastrointestinal y diafragmática. En el caso del sistema gastrointestinal, la afección adicional de diversa consideración, de las capas musculares subyacentes y de las placas de Peyer, fueron hallazgos frecuentes.

4.2.1.1.8. MEDIASTINO.

Las lesiones observadas en la zona mediastínica en esta experiencia no mostraron excesiva gravedad. Se observaron lesiones inflamatorias PAP (+) poco significativas en R9, R10, R11, R13 y R14.

4.2.1.1.9. Otros órganos.

Se observaron algunas lesiones PAP (+) en el epicardio, caso de R14, y en los pulmones, casos R4 y R8, pero en general no fueron significativas.

4.2.1.2. EXPERIENCIA 2

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 4h

DOSIS INOCULACION : $1,5 \times 10^7$ m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal (i.p.)

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo

p.i.	4h	12h	20h	28h	30h	36h	44h	45h
	R1	R3	R5	R7	R9*	R11	R13*	R15*
	R2	R4	R6	R8	R10*	R12	R14*	R16*

(*) mortalidad

4.2.1.2.1. BAZO.

Hasta las 12 h.p.i. no comenzaron a observarse alteraciones morfológicas evidentes en este órgano, si bien en R1 y R2 fue ya posible detectar M0s con bacterias PAP (+) mediante el uso de objetivo de inmersión. Tales M0s con listerias fagocitadas se localizaban principalmente en la zona marginal (ZM) de la pulpa blanca (PB).

Las primeras alteraciones apreciables se observaron en R3 a 12 h.p.i., consistiendo en una afluencia progresiva de M0s y PMNNs al órgano, los cuales se distribuyeron profusamente por los sinusoides de la pulpa roja (PR) y ZM. Al igual que en R1 y R2 algunas de estas células mostraron reacción PAP (+) intracelular. Se observó también en este caso una incipiente depleción e inflamación de la zona periarteriolar de la PB (PALS), así como presencia de M0s PAP (+) en la misma. R4 no mostró alteraciones significativas, pudiéndosele aplicar lo referido a R1 y R2.

Entre las 20-28 h.p.i. (R5, R6, R7 y R8), la depleción linfoide del PALS progresó gradualmente, haciéndose más evidente en torno a la arteriola central de la PB, lo cual se manifestó por la existencia de cariorrexis y cariólisis en dicha zona. También se observó reacción PAP (+) intracelular en folículos linfoides; mayoritariamente en células identificables como "macrófagos de cuerpo tingible" (MCTs). La depleción linfoide siempre coincidió con la afluencia de M0s y PMNNs a la zona del PALS y con la presencia de reacción PAP (+) intracelular en dichas células fagocíticas. Este patrón lesional consistente en depleción e inflamación y necrosis del PALS, será ya constante y se intensificará progresivamente durante toda la experiencia.

La ZM se observó particularmente activada, con cantidades importantes de células fagocíticas PAP (+) y fenómenos de necrosis celular que predominaban y eran más abundantes en la zona inmediatamente adyacente a la PB.

Respecto de la PR en este primer día p.i., además de una gran profusión de PMNNs y M0s, muchos de ellos con reacción PAP (+) intracelular, cabe decir que mostró también necrosis celular difusa distribuida mas o menos uniformemente por toda ella, sobre todo en R5 y R8.

A partir de las 28-30 h.p.i., las lesiones previamente descritas aumentaron gradualmente en extensión y gravedad hasta el final de la experiencia. Como consecuencia de ello, la afección de la PB, que se manifiesta básicamente por la existencia de inflamación de tipo mixto (PMNNs/M0s) y por depleción y necrosis linfoide ambas progresivas, fue intensificándose gradualmente (R8, R9) hasta el punto de poderse constatar su práctica desaparición en R10, R13 y

R14. Únicamente los folículos linfoides de la PB conservaron vestigios reconocibles de su estructura. En R15 y R16 a 45 h.p.i., la necrosis del órgano es casi total (Figura 25).

En los últimos animales de la experiencia (R13-R16), la depleción linfóide y la necrosis fueron de tal magnitud que era posible apreciar parcialmente estructuras del estroma del órgano. Particularmente aparentes eran sobre todo las estructuras vasculares, algunas de las cuales - con toda probabilidad venas - se observaron anormalmente distendidas. La observación de múltiples trombos fue también frecuente en estos casos (Figura 25).

Hay que destacar que en R11 y R12 (36 h.p.i.), el bazo, si bien mostró una importante reacción inflamatoria generalizada tanto en la PB como en la PR, no mostró por el contrario existencia de necrosis significativa en su seno. Así por ejemplo, esta fue menos importante en R11 y R12 a 36 h.p.i. que en R9 y R10 a 30 h.p.i., y por supuesto que en R13-R16. En consonancia con esto, la reacción PAP (+) también fue ostensiblemente menor en R11 y R12 que en el resto de los casos anteriormente mencionados.

En resumen, durante los dos primeros días post-infección las lesiones existentes en el bazo se caracterizaron por una depleción y necrosis linfóide progresivas, tanto de la PB como de la PR, y por una masiva afluencia de M0s y PMNNs, los cuales se distribuyen profusamente por todo el órgano. Las lesiones inflamatorio-necróticas descritas se inician en la ZM de la PB y el PALS. Los folículos linfoides son las estructuras de la PB menos y más tardíamente afectadas.

La PR se afectó casi a la vez o simultáneamente a la PB, y en ella, además de la presencia de gran cantidad de PMNNs y M0s, la existencia de necrosis celular difusa fue el hecho más significativo.

La positividad de la reacción de PAP mostró tanto en lo referente a su intensidad como a su distribución en el órgano, un curso paralelo y similar al de la progresión de las lesiones descritas.

4.2.1.2.2. GANGLIOS LINFÁTICOS.

La relación de ganglios linfáticos estudiados y valorados fue la siguiente:

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	14/16
■ Gs. renales e ilíacos (linfocentro lumbar) ---	13/16
■ G. gástrico -----	10/16

- Gs. mediastínicos (linfocentro) ----- 9/16
- Gs. mandibulares (linfocentro) ----- 11/16

En esta experiencia el primer ganglio en el que se observaron signos de inflamación fue el G. mediastínico de R2 a 4 h.p.i. (Gráfica 2). Mostraba reacción PAP (+) intensa circunscrita a los senos subcapsular y medulares y siempre asociada a la presencia importante de PMNs y M0s. En contraste, la zona exterior adyacente al ganglio permaneció indemne. Las listerias detectadas siempre lo fueron en posición intracelular.

La afección y reacción PAP (+) del linfocentro mediastínico se mantuvo durante el transcurso de toda la experiencia (R5, R6, R7, R12, y R15), variando únicamente el grado de inflamación y necrosis existente en el mismo, que en general siempre fue importante. El patrón lesional de inflamación mixta difusa y necrosis en grado variable, distribuidas principalmente por el seno subcapsular y la médula ganglionar, se corresponde con la de un Ag o agente infeccioso que accede al ganglio vía linfática aferente.

En el G. yeyunal se observaron a 20 h.p.i. (R5,R6) los primeros indicios de inflamación (Gráfica 2). Consistieron éstos en una amplia zona de moderada depleción linfoide sita en el paracórtex, junto con la presencia en la misma zona de abundantes células de aspecto macrofágico. Toda la zona fue PAP (-).

En R6 sin embargo se observó un nº reducido de acúmulos inflamatorios mixtos (PMNs/M0s) mal definidos en paracórtex y córtex interfolicular. Tales acúmulos se asociaban invariablemente a vénulas post-capilares y la reacción PAP (+) fue solo detectable en algunos M0s mediante objetivo de inmersión.

A partir de este momento (R8 a R16) las lesiones descritas fueron ya constantes durante toda la experiencia, observándose también con frecuencia en la zona subcapsular (Figura 26). No obstante, aunque el nº de acúmulos inflamatorios se incrementó moderadamente, ni las lesiones ni la positividad a la reacción de PAP fueron excesivamente importantes.

Una significativa depleción linfoide fue observable en todos los casos desde R8 a R16. Esta era muy evidente tanto en el paracórtex como en los folículos linfoides, estos últimos PAP y Gram (-).

Respecto de los demás ganglios abdominales (G. gástrico, Gs. renales e ilíacos), la valoración de las lesiones que mostraron es en general similar a la ya comentada para el ganglio mesentérico. En ellos, el grado de

inflamación y necrosis si bien varió ostensiblemente, fue prácticamente constante. En concreto el grado de afección que se observó en estos ganglios se detalla en la Tabla 2.

En lo que se refiere a los ganglios mandibulares el primer caso en el que se observaron signos de inflamación fue el R5 a 20 h.p.i. (Gráfica 2). Al igual que en el ganglio mesentérico de este mismo caso, el hallazgo más relevante fue una importante zona de depleción linfoide paracortical con abundantes M0s, todo ello asociado a la presencia de lesiones inflamatorias alrededor de algunas vénulas post-capilares de endotelio alto (VEAs). La reacción PAP fue positiva débil y se localizó intracelularmente en M0s. Para su detección fue necesario el objetivo de inmersión.

Las lesiones observadas en los Gs. mandibulares de los demás casos de esta experiencia (R8, R9, R10, R12, R13, R15 y R16), consistieron en acúmulos inflamatorios mixtos (PMNNs/M0s) más o menos bien definidos en paracórtex y córtex interfolicular y en la existencia de una variable pero significativa depleción linfoide. En algunos M0s de los acúmulos inflamatorios perivenulares descritos se pudieron detectar listerías PAP (+).

4.2.1.2.3. TIMO.

En el timo los primeros signos de alteración se observaron a 12 h.p.i. en R3 y R4. Consistieron en una depleción linfoide incipiente del córtex tímico, que no de la médula, y una gran profusión de MCTs también en el córtex.

Sin embargo a 20 h.p.i. el timo de R5 mostró necrosis progresiva del córtex, lo cual se manifestó por existencia de gran cantidad de cariorexias y cariolisis, hasta el punto de que era difícilmente reconocible. La médula aparentemente no se observó afectada y la reacción PAP fue negativa en esta zona del órgano.

El desarrollo de necrosis cortical tímica fue un hallazgo constante durante toda la experiencia. De hecho, a partir de las 28 h.p.i. esta lesión fue observable en todos los casos estudiados: R8, R9, R10, R12, R13, R14 y R15.

Sólo en R14 se observó un pequeño acúmulo inflamatorio muy poco significativo en el córtex del órgano. Se apreciaron en él M0s y PMNNs débilmente PAP (+). Por el contrario, en R10 se observó una leve lesión inflamatoria

PAP (+) en la médula tímica asociada a una vénula post-capilar.

Tales lesiones fueron tan poco significativas respecto del conjunto del órgano que no parece posible establecer una relación de causalidad plausible entre ellas y la total depleción linfoide observada en el córtex tímico.

En ningún momento se observaron lesiones en la zona del mediastino adyacente al timo.

4.2.1.2.4. PLACAS de PEYER.

En el transcurso de la experiencia no se observaron lesiones inflamatorias del parénquima linfoide. Si se apreció por el contrario una notable depleción linfoide que, desde las 28-30 h.p.i., fue observable en todos los casos hasta el final del experimento (R9 a R16), coexistiendo en algunos de ellos (R13) con una importante profusión de MCTs.

Hacia las 20 h.p.i. se observó la presencia de algunas listerias adheridas al mesotelio de las placas de Peyer. Eran detectables aparentemente libres, o bien fagocitadas por M0s y PMNNs adheridos así mismo a la serosa. Este hecho fue observado ya invariablemente hasta el final del experimento.

Unicamente en algunos casos (R8, R9, R10, R14) se hizo patente la presencia de listerias en la capa muscular subyacente a la serosa. La reacción inflamatoria generada en esos casos fue moderada (R8) o prácticamente nula (R9, R10, R14).

4.2.1.2.5. HIGADO.

En el hígado los primeros signos de inflamación se observaron casi súbitamente a 20 h.p.i. (R5, R6). Hasta entonces, si bien no se apreciaron lesiones aparentes, si que fueron detectables cantidades significativas de listerias en fase de colonización de hepatocitos o fagocitadas por células de Kupffer (R1, R2, R3). En R4 (12 h.p.i.) incluso es posible apreciar la formación de acúmulos inflamatorios muy incipientes provocados por la presencia de bacterias PAP.

