

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y
PRODUCCIONES ANIMALES

PATOGENIA DE LA LISTERIOSIS MURINA EXPERIMENTAL

ALBERTO MARCO VALLE



Bellaterra 1990

Figura 84: Experiencia 9. (R8). 72 h.p.i. Lesión inflamatorio-necrótica con desarrollo de necrosis central (estrella). El componente inflamatorio predominante es polimorfonuclear (PMNNs). Hepatocitos necróticos se observan en la periferia de la lesión.

Figura 85: Experiencia 9. (R9). 96 h.p.i. Lesión hepática PAF (+) similar a la de la figura 84, pero sin que se halla desarrollado necrosis en su centro. Obsérvese como la reacción PAP (+) es más intensa en la periferia de la lesión.

Figura 86: Experiencia 9. (R10). 96 h.p.i. Coexistencia de lesiones mixtas (PMNNs y MØs) PAF (+) (flechas) junto con otras de aspecto aparentemente granulomatoso alrededor del conducto biliar (margarita). No puede eliminarse la posibilidad de que muchas de estas células sean hematopoyéticas. Obsérvese también la presencia de un trombo en el lumen de la vena portal como consecuencia de la vasculitis existente (estrella).

Figura 87: Experiencia 9. (R10). Lesión hepática mixta (MØs y PMNNs) con reacción PAP (+) poco significativa en relación con la gravedad de dicha lesión. El aspecto de estas lesiones es característico de la fase de inmunidad específica. Obsérvese también la presencia de un trombo en una vena (estrella).

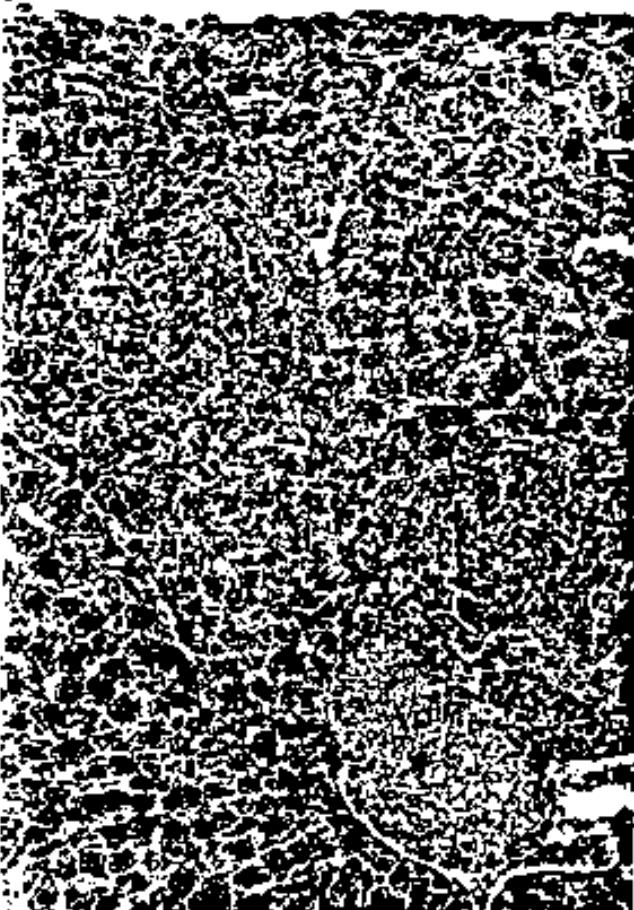
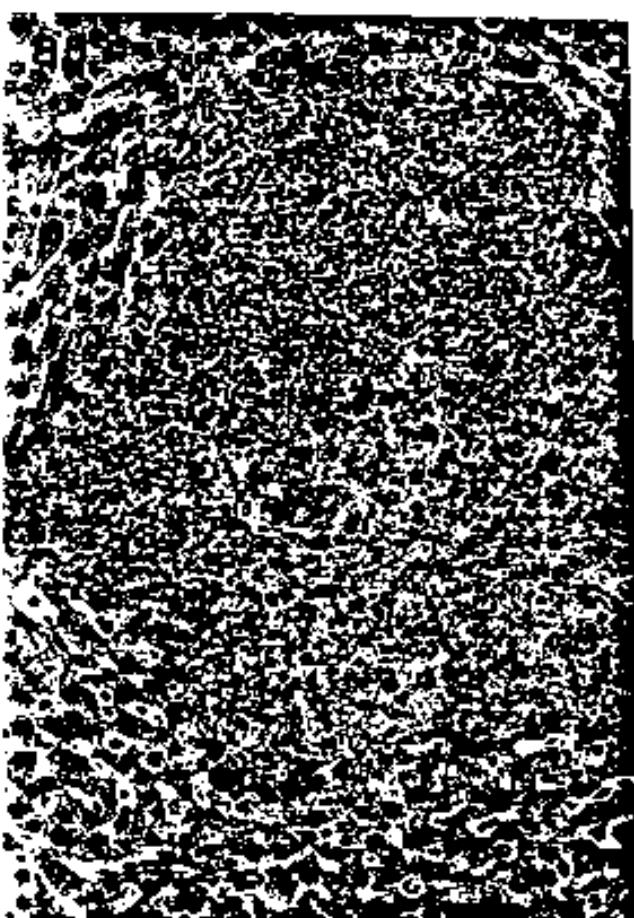
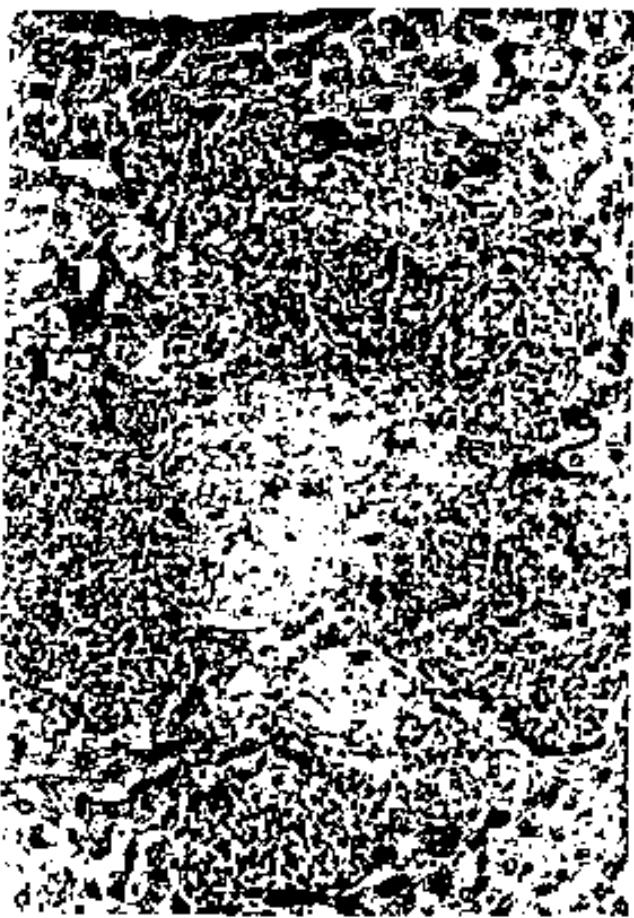


Figura 88: Experiencia 9. (R11). 120 h.p.i. Lesión granulomatosa PAP (+). La reacción PAP (+) observada es claramente intracelular. También pueden observarse varias células de Kupffer con reacción PAP (+).

Figura 89: Experiencia 9. (R9). 96 h.p.i. Vesícula biliar. Eliminación de listerias por la bilis.

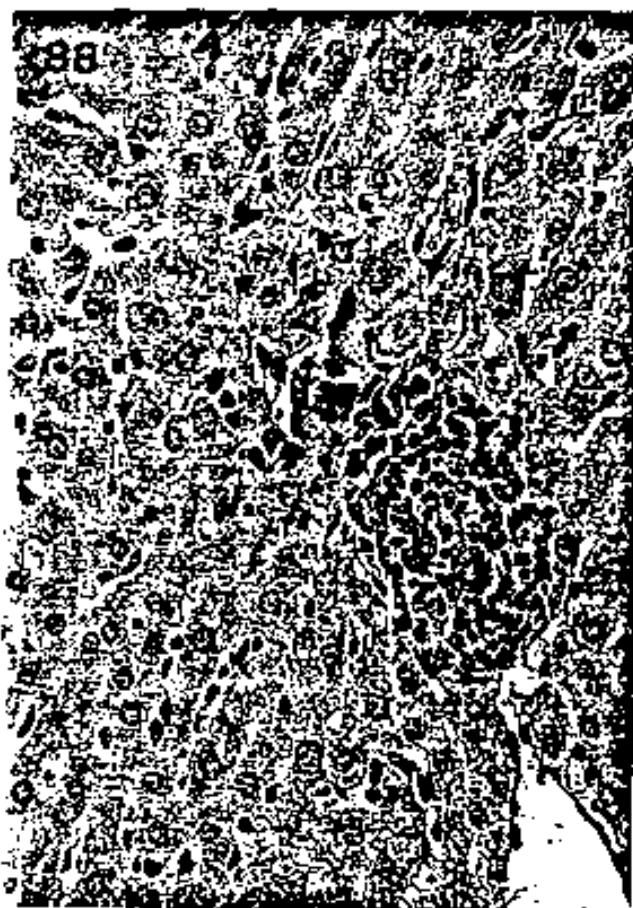
Figura 90: Experiencia 9. (R9). 96 h.p.i. Lesión inflamatoria PAP (+) en una glándula suprarrenal. La inflamación no parece afectar a la médula ganglionar. PAF/H-E.

Figura 91: Experiencia de drenaje linfático de Tinta China tras inoculación i.p.. 3 horas post-inoculación. Puede apreciarse como los conductos linfáticos aferentes por los que se drena el marcador desembocan en los ganglios esternales craneales del linfocentro torácico ventral.

Figura 92: Imagen microscópica de una sección torácica del caso mostrado en la figura 91. Puede observarse la sección transversal de un conducto linfático aferente lleno de Tinta China. H-E.

Figura 93: Imagen microscópica de un ganglio mediastínico perteneciente al mismo caso que las figuras 91 y 92. Se aprecia claramente la distribución periférica subcapsular, así como a nivel de los senos medulares, de la Tinta China procedente de la cavidad peritoneal. H-E.

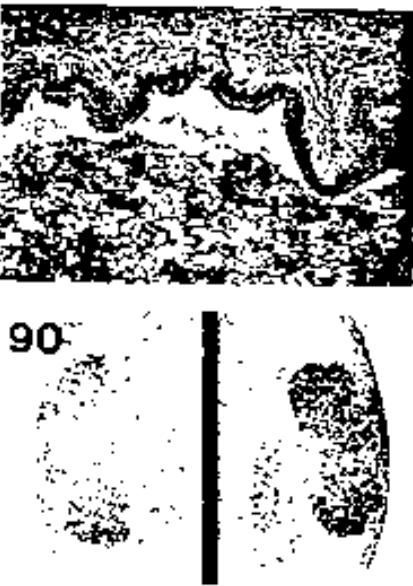
98



91



90



92



93



Figura 94: Experiencia 10. (R13). 70 h.p.i. Necrosis grave esplénica. Tanto la pulpa blanca (PB) como la pulpa roja (PR) muestran una muy abundante cariorrexis y cariolisis. Puntas de flecha: arteria central de la pulpa blanca. H-E.

Figura 95: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Ganglio yeyunal. Grave inflamación y depleción linfoides fundamentalmente a nivel del paracórtex ganglionar (Pc). Obsérvese como la médula (m) del ganglio no está afectada. H-E.

Figura 96: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Inflamación de evolución necrotizante, PAP (+), en la zona paracortical (Pc) del ganglio yeyunal. Obsérvese también como la médula ganglionar (m) no está afectada.

Figura 97: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Grave inflamación (estrellas) de los ganglios mandibulares. La médula ganglionar (m) no está afectada. H-E.

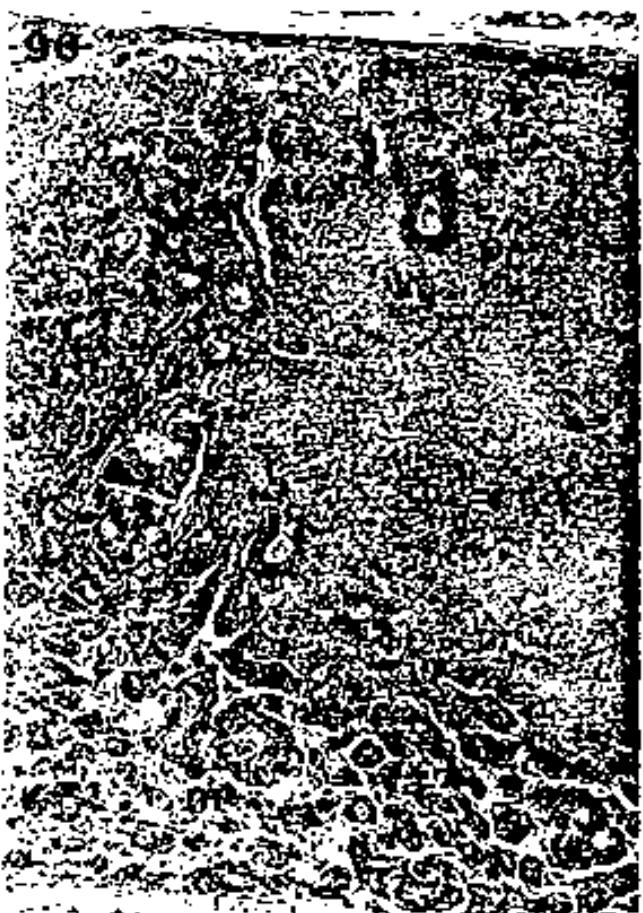


Figura 98: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Ganglio mandibular con inflamación PAP (+) en el paracórtex principalmente.

Figura 99: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Ampliación del ganglio mandibular de la figura 98. El componente inflamatorio está constituido fundamentalmente por MOs.

Figura 100: Experiencia 10. (R16). 95 h.p.i. Inflamación y necrosis linfoides masiva de una placa de Peyer. La existencia de cariorrexis y cariolisis es muy abundante y distribuida de manera difusa por toda la placa de Peyer. H-E.

Figura 101: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Inflamación PAP (+) y necrosis linfoides de una placa de Peyer.

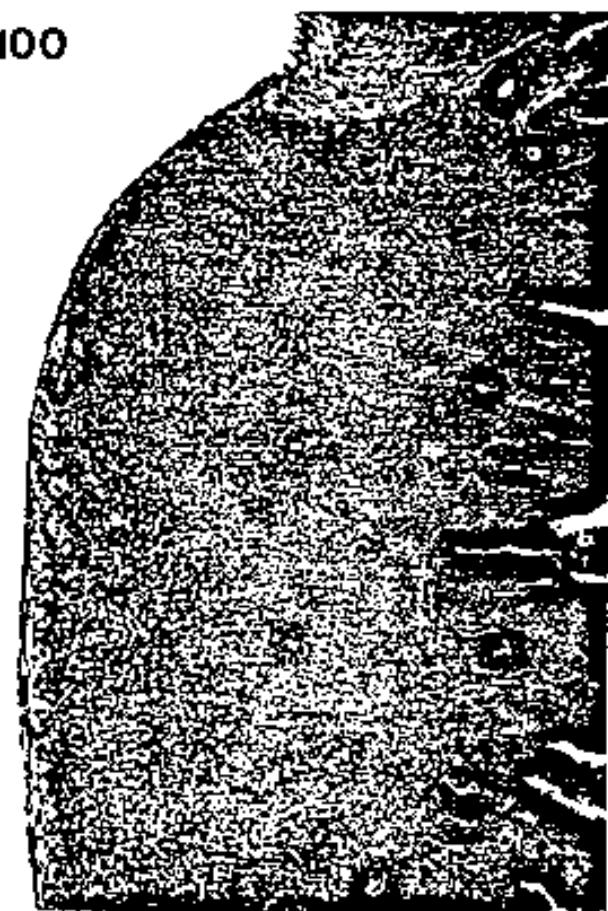


Figura 102: Experiencia 10. (R18). 115 h.p.i. Lesiones hepáticas con carácter de microabscesos. H-E.

Figura 103: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Hígado. Lesiones PAP (+) sin prácticamente reacción inflamatoria asociada.

Figura 104: Experiencia 10. (R17). 100 h.p.i. Hígado. Lesiones inflamatorias (microabscesos) y un microinfarto (estrella). H-E.

Figura 105: Experiencia 10. (R20). 140 h.p.i. Grave inflamación del miocardio que prácticamente afecta a toda la aurícula. H-E.

Figura 106: Experiencia 10. (R15). 95 h.p.i. Múltiples lesiones inflamatorias en el miometrio (puntas de flecha). H-E.



Figura 107: Experiencia 10. (R14). 70 h.p.i. Reacción PAP (+) intracelular en la médula ósea.

Figura 108: Experiencia 10. (R15). 70 h.p.i. Inflamación multifocal de la vena cava en la zona lumbar. H-E.

Figura 109: Experiencia 11. (R11). 58 h.p.i. Afección de un ganglio inguinal superficial con inflamación, depiección y necrosis linfoides masivas del córtex y paracórtex ganglionar. En el seno subcapsular pueden observarse abundantes células inflamatorias en su tránsito por el mismo (flechas). Estrella: Linfático probablemente aferente. H-E.

Figura 110: Experiencia 11. (R12). 58 h.p.i. Ganglio inguinal superficial. Inflamación mixta (PMNNs y MØs) distribuida por el seno subcapsular (asteriscos) y córtex ganglionar (c) fundamentalmente. Pc: paracórtex, m: médula. H-E.



107



108



109



110

Figura 111: Experiencia 11. (R16). 75 h.p.i. Lesión inflamatorio-necrótica hepática. La reacción PAP (+) se localiza fundamentalmente por la periferia.

Figura 112: Experiencia 11. (R17). 96 h.p.i. Múltiples lesiones inflamatorio-necróticas hepáticas. H-E.

Figura 113: Experiencia 11. (R15). 75 h.p.i. Microtrámbo (puntas de flecha) asociado a una lesión inflamatorio-necrótica hepática. H-E.

Figura 114: Experiencia 11. (R17). 75 h.p.i. Lesiones inflamatorio-necróticas causadas directamente por la presencia de L.monocytogenes y microinfarto (estrellas). H-E.

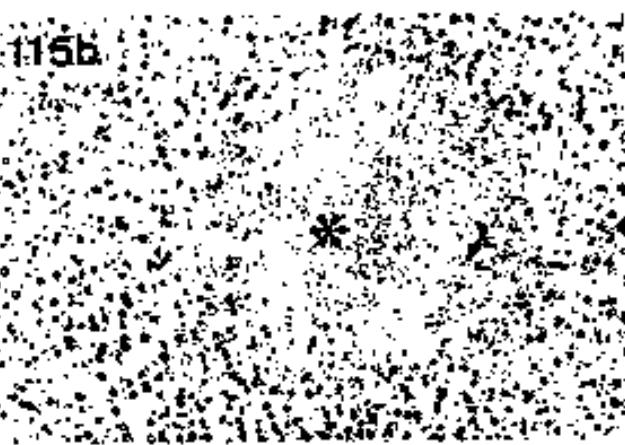


Figura 119: Experiencia 11. (R18). 96 h.p.i. Médula ósea. Reacción PAP (+) intracelular. Obsérvese también la existencia de alguna zona de necrosis (estrella).

Figura 120: Experiencia 11. (R14). 65 h.p.i. Reacción PAP (+) intracelular en la médula ósea. A pesar de la abundancia de reacción PAF (+) no se observan signos de inflamación o necrosis evidentes.

Figura 121: Experiencia 11. (R13). 65 h.p.i. Reacción PAP (+) intracelular en la médula ósea.

Figura 122: Experiencia 11. (R18). 96 h.p.i. Glándula adrenal. Lesiones inflamatorias corticales bien delimitadas del parénquima adyacente (margaritas). H-E.

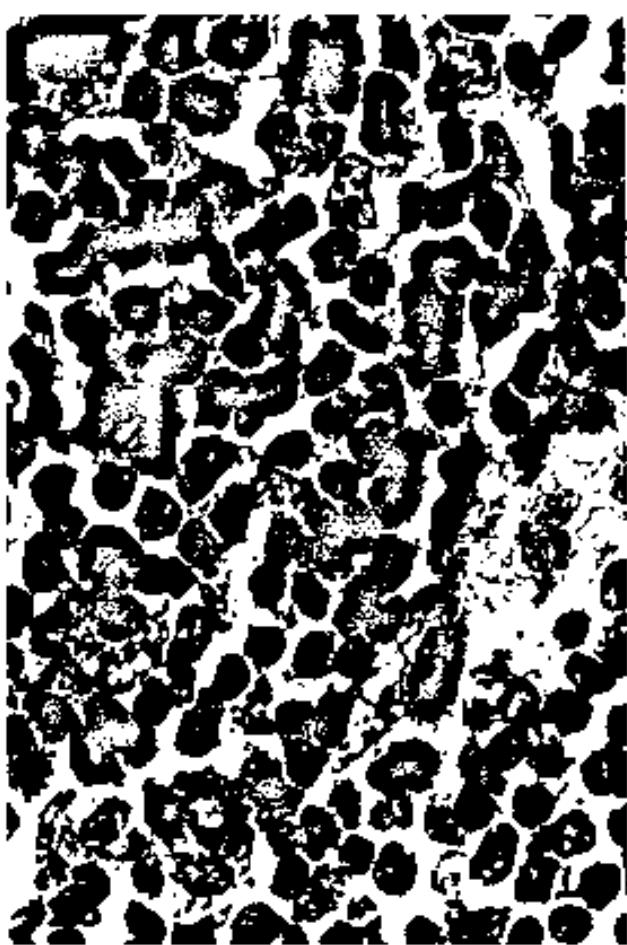
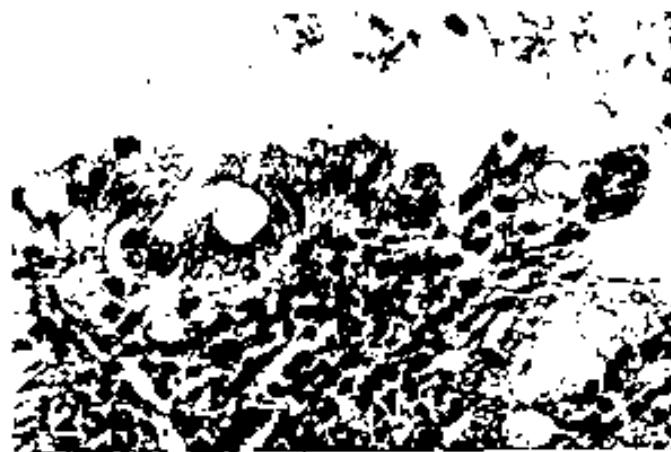
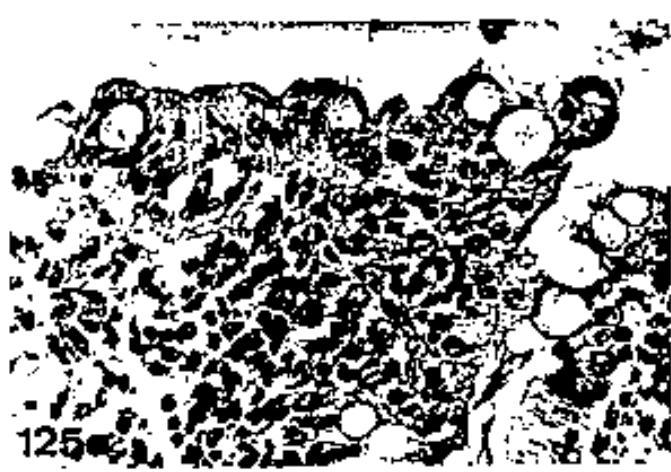


Figura 123: Experiencia 13. (R8). 4 d.p.i. Reacción PAP (+) intracelular en el epitelio intestinal, próximo, o sobre una placa de Peyer. No se observa reacción inflamatoria aparente en la mucosa intestinal subyacente.