Transcurrido el primer d.p.i. fueron ya evidentes múltiples lesiones por todo el órgano. Se caracterizaban por la presencia de acúmulos de células inflamatorias

fagocíticas (PMNNs y M0s), necrosis incipiente de hepatocitos (picnosis nuclear y eosinofilia citoplásmica) y presencia en general importante de listerias en su seno. En aquellos casos más graves en los que se observó mortalidad, no se apreció reacción inflamatoria significativa asociada a lesiones. Estaban éstas constituidas por grupos de hepatocitos adyacentes necróticos y repletos de listerias; la reacción PAP (+) fue muy intensa en estos casos (Figura 27).

Fue interesante en esta experiencia el hecho de que pudo observarse el proceso de formación de las lesiones durante la fase inicial de la infección (0-48 h.p.i.) en este órgano. Así se apreciaron, desde cantidades muy reducidas de listerias en el interior de hepatocitos recién infectados, hasta hepatocitos repletos de listerias que todavía no habían sido lisados y por lo tanto no habían generado aún respuesta inflamatoria (Figuras 28 a 30). Simultáneamente era también factible observar lesiones inflamatorias con carácter de microabscesos, bien incipientes, bien ya desarrollados (Figura 31a y b).

Por otra parte, el nº de lesiones, la cantidad "grosso modo" valorable de listerias, así como el tamaño de las lesiones observadas, se incrementó progresivamente en el transcurso de la infección. Consecuentemente, durante el segundo d.p.i., la mayoría de dichas lesiones se observaron, en general, bien desarrolladas (400-500 μ m de diámetro), teniendo además carácter predominantemente inflamatorio-necrótico (Figura 32).

R11 y R12 (36 h.p.i.) presentaron lesiones de características similares a las ya descritas, pero la cantidad de listerias observables en las mismas fue ostensiblemente menor que en los otros casos mencionados; incluso comparándolos con un tiempo post-infección inferior, caso de R9 y R10 a 30 h.p.i..

4.2.1.2.6. PERITONEO:

La afección de las serosas abdominales fue constante, aumentando progresivamente la gravedad de las lesiones en el transcurso de la experiencia. Las lesiones inflamatorias observadas fueron más frecuentes en el mesenterio, conjunto de serosas del sistema genito-urinario, serosa peritoneal diafragmática y meso gastro-esplénico.

Las lesiones consistieron en acúmulos más o menos difusos de PMNNs y M0s principalmente en la superficie de las serosas mencionadas, pero que tendían progresivamente a

invadir el interior de los mesos. La reacción de PAP fue siempre (+), incrementándose a lo largo de la experiencia.

Las lesiones inflamatorias fueron particularmente intensas a nivel de las serosas del sistema genitourinario en ambos sexos.

4.2.1.2.7. SISTEMA GENITAL:

La afección genital fue manifiesta de manera importante en las hembras, en particular en R8 y R10 a 28 y 30 h.p.i. respectivamente. En ambos casos las lesiones inflamatorias observadas fueron muy extensas, afectando principalmente a la superficie serosa de ovario, oviducto, útero e incluso vagina. En los dos casos la serosa mostraba inflamación en su práctica totalidad, afectándose también el miometrio con intensidad variable en múltiples puntos del útero. La reacción PAP fue positiva intensa en todas las lesiones.

El patrón lesional indica casi con toda probabilidad que la infección se disemina a partir de la serosa peritoneal.

Los ratones machos mostraron inflamación extensa y difusa de la serosa de los órganos genitales, pero en ningún caso se observó afección paralela de su parénquima.

4.2.1.2.8. PANCREAS:

El páncreas comenzó a observarse afectado hacia las 30-36 h.p.i. aproximadamente. Las lesiones son en general reducidas, tanto en cantidad de focos inflamatorios como en la extensión de órgano afectado. Se caracterizaron por restringirse a acinis o grupos de acinis próximos bien definidos y muestran normalmente reacción PAP (+) intensa.

Al igual que en el sistema genital, el hecho de que únicamente se afectasen acinis superficiales y en contacto con zonas de la serosa con frecuencia inflamada, indica probablemente que la infección se disemina a partir de esta última.

4.2.1.2.9. Otros órganos:

No se observaron lesiones en los demás órganos estudiados. Esto es válido para corazón, pulmones, riñones, encéfalo y zona mediastínica en sentido amplio.

4.2.2. Experiencias de duración normal

4.2.2.1. EXPERIENCIA 3

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 1/2a

DOSIS INOCULACION : $2,6 \times 10^4$ m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD* :

Tiempo

p.i. 24h 48h 72h 96h 120h 144h 168h 192h

	R1	R3	R5	R7	R9	R11	R13	R15
	R2	R4	R6	R8	R10	R12	R14	R16

(*) No se registró mortalidad en esta experiencia

4.2.2.1.1. BAZO.

En el transcurso de la experiencia únicamente se observaron lesiones en la pulpa blanca. Estas consistieron en depleción linfoide e inflamación piogranulomatosa de extensión e intensidad variable en la zona periarteriolar o PALS. No se observaron lesiones necróticas en ningún caso y los folículos linfoides permanecieron, en general, indemnes. La pulpa roja no presentó alteraciones aparentes.

La depleción linfoide de la zona periarteriolar se observó ya a las 24 h.p.i. en R1, siendo esta muy moderada y no presentando reacción PAP (+) apreciable.

Posteriormente, se observaron lesiones en la PB en R3, R6, R7, R8, R9 y R16. En R6 y R9 la afección fue débil, mientras que en R3, R7 y R8 las lesiones inflamatorias observadas fueron bastante importantes y afectaron a grandes zonas de la pulpa blanca. En estos últimos casos, el carácter de la inflamación fue de tipo piogranulomatoso (Figura 33).

Es de destacar, que durante toda la experiencia las lesiones existentes o bien no mostraron reacción PAP (+) apreciable (R1 y R6), o bien ésta fue sólo detectable de manera fiable con objetivo de inmersión (R3, R7, R8, R9 y R16).

En los casos R6, R7, R8, R9 y R10 se apreció un número de mitosis superior al observado en condiciones normales en la pulpa blanca, incluido el PALS.

4.2.2.1.2. GANGLIOS LINFATICOS.

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	14/16
■ Gs. renales e ilíacos (linfocentro lumbar) ----	7/16
■ G. gástrico -----	5/16
■ Gs. mandibulares (linfocentro) -----	11/16
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	4/16

4.2.2.1.2.1. G. yeyunal.

En el transcurso de esta experiencia sólo se observaron lesiones en R7 y R8 (96 h.p.i.), no siendo la afección ganglionar en ninguno de los casos excesivamente intensa. Al igual que en el bazo, en las lesiones observadas predominaron, en general, M0s morfológicamente de aspecto activado. La reacción PAP (+) sólo fue detectable mediante objetivo de inmersión.

4.2.2.1.2.2. Linfocentro lumbar.

Solamente R7 (96 h.p.i.) mostró lesiones inflamatorias, siendo el grado de afección leve y la reacción PAP (+) débil. En el resto de los ganglios lumbares estudiados no se observaron lesiones aparentes.

4.2.2.1.2.3. G. gástrico.

La cantidad de ganglios estudiados fue poco significativa como para hacer una valoración fiable de los mismos en esta experiencia. De cualquier manera, en los casos estudiados no se observaron lesiones.

4.2.2.1.2.4. Linfocentro mandibular.

No se observaron lesiones aparentes en ninguno de los ganglios mandibulares estudiados en esta experiencia.

4.2.2.1.2.5. Linfocentro mediastínico.

El escaso número de ganglios mediastínicos estudiados en esta experiencia, no permitió la valoración de los mismos.

4.2.2.1.3. PLACAS de PEYER.

Además de ser una cantidad poco significativa de placas de Peyer la que pudo ser estudiada, no se observaron lesiones aparentes en ningún caso de los valorados.

4.2.2.1.4. TIMO.

En lo referente a este órgano, lo más interesante fue la no existencia de depleción linfocítica del córtex en ningún caso de los que componían la experiencia. Así mismo, no se observaron lesiones inflamatorias ni reacción PAP (+) en ningún momento (Figura 34).

4.2.2.1.5. HIGADO.

El hígado fue el órgano más constantemente afectado en el transcurso de esta experiencia. Sin embargo, las lesiones observadas nunca fueron consideradas graves.

Es importante señalar que no se apreció reacción PAP (+) en ningún caso de los estudiados en esta experiencia. Las células inflamatorias presentes en las lesiones fueron, desde el principio, de tipo mixto, observándose en ellas abundantes PMNs, M0s y, en menor cantidad, linfocitos.

Conforme transcurrió la experiencia, el carácter granulomatoso, con mayoría de M0s de aspecto epiteliocítico, fue progresivamente más evidente.

Las lesiones observadas fueron siempre múltiples, oscilando el tamaño de las mismas entre 100 y 400 μ m de diámetro, y no se apreciaron zonas necróticas en las mismas. Su distribución fue predominantemente portal, en particular, en torno a los conductos biliares de los espacios porta, además de al azar por todo el parénquima.



4.2.2.1.6. SISTEMA CARDIORRESPIRATORIO.

Unicamente se observó un acúmulo inflamatorio mixto PAP (+) en miocardio en R11 (144 h.p.i).

4.2.2.1.7. PERITONEO.

Las serosas peritoneales mostraron un grado de inflamación débil en relación a experiencias con dosis superiores y mismo serotipo de L.monocytogenes. Predominaron en R7 y R8, y sus características fueron similares a las que se describen en las experiencias 4 y 5, si bien, ostensiblemente menos importantes.

4.2.2.2. EXPERIENCIA 4

ESPECIE /SEROTIPO : L.monocytogenes 1/2a

DOSIS INOCULACION : $0,8 \times 10^8$ n.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo

p.i. 24h 48h 72h 96h 120h 144h

	24h	48h	72h	96h	120h	144h
	R1	R3	R5	R9*	R13	R15
	R2	R4	R6	R10*	R14	
			R7*	R11		
			R8*	R12		

(*) mortalidad

4.2.2.2.1. BAZO.

Durante las primeras 24 h.p.i., en R1, no se observaron lesiones aparentes, pero en R2 ya existían algunos acúmulos inflamatorios poco significativos en el PALS y en la ZM. Tales lesiones fueron PAP (+), observándose también en la ZM M0s PAP (+). Esta última mostraba aspecto de gran activación, con gran profusión de PMNNs y M0s.

Transcurridas 48 h., en R3 y R4 fueron ya evidentes lesiones inflamatorias masivas en el PALS, las cuales coincidían con una clara depleción linfoide del mismo (Figura 35). La zona más periférica de la PB, principalmente folículos linfoides, se observaba parcialmente preservada.

En el PALS, las células inflamatorias predominantes fueron PMNNs y M0s, estos últimos mostrando claramente listerias fagocitadas en su citoplasma. En la PR, el componente celular mayoritario fueron sin embargo PMNNs, los cuales formaban múltiples acúmulos inflamatorios bastante bien delimitados del entorno próximo no alterado y con tendencia a la formación de microabscesos. En conjunto, en R3 y R4 la afección de la PB fue superior a la de la PR. Todas las lesiones, tanto en la PB como en la PR, fueron PAP(+) y la presencia de trombos no fue un hecho infrecuente (Figura 36). La evolución y relación entre la gravedad de la lesión observada y la reacción PAP (+) se muestra en la gráfica 4.

A partir de las 48 h.p.i., las lesiones inflamatorias descritas en R3 y R4 se intensificaron y generalizaron por todo el órgano, pudiendo definirse la lesión observada como una esplenitis piogranulomatosa difusa. En esta fase lo más característico fue una gran profusión de PMNNs y M0s por todo el órgano y la existencia de reacción PAP (+) difusa y generalizada. En la figura 37 puede observarse la inflamación de aspecto granulomatoso del PALS en R5 a 72 h.p.i..

En la zona correspondiente a la PR fue posible observar múltiples microabscesos que gradualmente se transformaban en focos inflamatorio-necróticos con gran abundancia de cariorexis y cariólisis (Figura 38). No obstante, las lesiones existentes fueron predominantemente de tipo inflamatorio, siendo el componente necrótico de las mismas, mínimo.

En las 24 h. siguientes, a 96 h.p.i., la situación de "fase crítica" parecía mantenerse, pues coexistían en esta etapa ratones que mostraban una progresiva regeneración de las lesiones (esplenitis piogranulomatosa difusa), caso de R11 y R12, ambos eutanasiados, junto con otros en los que se apreciaban fenómenos necróticos predominantemente, caso de R9 en el que se apreció muerte espontánea. R9 mostró lesiones inflamatorio-necróticas similares a las ya descritas para R7 y R8. R10 no fue procesado por presentar un estado de franca autólisis.

Fue interesante el caso de R11, animal que fue sacrificado en estado preagónico. En él, aun persistiendo lesiones inflamatorias PAP (+) en la PB, éstas tendían a ser granulomatosas con abundantes M0s de aspecto epiteliode, siendo también detectable la presencia de células linfoides

de aspecto blástico en la misma. La PR, por el contrario, mostraba una imagen en la que predominaban múltiples microabscesos y lesiones inflamatorias más o menos difusas, PAP (+).

Aun sugiriendo la valoración histopatológica de este último caso una franca tendencia hacia la resolución de la enfermedad, las lesiones padecidas en éste y otros órganos, probablemente impidieron su curación, tal y como quedó de manifiesto al ser eutanasiado en estado preagónico.

En contraste con lo anterior, R12, al mismo tiempo p.i. (96 h) no mostró lesiones aparentes. Mas bien al contrario, lo que se observaba era una manifiesta hiperplasia de los folículos linfoides. La ZM persistía activada y en la PR se observaron abundantes células hematopoyéticas y gran profusión de PMNs y MØs en los sinusoides. La reacción PAP fue en este caso negativa.

Posteriormente, a partir del quinto d.p.i., las lesiones, si se observaban (R13 y R14), eran residuales (Figura 39). Estas consistían en depleción poco significativa del PALS y, esporádicamente, algún foco inflamatorio PAP (+).

Aunque la valoración histopatológica del bazo en R13 y R14 permitiría suponer que la infección ya había sido controlada, la persistencia de estas últimas lesiones sería indicativo de que todavía existen focos infecciosos en el mismo bazo, o en otros puntos del organismo.

Por el contrario, en R15, no se observaron lesiones inflamatorias y la reacción PAP fue negativa. Podría interpretarse en este caso que una "restitutio ad integrum" de las lesiones se ha producido ya a este tiempo post-infección.

Tanto en R13 y R14 como en R15 (Figura 39), la hiperplasia de los folículos linfoides fue manifiesta y evidente. En general, la regeneración de las lesiones desde R12 a R15 coincidió con la presencia en la PB de una población linfoide homogénea de aspecto blastoide. Consecuentemente con ello, un número de mitosis por campo superior al observado en condiciones normales fue un hallazgo frecuente, siendo esto extensible también a la pulpa roja.

4.2.2.2.2. GANGLIOS LINFATICOS.

■ Gs. renales e ilíacos (linfocentro lumbar) ----	3/16
■ G. gástrico -----	5/16
■ Gs. mandibulares (linfocentro) -----	11/16
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	6/16

4.2.2.2.2.1. G. yeyunal.

La infección en este ganglio se caracterizó desde las 24 h.p.i., por la existencia de múltiples zonas inflamatorio-necróticas de tamaño variable (300-1000 μ m de diámetro), que en algunos casos adquirieron proporciones muy importantes y llegaron a ser casi masivas; caso este último observado desde R5 a R11 (Gráfica 5). En estos casos en los que las lesiones fueron más extensas e importantes, excepto la médula ganglionar (Figura 40), el resto del ganglio se observaba afectado por procesos inflamatorios mixtos, si bien con predominio de M0s como célula inflamatoria fundamental. La reacción PAP, aunque variable, fue positiva en todos los casos.

Por el contrario, en R12 (96 h.p.i.), R13, R14 (120 h.p.i.), y R15 (144 h.p.i.), las lesiones inflamatorias observadas tendieron gradualmente a disminuir (Figura 41), además de no ser éstas muy relevantes y PAP (+) poco significativo o negativo. Fue destacable en estos casos la presencia de folículos linfoides secundarios.

4.2.2.2.2.2. Gs. renales, ilíacos y gástrico.

El escaso nº de ganglios observados no ha permitido una valoración fiable de los mismos.

4.2.2.2.2.3. Linfocentro mandibular.

Las lesiones observadas en estos ganglios fueron variables en importancia e inconstantes en su presentación.

A 24 h.p.i., en R1, se observó ya un acúmulo inflamatorio mal definido, poco relevante y PAP (-). Posteriormente sin embargo, se observaron ya lesiones PAP (+) en R3 (48 h.p.i.), R5 (72 h.p.i.) y R7, R8, R9, y R10 a 96 h.p.i.. En general, las lesiones observadas eran múltiples, con tendencia a granulomatosas y la reacción PAP (+) que presentaban era poco significativa en relación al tamaño de las mismas.

A partir de las 96 h.p.i., en R12, R14 y R15, no se observaron lesiones significativas, y la presencia de folículos linfoides secundarios fue constante (Gráfica 5).

4.2.2.2.4. Linfocentro mediastínico.

En esta experiencia, el nº de ganglios mediastínicos estudiados tampoco es suficiente como para hacer una valoración fiable. No obstante, los casos en los que ha sido posible su estudio confirman las observaciones descritas en otras experiencias de esta tesis con la misma vía de inoculación y serotipo. Es decir, lesiones inflamatorio-necróticas precoces (desde 24 h.p.i.), PAP (+) y de bastante intensidad. Algunas veces, como en R5 y R8 a 72 h.p.i., la afección resultó ser masiva (Gráfica 5).

4.2.2.2.3. PLACAS de PEYER.

Las placas de Peyer no mostraron lesiones aparentes en el transcurso de esta experiencia.

4.2.2.2.4. TIMO.

A 24 h.p.i., en R1 y R2, no se observaron alteraciones aparentes de este órgano, pero a partir de las 48 h.p.i., en R3, la depleción-necrosis linfoide del córtex fue constante y evidente desde R4 a R11, este último en el 4º d.p.i..

Mayoritariamente, la depleción del córtex fue PAP (-), pero en algunos casos se observaron acúmulos inflamatorios más o menos focales PAP (+). En cualquier caso, la zona lesionada PAP (+) no fue relevante en relación a la generalidad del córtex.

En contraste con ello, en R12, R14 y R15, no se observaron lesiones aparentes en el órgano. Si ello fue consecuencia de que hubo una rápida e intensa repoblación del córtex o, si por el contrario, en estos casos nunca hubo depleción linfoide, no es posible determinarlo en esta experiencia.

4.2.2.2.5. HIGADO.

A 24 h.p.i., en R2, se observaron pequeños acúmulos inflamatorios de 50-100 µm de diámetro formados básicamente por PMNs y MDs PAP (-) (Gráfica 3).

A 48 h.p.i., el cuadro lesional de este órgano persistía sin grandes variaciones, pero ya era posible

observar algún foco inflamatorio de 200-250 μ m de diámetro PAP (+) débil, caso de R4. No obstante, la cantidad de lesiones observada era mínima.

Hacia las 72 h.p.i., en R7 y R8 se observó ya un aumento ostensible en la cantidad de lesiones inflamatorias mixtas (PMNNs y MOs), del tipo de las descritas en R4. Sin embargo, también se apreciaban pequeños acúmulos inflamatorios como los descritos en R2. Estos, eran a veces PAP (+) y otras negativos.

En contraste con estos hallazgos, en R5 y R6, a 72 h.p.i., es decir al mismo tiempo post-infección que R7 y R8, la cantidad de lesiones observada fue tan escasa, que prácticamente pueden considerarse no significativos; excepción hecha de un foco subcapsular de carácter local PAP (+) en R6 y una cierta inflamación en el entorno de la vesícula biliar en R5.

Los casos R9 y R11 a 96 h.p.i., mostraron una imagen muy similar a la descrita para R7 y R8.

R12 y R13 también a 96 h.p.i., mostraron lesiones inflamatorias variables en las que lo más sobresaliente fue el que éstas se observaron en mayor cuantía respecto de los casos anteriores.

Finalmente, a partir de 120 h.p.i., en R14 y R15, las lesiones disminuyeron gradualmente, tanto en cantidad como en intensidad, no sobrepasando las 100-200 μ m de diámetro. Estas lesiones además fueron PAP (-), y su carácter, inicialmente mixto, se transformó progresivamente en granulomatoso.

4.2.2.2.6. SISTEMA CARDIORRESPIRATORIO.

Excepción hecha de dos acúmulos inflamatorios mixtos PAP (+), poco significativos, en miocardio y en los pulmones de R11, en los demás casos no se observaron lesiones aparentes en el transcurso de esta experiencia.

4.2.2.2.7. PERITONEO.

En este apartado se estudiaron las serosas del bazo, hígado, sistemas genitourinario y gastrointestinal, diafragmática y mesenterio.

La observación de lesiones inflamatorias fue constante en las serosas mencionadas, desde el primer hasta el cuarto día p.i. incluido (R1 a R11). Sin embargo, a partir del

quinto d.p.i., la ausencia o la resolución de las lesiones fue prácticamente completa.

Las lesiones observadas fueron desde focales o multifocales, hasta difusas y extensas, y estaban constituidas por acúmulos variables de principalmente PMNNs y, en menor cuantía, M0s. Siempre que se observaron fueron PAP (+).

Es importante indicar, que en determinados casos la intensidad de la inflamación provocó la afección grave de estructuras subyacentes a la serosa, caso de R2, R3 y R14, donde se comprobó una grave miositis diafragmática. Interesantemente, en estos casos, la afección diafragmática se observó tanto en la cara abdominal como en la torácica.

Por otra parte, desde R3 hasta R9, la inflamación de la serosa gastrointestinal afectó también, al progresar, a la musculatura lisa subyacente en diverso grado. Las lesiones observadas en estos casos parecieron distribuirse al azar y fueron siempre PAP (+).

La serosa del sistema genitourinario se observó afectada en R3, R5 y, particularmente, en R11, caso en el que la inflamación se extendió por el miometrio provocando graves lesiones PAP (+) en el mismo. Los uréteres y la vejiga de la orina también se observaron afectados en algunos casos (R5 y R11). Por lo demás, en el riñón, aun estando la serosa renal casi constantemente afectada, nunca se observó la extensión de la inflamación hacia el interior del parénquima.

4.2.2.3. EXPERIENCIA 5

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 1/2a

DOSIS INOCULACION : 3×10^8 m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo

p.i. 24h 36h 48h 60h 72h 80h

	24h	36h	48h	60h	72h	80h
	R1	R3*	R5*	R9*	R10*	R12*
	R2	R4*	R6*		R11*	
			R7*			
			R8*			

(*) mortalidad

4.2.2.3.1. BAZO.

Resultado de la dosis letal de infección empleada, fue la existencia, a 24 h.p.i., de lesiones inflamatorias y necróticas masivas por todo el órgano, tanto en la pulpa blanca como en la pulpa roja (Figura 42). Resultado de ello fue la observación de cariorrexis y cariólisis masiva por todo el órgano. La reacción PAP (+) fue máxima tanto en la pulpa blanca como en la pulpa roja (Figura 43).

Necrosis generalizada del órgano similar a la descrita en R2, fue observable también posteriormente en R3, R4, R6, R7, R8 y R9. En todos estos casos la reacción PAP (+) fue constante, pero disminuyó progresivamente durante el transcurso de la infección, no obstante ser ésta siempre intensa.

Paralelamente a la reacción PAP (+), los fenómenos de cariorrexis y cariólisis descritos también fueron cada vez menos ostensibles conforme progresaba la necrosis. Este aspecto fue claramente observable en R9, donde la celularidad del órgano estaba tan disminuida, que era posible apreciar en algunas zonas incluso el estroma del órgano (Figura 44). Así mismo, fue patente en este caso una anómala y gran distensión de numerosos sinusoides y otras estructuras, probablemente venosas, del órgano.

En R5 sin embargo, y, más claramente en R10, R11 y R12, las lesiones necróticas tendieron a restringirse a la pulpa blanca predominantemente; mostrando la pulpa roja una notable tendencia a la regeneración (Figura 45). Adicionalmente, la reacción PAP (+) fue muy superior en estos casos en la pulpa blanca que en la pulpa roja, asociándose entonces a la importante necrosis existente en dicha zona (Figura 45). Por el contrario, en la pulpa roja, la reacción PAP (+) además de ser menos ostensible, fue predominantemente intracelular y se asoció a células inflamatorias de manera principal.

4.2.2.3.2. GANGLIOS LINFÁTICOS.

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	12/12
● Gs. renales e ilíacos (linfocentro lumbar) ----	4/12
■ G. gástrico -----	5/12
■ Gs. mandibulares (linfocentro) -----	8/12
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	6/12

4.2.2.3.2.1. G. yeyunal.

Las lesiones observadas en este ganglio consistieron en acúmulos inflamatorios de extensión variable a nivel de la zona subcapsular y zonas del córtex adyacentes, y además, acúmulos o focos inflamatorio-necróticos irregulares de diversa gravedad y consideración en paracórtex.

Las lesiones fueron siempre de carácter mixto (PMNNS y MOs) y PAP (+), mostrando en todos los casos un aspecto similar independientemente del día post-inoculación.