Figura 124: Experiencia 13. (R8). 4 d.p.i. Visión a más aumentos del epitelio entérico de la figura anterior. Obsérvese que las células epiteliales con bacterias PAP (+) en su citoplasma no muestran signos aparentes de necrosis.

Figura 125 a y b: Experiencia 13. (R8). 4 d.p.i. Control (-) de la reacción PAP.

Figura 126: Experiencia 13. (R8). 4 d.p.i. Placa de Peyer. Presencia de listerias intracelulares en M0s de dicha placa. No se observan signos de inflamación aparente asociados a la presencia de L.monocytogenes.



5. DISCUSION.

Del conjunto de los resultados obtenidos en estas experiencias puede afirmarse que independientemente de la vía, serotipo o dosis de inoculación empleadas, la listeriosis murina experimental se manifiesta invariablemente como una infección sistémica, y, dependiendo de su gravedad, como una septicemia. Casos de infección listérica sistémica, con septicemia, son también constatables en todas las especies susceptibles a esta enfermedad (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974; GITTER, 1985), incluida la especie humana (GRAY y KILLINGER, 1966; MCLAUCHLIN, 1987; MARTH, 1988; NELSON y col., 1989).

En nuestras experiencias L.ivanovii fue capaz de provocar infección sistémica únicamente por vía i.p., y no por vía s.c.. En este último caso, a pesar de no demostrarse lesiones en ningún órgano, L.ivanovii si fue detectada en gran cantidad en la zona del punto de inoculación. Si bien no existen experiencias comparables en la bibliografía consultada, en conjunto, este hecho corrobora la idea defendida por otros autores del grado intermedio de patogenicidad de esta especie de listeria (AUDURIER y col., 1981; HOF, 1984).

De los resultados obtenidos se concluye también que en la listeriosis septicémica de curso agudo o sobreagudo constatable en las experiencias realizadas no se observan manifestaciones clínicas o lesiones nerviosas aparentes. Esta afirmación es válida tanto para L.ivanovii como para L.monocytogenes, esta última incluso a dosis letales como 100 x DL50. Aun con algunas excepciones (POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985), la mayoría de la bibliografía consultada confirma esta suposición (GRAY y KILLINGER, 1966; MANDEL y CHEERS, 1980; DOMINGO y col., 1986; JOHN, 1988). En contraste con esto, en la infección listérica sistémica de la especie humana, la meningitis es la manifestación más característica, y, a veces, incluso la única apreciable de la enfermedad (GRAY y KILLINGER, 1966; MCLAUCHLIN, 1987;).

Desde este punto de vista, la listeriosis murina no constituye un buen modelo experimental para el estudio de la meningitis listérica, pero, por el contrario, si que es asimilable a la forma septicémica constatable en todas las especies susceptibles. La causa o causas de estas diferentes manifestaciones de la enfermedad en función de la especie, no se conocen, pero no debe eliminarse la posibilidad de que parcialmente sean consecuencia de las condiciones experimentales habitualmente empleadas en el estudio de la listeriosis murina. En este sentido, el uso de otras vías de inoculación (v.g. subcutánea) con una menor tendencia a la generalización precoz de la infección, y el empleo de dosis de inoculación subletales que provoquen una infección sistémica de curso subagudo, quizás sean planteamientos

experimentales más útiles para el estudio y la reproducción de la meningitis listérica en el modelo experimental murino. Adicionalmente, no hay que eliminar tampoco la posibilidad de que la meningitis listérica habitualmente observable en la especie humana, no sea sino una manifestación más tardía de una infección sistémica de carácter subclínico e inaparente.

El efecto dosis fue estudiado en relación a los serotipos 1/2a y 4b de L.monocytogenes. Puede afirmarse que la variación en el rango de la dosis empleada - desde 0,01 hasta 100 veces la DL50 - se manifiesta principalmente por un aumento de la mortalidad conforme aquella se incrementa, hecho este bien documentado en la bibliografía (SELBITZ y col., 1986).

Otra característica notable de la listeriosis murina fue la constancia y regularidad de los órganos afectados en el contexto de la enfermedad, principalmente hígado, bazo y ganglios linfáticos. La existencia de lesiones en estos órganos es, en general, constante, variando fundamentalmente su gravedad más que la existencia o no de las mismas en función de la dosis. No obstante, con DL50 o 100xDL50 es posible observar también la presencia de lesiones en otros órganos que, aunque por su frecuencia son significativas, caso de los sistemas cardiorrespiratorio y genital femenino, son siempre menos características y más inconstantes que las lesiones observables en los órganos previamente mencionados (Gráficas 8 y 10).

En lo referente al estudio de la listeriosis murina experimental en función de diferentes vías de inoculación, es conveniente enfatizar que existen importantes variaciones entre ellas (Cuadros 2 y 3); no sólo respecto de la patogenia de la infección listérica, sino también en lo referente al pronóstico y a la existencia de posibles lesiones secundarias que pueden complicar el curso inicial de la enfermedad.

Mediante la vía i.p., invariablemente hemos observado que los órganos más precozmente afectados, y en los que es posible detectar primeramente la presencia de listerias en gran cantidad empleando la técnica de PAP, son siempre ganglios del linfocentro mediastínico.

Sorprendentemente, mientras que ya a 4 h.p.i. son evidentes importantes lesiones en estos ganglios, por el contrario, ganglios abdominales como el yeyunal, gástrico u otros del linfocentro lumbar no muestran signo alguno de inflamación hasta aproximadamente las 24 h.p.i.. Este hecho y la observación de que la reacción inflamatoria PAP (+) (PMNs y MØs) se distribuía fundamental y constantemente por el seno subcapsular y los senos medulares ganglionares, nos indujo a pensar la posibilidad de que la circulación

linfática aferente peritoneal fuera directamente tributaria de los ganglios del linfocentro mediastínico.

Experimentos adicionales mediante inoculación de una suspensión de carbón coloidal (Tinta China) como marcador, manteniendo constantes la estirpe murina y la pauta de sacrificio empleadas en las experiencias originales, confirmaron esta hipótesis. En apoyo de estas observaciones puede señalarse que este tipo de conexión linfática entre el peritoneo y el linfocentro mediastínico, ha sido demostrada también en otras especies (HIGGINS y GRAHAM, 1929). Por otra parte, una confirmación indirecta adicional de la existencia de drenaje linfático directo entre el peritoneo y el linfocentro mediastínico, se deduce del hecho de que en las experiencias mediante el uso de la vía s.c. como vía de inoculación no se observó afección inicial de los ganglios de este linfocentro, siendo pues la existencia de lesiones en el linfocentro mediastínico una particularidad específica de la infección por vía i.p..

Así pues, en esta fase inicial, los M0s y los PMNNs - aparentemente estos últimos en mayor proporción que los primeros - son las células encargadas de establecer la primera barrera de defensa contra la infección por la vía i.p.. La linfadenitis purulenta constatable en estos casos, y la presencia constante de reacción PAP (+) intracitoplasmica en estas células confirman esta opinión. Este hecho, apoya así mismo las tesis defendidas por algunos investigadores sobre la importancia de los PMNNs en el establecimiento de resistencia contra la infección listérica durante las primeras 24-48 h.p.i. (CZUPRYNSKI y col., 1985; KRATZ y KURLANDER, 1988; DLUGONSKA y col., 1988).

Tras esta etapa inicial en la que M0s residentes e inflamatorios peritoneales, PMNNs y los ganglios del linfocentro mediastínico constituyen la primera barrera de defensa contra la infección, ésta se disemina mediante la linfa eferente hacia la circulación sanguínea, y, desde aquí, hacia bazo, hígado y ganglios linfáticos principalmente. El resultado final del proceso será la instauración de una infección sistémica, con posibilidad de evolucionar hacia una septicemia, descrita ya clásicamente por todos los investigadores que han estudiado esta enfermedad (MACKANESS, 1962; GRAY y KILLINGER, 1966; MANDEL y CHEERS, 1980; WIRSING Von KOENIG y col., 1983; SELBITZ y col., 1986).

De nuestras experiencias se deduce que el hígado constituye - junto con el bazo - el órgano más conspicuamente afectado en el transcurso de la listeriosis murina, siendo la evolución de las lesiones observadas por nosotros en este órgano, confirmación y ampliación de los estudios realizados previamente por otros autores (NORTH, 1970; MANDEL y CHEERS, 1980; WIRSING Von KOENIG y col.,

1983; DOMINGO y col., 1986). Dicha evolución se explica con precisión en cada una de las experiencias consignadas en el capítulo de resultados y, particularmente, en los puntos 4.5. y 4.6. de esta tesis. No obstante, creemos interesante comentar aquí más concretamente algunos hallazgos que consideramos importantes.

Una gran ventaja de la técnica de PAP es que, siendo una técnica menos compleja y sofisticada que la microscopía electrónica, permite la demostración "in situ" de las listerias fagocitadas por las células de Kupffer con notable precisión. Así, aunque las primeras lesiones hepáticas significativas se observan hacia las 24-48 h.p.i., tan pronto como a 4 h.p.i. es posible detectar ya, mediante la técnica de PAP, listerias en células de Kupffer por todo el órgano; y ello en completa ausencia de inflamación. Este hecho ha sido documentado también por otros investigadores mediante M.E. (MANDEL y CHEERS, 1980).

Desde los primeros experimentos de Mackaness (1962) el hígado es reputado como el órgano con mayor capacidad para inactivar ("aclaramiento") y destruir el inóculo bacteriano. A este respecto, se acepta que mediante la vía i.v. del orden del 90% del inóculo es captado y destruido por el hígado durante los 10 minutos siguientes a la inoculación (MACKANESS, 1962; MITSUYAMA y col., 1978). Sin embargo, mediante el uso de la vía i.p., Wirsing Von Koenig y col. (1983) han demostrado que a 2 h.p.i., solamente del orden del 10-20% del inóculo es captado por el hígado. Según nuestras observaciones, es razonable suponer que ello es debido a la acción de los MØs residentes peritoneales además de a los PMNNs que se acumulan rápidamente en el peritoneo; todo ello potenciado por la interposición, en la diseminación linfática de la infección, de los ganglios del linfocentro mediastínico.

Según estas observaciones puede concluirse que tras una fase inicial de fagocitosis por células de Kupffer, las primeras lesiones hepáticas significativas se observan entre 24 y 48 h.p.i.. El origen de estas lesiones está en la capacidad de L.monocytogenes y L.ivanovii para sobrevivir y proliferar en las células de Kupffer provocando su muerte y lisis posterior, con liberación de listerias a los sinusoides hepáticos. Desde aquí, ambas especies de listerias son capaces de infectar hepatocitos, multiplicarse sin restricción en su citoplasma, y producir necrosis hepáticas con reacción inflamatoria predominantemente purulenta en esta fase de la infección. Esta secuencia de eventos puede evidenciarse habitualmente en el hígado en diferentes etapas de desarrollo en un momento dado.

Así, entre 24 y 48 h.p.i., con dosis de inoculación letales es posible apreciar desde cantidades reducidas de listerias en el interior de hepatocitos recién infectados,

hasta hepatocitos repletos de listerias que todavía no han sido lisados y que, por lo tanto, no han generado aún reacción inflamatoria alguna. Con frecuencia, tales hepatocitos constituyen grupos de entre 3-5 o más células adyacentes, todas ellas infectadas en diverso grado y mostrando reacción PAP (+) intensa. Simultáneamente, es también característico de esta etapa inicial de la infección la existencia de múltiples microabscesos PAP (+) con PMNNs como elemento celular predominante. En esta fase, es patente una gran profusión de células inflamatorias, PMNNs y monocitos/M0s, por los sinusoides de todo el órgano.

Por tanto, de estas observaciones se concluye que estas dos especies de listerias tienen también capacidad para penetrar e invadir directamente células epiteliales hepáticas.