4.2.2.3.2.2. Linfocentro lumbar.

El nº de ganglios de este tipo estudiados en esta experiencia, no permite una descripción secuencial de la evolución de las lesiones. No obstante, merece la pena indicar que en R2 y R5 éstas son muy intensas, teniendo un carácter inflamatorio-necrótico generalizado tanto en el córtex como en el paracórtex ganglionar; todo ello PAP (+).

4.2.2.3.2.3. G. gástrico.

Las lesiones observadas en este ganglio respondieron predominantemente al patrón lesional de tipo periférico o subcapsular, es decir, característico del acceso de L.monocytogenes al ganglio vía linfa aferente. Ello es probable que fuera debido a que su zona de drenaje incluye también la pared del estómago, frecuentemente afectada y objeto de lesiones inflamatorias importantes en el transcurso de toda la experiencia.

4.2.2.3.2.4. Linfocentro mandibular.

Las lesiones observadas en estos ganglios, aunque constantes, fueron poco relevantes en esta experiencia. Consistieron en uno o varios acúmulos inflamatorios irregulares, mixtos y PAP (+), en córtex interfolicular y en el paracórtex ganglionar.

4.2.2.3.2.5. Linfocentro mediastínico.

Desde las primeras 24 h.p.i., las lesiones observadas en estos ganglios fueron, en general, masivas y afectaron prácticamente a la totalidad del ganglio (R1, R8, R9, R10, R11). La reacción PAP (+) fue siempre constante.

4.2.2.3.3. PLACAS de PEYER.

En esta experiencia, excepto la constante presencia de abundantes MCTs y una importante depleción linfoide, no se observaron lesiones significativas.

4.2.2.3.4. TIMO.

Además de la depleción linfoide del córtex ya descrita en la experiencia 1, lo más característico de esta nueva experiencia en lo referente al timo, fue la mayor frecuencia e intensidad de las lesiones inflamatorio-necróticas PAP (+) asociadas a este órgano.

La presencia de lesiones inflamatorias de carácter mixto (PMNNs y M0s) así como la intensidad de las mismas fue variable en cada caso. Estas fueron leves en R2, caso en el que se observaron dos acúmulos inflamatorios relativamente bien definidos PAP (+) en la unión córtico-medular, moderada en R3, R4 y R7, y graves o prácticamente generalizadas en R5, R10, R11 y R12 (Figura 46).

Excepto en R2, en todos los demás casos las lesiones se dispusieron predominantemente según el patrón "periférico" o "peritímico" ya descrito en la experiencia 1, coincidiendo también de manera constante este hecho con la presencia de lesiones inflamatorio-necróticas en el mediastino adyacente, al timo. Estas últimas son sobre todo evidentes en R2 y R11.

La intensidad y extensión de las lesiones observadas y la reacción PAP (+) que estas presentaban se correlacionaron directamente en el transcurso de toda la experiencia.

Así mismo, al igual que en la experiencia 1, no se observó una relación o vinculación directa entre la depleción linfoide del córtex PAP (-) y la existencia de lesiones inflamatorio-necróticas PAP (+); ya que, aunque éstas afectaron predominantemente a zonas concretas del córtex tímico, existían también amplias zonas del mismo deplecionadas sin reacción inflamatoria alguna y PAP (-).

4.2.2.3.5. HIGADO.

En general, las lesiones hepáticas no fueron especialmente importantes en esta experiencia, si bien éstas se observaron en todos los casos.

Durante las primeras 24 h.p.i. (R1 y R2), únicamente se observaron grupos de hepatocitos aislados e infectados con cantidades variables pero importantes de listerias en su

citoplasma. En hepatocitos adyacentes a éstos se apreciaron signos de incipiente necrosis, la cual se manifestó por eosinofilia citoplasmática y picnosis nuclear intensas.

En contraste con esto, no se observó reacción inflamatoria asociada a tales lesiones a este tiempo post-infección. Por lo demás la reacción de PAP fue intensamente (+) en estos casos y también en R7 y R9.

No obstante, a partir de 36 h.p.i., una reacción inflamatoria no demasiado importante y con claro predominio de PMNNs será ya evidente en R3, R4, R5, R6, R8, R10, R11 y R12. Estas lesiones, de entre 100-300 μm de diámetro, fueron siempre PAP (+) y evidenciaban la presencia de numerosas listerias en su seno. En R12 fue interesante el hecho de que la afección de la serosa hepática provocó lesiones inflamatorias a nivel subcapsular (Figura 47). En R11 y R12 se apreció además necrosis incipiente de las lesiones inflamatorias, mostrando éstas también un mayor tamaño, 200-500 μm de diámetro.

En R3, R10 y R11 se observaron listerias PAP (+) en los conductos biliares portales (Figura 48), y en R1, R3 y R8 se apreciaron también pequeños infartos hepáticos PAP (-) de entre 400-700 μm de diámetro.

4.2.2.3.6. PANCREAS.

Excepto en R1, se han observado lesiones pancreáticas en todos los casos de esta experiencia. Tales lesiones, con una reacción inflamatoria asociada poco significativa, tuvieron carácter predominantemente acinar, tendiendo además a presentar reacción PAP (+) intensa (R6, R8, R9, R10, R11 y R12), debido a la presencia de grandes cantidades de listerias en dichos acinis.

La serosa pancreática se observó afectada con frecuencia, siendo acinis periféricos y adyacentes a esta, los principalmente lesionados. Esto sugiere que las lesiones del páncreas se ocasionaron con toda probabilidad por extensión de las existentes en la serosa de la glándula.

4.2.2.3.7. SISTEMA CARDIORRESPIRATORIO.

Sólo se observaron lesiones significativas en R5, caso en el que se apreció un foco inflamatorio de morfología irregular, carácter mixto (PMNNs, MÓs) y PAP (+), en el seno del miocardio (Figura 49).

En R10 y R11, se observaron zonas muy poco significativas y discretas de reacción PAP (+) en la pleura. Estas consistieron en acúmulos focales de PMNNs y M0s que afectaron casi exclusivamente a la serosa.

4.2.2.3.8. MEDIASTINO.

Lesiones inflamatorias de diferente consideración fueron evidentes en casi todos los casos pertenecientes a esta experiencia.

Tales lesiones, mayoritariamente constituidas por PMNNs, fueron más importantes en R2 a 24 h.p.i., R6 y R7 a 48 h.p.i. y R10 y sobre todo R11, ambos últimos casos a 72 h.p.i..

La reacción inflamatoria fue particularmente intensa y frecuente en la periferia tímica, coincidiendo entonces con la existencia de lesiones de gravedad y extensión variables en el timo adyacente. En este sentido, la repetida coincidencia y asociación entre estos hallazgos, permite suponer una clara interrelación de causalidad entre ambos hechos.

Es interesante mencionar que, al menos en R11, se observaron pequeños acúmulos inflamatorios PAP (+) que "parecían seguir" y se disponían entorno al trayecto de las grandes arterias y venas del hilio pulmonar a nivel de su adventicia.

4.2.2.3.9. PERITONEO.

Las lesiones en mesenterio y peritoneo fueron constantes en el transcurso de toda la experiencia, siendo similares sus características a las ya expuestas en las experiencias 1 y 4.

Es interesante destacar, que excepto en dos ocasiones, en las que únicamente se observaron dos células PAP (+), los conductos linfáticos mesentéricos no demostraron alteración alguna, ni mostraron células reactivas PAP (+) en el transcurso de esta experiencia.

Finalmente, al igual que en las experiencias 1 y 4, se observaron lesiones inflamatorias de diversa consideración en la serosa y en la muscular gastrointestinal, así como en las serosas genitourinaria, diafragmática y serosas del hígado, bazo, páncreas y riñones.

4.2.2.4. EXPERIENCIA 6

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 4bDOSIS INOCULACION : $3,2 \times 10^5$ m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intrapéritoneal

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
p.i.	R1	R3	R5*	R9	R11*	R14	R16
	R2	R4	R6*	R10	R12	R15	
			R7		R13		
			R8				

(*) mortalidad

4.2.2.4.1. BAZO.

A las 24 h.p.i. ya se observó depleción linfoide e inflamación del PALS (Gráfica 6). Las células comprometidas en dicha reacción inflamatoria son básicamente MØs y PMNns que presentaron reacción PAP (+) débil.

En la pulpa roja, además de congestión, se observó una gran afluencia de PMNns, distribuidos profusamente por todo el órgano, y múltiples acúmulos inflamatorios similares a microabscesos Gram y PAP (+). Tales lesiones, relativamente bien definidas respecto del parénquima adyacente, se ubicaron regularmente en la periferia inmediata de la ZM, si bien posteriormente se diseminaron más o menos de manera uniforme por toda la pulpa roja.

La gravedad de las lesiones descritas aumentará progresivamente conforme transcurre la experiencia, observándose su punto álgido a 72 h.p.i., tal y como se demuestra en R5 y R6. R5 presentó necrosis prácticamente masiva de todo el órgano, incluidas tanto pulpa blanca como pulpa roja, pero en R6 la gravedad de las lesiones fue algo menor. En este último caso se observó necrosis masiva del PALS, pero se preservaron relativamente bien las zonas B-dependientes correspondientes a los folículos linfoides. De manera paralela, no obstante mostrar la pulpa roja amplias zonas de necrosis, también se apreciaron "islotes" de la misma relativamente preservados. Las lesiones existentes fueron siempre PAP (+).

Entre 72 y 96 h.p.i., el componente necrótico de las lesiones disminuye de manera gradual y una reacción inflamatoria difusa de tipo piogranulomatosa, básicamente formada por M0s y PMNNs, se hace predominante (R7, R8, R9, R10) (Figura 50). La reacción PAP (+) también disminuyó gradualmente tanto en cantidad como en intensidad. Es importante destacar que en R10 (72 h.p.i.) ya es posible observar una incipiente hiperplasia de los folículos linfoides.

La tendencia hacia la recuperación clínica de la enfermedad, incipiente en esta fase, se observa plenamente establecida a partir del 5º d.p.i., manifestándose entonces a nivel histopatológico por la existencia de procesos de restitución, tales como transformación blástica e intensa linfoproliferación en todo el órgano, y por ser básicamente PAP (-). El nº de mitosis / campo (x 400) fue significativamente alto en toda la pulpa blanca, siendo del orden de 5-10 desde R12 a R16 (120-168 h.p.i.).

En definitiva, el aspecto del bazo en los últimos casos entre el 5º y 7º d.p.i. (R12 a R 16), es el de un órgano que procede a la reposición de sus células linfoides, hecho que se manifiesta como una hiperplasia gradual, básicamente de la pulpa blanca.

En R11, estas características se combinan con la presencia de múltiples y amplios focos de necrosis en los que la cariólisis observable es muy intensa. Este hecho y la muerte posterior, podrían interpretarse como una "recaída" irreversible que hubiera truncado el inicio de la recuperación de la enfermedad. Testigo de ello sería la esplenitis granulomatosa generalizada observable en la hasta entonces convalecencia de este ratón.

4.2.2.4.2. GANGLIOS LINFATICOS.

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	16/16
■ Gs. renales e ilíacos (linfocentro lumbar) ----	13/16
■ G. gástrico -----	6/16
■ Gs. mandibulares (linfocentro) -----	15/16
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	8/16

4.2.2.4.2.1. G. yeyunal.

Las primeras lesiones detectadas en este ganglio se observaron a 24 h.p.i. (R2)(Gráfica 7). Consistieron en una cantidad poco significativa de acúmulos inflamatorios mixtos (PMNNs y M0s) aparentemente Gram y PAP (-). También se

observaron numerosos PMNs en las "Vénulas de Endotelio Alto" (VEAs).

Las lesiones inflamatorias mencionadas, fueron gradualmente más frecuentes conforme transcurría la experiencia hasta las 120 h.p.i. (59 día) aproximadamente, momento en el que dejaron de observarse. Un grado variable pero constante de reacción PAP (+) fue siempre demostrable en dichas lesiones (consultar Tabla 6). En R5, R6, R7, R10 y R11 se observaron también áreas importantes de necrosis en la periferia ganglionar (zona dependiente del seno subcapsular) y en paracórtex, siempre PAP (+).

Desde R1 a R11 se observó de manera constante una gran profusión de MCTs en paracórtex y folículos linfoides.

Respecto de su localización en el ganglio, cabe indicar que las lesiones descritas se observaron siempre en paracórtex, córtex interfolicular y seno subcapsular, variando de manera aleatoria según los diferentes casos.

A partir del 59 d.p.i. (R12 a R16) deja de observarse reacción PAP(+). En general el aspecto de estos ganglios es una mezcla de inflamación granulomatosa difusa y proliferación linfoblástica.

4.2.2.4.2.2. Linfocentro lumbar.

Las primeras lesiones se observaron en R3 y R5 entre 48 y 72 h.p.i.. Consistieron en extensas áreas de inflamación mixta (PMNs y MØs) y necrosis que afectaban prácticamente a todo el ganglio exceptuada su zona medular. La reacción PAP (+) fue importante.

Estos hallazgos fueron comunes en mayor o menor medida desde R9 a R11 (hasta 5 d.p.i.), observándose también en ellos profusión de MCTs. A partir de 5 días p.i. dejaron de observarse lesiones significativas.

4.2.2.4.2.3. G. gástrico.

Este ganglio mostró lesiones inflamatorio-necróticas similares a las descritas para los ganglios renales e ilíacos, pero su gravedad fue menor. Los más afectados se observaron entre 48 y 96 h.p.i., particularmente en R10.

4.2.2.4.2.4. Linfocentro mandibular.

Excepto en R2, R9 y R11 a 24, 96 y 120 h.p.i. respectivamente, en los que se observaron algunos acúmulos inflamatorios en paracórtex asociados a VEAs, estos ganglios no mostraron lesiones significativas aparentes en el

transcurso de la experiencia. R11 fue el que mostró lesiones inflamatorias más importantes (Gráfica 7).

4.2.2.4.2.5. Linfocentro mediastínico.

A 24 h.p.i. en R2 se observaron ya lesiones inflamatorio-necróticas masivas en un ganglio mediastínico (Gráfica 7). La reacción PAP (+) fue intensa.

En R3, R5, R7 y R10 (48-96 h.p.i.) se constataron similares hallazgos. En R5 la necrosis fue de tal magnitud que prácticamente ya no existía población linfoide en el ganglio, pudiendo entonces observarse sin dificultad el estroma ganglionar (Figura 51). La reacción PAP (+) fue residual en este caso.

4.2.2.4.3. TIMO.

A 24 h.p.i. en R1 y R2 se observó una gran profusión de MCTs en el córtex tímico. A partir de las 48 h.p.i. y hasta el final de la experiencia (R3, R5, R6, R7, R8, R9, R10 y R11) la depleción linfoide cortical es completa (Figura 52), y excepto en R8 y R10, PAP (-).

En R8 se observaron algunos acúmulos inflamatorios mixtos PAP (+) en el córtex, asociados a lesiones de la serosa adyacente, pero en cualquier caso no significativos si se comparan con la completa depleción linfoide cortical. En R10 por el contrario, se observó un acúmulo inflamatorio mixto PAP (+) con necrosis linfoide adicional en la médula del órgano. Por lo demás, en R13, R15 y R16 no se observaron lesiones aparentes ni tampoco depleción del córtex.

4.2.2.4.4. PLACAS de PEYER.

Durante las primeras 72 h.p.i. en R1, R2, R3, R5 y R7 no se observaron alteraciones significativas. Hacia las 72-96 h.p.i. en R8, R9 y R10 se observó la presencia de MCTs y en concreto en R10 se apreció un foco inflamatorio mixto bien definido, ubicado en la zona cúpula de una placa de Peyer, la cual no pudo ser procesada mediante la técnica de PAP.

A partir de las 120 h.p.i. (R12 a R16) no se observaron lesiones aparentes en el resto de las placas de Peyer estudiadas. Únicamente fue significativo el hecho de que R13 y R14 mostraron una notable hiperplasia linfoide.

4.2.2.4.5. HIGADO.

En este órgano se observaron ya a las 24 h.p.i. acúmulos inflamatorios mixtos de entre 100-150 μm de diámetro y una media de 4-5 por campo (x 40) (Gráfica 6). Los componentes celulares implicados son principalmente PMNNs y, en menor medida, M0s. Las lesiones mostraron reacción PAP (+) débil o moderada.

Conforme progresaba la experiencia (R5, R7, R8, R9, R10) el tamaño y la cantidad de las lesiones también se incrementó gradualmente, observándose entonces focos inflamatorios o inflamatorio-necróticos de localización predominantemente perivascular de hasta 200-400 μm de diámetro y en n^o aproximado de 7-10/campo (x 40). Así mismo la reacción PAP (+) también se intensificó .

En R10 a 96 h.p.i. fue interesante observar la coexistencia de lesiones inflamatorio-necróticas similares a las descritas y lesiones con carácter granulomatoso. Tales granulomas, básicamente constituidos por M0s, mostraron también abundantes mitosis; probablemente de células del SMF (M0s o células de Kupffer).

A partir de 120 h.p.i. (R11, R12) fue muy evidente en los sinusoides hepáticos una gran afluencia de células mononucleares - muchas de ellas con aspecto de monocitos - y todas las lesiones existentes tenían ya aspecto predominantemente granulomatoso (Figura 53). Así mismo, tanto la cantidad de lesiones observables como la reacción PAP (+) detectada disminuyeron también gradualmente a partir de ese momento.

Entre R13 y R16 las lesiones existentes, si las había, eran ya PAP (-) y prácticamente residuales o poco significativas.

Inflamación circundante a la vesícula biliar se observó desde las 48 h.p.i. (R3 y R4), siendo siempre PAP (+). Además, en R7, R8, R10 y R12 la bilis de la vesícula biliar poseía multitud de bacterias PAP y Gram (+) (Figuras 54 y 55).

4.2.2.4.6. CORAZON.

Las lesiones observadas en el corazón fueron predominantemente epicárdicas, casos R7, R8, R9, R10 y R12, todos ellos entre 72 y 120 h.p.i., afectándose por extensión algunas veces la zona del miocardio inmediatamente subyacente a la serosa (Gráfica 8). Las lesiones fueron

siempre PAP (+) y las células inflamatorias presentes en las mismas PMNNs y MÓs.

En R6 por el contrario, se observó en el miocardio un acúmulo inflamatorio mixto PAP (+) de 100-200 μ m que no tenía relación alguna con la serosa epicárdica.

Algo similar fue también apreciable en R12 a 120 h.p.i.. En este caso la lesión observada poseía aspecto nodular, hacía prominencia sobre la superficie cardiaca y estaba bastante bien delimitada del parénquima adyacente. Tenía además un tamaño notable (2 x 1 mm aproximadamente) y, aunque afectaba predominantemente al miocardio, su localización fue subepicárdica.

4.2.2.4.7. PULMONES.

Las lesiones observadas en los pulmones afectaron principalmente a la pleura y, secundariamente, al parénquima pulmonar (R7, R8, R9, R10, R12) (Gráfica 8). En algunos casos, el aspecto de la lesión fue el de una neumonía intersticial de gravedad variable, cuyo componente inflamatorio es de tipo mixto, mezcla de purulento y granulomatoso.

Respecto de la afección del parénquima pulmonar, esta fue predominantemente perivascular y peribronquial, con la salvedad de que eran precisamente los bronquios y las arterias y venas de mayor calibre, las que mostraban lesiones más graves y extensas.

Es importante destacar que en los casos en que se observó afección de la serosa pleural también se constataron lesiones epicárdicas, coincidencia que aboga por un origen común de estas serositis.

En algunos de los casos examinados (R7, R8, R10) fue posible observar la existencia de continuidad entre la lesión pleural y la perivascularitis y peribronquitis a nivel del hilio pulmonar (Figura 56), por lo que existe la posibilidad de que este último patrón lesional no sea sino extensión del primero. Es decir, desde la pleura la inflamación se introduciría en los pulmones por medio de la adventicia de los bronquios principales y de las arterias y venas pulmonares; desde ahí la infección afectaría finalmente al parénquima respiratorio.

4.2.2.4.8. PANCREAS.

En este órgano se observaron zonas focales de inflamación bien delimitadas y de carácter mixto (PMNNs y MDs) en R3, R4, R5, R7, R9, R10 y R11. Las características de estas lesiones son muy similares a las ya comentadas para este mismo órgano en las experiencias 1 y 2.

4.2.2.4.9. SISTEMA GENITAL.

En los machos únicamente la serosa que recubre los órganos genitales, lo mismo que otras serosas peritoneales, mostró signos de inflamación. El parénquima de dichos órganos nunca se observó afectado. Este hecho será un hallazgo constante en toda la experiencia.

Por el contrario en las hembras, tanto la serosa uterina (R2, R4, R5, R7, R10) (Figura 57) como el miometrio (R7, R10) mostraron inflamación en grado variable durante toda la primera fase de la experiencia (Gráfica 8).

Al igual que en la experiencia 4, la inflamación mostró un carácter difuso y afectó principalmente a la zona del miometrio subyacente a la serosa. La reacción PAP (+) fue en R7 y R10 muy intensa. En R5 y R7 también un ovario se observó afectado.

4.2.2.4.10. PERITONEO.

La inflamación de la serosa mesentérica y otros mesos abdominales fue constante también en esta experiencia. La serosa gastrointestinal, pancreática, hepática, esplénica, genitourinaria y diafragmática se observaron casi constantemente afectadas.

En algunos casos este hecho permitió la entrada de L.monocytogenes al interior de los órganos. El ejemplo más claro fue el sistema gastrointestinal, en el que la capa muscular subyacente a la serosa se observó frecuente y aleatoriamente afectada en numerosos puntos (R5, R7, R8, R9, R10, R11, R12), incluidas placas de Peyer (R7, R8, R9). La capa muscular de la vejiga de la orina también mostró inflamación en R9 y R12.

Por otra parte, es importante señalar que la serosa y el músculo diafragmático también se observaron inflamados (miositis) de diversa consideración en R7, R8, R9 y R10.

4.2.2.5. EXPERIENCIA 7

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 4bDOSIS INOCULACION : $1,2 \times 10^7$ m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo

p.i. 24h 37h 48h 72h 96h 120h 144h

p.i.	24h	37h	48h	72h	96h	120h	144h
	R1	R3*	R4*	R5*	R8*	R10	R12
	R2			R6	R9	R11	
				R7			

(*) mortalidad

4.2.2.5.1. BAZO.

A 24 h.p.i., en R1, se observó intensa inflamación y necrosis de la PB, pero no así de la PR, la cual se conservaba aparentemente indemne. No obstante, la reacción PAP (+) fue común a ambas zonas. En la pulpa roja, la reacción PAP (+) estaba confinada en células fagocíticas infectadas, que mayoritariamente no habían sufrido todavía necrosis por efecto de la proliferación listérica intracelular. La consecuencia de este hecho fue que aun habiendo una cantidad importante de listerias en la pulpa roja, no se observaban lesiones inflamatorio-necróticas aparentes en la misma con técnicas convencionales como la de hematoxilina-eosina (H-E).

En R2, R3 y R4 entre 24 y 48 h.p.i., la reacción inflamatorio-necrótica progresó tanto en la PB como en la PR, siendo la reacción PAP (+) intensa en ambos casos. En esta etapa de la infección el componente necrótico de la lesión fue predominante.

A diferencia de estos últimos casos, en R5 y R6 (72 h.p.i.) los componentes necrótico e inflamatorio de las lesiones observadas presentaron un relativo equilibrio. En R5 la necrosis predominó en la PB, mientras que en R6 lo hizo en la PR; adoptando en este último caso el aspecto de múltiples microabscesos, muchos de ellos con abundante cariorrhexis y cariólisis. La reacción PAP (+) en R6 fue ostensiblemente menor que en los casos anteriores.

Entre 72 y 96 h.p.i. se observó ya una esplenitis piogranulomatosa difusa, no siendo apreciable además necrosis ni en la PB ni en la PR. A partir de este momento, la reacción PAP (+) declinó ya gradualmente hasta el final

de la experiencia. Adicionalmente, la población linfoide de la pulpa blanca mostraba un aspecto linfoblástico indicativo de la existencia de procesos de regeneración y restitución en la misma.

Entre 120 y 144 h.p.i. (R10, R11, R12) no se observaron lesiones aparentes, pero si fue constatable la existencia de hiperplasia linfoide así como una gran afluencia de PMNNS y M0s al Órgano. En estos últimos casos la reacción PAP fue (-).

4.2.2.5.2. GANGLIOS LINFATICOS.

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	9/12
■ Gs. renales e ilíacos (linfocentro lumbar) ----	6/12
■ G. gástrico -----	3/12
■ Gs. mandibulares (linfocentro) -----	11/12
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	4/12

4.2.2.5.2.1. G. yeyunal.

Durante las primeras 24h.p.i. en R1 y R2 ya se observaron lesiones inflamatorias de carácter mixto y aspecto irregular en el córtex y paracórtex ganglionar. La reacción PAP fue positiva en tales lesiones. En R1 además se observaron abundantes MCTs en el paracórtex, por lo que cabe suponer la existencia de necrosis linfoide a este nivel.