Similarmente a lo expuesto para los hepatocitos, en nuestras experiencias por vía i.p., L.monocytogenes también mostró capacidad para infectar células epiteliales pancreáticas. Así, células aisladas o grupos de células adyacentes intensamente PAP (+), fueron un hallazgo frecuente. Sorprendentemente, no hay informaciones en la bibliografía que valoren o consignen de manera concreta estos hechos.

No obstante, la capacidad de L.monocytogenes y L.ivanovii para infectar diferentes líneas celulares no fagocíticas, estudiada por diversos investigadores mediante experiencias "in vitro", corrobora indirectamente nuestros resultados. Así, Havell (1986) demuestra como L.monocytogenes es capaz de diseminarse de "célula a célula" en un cultivo de fibroblastos murinos, y Gaillard y col. (1987) demuestran que L.monocytogenes y L.ivanovii son capaces de penetrar mediante endocitosis en células epiteliales de origen carcinomatoso de la línea Caco-2. Estos últimos autores calculan la duración del ciclo de multiplicación de las listerias en estas células en 90 minutos aproximadamente. La existencia de numerosos hepatocitos "repletos" de listerias hacia las 24 h.p.i. es compatible con este hecho.

Por otra parte, la presencia simultánea - durante las primeras 48 h.p.i. - de acúmulos inflamatorios iniciales y necrosis aislada de hepatocitos, junto con lesiones inflamatorias o inflamatorio-necróticas más graves que muestran necrosis central en grado variable, indica que existe una afluencia constante de listerias al órgano vía sanguínea - posiblemente de procedencia esplénica -, o bien que las lesiones se originan mediante colonización de hepatocitos indemnes por listerias liberadas de hepatocitos necróticos previamente infectados. Probablemente ambas posibilidades coexisten y constituyen el mecanismo real de diseminación de la infección en este órgano.

La evolución gradual de los microabscesos y lesiones inflamatorio-necróticas hacia lesiones progresivamente más granulomatosas, con predominio de M0s de aspecto activado, se observa de manera constante a 3-4 d.p.i., lo cual coincide y se correlaciona directamente con la disminución y declinar progresivo de la reacción PAP (+) en dichas lesiones. A partir de los días 5-7 p.i., las lesiones observables, todas de carácter granulomatoso, son invariablemente PAP (-). Esta observación es coherente con el hecho profusamente documentado en la bibliografía (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970; MANDEL y CHEERS, 1980; WIRSING von KOENIG y col., 1983) de la presencia, a este tiempo p.i., de M0s activados con gran poder listericida en tales lesiones, y, confirma, así mismo, los estudios de North (1970) sobre la cinética de la infección, en los que este autor demuestra que la tasa de acumulación de M0s en las lesiones y la tasa crecimiento y proliferación listérica en el hígado, están inversamente relacionadas.

También es frecuente en esta fase la existencia de múltiples mitosis en células morfológicamente identificables como M0s inflamatorios o como células de Kupffer en dichas lesiones granulomatosas. A este respecto, North (1970) afirma que las células de Kupffer muestran una importante tasa de proliferación entre 24 y 72 h.p.i.. Por otra parte, la rápida "restitutio ad integrum" observada por diversos investigadores (NORTH, 1970; MANDEL y CHEERS, 1980) a partir de la 2^a semana post-infección, se patente por la existencia de múltiples mitosis de hepatocitos en esta fase de resolución de la enfermedad.

Un hecho de especial importancia y no consignado en la bibliografía existente sobre la listeriosis, es el observado por nosotros - tanto en las experiencias por vía i.p. como por vía s.c. - de que las listerias se eliminan del organismo, principalmente, por mediación de la bilis. A este respecto, mediante la técnica de PAP no sólo hemos podido observar en algunos casos grandes cantidades de listerias en la bilis de la vesícula biliar, sino que también ha sido posible detectarlas en el interior de los conductos biliares de los espacios porta. Dado que el hígado es, invariablemente, un órgano "diana" de la listeriosis - incluidas las infecciones subclínicas o inaparentes - en todas las especies susceptibles, las repercusiones que este hecho puede tener en relación a la existencia de portadores fecales, son evidentes.

El bazo, junto con el hígado, es el órgano más constante y gravemente afectado en el curso de la listeriosis murina. Sin embargo, sorprende la ausencia casi absoluta de información en la bibliografía sobre la existencia y/o características de las lesiones observadas en este órgano durante la infección listérica experimental. La

existencia y evolución de tales lesiones esplénicas es similar tanto para la vía de inoculación i.p. como para la s.c..

En nuestras experiencias, y mediante la técnica de PAP, pudieron detectarse ya durante las primeras 4 h.p.i. listerias fagocitadas por M0s en la zona marginal de la pulpa blanca; y ello en ausencia de lesión inflamatoria aparente. Este hecho es coherente con las características circulatorias esplénicas, en las que la sangre de la arteria central de la pulpa blanca tiene finalmente acceso a esta zona y a los sinusoides de la pulpa roja, mediante los senos especializados de la zona marginal (HERMAN, 1980; KLEIN, 1982), y con la abundante existencia en dicha zona de dos subpoblaciones de M0s, ambas probablemente encargadas de la captación y procesamiento de Ags circulantes: M0s metalófilos y M0s de la zona marginal (BUCKLEY y col., 1987; MATSUNO y col., 1989). En la inoculación mediante la vía s.c., los primeros acúmulos inflamatorios PAP (+) se observaron en la pulpa blanca esplénica entre 24 y 48 h.p.i..

En el bazo las lesiones observables en la pulpa blanca tienen su punto álgido entre las 48 y 96 h.p.i.. La característica más importante de dichas lesiones esplénicas es la coexistencia en el PALS - o zona T-dependiente de la pulpa blanca -, de depleción linfocitaria e inflamación mixta con abundantes PMNNs y M0s. Aunque en grado variable, muchas de estas células fagocíticas muestran constantemente reacción PAP (+) intracelular.

Puesto que la instauración de inmunidad contra la infección por L.monocytogenes es mediada por Lts T, la importancia que la constante existencia de estas lesiones en el PALS puede tener para dilucidar la patogenia de la listeriosis, es evidente.

Dos posibilidades principales pueden aducirse en orden a explicar el origen de estas lesiones:

a) Stress: Si el estado de stress intenso y prolongado puede provocar efectos similares a los de la corticoterapia experimental (RITTER y col., 1988), no sería aventurado suponer que el stress ocasionado por la infección con DL50 de L.monocytogenes fuera, al menos parcialmente, causa de la depleción linfocitaria del PALS en el transcurso de la listeriosis murina.

Experimentalmente ha sido demostrado que los glucocorticoides - amén de otras muchas acciones sobre diversas células y funciones del sistema inmune - alteran drásticamente la normal migración de los Lts circulantes hacia los órganos linfoides secundarios que poseen VAs, es decir, ganglios linfáticos y placas de Peyer principalmente

(CHUNG y col., 1986). Consecuencia de este hecho es la disminución dosis-dependiente de la migración de Lts circulantes a dichos órganos linfoides (CHUNG y col., 1986).

Simultáneamente a estos hechos, el tratamiento con glucocorticoides provoca también un ostensible aumento de la migración de Lts circulantes a la médula ósea ("secuestro"), lo cual se manifiesta por una linfopenia concomitante (FAUCI y DALE, 1975; CHUNG y col., 1986).

Aunque el bazo no posee VEA en la pulpa blanca, sería razonable pensar que quizás algún mecanismo similar de migración linfocítica operase a nivel de los senos especializados de la zona marginal, y que, por lo tanto, la liberación aguda de glucocorticoides provocada por el stress pudiera occasionar, similarmente a lo observado en el paracórtez de los ganglios linfáticos, depleción linfoide parcial del PALS.

No obstante, en contra de esta suposición pueden arguirse varias consideraciones:

* La adrenalectomía previa a la infección con DL50 de L.monocytogenes, no previene la depleción linfoide del PALS (CHAN y CHEERS, 1982).

* La depleción linfoide del córtex tímico se considera una de las manifestaciones o signos característicos de la liberación aguda de glucocorticoides por las glándulas adrenales (RITTER y col., 1988). Pues bien, en nuestras experiencias hemos constatado que cuando se provoca la infección subclínica con L.monocytogenes (0.01 DL50), aunque no se observa depleción linfoide timocortical, sí que se aprecia, sin embargo, depleción linfoide del PALS entre 24 y 96 h.p.i..

* Similarmente, la infección subletal de estirpes murinas listeria-resistentes con L.monocytogenes tampoco provoca depleción del córtex tímico y sí del PALS (MANDEL y CHEERS, 1980).

b) Por otra parte, la constante existencia de reacción PAP (+) en el PALS sugiere que, si no de manera principal, al menos parcialmente, la depleción linfoide descrita es consecuencia directa de la inflamación provocada por el acceso de PMNNs y M0s infectados a dicha zona. Si bien todavía no se ha explicado en su totalidad el modo de acción de las citolisin secretadas por L.monocytogenes y L.ivanovii, se ha propuesto que al menos una de sus funciones sería la de provocar la disrupción de los fagosomas, liberándose así las listerias fagocitadas por PMNNs y M0s en el citoplasma de dichas células antes de su fusión con los lisosomas (GAILLARD y col., 1987; COSSART y MENGAUD, 1988). La libre proliferación de las listerias en

el citoplasma de algunas células fagocíticas - particularmente PMNNs -, terminaría por provocar su muerte y lisis posterior con la consiguiente liberación de productos lisosomales al medio extracelular.

Adicionalmente, podría conjeturarse si la migración de M0s con listerias fagocitadas al PALS no es sino un mecanismo "habitual" del organismo en el establecimiento de inmunidad contra agentes patógenos de carácter intracelular. En relación con ello, Hume y col. (1983), trabajando con el Ag F4/80 como marcador de membrana de M0s, observaron que tales células no son comúnmente residentes en las zonas T-dependientes de los órganos linfoides en condiciones normales. Sin embargo, tras la infección con el bacilo de Calmette-Guerin, dichos investigadores observaron como la presencia de M0s aumentaba significativamente en dichas zonas.

Hechos como el que la lesión inflamatoria se inicie y predomine siempre en la zona T-dependiente de la pulpa blanca, y el que la reacción PAP (+) - aunque variable - sea constante en dicha zona, apoyarian esta suposición. Complementariamente, un proceso crucial para la activación de los mecanismos específicos de inmunidad como el de presentación de Ag listérico - estudiado con minuciosidad por algunos investigadores (ZIEGLER y UNANUE, 1981; JUNGI y JUNGI, 1982; ALLEN y col., 1984) -, podría realizarse probablemente en el bazo de esta manera.

Según nuestras observaciones, aunque la afección de la pulpa roja es prácticamente constante en la infección listérica, esta parece ser - al menos, cronológicamente - secundaria a la existencia de lesiones en la pulpa blanca. De manera similar a lo descrito por Mandel y Cheers (1980), las lesiones existentes en esta zona son acúmulos de PMNNs PAP (+) con tendencia a formar microabscesos en cantidad y gravedad variables.

En la fase inicial de la listeriosis murina (0-48 h.p.i.), si bien las lesiones inflamatorias o inflamatorio-necróticas de la pulpa blanca tienen carácter mixto (PMNNs y M0s principalmente), y las de la pulpa roja son predominantemente purulentas (microabscesos), hacia las 72-96 h.p.i. tales lesiones, tanto en la pulpa blanca como en la pulpa roja, tienden a generalizarse en todo el órgano y a hacerse gradualmente más granulomatosas. Resultado de ello, es la esplenitis piogranulomatosa difusa apreciable a 4-5 d.p.i. en los casos en los que no se observa muerte espontánea por el padecimiento de la enfermedad. Este hecho coincide siempre con el declinar de los recuentos bacteriológicos (MACKANESS, 1962; CHAN y CHEERS, 1982b) y la disminución gradual de la reacción PAP (+) en el órgano, lo que debe interpretarse como un signo de la instauración de la fase de resistencia específica contra la infección.

Otra observación importante es la de que en el bazo, y, en general, en todos los órganos linfoides, la gravedad de las lesiones existentes es siempre ostensiblemente mayor que la que podría suponerse en función de la cantidad de reacción PAP (+) observada; es decir, en última instancia, de la cantidad de listerias existentes en un órgano linfóide en un momento dado. En nuestra opinión este hecho podría tener una doble explicación:

* En primer lugar, como es obvio, los órganos linfoides por su propia naturaleza constituyen siempre un ambiente "hostil" para la proliferación bacteriana en general. Si bien *L.monocytogenes* es un patógeno intracelular obligatorio y emplea precisamente la capacidad fagocítica de M0s y PMNNs para multiplicarse y proliferar en el citoplasma de estas células, es también cierto que los PMNNs y, principalmente M0s, poseen un importante poder listericida innato, aunque siempre inferior a la de los M0s activados. Por ello, conforme el organismo logra una inmediata movilización y acúmulo precoz de estas células en las lesiones iniciales en las que se multiplica y prolifera *L.monocytogenes*, las posibilidades de destrucción de cantidades importantes de listerias son mayores y, por lo tanto, la reacción PAP (+) tiende a disminuir gradualmente.

* Por otra parte, como ha sido mencionado anteriormente, puede suponerse que las lesiones observadas en la listeriosis murina no son únicamente resultado de la acción directa de *L.monocytogenes*, sino que, probablemente, posea importancia equivalente la lesión tisular provocada por liberación del contenido lisosomal de principalmente PMNNs y, en mucha menor medida de M0s.

Adicionalmente, en nuestras experiencias hemos observado con frecuencia fenómenos de trombosis e infartos en órganos linfoides e hígado, principalmente en los casos de muerte espontánea. Independientemente de otras consideraciones, la actividad procoagulante de *L.monocytogenes* ha sido ya señalada por diversos investigadores (CZUPRYSKI y BALISH, 1981a y b; DAVIES y col., 1981).

En la listeriosis murina la evolución de la infección en el bazo se manifiesta según dos cuadros lesionales relativamente bien diferenciados, si bien, como es lógico, con todo tipo de gradaciones intermedias. Uno de ellos, caracterizado por la existencia de necrosis difusa y masiva por todo el órgano, es observable en las experiencias cuya dosis infectiva es superior a la DL50 o en casos aislados de otras experiencias con DL50. Histopatológicamente, el hallazgo más relevante en estos casos es una gran abundancia de necrosis celular, manifiesta por la gran cantidad de cariorrexis y cariolisis observada por todo el órgano. En coincidencia con esto, existe una significativa correlación

entre este tipo de esplenitis necrotizante y la existencia de mortalidad como consecuencia de la infección. Así mismo, es también en estos casos donde suelen observarse lesiones más graves y generalizadas en el resto del organismo.

Por el contrario, en el otro tipo lesional caracterizado como una esplenitis piogranulomatosa difusa, los fenómenos de necrosis celular no son significativos, o no se observan. En estos casos, histopatológicamente se aprecia una abundante y difusa población celular, mixta, a base de PMNNs, M0s y células linfoides en diverso grado, que no permite con frecuencia la diferenciación entre pulpa blanca y pulpa roja. Complementariamente, no suele observarse mortalidad espontánea en dichos casos.

Según lo expuesto, podría interpretarse que la necrosis masiva esplénica implica un "desmoronamiento" de la resistencia del sistema inmune contra la infección. Adicionalmente, el fracaso del organismo para contener la progresión de la enfermedad - entendido como la imposibilidad de mantener y controlar la tasa de proliferación listérica por debajo del "nível letal" (SELBITZ y col., 1986) - tendría como consecuencia inevitable la muerte por efecto de la grave infección padecida. En contraste con esto, la esplenitis piogranulomatosa podría suponerse que implica una "vigorosa" respuesta del sistema inmune contra la infección, expresión de lo cual sería la supervivencia y gradual curación de la enfermedad a partir de los 4-5 d.p.i..

El timo es uno de los órganos más frecuentemente afectados en la listeriosis murina. No obstante, la afección de este órgano en el transcurso de la infección experimental posee peculiaridades que no lo hacen equiparable a otros órganos linfoides.

Como ya describieron primeramente Mandel y Cheers (1980), la lesión observada con más frecuencia en este órgano es la existencia de depleción linfoide del córtex desde aproximadamente las 24-48 h.p.i.. Estos investigadores, mediante la realización de adrenalectomía previa a la infección experimental con DL50 de L.monocytogenes, demostraron que la depleción linfoide del córtex tímico era debida al stress causado por el padecimiento de la enfermedad.

A este respecto, es bien conocido que los timocitos del córtex son sumamente sensibles a la acción de las hormonas glucocorticoides (Van EWIJK y col., 1981; CHAN y CHEERS, 1982), poseyendo éstas un drástico efecto citolítico sobre los ts timocorticales en esta especie (KLEIN, 1982).

En nuestras experiencias los primeros signos de depleción linfoide tímica cortical se observan hacia las

12-24 h.p.i., consistiendo estos en la presencia más o menos difusa de fenómenos de cariorrexis y cariolisis por todo el córtex tímico, y todo ello PAP (-). Coherentemente, este hecho siempre coincide con un ostensible aumento de la cantidad de MCTs en dicha zona.

El proceso de depleción timocortical es sumamente rápido, de manera que entre 20 y 28 h.p.i. los fenómenos de necrosis celular (cariorrexis y cariolisis) son masivos. Hacia las 36-48 h.p.i. la depleción del córtex tímico es ya totalmente manifiesta.

Según Mandel y Cheers (1980), hacia la 2^a semana p.i. se produce una gradual recuperación de la depleción timocortical. Sin embargo, en nuestras experiencias, entre los días 5-7 p.i. el aspecto del timo es aparentemente normal en todos los casos. Suponiendo que el stress ocasionado por la infección induce depleción del córtex de manera regular en esta especie, y teniendo en cuenta el escaso margen de tiempo existente entre ésta, y el proceso de recuperación de la estructura tímica normal, puede pensarse que quizás en algunos casos dicha depleción no se produce, o si lo hace, sólo parcialmente.

No obstante, en apoyo de la hipótesis de una rápida regeneración del córtex tímico, hay que destacar que en experiencias en las que se provoca una completa depleción timocortical mediante irradiación de todo el organismo, dicha recuperación se inicia hacia el día 5 y es prácticamente completa entre los días 8 y 10 post-irradiación (HUISKAMP y Van EWIJK, 1985a y b). Una población de células "poco diferenciadas" de la médula tímica resistentes a la radiación, es la responsable de esta sorprendente recuperación.

En cualquier caso, sin eliminar la posibilidad de que se produzca una muy rápida regeneración del córtex tímico, puede pensarse que quizás haya notables variaciones de base individual en relación con la resistencia innata contra la infección, y que, por lo tanto, en algunos casos el stress inducido por la misma no sea significativo. Este hecho, muy bien pudiera tener como consecuencia el que la depleción linfoide del córtex tímico no se produjera. En apoyo de esta última posibilidad, puede arguirse, como lo demostraron Mandel y Cheers (1980), que las estirpes murinas *Listeria*-resistentes tampoco muestran depleción timocortical tras la infección con dosis subletal de *L.monocytogenes*. De manera similar, en nuestras experiencias, la infección experimental con 0,01 DL50, que provoca únicamente una infección subclínica, no induce depleción del córtex tímico en ningún caso (Experiencia 3).

Según nuestras observaciones, principalmente en las experiencias por vía i.p., lesiones inflamatorias PAP (+),

focales, que afectan al córtex tímico también son posibles en algunos casos, en particular cuando la dosis de inoculación empleada es superior a la DL50.

Tales lesiones son, aunque de extensión variable, focales, y, además coinciden siempre con lesiones inflamatorias de la serosa tímica y del mediastino en algunos casos. Dichas lesiones puede suponerse que no son sino extensión de las existentes en los ganglios esternales craneales y mediastínicos, así como de la vascularización linfática aferente y eferente de estos ganglios en su curso por el mediastino.

Como ya ha sido mencionado previamente, en nuestras experiencias mediante inoculación i.p. de tinta china como marcador, hemos demostrado que el drenaje de la linfa peritoneal es realizado directamente por linfáticos que, atravesando el diafragma, discurren por el torax a ambos lados del esternón hasta desembocar en los ganglios esternales craneales. Desde aquí, la linfa es dirigida entonces hacia los ganglios mediastínicos y, finalmente, a la circulación venosa general. Es razonable pensar, que es en diferentes puntos a nivel de este complejo mecanismo de drenaje donde se producen lesiones vasculares linfáticas o ganglionares capaces de diseminarse a órganos mediastínicos adyacentes como el timo.

En apoyo de esta suposición puede argüirse que las células fagocíticas que primeramente se encargan del "aclaramiento" del inóculo son PMNNs y MØs residentes peritoneales. A ambos tipos de células - particularmente al PMNN - se les atribuye una capacidad listericida significativamente inferior a la de los MØs inflamatorios derivados de médula ósea (NORTH, 1970; CHEERS y col., 1978; SKAMENE y col., 1978; SKAMENE y KONGSHAVN, 1979; MANDEL y CHEERS, 1980; STEVENSON y col., 1981; WOOD y col., 1986; CZUPRYNSKI y BROWN, 1987), y, por lo tanto, probablemente son más susceptibles de ser infectados y destruidos por la acción patógena de las listerias. Las negativas consecuencias que este hecho puede tener para los vasos linfáticos afectados, los ganglios linfáticos regionales u otros órganos del mediastino, son obvias.

Que la presencia de estas lesiones inflamatorias o inflamatorio-necróticas PAP (+) no son la causa de la generalizada depleción timocortical observada, lo demuestra, todo lo que antecede, y el hecho de que en nuestras experiencias por vía i.p., la mayoría de casos investigados únicamente mostraban depleción linfoide del córtex, sin observarse lesión inflamatoria PAP (+) asociada a la misma. Adicionalmente, en la infección listérica experimental por vía s.c., aun siendo también constatable la depleción linfoide del córtex a partir de las 20-24 h.p.i., esta es siempre PAP (-), no observándose lesiones inflamatorias en

ningún caso. La independencia causal entre ambos hechos parece por tanto evidente.

Interesantemente, en nuestras experiencias por vía s.c. hemos podido constatar, en algunos casos, lesiones inflamatorias PAP (+), leves, en la médula timica; no observándose afectado el córtex en estos casos. Si bien el origen hematógeno de estas lesiones está fuera de toda duda, la razón por la cual células con listerias fagocitadas - presumiblemente MØs - acceden al timo a nivel de la unión córtico medular se desconoce.

En la listeriosis murina los ganglios linfáticos se observan afectados con mayor o menor gravedad, tanto por vía i.p. como por vía s.c.. Sorprendentemente, no existen informaciones a este respecto en la prolífica bibliografía consultada.

En los ganglios linfáticos, el primer hallazgo significativo es la depleción linfoide observada en el paracórtex hacia las 24 h.p.i.. En esta fase inicial, tal depleción no muestra signos de inflamación y es PAP (-), por lo que, razonablemente, debe atribuirse al stress provocado por la infección.

En lo referente a las lesiones observadas, de nuestras experiencias mediante la vía i.p. puede deducirse que la infección listérica experimental provoca dos patrones lesionales ganglionares relativamente bien diferenciados. Uno de ellos, constante y evidente en los ganglios del linfocentro mediastínico, lo hemos denominado patrón "linfático aferente", y, denota aquel patrón lesional en el que las listerias acceden al ganglio mediante la linfa aferente proveniente de la cavidad peritoneal. El otro tipo de patrón lesional lo hemos denominado "hematógeno", porque en este caso, las listerias acceden al ganglio, vía sanguínea, probablemente mediante las vérulas postcapilares de endotelio alto (VEAs) sitas en el paracórtex y córtex interfolicular ganglionares.