En R2, la mayoría de las VEAs - sitas en el paracórtex y córtex interfolicular -, mostraron M0s PAP (+) aparentemente migrando desde la circulación al interior ganglionar. Este hecho sugeriría una importante participación de la vía sanguínea en la diseminación de la infección hacia los ganglios linfáticos, independientemente de cual sea la ubicación de estos (figura 58).

En R5, R6 y R7 a 72 h.p.i., el patrón de distribución de las lesiones observables es doble. Por una parte, la presencia en el paracórtex de lesiones inflamatorias de carácter irregular y relativamente bien definidas respecto del parénquima adyacente, indicaría la posibilidad ya mencionada de diseminación hematogena de la infección. Por otra, la existencia de lesiones inflamatorio-necróticas difusas en la periferia ganglionar y, en particular, en la zona subcapsular, indicaría también que L.monocytogenes accede al ganglio vía conductos linfáticos aferentes. La reacción PAP (+) fue constante en estas lesiones.

Posteriormente, de R9 a R12 no se observaron lesiones aparentes (R9, R10, R12) o estas, si existieron, fueron poco

significativas (R11). En R10, R11 y R12 los centros germinales de los folículos linfoides fueron muy evidentes, hecho este indicativo de su activación.

4.2.2.5.2.2. Linfocentro lumbar.

Las primeras lesiones se observaron a 24 h.p.i. (R2), consistiendo en acúmulos inflamatorios predominantemente situados en la periferia ganglionar y uno de ellos en la médula. El grado de lesión fue variable en los diferentes ganglios afectados, pero siempre PAP (+).

A 72 h.p.i. en R7 todavía se observaron lesiones inflamatorias PAP (+) tanto en la zona subcapsular como en el paracórtex, pero en el resto de los casos estudiados a partir de 96 h.p.i. (R10, R11, R12), no se observaron lesiones aparentes.

4.2.2.5.2.3. G. gástrico.

Dado el escaso nº de ganglios gástricos estudiados no fue posible hacer una valoración significativa del curso de la infección en los mismos. No obstante en R7 (72 h.p.i.), R10 y R11 (120 h.p.i.) no se observaron lesiones aparentes.

4.2.2.5.2.4. Linfocentro mediastínico.

Aun habiéndose podido estudiar únicamente 4 casos de este lote, el hecho de haber sido posible observar ganglios del linfocentro mediastínico en R1 y R2 a 24 h.p.i., hace interesante su valoración.

En R1, un ganglio traqueo-bronquial mostró lesiones PAP (+) intensas que afectaron prácticamente en su totalidad a dicho ganglio, siendo la proliferación bacteriana en el mismo muy importante y evidente. En este caso hubo también lesiones importantes en el mediastino adyacente al citado ganglio, no existiendo solución de continuidad entre la inflamación mediastínica y la ganglionar. Sin embargo, en un ganglio mediastínico de R2 las lesiones observadas fueron muy poco significativas.

A 72 h.p.i. en R7, fue interesante observar como había ganglios muy afectados con reacción inflamatorio-necrótica PAP (+) intensa y masiva, junto con ganglios pertenecientes al mismo linfocentro mediastínico cuya afección era mínima o inexistente. Posteriormente a 96 h.p.i. (R9), no se observaron lesiones aparentes.

4.2.2.5.2.5. Linfocentro mandibular.

En general el grado de afección de estos ganglios fue inconstante y poco significativo en el transcurso de toda la experiencia.

Los hallazgos histopatológicos observados fueron variables. Así, R1 a 24 h.p.i. y R8 a 96h.p.i., mostraron una gran profusión de MCTs en el paracórtex; en ambos casos la reacción PAP fue (-). En R2 se observó reacción PAP (+) intracelular en M0s que migraban a través de las VEAs y R5 mostró varios acúmulos inflamatorio-necróticos de tamaño variable (100-500 μ m de diámetro) asociados presumiblemente a vénulas post-capilares del paracórtex (Figura 59).

R1, R4, R6, R7, R9, R10, R11 y R12 no mostraron lesiones aparentes. En R10 y R12 entre 120 y 144 h.p.i., se observaron folículos linfoides secundarios.

4.2.2.5.3. TIMO.

En principio, desde R2 fue evidente una progresiva necrosis y depleción linfoide del córtex, manifestándose esta en sus primeros momentos (24 h.p.i.) por una gran profusión de MCTs y abundante cariorexix y cariolisis (Figura 60), todo ello PAP (-).

Ahora bien, este hecho se complicó frecuentemente con lesiones de índole inflamatoria (PMNNs y M0s) provocadas, bien por extensión de las existentes en mediastino (R2, R5), bien por diseminación hemática a nivel de la médula tímica, caso de R8. En ambas circunstancias las lesiones fueron PAP (+).

4.2.2.5.4. PLACAS de PEYER.

Excepto en R9, a 96 h.p.i., donde se apreció un foco inflamatorio bien definido (PMNNs/M0s) en la zona cúpula de una placa de Peyer, no se observaron lesiones aparentes en ningún otro caso estudiado. En R10 y R12 se observaron folículos linfoides secundarios o activados.

4.2.2.5.5. HIGADO.

Durante las primeras 24 h.p.i., en R1 y R2 únicamente se observaron múltiples focos de proliferación bacteriana constituidos por grupos de 1-3 hepatocitos que mostraron

reacción PAP (+) (Figura 61). Esta técnica permitió demostrar perfectamente la existencia de cantidades variables de listerias en el interior de hepatocitos infectados por todo el hígado.

Conforme evolucionaba la infección, a 37 y 48 h.p.i. se observaron ya lesiones con una amplia reacción inflamatoria cuyo tamaño era de entre 200-500 μm de diámetro. Tales lesiones fueron predominantemente de carácter polimorfonuclear y con abundante cariorexix y cariolisis en el centro de las mismas.

Esta imagen, caracterizada por múltiples microabscesos en diferentes fases de evolución, coexiste con lesiones más recientes en las que, como en R1 y R2, se observaban acúmulos variables de hepatocitos intensamente infectados por numerosas listerias. Todas las lesiones fueron PAP (+) a este tiempo post-infección. Simultáneamente, una gran afluencia de células, en su mayoría mononucleares, fue evidente por los sinusoides de todo el órgano.

A 72 h.p.i. la progresión de las lesiones es variable según los casos. Así, R5 mostró un aspecto similar al ya descrito para R3 y R4 con lesiones en diferentes fases de evolución, desde necrosis incipiente de hepatocitos hasta grandes focos inflamatorio-necróticos de entre 500-600 μm de diámetro.

Por el contrario, R6 presentaba mayoritariamente lesiones de características granulomatosas con ostensible predominio de M0s y en menor medida otras células inflamatorias (Lts y PMNAs) (Figura 62). Es interesante el hecho de que estas lesiones fueron PAP (-) y además se observó en ellas un índice de mitosis importante. No obstante, tales lesiones coexistieron también con lesiones del tipo de microabscesos, si bien en cantidad menos significativa.

Las lesiones en R7 sugieren un estadio intermedio de evolución entre R5 y R6, caracterizándose por ser inflamatorio-necróticas pero en general de aspecto menos grave y en menor cantidad que las existentes de R1 a R5.

En R8 y R9 a 72 y 96 h.p.i. respectivamente, las lesiones existentes sugieren ya una gradual superación de la infección. Esto se manifiesta por la cantidad poco significativa de las lesiones observadas, la disminución de la positividad a la reacción de PAP y por ausencia de necrosis en las mismas.

De R10 a R12 las lesiones fueron poco importantes y la reacción de PAP poco significativa (R10) o ausente (R11 y R12). La reacción inflamatoria observada fue mixta con

tendencia a granulomatosa y abundó especialmente en la periferia de los conductos biliares y espacios porta.

4.2.2.5.6. CORAZON.

Se observaron lesiones en R5 y R8 a 72 y 96 h.p.i. respectivamente.

Es interesante el hecho de que en R5 la lesión inflamatoria observada afectó únicamente a las serosas del órgano en toda su extensión, por lo que estas se diagnosticaron como epicarditis y pericarditis. Ambas serosas fueron intensamente positivas a la reacción de PAP (Figuras 63 y 64), apreciándose también exudado inflamatorio difuso PAP (+) en el mediastino. La adventicia de la aorta y otros grandes vasos de la base del corazón, también mostraron reacción inflamatoria PAP (+) importante (Figura 65). Sin embargo, el miocardio en sentido estricto, no se observó lesionado.

En R8 la lesión epicárdica es poco significativa, pero se observó un foco inflamatorio con reacción PAP (+) intensa en el ápex ventricular. El resto de los casos estudiados no mostró lesiones aparentes.

4.2.2.5.7. PULMONES.

Las lesiones observadas en este órgano se restringieron a R5 y R8 a 72 y 96 h.p.i. respectivamente, y mostraron un patrón de distribución predominantemente pleural y subpleural con exudación fibrinosa importante (Figuras 66 y 67a y b).

La pleuritis fibrinosa afectó a la serosa prácticamente en toda su extensión, pero cuando se observó inflamación del parénquima subpleural, ésta fue siempre focal. El exudado inflamatorio mixto (PMNs y M0s) mostró reacción PAP (+) constante.

4.2.2.5.8. MEDIASTINO.

En el mediastino se constataron lesiones inflamatorias de intensidad variable en R1, R2, R4, R5 y R8. Es interesante señalar como la existencia de reacción inflamatoria PAP (+) en el timo siempre coincidió con la

existencia de lesiones inflamatorias mas o menos difusas en el mediastino. Viceversa, en R7, donde lo único que se observó fue depleción del córtex, el mediastino no mostró rastro alguno de inflamación.

4.2.2.5.9. PERITONEO.

La inflamación de las serosas peritoneales en sentido amplio, fue constante hasta el 5º d.p.i.. Lo mismo que en otras experiencias, las más afectadas fueron el mesenterio, serosa gastrointestinal, meso gastroesplénico, serosas genitourinarias, diafragmática y en general todas las serosas de los órganos abdominales. De R9 a R12 sin embargo, no se observaron lesiones aparentes.

En esta experiencia pudo comprobarse frecuentemente como la serosa era invadida activamente desde la superficie, provocándose entonces lesiones inflamatorio-necróticas de intensidad variable que tenían acceso a la vascularización sanguínea y linfática del interior de las serosas. También la capa muscular externa gastrointestinal y el diafragma fueron frecuentemente afectados desde la serosa visceral peritoneal.

4.2.2.6. EXPERIENCIA 8

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 3a

DOSIS INOCULACION : $1,6 \times 10^8$ m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo p.i.	24h	48h	72h	96h	120h	144h
	R1	R3	R5*	R8	R10	R12
	R2	R4*	R6	R9*	R11	
			R7			

(*) mortalidad

4.2.2.6.1. BAZO.

A las 24 h.p.i. ya se observó depleción linfoide y lesiones inflamatorio-necróticas PAP (+) en el PALS (Figura 68). No obstante, la zona más periférica de la pulpa blanca permanecía relativamente bien preservada (Gráfica 9).

El componente inflamatorio de estas lesiones fue de carácter mixto (PMNs y M0s), pero con predominio manifiesto de los primeros. La existencia de cariorrexis y cariólisis fue también abundante en el PALS.

En la pulpa roja, en R1 y R2, fueron ya evidentes múltiples acúmulos inflamatorio-necróticos PAP (+) con tendencia a la formación de microabscesos (Figura 68). Su distribución fue más o menos uniforme por toda la pulpa roja, siendo más abundantes en R2 que en R1.

El aspecto de R3 a 48 h.p.i., fue muy similar al descrito para R1 y R2. Sin embargo, en R4, al mismo tiempo post-infección, el componente necrótico de las lesiones era muy poco significativo, predominando por el contrario, una reacción inflamatoria piogranulomatosa por todo el órgano. También la reacción PAP (+) fue ostensiblemente menor que en casos anteriores (Figura 69).

A 72 h.p.i., la esplenitis piogranulomatosa difusa fue manifiesta en R6 (Figura 70), caso en el que la reacción PAP (+) y la existencia de inflamación en la pulpa roja, fue particularmente intensa (Figura 71). Sin embargo, en R5 y

R7, el grado de afección esplénica fue ostensiblemente inferior que en casos anteriores.

En R5 y, sobre todo, en R7, la pulpa blanca se observó relativamente bien preservada, con únicamente una cierta depleción linfoide e inflamación del PALS poco importante. En la pulpa roja, el componente piogranulomatoso fue lo más evidente, no detectándose ya microabscesos. Por otra parte, en estos dos últimos casos la reacción PAP (+) fue también menos importante que entre 24 y 48 h.p.i..