Este último patrón lesional se observa inequívocamente en el linfocentro mandibular, siendo además predominante en los ganglios peritoneales estudiados; si bien, en estos casos, debido a la frecuente existencia de lesiones en la serosa peritoneal, musculatura gastrointestinal, etc., a veces puede observarse también un patrón lesional mixto, mezcla de ambos tipos. No obstante, excepto en el linfocentro mediastínico, consideramos que el patrón hematógeno siempre predomina sobre el linfático aferente.

Diferentes estudios experimentales sobre difusión de Ags y marcadores que acceden a los ganglios mediante la linfa aferente (POSSUM, 1980; HARDONK y col., 1986;

SAINT-MARIE y PENG, 1986; VAN ROIJEN, 1987), apoyan el establecimiento de este doble patrón lesional básico.

En relación a nuestras experiencias con la vía s.c., observamos que, en algunos casos, ganglios del linfocentro lumbar mostraban un patrón de afección tipo aferente predominante o mixto. Este hallazgo se explica y es coherente con el hecho de que parte de la linfa aferente de los ganglios ilíacos procede, a su vez, de los ganglios inguinales superficiales, los cuales drenan directamente el punto de inoculación. El resto de los ganglios linfáticos estudiados mediante esta vía de inoculación mostraron un patrón lesional inequívocamente hematógeno.

El que en dicho patrón hematógeno - observado mayoritariamente en las experiencias por vía i.p. y por vía s.c. - las lesiones afectaran siempre al paracórtex y córtex interfolicular, y nunca a la médula ganglionar, aboga categóricamente por la posibilidad de que las VEA sean los puntos por los que M0s infectados y, quizás, también otras células, acceden a los ganglios linfáticos cuando se ha generalizado la infección en el organismo.

Respecto de esta cuestión, es suficientemente conocido el que estas vérulas postcapilares poseen un endotelio especializado en la migración de los Lts circulantes desde la sangre al interior ganglionar (KLEIN, 1982; CHUNG y col., 1986; PABST y BINNS, 1989; PALS y col., 1989). Si bien se acepta que la migración a través de las VEA es selectiva para Lts, estudios recientes (PALS y col., 1989) informan de que, además de los Lts, otras células como M0s, células dendríticas, etc., poseen también los receptores específicos necesarios para migrar a través de estas vérulas especializadas (Lymphocyte Homing Receptors/ LHRs). En apoyo de esta hipótesis, Hume y col. (1983) demuestran que si bien en condiciones normales la cantidad de M0s presentes en la zona T-dependiente de los ganglios linfáticos es muy poco significativa, durante el establecimiento de la respuesta inmunitaria contra la infección con el bacilo de Calmette-Guerin, la tasa de migración de M0s a dicha zona aumenta ostensiblemente. Interesantemente, y, según dichos investigadores, tales M0s se observan de manera predominante en la zona adyacente a las VEA paracorticales y del córtex interfolicular.

Por tanto, a nuestro juicio, este hecho implicaría una "estrategia" habitual mediante la cual el organismo activaría todos sus órganos de defensa cuando una infección se ha instaurado ya en él. De manera similar a lo expuesto para el bazo, procesos tan importantes como la presentación de Ag y la limitación de la infección a los órganos linfoides, intentando así impedir su diseminación a otros órganos vitales del organismo, justificarían quizás todos estos acontecimientos. En relación con esto, la frecuente

existencia de linfadenopatía generalizada en infecciones con agentes patogenos intracelulares como pueden ser Brucellosis, Leishmaniosis, etc., quizás pueda explicarse en cierta medida por este hecho.

En contraste con la regular afección de los ganglios linfáticos, las placas de Peyer sólo raramente muestran lesiones significativas en la infección listérica experimental vía i.p.. No obstante, mediante la vía s.c., lesiones inflamatorio-necróticas graves son observadas en algunos casos en los que la septicemia ocasionada por la infección es de curso mortal. En nuestras experiencias, sólo L.monocytogenes 1/2a ha sido capaz de desarrollar este tipo de lesiones.

Similarmente a lo constatado en los ganglios linfáticos, el primer hecho significativo observado en las placas de Peyer es la depresión linfoide apreciable desde las 24-48 h.p.i. en las experiencias con DL50 o dosis superiores. Tal depresión no se asocia normalmente a lesiones inflamatorias y es PAP (-). En nuestra opinión, este hecho es atribuible al stress inducido por el padecimiento de la enfermedad; siendo además, en coherencia con ello, mucho más ostensible cuanto mayor es la dosis infectiva empleada.

Posteriormente, en casos graves o en estado preagónico, algunas de estas placas de Peyer pueden presentar lesiones inflamatorias o inflamatorio-necróticas PAP (+) de gravedad variable. En estos casos, el epitelio intestinal de la zona cúpula de dichas placas de Peyer no se observa nunca afectado.

Un hallazgo sorprendente en la infección listérica experimental por vía i.p., es la presencia de células similares a MØs e incluso lesiones PAP (+), en la serosa peritoneal correspondiente a las placas de Peyer. En algunos casos, tales lesiones afectan también a la túnica muscular e incluso al parénquima linfoide subyacente. A este respecto, Mikkelsen y col. (1988) han demostrado la existencia, en condiciones normales, de células similares a MØs ("Macrophages-like cells") en la subserosa y entre ambas túnicas musculares, longitudinal y circular, del intestino delgado. Dichos investigadores relacionan estas células con células del SME y con células del tipo de las células dendríticas.

Otro hallazgo importante que hemos podido constatar en nuestras experiencias es la afección de la médula ósea en el transcurso de la listeriosis murina; en concreto mediante infección con L.monocytogenes 1/2a y 4b por vía s.c..

Dicha afección es paralela y coincide "grosso modo" con el curso de la infección en el hígado y el bazo.

Probablemente ello es debido a que tanto estos órganos, como la médula ósea, poseen una abundante población de células del SMF (KLEIN, 1982; HUME y col., 1983).

Si bien con las técnicas empleadas en estas experiencias, no es posible identificar el tipo o tipos celulares en los que se observa reacción PAP (+) en la médula ósea, la similar evolución de la infección en este órgano y la observada en hígado y bazo, nos induce a pensar que, al menos, mayoritariamente, dichas células sean MØs.

Una repercusión importante de este hecho sería la posibilidad de realizar punciones de médula ósea como método de diagnóstico complementario en la listeriosis septicémica. En la especie humana, si bien la realización de cultivos microbiológicos de sangre y LCR, así como de frotis con tinción de Gram de este último, son técnicas habituales en el diagnóstico de la enfermedad, la probabilidad de obtención de falsos negativos es bastante considerable (BANNISTER y col., 1987; JOHN, 1988). Una ventaja adicional de esta posibilidad diagnóstica sería la rapidez de su realización. En cualquier caso, posteriores investigaciones en este sentido deberían confirmar esta interesante posibilidad.

L. ivanovii, no mostró afección de la médula ósea en ninguno de los casos estudiados, lo cual es coherente y confirma el resto de los resultados obtenidos con esta especie mediante la vía de inoculación s.c..

Mediante la vía i.p., la inflamación de múltiples serosas, en última instancia derivadas del peritoneo, es un hecho frecuente que puede tener importantes repercusiones en la valoración de las lesiones experimentales observadas. Así por ejemplo, en el sistema genital femenino - frecuentemente afectado en la infección listérica murina por esta vía -, la diseminación de la infección se produce fundamentalmente desde la serosa peritoneal, y no por vía sanguínea. De la misma manera, además del caso ya expuesto de las placas de Peyer, la musculatura gastrointestinal es también frecuentemente afectada, originándose las graves lesiones inflamatorias PAP (+) observadas en la misma, por diseminación de la infección directamente desde el peritoneo. La posible participación, en este caso, de las mencionadas "MØs-like cells", no es posible valorarla en estas experiencias.

En la infección listérica experimental mediante la vía i.p., la existencia de lesiones de diversa gravedad en la zona mediastínica en sentido amplio, y en las serosas tímica y del sistema cardiorrespiratorio, aunque relativamente poco frecuentes, parecen ser lesiones características de la listeriosis murina mediante esta vía de inoculación. De

hecho, en la infección experimental mediante la vía s.c., tales lesiones no se observan.

La serosa tímica es siempre la más afectada. Epicardio y pleura lo son más raramente. Según nuestra opinión, en conjunto, estas lesiones tienen un origen común basado en la ya explicada diseminación linfática inicial de la infección. El desarrollo de lesiones en algunos de los ganglios o conductos linfáticos interpuestos en la circulación linfática - desde el peritoneo hasta los ganglios mediastínicos, pasando por los ganglios esternales craneales - podría provocar esta serositis.

Respecto de los pulmones, además de la lesión pleural, en algunos casos son también observables lesiones de diferente gravedad a nivel perivasculares o peribronquial. La característica más interesante de este hecho es que, precisamente los bronquios y arterias de mayor calibre son siempre los más afectados, particularmente a nivel del hilio. De nuestras experiencias se infiere que tales lesiones perivasculares y peribronquiales, se originan por extensión - mediante la adventicia bronquial y vascular, o por algún otro medio - de las existentes en el mediastino. En apoyo de esta suposición puede aducirse que las lesiones nunca son observables a nivel del parénquima alveolar o del lumen bronquial o vascular. Adicionalmente, en estos casos suelen ser constatables casi siempre lesiones mediastínicas más o menos graves.

Respecto de las lesiones cardíacas mediante la vía i.p., éstas son, siempre que existen, superficiales (epicarditis), no afectando casi nunca al miocardio. Adicionalmente, también las aurículas, e incluso algunas grandes arterias de la base del corazón, son afectadas a partir del epicardio o de la adventicia vascular respectivamente.

En contraste con esto, en la listeriosis murina experimental mediante la vía s.c. si que son constatables lesiones cardíacas significativas e importantes. En nuestros experimentos, tales lesiones fueron observables únicamente en la experiencia con el serotipo 1/2a, siendo relevante el hecho de que el inicio y evolución de las mismas fueron eventos más tardíos que la afección de otros órganos como son el hígado y el bazo.

Así, la existencia de lesiones miocárdicas y endocárdicas - nunca epicárdicas - a partir del día 3 post-infección, es un hecho frecuente. Lo más importante de estas lesiones es que, cronológicamente, su evolución no coincide con la de los órganos de referencia - hígado y bazo - más representativos de la enfermedad. De tal manera que hacia los días 5-6 p.i., una vez instaurada ya la fase de inmunidad específica en el organismo, y cuando las lesiones

hepáticas y esplénicas se observan en el inicio de una franca regresión, las lesiones miocárdicas se muestran sorprendentemente activas y en fase de evidente progresión. Son, por lo tanto, lesiones con una probable tendencia a la cronicidad, y cuyo punto álgido se desarrolla en una etapa posterior a la fase sistémica de la infección.

Estas diferencias en la evolución de las lesiones según los diferentes órganos quizás pudiera ayudar a comprender la patogenia de los casos de afección cardiaca existentes en la bibliografía ocasionados por L.monocytogenes. Así por ejemplo, los casos de miocarditis listérica observados ocasionalmente en aves domésticas (GRAY y KILLINGER, 1966; LADDS y col., 1974; RAMOS y col., 1988) y aquellos más raros de endocarditis señalados en la especie humana (GALLAGER y WATANAKUNAKORN, 1988; CARVAJAL y FREOERIKSEN, 1988), quizás sean consecuencia de los hechos aquí referidos. Si esta suposición se confirmara, implicaría que tales casos de afección cardiaca no son hechos aislados o formas infrecuentes de la enfermedad, sino que en realidad son el resultado del desarrollo más tardío de las lesiones en este órgano una vez superada la fase sistémica - probablemente inaparente - de la infección.

Excepción hecha de la encefalitis listérica típica de los rumiantes adultos, en la que la infección se propaga vía neurógena - normalmente desde la cavidad bucal hasta la base del encéfalo -, la vía oral se supone que es el principal modo mediante el cual se produce la infección con L.monocytogenes en condiciones naturales. Inicialmente, una de las conclusiones más importante que puede deducirse de nuestras experiencias es que la infección listérica murina mediante esta vía de inoculación, a semejanza de lo observado con las vías i.p. y s.c., es también de tipo sistémico, si bien el curso de la misma es subclínico, caracterizándose por no provocar lesiones importantes en los diferentes órganos afectados y por no ocasionar mortalidad. En este sentido, nuestros resultados son comparables a los de otros investigadores que han revisado o estudiado la listeriosis experimental mediante inoculación por vía oral (GRAY y KILLINGER, 1966, WIRSING Von KOENIG y col., 1983; MACDONALD y CARTER, 1980).

En coherencia con lo anterior, es necesario enfatizar la inconstancia e irregularidad en la existencia de lesiones en los órganos linfoideos, así como su carácter predominantemente leve con reacción PAP (+) poco significativa o negativa en las mismas. Adicionalmente, si bien el hígado se observa afectado de manera constante en el transcurso de la listeriosis murina por vía oral - lo cual corrobora también los resultados obtenidos por otros investigadores (MILLER y BURNS, 1970; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985; MACDONALD y CARTER, 1980) -, dichas lesiones son siempre leves y fundamentalmente PAP (-).

En lo referente al modo de penetración de L.monocytogenes en el organismo, los resultados de nuestras experiencias apoyan predominantemente la tesis defendida por Macdonald y Carter (1980) de que esta bacteria inicialmente atraviesa la mucosa intestinal a nivel del epitelio de las placas de Peyer.

Conviene enfatizar, no obstante, que este hecho únicamente ha sido observado en algunas placas de Peyer de sólo unos pocos casos del conjunto de los estudiados en toda la experiencia. En cualquier caso - considerando la constante existencia de lesiones en el hígado y, más irregularmente, en bazo y ganglio yeyunal - parece razonable suponer que la penetración de L.monocytogenes en el organismo a través de las placas de Peyer se produce, de hecho, en todos los casos.

Por otra parte, la tesis expuesta por Racz y col. (1972) y Gaillard y col. (1987) de que L.monocytogenes penetra en el organismo a través de los enterocitos del epitelio intestinal no asociado a placas de Peyer, no debe, en nuestra opinión, eliminarse, ya que quizás pueda ocurrir que la cantidad de listerias que atraviesen el epitelio entérico sea más bien escasa, y que, además, este hecho se produzca de manera difusa a nivel de todo el tracto intestinal, resultando de todo ello difícil su detección con las técnicas de microscopía óptica empleadas en esta experiencia.

Las células M son células especializadas del epitelio de las placas de Peyer mediante las cuales diversos antígenos - entre ellos agentes patógenos víricos y bacterianos - pueden acceder al interior del organismo e inducir de esta manera la instauración de una eficaz respuesta inmunitaria contra la posible acción patógena de dichos antígenos (WOLF y col., 1984; EGBERTS y col., 1985). Aunque según nuestros resultados se demuestra que L.monocytogenes puede atravesar el epitelio intestinal a nivel de las placas de Peyer, la posible importancia o participación de las células M en este hecho, aun siendo probable, no puede ser confirmada con las técnicas de microscopía óptica empleadas en esta experiencia. No obstante, la presencia de listerias en células que con toda probabilidad no son sino enterocitos de función absortiva, característicos del epitelio de las vellosidades intestinales, parece indicar la no exclusividad de las células M como "puntos especializados" mediante los cuales L.monocytogenes accede al interior del organismo.

En el Cuadro 4 se expone el posible esquema de la patogenia de la listeriosis murina experimental mediante el empleo de la vía oral (intragástrica) como vía de inoculación.

Es importante destacar que no se observaron lesiones a nivel gastrointestinal en toda la experiencia, ni siquiera en las placas de Peyer en las que se observó reacción PAP (+) intracelular, bien a nivel del epitelio, bien en MØs dispersos en el seno de dichas placas. Este hecho contribuye sin duda a aumentar la dificultad en la detección de L.monocytogenes en el estudio de la patogenia de la infección mediante la vía oral, pero, por otra parte, coincide y probablemente ayuda a explicar la ausencia de lesiones y síntomas entéricos observada generalmente en los casos de listeriosis en la especie humana.

Solamente Miller y Burns (1970) describen de manera poco precisa lesiones inflamatorias intestinales a 7 d.p.i. en la listeriosis murina por vía oral. Aparte de estos investigadores, únicamente Racz y col. (1972) y Czuprynski y Balish (1981c), trabajando con otras especies de roedores de laboratorio informan de la existencia de enteritis - particularmente en I.grueso - en experiencias similares a la realizada por nosotros. Sin embargo, en estos casos dichas experiencias no son homologables a la nuestra porque, en el caso de Czuprynski y Balish (1981c), estos autores trabajaban con un lote de ratas gnotobióticas, y en el caso de Racz y col. (1972), dichos autores sometían el lote de cobayos con el que realizaban su experiencia, a un "pretratamiento" (neutralización del pH ácido gástrico e inhibición del peristaltismo intestinal mediante inoculación i.p. de tintura de opio) para favorecer la instauración de la infección. De hecho, en el lote control no pretratado estos investigadores no consiguieron provocar el padecimiento de la listeriosis por esta vía.

Con respecto a la existencia de lesiones inflamatorias débilmente PAP (+) o bien PAP (-) en el ganglio yeyunal, nuestros resultados confirman los obtenidos - únicamente por métodos microbiológicos - por otros autores (MACDONALD y CARTER, 1980; AUDURIER y col., 1981; POHJANVIRTA y HUTTUNEN, 1985), hecho que apoya la idea defendida por estos investigadores de que el ganglio yeyunal constituye una etapa previa a la generalización de L.monocytogenes en el organismo (Cuadro 4).

Por tanto, todo induce a pensar que la cantidad de listerias que penetran a través de la mucosa intestinal en condiciones naturales es, aunque significativa, poco importante, lo cual es a su vez coherente con la levedad de las lesiones observadas en nuestros resultados, con los recuentos bacteriológicos moderados obtenidos con esta vía de inoculación (CZUPRYNSKI y col., 1989), y con la dificultad para reproducir la infección experimental también por esta vía (GRAY y KILLINGER, 1966; WIRSING Von KOENIG y col., 1983).

Así pues, corroborando la opinión de otros investigadores (SCHLECH, 1984; MARTH, 1988; COX, 1989), opinamos que para que se instaure la enfermedad con sintomatología clínica y evolución hacia una posible septicemia, deben concurrir probablemente factores predisponentes y/o de susceptibilidad individual que la favorezcan.

Existen importantes diferencias entre las especies patógenas del género Listeria, respecto del tropismo y grado de afección de los órganos linfoides.

La diferencia más significativa y concluyente entre L.monocytogenes y L.ivanovii es la prácticamente nula afección de los órganos linfoides por parte de esta última, lo cual confirma las experiencias de Audurier y col. (1981) al respecto; si bien estos investigadores únicamente emplean técnicas microbiológicas, y no histopatológicas, para establecer esta conclusión.

Si exceptuamos la depresión linfoidal timocortical, atribuible al stress inducido por la infección, solamente los ganglios del L.mediastínico muestran lesiones inflamatorias o inflamatorio-necróticas importantes en la infección experimental con L.ivanovii por vía i.p.. Por el contrario, esta especie del género Listeria ocasiona en el hígado lesiones inflamatorio-necróticas graves mucho más importantes que las inducidas por L.monocytogenes 1/2a y 4b, y equivalentes a las provocadas por L.monocytogenes 3a.

Respecto de los tres serotipos 1/2a, 4b y 3a de L.monocytogenes, el serotipo 1/2a se caracteriza por afectar grave y predominantemente a todos los órganos linfoides en general, siendo su capacidad para inducir lesiones hepáticas ostensiblemente inferior a la del serotipo 4b y, sobre todo, a la del serotipo 3a. Por su parte, el serotipo 4b provoca lesiones de gravedad equivalente tanto en el hígado como en los órganos linfoides. Finalmente, el serotipo 3a induce lesiones predominantemente hepáticas similares a las provocadas por L.ivanovii, siendo las lesiones observadas en los órganos linfoides mucho menos significativas que las provocadas por las serovariiedades 1/2a y 4b. Extrañamente, Wirsing von Koenig y col. (1983), como consecuencia de obtener una D₅₀ excesivamente elevada, de 10^{12} m.o./ml para L.monocytogenes 3a por vía i.p., no otorgan patogenicidad a este serotipo.

Así pues, según los resultados expuestos puede afirmarse que la constante afección y el tropismo por los órganos linfoides es el hecho central y fundamento de la patogenia de la listeriosis murina.

En apoyo de esta aseveración, ha de pensarse que el serotipo 1/2a de L.monocytogenes - ampliamente documentado

en la bibliografía como causa grave de enfermedad tanto a nivel natural (GRAY y KILLINGER, 1966; SEELIGER y FINGER, 1969; HO y col., 1986; MCLAUCHLIN, 1987; etc.) como experimental (WIRSING Von KONIG y col., 1983; HOF, 1984; KAUFMANN, 1984; DOMINGO y col., 1986; MAINOU-FOWLER y col., 1988; etc.) - no provoca lesiones hepáticas importantes con DLSD, mientras que, por el contrario, sí ocasiona lesiones graves desde inflamatorias a inflamatorio-necróticas en todos los órganos linfoides.

En contraste con ello, L.ivanovii - muy raramente citada en la bibliografía como causante de listeriosis en condiciones naturales y experimentales - no provoca prácticamente lesiones en los órganos linfoides, siendo sin embargo capaz de inducir lesiones hepáticas graves en la infección murina experimental. En relación con ello, hay que considerar también que L.ivanovii no ha sido prácticamente implicada como causa de mortalidad en la especie humana y en el individuo adulto (GRAY y KILLINGER, 1966; SEELIGER y FINGER, 1969; ROCOURT y SEELIGER, 1985), sino únicamente en fetos y neonatos, particularmente en la especie ovina (MCLEOD y col., 1974; SEELIGER, 1987; JENSEN y SWIFT'S, 1988). Nuestras experiencias, por otra parte, confirman el ostensiblemente inferior grado de patogenicidad de L.ivanovii respecto de L.monocytogenes 1/2a, y, en concreto, respecto del serotipo 4b; hecho este también corroborado por Audurier y col. (1981).

El serotipo 4b de L.monocytogenes - capaz de inducir equivalentemente lesiones tanto en el hígado como en los órganos linfoides -, es, en nuestras experiencias, y en coincidencia con las de Wirsing Von Koenig y col. (1983), el serotipo más patógeno de los estudiados; lo cual es también coherente con el hecho de que un amplio porcentaje de la casuística de la listeriosis en condiciones naturales, es ocasionado por esta serovariedad (SEELIGER y FINGER, 1969; FLEMING y col., 1985; HO y col., 1986; MCLAUCHLIN y col., 1988; SCHONBERG, 1988b; etc.).

Así pues, sin perjuicio de que la existencia de lesiones hepáticas o, más raramente, de otros órganos no linfoides, puedan contribuir de manera significativa a la explicación de la patogenia de la enfermedad, parece sin embargo más razonable pensar, que es la existencia de lesiones graves y generalizadas en órganos linfoides el hecho crucial que mayormente condiciona el curso y el pronóstico de la infección listérica. En este sentido, si dichas lesiones muestran un carácter necrotizante, el pronóstico es desfavorable y, probablemente, fatal. Posteriormente estudios en este sentido deberían confirmar esta suposición.

Desde que Mackaness (1962) demostrara de manera inequívoca que la inmunidad contra L.monocytogenes era

mediada por Lts T, y no mediante Lts B, la ingente producción científica posterior ha hecho de la listeriosis murina un modelo experimental de elección en el estudio de la inmunidad de base celular o T-dependiente.

En el transcurso de las últimas décadas, el desarrollo progresivo de la investigación en este sentido ha permitido conocer, con encomiable precisión, el proceso crucial de activación macrofágica por Lts T sensibilizados listeria-específicos. Proceso constituido a su vez en el fundamento de la instauración de inmunidad contra la infección con L.monocytogenes.