Lo mencionado para R5 y R7, fue extensivo para R8 y R9 a 96 h.p.i., casos en los que, aunque persistía la inflamación piogranulomatosa en la pulpa roja, los procesos de reparación y la repoblación linfoide, tanto en la PB como en la PR, fueron manifiestos. La reacción PAP (+) a su vez, tendía a ser progresivamente más imperceptible. En R9, se observó además hematopoyesis abundante.

Finalmente, de R10 a R12 (120-144 h.p.i.), ya no se observaron lesiones aparentes, y la reacción PAP fue invariablemente (-). También se observó hematopoyesis abundante en R10 y R11, e hiperplasia linfoide en R11 y R12 (Figura 72).

4.2.2.6.2. GANGLIOS LINFATICOS.

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	11/12
■ Gs. ilíacos (linfocentro lumbar) -----	6/12
■ G. gástrico -----	6/12
■ Gs. mandibulares (linfocentro) -----	11/12
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	6/12

4.2.2.6.2.1. G. yeyunal.

A 24 h.p.i., se observaron múltiples acúmulos inflamatorios discretos básicamente constituidos por M0s y asociados a VEAs en R1 y R2. Fue también posible detectar mediante PAP algunas listerias fagocitadas en M0s presentes en dichas lesiones (Gráfica 10).

En el contexto general del ganglio, las lesiones se ubicaron en el córtex interfolicular y en paracórtex. Adicionalmente, en R2, se apreciaron zonas irregulares y mal definidas en las que se observaba depleción linfoide y presencia difusa de M0s. Algunas de estas células eran PAP (+), pero lo más destacable de estos casos fue la evidente desproporción observada entre la importancia de las lesiones y la reacción PAP (+), que era mínima.

De R3 a R6 (48-72 h.p.i.), las lesiones anteriormente descritas persistieron y aumentaron tanto en cantidad como en intensidad. La cantidad de bacterias PAP (+) observadas en las mismas también se incrementó, y respecto de la ubicación de las lesiones, estas se hallaban igualmente en paracórtex y córtex interfolicular de manera predominante.

No obstante, en R3 (Figuras 73 y 74), R4, R5 y R6 también se apreció reacción inflamatoria PAP (+) más o menos difusa a nivel subcapsular, por lo que aparentemente coexistían dos patrones de inflamación, uno de origen sanguíneo, asociado a VEAs, en córtex interfolicular y paracórtex, y otro del tipo linfático aferente, localizado en seno subcapsular y zonas adyacentes.

Lo expuesto para R4 es aplicable también a R5 y R6, si bien las lesiones progresaron en estos casos en lo que a gravedad se refiere. Es interesante el hecho de que en R6 fueran observables células de aspecto macrofágico con listerias fagocitadas en el lumen vascular de algunas VEAs.

A partir de 96 h.p.i., la gravedad de las lesiones disminuyó drásticamente, de manera que de R10 a R12 (120-144 h.p.i.), ya no se observaron lesiones aparentes. De manera similar, la reacción PAP (+) en R8 fue ya insignificante y, a partir del quinto d.p.i., ésta ya no fue detectada.

4.2.2.6.2.2. Linfocentro lumbar (Gs. ilíacos).

La cantidad de ganglios ilíacos estudiados en esta experiencia no fue suficiente como para establecer resultados concluyentes.

El caso más relevante fue R4 a 48 h.p.i., en el que se pudieron observar importantes lesiones inflamatorias y necróticas en la zona de influencia del seno subcapsular, y en el córtex y paracórtex. Dichas lesiones fueron PAP (+), y mostraron principalmente un patrón de inflamación en el que la infección accedía al ganglio vía linfa aferente. R2 mostró lesiones similares.

4.2.2.6.2.3. G. gástrico.

Además de que la cantidad de ganglios gástricos examinados en esta experiencia no es considerada significativa, en los casos estudiados las lesiones observadas fueron inconstantes y poco significativas.

4.2.2.6.2.4. Gs. mandibulares.

Estos ganglios mostraron lesiones poco importantes en el transcurso de toda la experiencia (Gráfica 10). Dichas lesiones consistieron en acúmulos inflamatorios múltiples en córtex interfolicular y paracórtex, cuya reacción PAP (+) fue débil en general. Muchas de las lesiones observadas parecían asociarse a VEAs.

4.2.2.6.2.5. Gs. mediastínicos.

A 24 h.p.i. ya se observaron lesiones en R1. Consistían en inflamación difusa asociada al seno subcapsular y senos medulares, además de acúmulos inflamatorios mixtos en paracórtex y microabscesos en folículos linfoides (Gráfica 10). Algunos MCTs presentes en dichos folículos linfoides mostraron reacción PAP (+).

En R3, la inflamación ganglionar fue mucho más intensa, afectando principalmente a la zona medular. Se observaron en ella lesiones inflamatorias mixtas (PMNNs y MOs) PAP (+) y abundante cariorrhexis y kariolisis en toda la zona.

En R7 a 72 h.p.i., en contraste con R1, se observó inflamación granulomatosa difusa PAP (+) de la práctica totalidad del ganglio, principalmente en la médula.

En R8 y R9, se observó también inflamación granulomatosa difusa de todo el ganglio, con la particularidad de que la reacción PAP (+) fue prácticamente

no significativa. En R12 no se observaron lesiones aparentes.

El patrón lesional predominante en todos estos casos, fue el característico del acceso de L.monocytogenes al ganglio vía linfa aferente.

4.2.2.6.3. PLACAS de PEYER.

Excepto en R5, caso en el que se observó depleción linfoide evidente de las placas de Peyer, no se apreciaron lesiones en el resto de los casos estudiados.

4.2.2.6.4. TIMO.

La evolución del timo mostró un patrón lesional ya descrito en experiencias previas. A 24 h.p.i., se observó en el córtex una gran profusión de MCTs y, a 48 h.p.i. en R3, la depleción linfoide del córtex era total. En días posteriores, esta se mantendría hasta aproximadamente las 120 h.p.i.

A partir de este momento, de R10 a R13, no se observaron lesiones aparentes. Por lo demás, sólo en R3 se apreció un pequeño acúmulo inflamatorio PAP (+) de 40-70 μ m de diámetro en el córtex.

4.2.2.6.5. HIGADO.

A 24 h.p.i., la cantidad de lesiones observada fue ya significativa, 0-5 acúmulos inflamatorios/campo (objetivo de 10x). Tales lesiones fueron microabscesos de pequeño tamaño (80-150 μ m de diámetro) PAP (+) y lesiones inflamatorias incipientes (Gráfica 9). Algunas células de Kupffer mostraron reacción PAP (+) intracitoplásmica. También fueron observables hepatocitos recién infectados con listerias en su citoplasma y ausencia de reacción inflamatoria a su alrededor.

A partir de este momento, las lesiones, así como la gravedad de las mismas, aumentará progresivamente entre las 48 y 96 h.p.i., para declinar de manera gradual y observarse finalmente como lesiones residuales PAP (-), hacia el 5º d.p.i..

Las lesiones observadas en el punto álgido de la infección (48-96 h.p.i.) fueron microabscesos y lesiones con

desarrollo de necrosis central variable, así como otras de carácter granulomatoso con predominio de M0s (Figura 75), todas ellas PAP (+). El tamaño de dichas lesiones osciló entre 200 y 500 μm de diámetro, observándose en cantidad de 1-5/campo (objetivo de 10x). Las lesiones más avanzadas y de mayor gravedad se apreciaron en R5, caso que presentó múltiples lesiones inflamatorias con desarrollo de necrosis central y reacción PAP (+) intensa en la periferia de dichas lesiones (Figura 76). En R8, por el contrario, coexistían lesiones de aspecto purulento predominante por todo el parénquima hepático con lesiones típicamente granulomatosas a nivel portal, en concreto alrededor de los conductos biliares (Figuras 77). Tales lesiones granulomatosas mostraban habitualmente numerosas mitosis (Figura 78). Por otra parte, la presencia de trombos asociados a estas lesiones no fue infrecuente (Figura 79).

A partir del 4º d.p.i. (R10 a R12), las lesiones no fueron significativas ni por su cantidad, ni por su intensidad. Consistieron en granulomas menores de 150 μm de diámetro PAP (-).

Fue interesante comprobar la abundancia de mitosis de hepatocitos en todos estos casos (Figura 80 a y b). La presencia de megacariocitos en el parénquima hepático, también fue frecuente en dichos casos.

4.2.2.6.6. PANCREAS.

En esta experiencia el páncreas se observó afectado en R5, R6 y R8. Las características de dichas lesiones fueron similares a las expuestas en otras experiencias, es decir, múltiples lesiones inflamatorias focales y superficiales PAP (+), restringida a grupos de acinis próximos entre sí.

4.2.2.6.7. SISTEMA GENITAL.

De manera similar a otras experiencias, en los ratones machos únicamente se observó inflamación de la serosa de los órganos genitales, pero no del parénquima (R4, R7).

También como en otras experiencias, en los ratones hembras los órganos genitales afectados fueron, en grado variable, ovario (R5, R9), oviducto y útero (R3, R5, R8, R9) (Figura 81). Las lesiones siempre fueron PAP (+), y afectaron en general, a toda la extensión de la serosa y,

más focalmente, a la capa muscular superficial del miometrio.

4.2.2.6.8. PERITONEO.

Las serosas peritoneales más frecuentemente afectadas fueron el mesenterio, serosas genitourinarias, meso gastroesplénico, y serosa diafragmática y gastrointestinal (Figura 82).

Las características de tales lesiones fueron similares a las ya descritas en otras experiencias. La gravedad de las mismas se incrementó gradualmente desde las 24 h.p.i., observándose su punto álgido entre 48 y 96 h.p.i. (R4, R5, R8, R9). Posteriormente, la gravedad de dichas lesiones declinó progresivamente hasta no ser ya observables a partir de las 120 h.p.i..

4.2.2.7. EXPERIENCIA 9

ESPECIE / SEROTIPO : L.ivanovii 5

DOSIS INOCULACION : $1,5 \cdot 10^8$ m.o./ml - 0,5 ml

VIA INOCULACION : Intraperitoneal

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo

p.i. 24h 48h 72h 96h 120h 144h 168h

Tiempo p.i.	24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
	R1	R3	R5*	R9	R11	R13	R15
	R2	R4	R6*	R10	R12	R14	R16
			R7				
			R8				

(*) mortalidad

La no existencia de lesiones significativas en los órganos linfoides y, por el contrario, la existencia constante de lesiones hepáticas graves durante los primeros 5 días post-infección, fueron los hallazgos más importantes y sobresalientes observados en esta experiencia.

4.2.2.7.1. ORGANOS LINFOIDES.

En concreto, respecto de los órganos linfoides, los hallazgos más destacables fueron la depleción del córtex tímico, entre el primer y quinto d.p.i., y lesiones inflamatorias PAP (+) en algunos ganglios del linfocentro mediastínico, durante toda la experiencia. Adicionalmente, en los casos R5 y R6 la presencia de MCTs en el bazo y otros órganos linfoides también fue un hecho significativo.

De manera similar a experiencias anteriores con L.monocytogenes, también se observó una depleción linfoide significativa y PAP (-) en el paracórtex de los ganglios yeyunales y mandibulares durante los dos primeros días post-infección. Por el contrario, hacia el 4-5 día, una progresiva hiperplasia linfoide fue notable y evidente en el bazo y ganglios linfáticos. En R15 también fue posible observar actividad hematopoyética importante en el bazo.

4.2.2.7.2. HIGADO..

Durante las primeras 24 h (Gráfica 11) ya pudo observarse la existencia de múltiples microabscesos de entre 100 y 250 μm de diámetro, PAP (+). Algunas células de Kuppfer también mostraban reacción PAP (+). Fue característico de esta experiencia el que las lesiones tendían a ser de tipo inflamatorio-necrótico hacia los días 2 o 3 post-infección, siendo el componente necrótico de las mismas muy evidente e incluso predominante; caso de R5, R6, R8 y R9 (Figuras 83 y 84).

Otro aspecto llamativo de tales lesiones fue el notable tamaño que presentaban, ya que en los casos previamente mencionados el diámetro aproximado de las mismas oscilaba entre 400 y 1000 μm . Hepatocitos colonizados por listerias, e intensamente PAP (+), eran constantes en la periferia de las lesiones (Figura 85). La existencia de microinfartos PAP (-) fue también frecuente en estos casos.

En contraste con los casos anteriores, en R7, R10, R11 y R12, las lesiones observadas fueron principalmente de tipo inflamatorio. No obstante, todavía coexistían en algunos de estos casos (R10, R12) lesiones con un componente necrótico significativo junto con otras de aspecto piogranulomatoso o granulomatoso, en particular, estas últimas, en los espacios porta y alrededor de los conductos biliares (Figura 86). Por el contrario, en R11, a un tiempo p.i. similar, las lesiones existentes eran más leves y de carácter únicamente granulomatoso, si bien todavía con reacción PAP (+)

importante (Figura 88). Posteriormente, de R13 a R15, las lesiones observadas fueron residuales y PAP (-).

La existencia de trombos en las venas de los espacios porta no fue un hallazgo infrecuente (Figuras 86 y 87).

En R8, a 72 h.p.i., pudieron observarse numerosas listerias en la vesícula biliar (Figura 89).

4.2.2.7.3. Otros órganos.

En esta experiencia, las glándulas adrenales mostraron lesiones inflamatorias PAP (+) importantes (R1, R7, R9), cuyo tamaño oscilaba entre 50 y 300-400 μ m de diámetro (Figura 90).

4.2.3. Drenaje linfático de una suspensión de carbón coloidal (Tinta China) tras inoculación i.p..

El hecho de que en todas las experiencias con la vía i.p. los ganglios del linfocentro mediastínico fueran los que más precozmente mostraban reacción PAP (+), nos indujo a pensar la posibilidad de que entre estos ganglios y el peritoneo existiera una conexión linfática directa.

Para estudiar esta posibilidad, se inoculó un lote de ratones (6) de la misma estirpe y edad que la de los empleados en el resto de las experiencias con 0,5 cc de una suspensión de carbón coloidal (Tinta China) como marcador. La pauta de sacrificio empleada fue la misma que la de las experiencias 1 y 2.

Los resultados obtenidos confirmaron dicha posibilidad. Así, a 3 h.p.i. se observó en la necropsia la presencia de tinta china sobre la superficie de las serosas y órganos abdominales, pero, macroscópicamente, no mostraron signos de haber captado el marcador. Esto fue particularmente evidente para todos los ganglios abdominales observados. Sin embargo, si se apreciaron múltiples conductos linfáticos aferentes en la cara abdominal del diafragma que drenaban tinta china hacia el torax a nivel del hiato esofágico.

Consecuentemente, a ambos lados del esternón, en la zona ventral del torax, fue posible observar dos conductos linfáticos de mayor calibre que drenaban el marcador hacia los ganglios esternales craneales del linfocentro torácico ventral (Figuras 91 y 92). Desde aquí, la linfa eferente de este linfocentro se dirigía hacia los ganglios del linfocentro mediastínico, los cuales se observaban con una coloración negruzca evidente.

Las preparaciones histológicas de estos ganglios mostraron inequívocamente la presencia de tinta china en el seno subcapsular y en los senos medulares de dichos ganglios (Figura 93).

A este mismo tiempo p.i., en la zona marginal de la pulpa blanca y en la pulpa roja, fue posible observar abundantes M0s con partículas de marcador fagocitadas. Respecto del hígado, las células de Kupffer mostraron una intensa captación del marcador por todo el órgano. A 24 y 48 h.p.i., los hallazgos fueron similares a los mencionados.

4.3. Vía subcutánea

4.3.1. EXPERIENCIA 10

ESPECIE / SEROTIPO : L.monocytogenes 1/2a

DOSIS INOCULACION : $0,9 \times 10^8$ m.o./ml 0,5 ml

VIA INOCULACION : Subcutánea (lumbar)

PAUTA DE SACRIFICIO Y/O MORTALIDAD :

Tiempo

p.i. 4h 10h 22h 34h 46h 58h 70h 95h 100h 115h 140h

	R1	R3	R5	R7	R9	R11	R13	R15*	R17*	R18*	R20
	R2	R4	R6	R8	R10	R12	R14	R16*		R19	

(*) mortalidad

4.3.1.1. BAZO.

En el transcurso de la experiencia se observó de manera constante una importante esplenomegalia, aparentemente asociada a intensa hiperemia, y a la existencia de inflamación y/o necrosis extensa en varios de los casos observados.

De R1 a R12, no fue posible determinar la existencia de depleción linfoide del PALS, pero si se observaron acúmulos inflamatorios muy leves de PMNs y M0s PAP (+) en dicha zona en R6 (22 h.p.i.), R9 (46 h.p.i.) y R11 (58 h.p.i.).

Hacia las 70 h.p.i. lesiones inflamatorio-necróticas graves fueron patentes prácticamente por todo el órgano en R13 (Figura 94). Fue evidente en este caso el que las lesiones se restringieron de manera más importante y significativa al PALS en vez de a los folículos linfoides, los cuales permanecían mejor preservados. No obstante, a un mismo tiempo p.i. R14 no mostró lesiones graves, no teniendo éstas además carácter necrotizante como en el caso anterior.

En los casos R15 a R18 (90-115 h.p.i.), la necrosis del órgano fue masiva y prácticamente total. De manera coincidente, en los casos R15 a R18, entre los márgenes cronológicos mencionados, se produjo la muerte como consecuencia de la infección. En todos estos casos, la necrosis existente se manifestó por una gran abundancia de cariorexia y cariolisis, sugiriendo que la causa que la provocó había actuado de manera súbita y reciente entre el segundo y tercer día post-infección. Se observó también en los mismos, la presencia de múltiples trombos, en particular en R17.

Por el contrario, en R19 y R20 (118 y 140 h.p.i. respectivamente), el componente inflamatorio, si bien muy intenso, predominaba significativamente sobre el necrótico, ofreciendo el aspecto de una esplenitis progranulomatosa difusa ya descrita en otras experiencias. La presencia de reacción PAP y Gram (+), fue en estos casos mucho menor que en los anteriores, particularmente, de R13 a R18.

4.3.1.2.

GANGLIOS

LINFATICOS.

■ G. mesentérico (G. yeyunal) -----	15/20
■ Gs. ilíacos (linfocentro lumbar) -----	14/20
■ G. gástrico -----	6/20
■ Gs mandibulares (linfocentro) -----	17/20
■ Gs. mediastínicos (linfocentro) -----	9/20
■ Gs. inguinales superficiales -----	11/20

4.3.1.2.1. G. yeyunal.

A 22 h.p.i., en R5, se apreció la existencia de depleción linfoide significativa a nivel de los folículos linfoides y del paracórtex, PAP (-). En R6 y R7 la depleción observada fue menos evidente.

En R11 (58 h.p.i.), se observó ya la existencia de lesiones inflamatorio-necróticas de tamaño variable (50-150 μ m de diámetro) y forma irregular con presencia de PMNNS y MÚs PAP (+).

La linfadenitis descrita se incrementó progresivamente, y en R14 (70 h.p.i.) presentó lesiones mixtas (PMNNS y M0s) en paracórtex y córtex interfolicular. No obstante, la reacción PAP (+) fue débil.

En R16, R17 y R18, la afección ganglionar fue, en líneas generales, similar a la descrita para R14, pero en R15, a 95 h.p.i., la necrosis observada fue masiva y PAP (+) intensa (Figuras 95 y 96).

En R19 y R20, el ganglio yeyunal también se observó afectado, si bien el componente inflamatorio constitutivo de dichas lesiones fue granulomatoso, no presentando estas necrosis significativa. Así mismo, la reacción PAP y Gram, aun siendo (+), fue débil.

4.3.1.2.2. Linfocentro lumbar.

En las experiencias en las que se utilizó la vía subcutánea como vía de inoculación, se creyó conveniente el estudio específico de los ganglios iliacos por ser, en última instancia, tributarios de los inguinales superficiales, en cuya zona de drenaje linfático se localizaba el punto de inoculación.

Los primeros casos en los que se detectaron lesiones inflamatorias fueron R10 y R11 (46 h.p.i.). En estos casos las lesiones observadas no fueron importantes, y la reacción PAP (+) fue poco significativa.

Posteriormente, a partir del tercer d.p.i., las lesiones observadas incrementaron su gravedad, siendo ya inflamatorio-necróticas, pero sin ser nunca, excepto en R18, excesivamente importantes. En este caso, las lesiones fueron generalizadas en todo el córtex y paracórtex ganglionar y la reacción PAP (+) también fue superior a la observada previamente.

Es interesante destacar, que el patrón de lesión ganglionar en el transcurso de esta experiencia fue principalmente de tipo aferente, es decir, indicativo de que L.monocytogenes accedió al ganglio vía linfa aferente de manera predominante.

4.3.1.2.3. G. gástrico.

La cantidad de ganglios gástricos que se pudo estudiar en esta experiencia, no fue suficiente como para establecer conclusiones significativas.

4.3.1.2.4. Linfocentro mandibular.

El primer caso en el que se observó afección ganglionar fue R13 a 70 h.p.i.. Presentaba lesiones inflamatorias o inflamatorio-necróticas múltiples PAP (+) asociadas aparentemente a VEAs en córtex interfolicular y paracórtex. Los folículos linfoides no parecían afectados, si bien, mostraban abundantes MCTs.

Posteriormente, de R15 (Figuras 97, 98 y 99) a R19, se observaron lesiones inflamatorio-necróticas similares a las halladas en R13 pero de mayor gravedad e importancia. Igualmente, los folículos linfoides permanecieron relativamente preservados.

4.3.1.2.5. Linfocentro mediastínico.

Hasta el segundo d.p.i., los casos R3, R8, y R9 no mostraron lesiones aparentes. Sin embargo, en R11 y R13, en el tercer d.p.i., se observaron pequeños acúmulos inflamatorios PAP (+) asociados a VEAs del paracórtex y seno subcapsular respectivamente. Curiosamente, en este último caso se observaron también lesiones PAP (+) en abdomen a nivel de la aorta abdominal y ganglios ilíacos.

De R16 a R20, excepto en R18, también se detectaron lesiones PAP (+), pero estas fueron moderadas. En R18 la afección ganglionar fue más importante.

4.3.1.2.6. Gs. inguinales superficiales.

En todos los casos observados, las lesiones existentes consistieron en una reacción inflamatorio-necrótica grave que se extendía por toda la zona periférica del ganglio de manera difusa y generalizada. Fue característico de estos ganglios el que la reacción PAP (+), aunque constante, era de un orden significativamente menor que la grave lesión existente en los mismos.

4.3.1.3. PLACAS de PEYER.

A 10 h.p.i. (R4), se observó la existencia de necrosis linfoide significativa, la cual se manifestaba por una gran profusión de MCTs, predominantemente en los folículos linfoides (Gráfica 12). También de R5 a R7 se observó el mismo fenómeno, siendo en cualquier caso PAP (-).

Contrariamente, en R9, R14 y R17, se observó la existencia de acúmulos inflamatorios mixtos (PMNs y MúS) PAP (+) ubicados en zonas cúpula de las placas de Peyer.

A 90-95 h.p.i., en R15 (Figura 100) y R16 (Figura 101), se demostró la existencia de inflamación y necrosis masiva, PAP (+), de todas las placas de Peyer observadas.

4.3.1.4. TIMO.

Desde las 10 h.p.i., se observó necrosis progresiva de las células linfoides del córtex y gran profusión de MCTs en el mismo, todo ello PAP (-). La depleción linfoide del córtex fue ya constante durante el transcurso de toda la experiencia.

4.3.1.5. HIGADO.

Las primeras manifestaciones evidentes de infección en este órgano se observaron a 58 h.p.i. en R10 y R11. Las lesiones apreciadas fueron acúmulos inflamatorios de entre 50-100 μ m de diámetro con presencia de PMNns y MÓs en los mismos. Adicionalmente, se evidenció la existencia de necrosis incipiente en hepatocitos aislados de la periferia de las lesiones (picnosis nuclear y eosinofilia intensa citoplásmica).

De R12 a R18, entre el segundo y cuarto d.p.i., las lesiones aumentaron gradualmente en cantidad y en gravedad, observándose entonces lesiones predominantemente inflamatorias, de entre 50 y 400 μ m de diámetro, y de distribución en su mayoría perivascular (Figura 102). En algunos casos de muerte espontánea la reacción inflamatoria asociada a las lesiones PAP (+) fue muy escasa (Figura 103). El componente necrótico de las lesiones en esta experiencia no fue significativo.

A partir del tercer d.p.i., de R14 a R18, la existencia de lesiones necróticas de origen trombótico y PAP (-), fue manifiesta. Excepto en R17, donde las lesiones fueron más graves (Figura 104), lo más característico de estos casos, además de los microinfartos observados (Figura 104), fue el que las lesiones apreciadas por si mismas no podían calificarse de especialmente graves, como por ejemplo en la experiencia homóloga con serotipo 4b; no obstante, éstas eran numerosas por todo el órgano.