En contraste con ello, los mecanismos de inmunidad inespecífica han sido considerados notablemente menos importantes y valorados de manera desigual y diversa por los investigadores que han trabajado sobre ellá. No obstante, en nuestra opinión, y en función de los resultados obtenidos en este trabajo doctoral, pensamos sin embargo que es la fase inicial o de inmunidad inespecífica (1-3 d.p.i.) la fase crítica que condiciona la evolución posterior y el pronóstico favorable o desfavorable de la infección. En este sentido, junto con otros investigadores (CHAN y col., 1977; NEWBORG y NORTH, 1980; SELBITZ y col., 1986; KRATZ y KURLANDER, 1988), pensamos que la inmunidad inespecífica se activa rápidamente tras el inicio de la infección con la función urgente de inhibir e interferir la proliferación y diseminación de L.monocytogenes en el organismo. Esto posibilita un intervalo de tiempo suficiente como para permitir la posterior y plena instauración de los mecanismos más eficaces de inmunidad Ag-específica, hecho que, finalmente, tendrá como resultado la superación de la infección y la curación de la enfermedad.

En apoyo de esta interpretación puede aducirse que el fundamento de la diferenciación entre estirpes murinas listeria-resistentes y listeria-susceptibles, no se explica en función de características de inmunidad T-dependiente, sino por la diferente capacidad de unas estirpes u otras en la movilización, acúmulo, y poder listericida de las células fagocíticas - principalmente del SMF - en los puntos de infección activa durante las primeras 48-72 h.p.i. (SKAMENE y KONGSHAVN, 1979; MANDEL y CHEERS, 1980; STEVENSON y col., 1980; CZUPRYNSKI y col., 1985; YOUNG y CHEERS, 1986; WOOD y CHEERS, 1986; CHEERS y col., 1988).

Puede argumentarse también en este sentido que, a diferencia de otras bacterias patógenas de tipo intracelular, como por ejemplo Mycobacterium spp., Listeria spp. son muy sensibles a la acción bactericida de los MØs activados; hecho bien demostrado ya, clásicamente, (MACKANESS, 1962; NORTH, 1970) cuando se estableció una correlación directa entre la instauración de inmunidad específica y el declinar progresivo de la presencia de

listerias en el organismo. Probablemente esto explique también por qué, excepto en la encefalitis de los rumiantes, la listeriosis no es habitualmente una enfermedad de curso crónico tanto en condiciones naturales como experimentales, sino fundamentalmente de curso agudo o subagudo.

Respecto de otros hechos fundamentales en la patogenia de la listeriosis, de nuestras experiencias se deduce que la diseminación de Listeria spp. en el organismo es, principalmente, consecuencia de la movilización de las células fagocíticas infectadas (M0s y PMNNs) a través de las "rutas de migración habituales", y de la relativa abundancia de células del SMF en los diferentes órganos. Muestra de ello, es que los órganos invariablemente afectados en esta enfermedad son siempre los órganos linfoideos - incluida la médula ósea - y el hígado, cuya población de células de Kupffer - dado el volumen de este órgano - es probablemente equiparable a la de un órgano linfoide.

En lo referente a los demás órganos, más raramente afectados, es razonable suponer que las lesiones observadas en ellos son también consecuencia de la migración a los mismos de células fagocíticas infectadas.

En consonancia con esta línea de argumentación, un factor adicional que podría explicar, parcialmente, las diferencias existentes en la listeriosis murina, entre la infección con L.monocytogenes y L.ivanovii, es el grado de patogenicidad, o, lo que es lo mismo, la capacidad de supervivencia de ambas especies de listerias en el citoplasma de las células fagocíticas. A este respecto, la menor patogenicidad de L.ivanovii quizás pudiera explicarse porque únicamente fuera capaz de infectar M0s residentes peritoneales, PMNNs y células de Kupffer, todas ellas células a las que se atribuye un poder listericida significativamente inferior al de los M0s inflamatorios derivados de médula ósea tras el inicio de la infección (NORTH, 1970; CHEERS y col., 1978; SKAMENE y KONGSHAVN, 1979; STEVENSON y col., 1981; WOOD y col., 1986; CZUPRYNSKI y col., 1987). La no existencia de lesiones linfoideas, sino sólo hepáticas, en la infección experimental con L.ivanovii por vía i.p., y la ausencia total de lesiones en la infección por vía s.c., apoyarian esta interpretación. De la misma manera, explicaría el porqué en condiciones naturales la infección con esta especie de listeria es tan poco frecuente y, además, se observa casi únicamente en fetos y neonatos en la especie ovina (MACLEOD y col., 1974; ROCOURT y SEELIGER, 1985).

Avalan también, indirectamente, esta interpretación los experimentos de Portnoy y col. (1988), quienes demostraron que L.monocytogenes era capaz de sobrevivir y proliferar en células murinas de la línea J774 "similares a M0s" (Macrophage-like cells), fibroblastos murinos primarios de

la línea CL.7 y células epiteliales humanas de la línea Henle 407, pero no en M0s murinos derivados de médula ósea. Mientras que en estas últimas células la proliferación de L.monocytogenes cesaba tras la tercera generación, en las otras tres líneas celulares la multiplicación de L.monocytogenes progresaba hasta niveles de 100 bacterias por célula; datos probablemente asimilables, en términos generales, a lo observado por nosotros respecto a la colonización de hepatocitos y células pancreáticas en la infección listérica experimental. Otros tipos celulares frecuentemente afectados por L.monocytogenes en nuestras experiencias fueron células musculares estriadas, lisas y cardiacas, mesoteliales y otras células epiteliales como las del córtex adrenal y, más raramente, de los cuerpos lúteos ováricos.

La diferente susceptibilidad de los distintos tipos celulares del organismo a la infección por L.monocytogenes, quedó también de manifiesto cuando los mencionados investigadores emplearon cepas mutantes, no hemolíticas, de esta especie bacteriana. Interesantemente, en este caso la cepa mutante de L.monocytogenes no fue capaz de sobrevivir y proliferar en las líneas celulares mencionadas J774 "M0s-like cells", fibroblastos CL.7 y M0s murinos derivados de médula ósea, pero sí lo hizo en la línea Henle 407.

Así pues, en consonancia con lo expuesto por Cossart y Mengaud (1988), de nuestras experiencias deducimos que el hecho crucial que determina la patogenicidad de los diferentes serotipos de L.monocytogenes y de L.ivanovii, no es tanto su capacidad para penetrar por endocitosis en las células hospedadoras - hecho este común a ambas especies -, como el diferente poder listericida ejercido por dichas células. En células no fagocíticas tales como células epiteliales, musculares, mesoteliales etc., la proliferación intracitoplásmica de L.monocytogenes y L.ivanovii no está en absoluto restringida, lo cual inevitablemente supone la necrosis y lisis final de la célula infectada. Por el contrario, en células fagocíticas, la supervivencia de estas bacterias depende de la diferente capacidad de cada serotipo - incluido el 5 - para evadirse y evitar ser destruidas por los sistemas microbicidas de PMNNs, células de Kupffer y M0s no activados.

Una repercusión importante de estos hechos es la posibilidad de que la infección y proliferación activa de L.monocytogenes y L.ivanovii en células no fagocíticas, principalmente epiteliales, sea un proceso crucial en la patogenia y evolución de la infección, ya que en esta "fase" epitelial, las listerias patógenas tienen la oportunidad de sobrevivir y multiplicarse sin restricción, evitando simultáneamente la acción listericida de los M0s inflamatorios y otras células del sistema inmune.

Finalmente, considerando de manera general todo lo expuesto, pensamos que la listeriosis murina es un buen modelo experimental, no sólo para el estudio de la patogenia de la listeriosis septicémica, sino también en lo referente al estudio del funcionamiento del sistema inmune ante una infección con un agente patógeno de carácter intracelular.

Paradójicamente, aunque existe una ingente producción científica sobre la listeriosis murina como modelo experimental, la gran mayoría de estudios e investigaciones realizadas se basan en planteamientos experimentales mediante técnicas *in vitro* y/o microbiológicas, adoleciendo frecuentemente de la falta de estudios complementarios sistemáticos sobre la patogenia y lesiones histopatológicas de la enfermedad. Esta carencia es todavía más sorprendente cuando se considera que el tropismo y la existencia de graves lesiones en todos los órganos linfoides sin excepción, es el acontecimiento más relevante de la listeriosis murina experimental. El que la bibliografía sobre la enfermedad no consigne de manera destacada este hecho, y ello, cuando básicamente casi toda la investigación realizada tiene por finalidad el estudio de la listeriosis murina como modelo en el establecimiento de inmunidad contra un agente patógeno de tipo intracelular, es ciertamente sorprendente.

En este sentido, consideramos que una de las aportaciones más útiles y significativas de nuestro trabajo doctoral, ha sido mostrar como el organismo reacciona ante la infección experimental con Listeria spp., mediante la realización de un estudio histopatológico secuencial, sistemático y exhaustivo de la infección "in situ". Esto nos ha permitido contribuir a la descripción de un marco genérico de referencia - el cual incluye la explicación de la patogenia, curso y evolución de la infección - respecto del cual será posible comparar y verificar los resultados de futuras investigaciones.

6. CONCLUSIONES.

I. La listeriosis murina, independientemente de la vía de inoculación, serotipo de Listeria o dosis de inoculación empleada, se manifiesta invariablemente como una infección sistémica, y, dependiendo de su gravedad, como una septicemia.

II. Los órganos más constante y gravemente afectados en la listeriosis murina son los órganos linfoides y el hígado, existiendo una significativa correlación entre la gravedad de las lesiones observadas en estos órganos, la reacción PAP (+) detectable en las mismas y la mortalidad.

III. La etapa inicial en la diseminación de L.monocytogenes y L.ivanovii en el organismo se produce por vía linfática, realizándose ésta exclusivamente hacia el linfocentro mediastínico en el caso de la infección experimental por vía i.p., hacia los ganglios inguinales superficiales e ilíacos en el caso de la inoculación por vía s.c. (cuando es a nivel lumbar), y hacia el ganglio yeyunal cuando la infección se produce por vía intragástrica.

IV. Tras la fase de diseminación linfática inicial, la diseminación hematogena de la infección se produce fundamentalmente por mediación MØs y PMNNs infectados. Este hecho tiene como consecuencia principal, la afección - además del hígado - del bazo, ganglios linfáticos, placas de Peyer y médula ósea.

V. Mediante infección parenteral y tras la instauración de una infección sistémica en el organismo, L.monocytogenes accede al parénquima del bazo a nivel de los senos de la zona marginal, mientras que en los ganglios linfáticos y placas de Peyer lo hace mediante las VEA.

VI. L.monocytogenes así como las lesiones que esta bacteria provoca se localizan inicial y fundamentalmente en las zonas T-dependientes de los órganos linfoides. La infección de estos órganos provoca una esplenitis y linfadenitis de carácter variable entre purulenta, necrotizante o piogranulomatosa, dependiendo de la fase y gravedad de la infección. Adicionalmente, se observa también una variable depleción linfoide concomitante. Mediante la técnica de PAP se puede demostrar siempre Ag de L.monocytogenes en el seno de dichas lesiones.

VII. En la listeriosis murina las lesiones cardíacas se caracterizan por ser lesiones cuyo inicio y evolución son más tardías que las observadas en los órganos de referencia, hígado y bazo; frecuentemente, una vez que el organismo está superando o ha superado ya la fase aguda de la infección.

VIII. Cuando en el transcurso de la infección listérica se producen lesiones hepáticas, la eliminación de las listerias del organismo se realiza mediante la bilis, y, consecuentemente, por las heces.

IX. La vía s.c. es una vía de inoculación adecuada para el estudio de la patogenia de la listeriosis murina, siendo las características de la infección por esta vía equiparables a los casos de listeriosis septicémica habidos en condiciones naturales. La vía i.p., como consecuencia de la frecuente afección de las serosas, y, por extensión desde el mesotelio, de diferentes órganos abdominales y mediastínicos, puede inducir a interpretaciones erróneas respecto de la patogenia de la enfermedad.

X. La infección murina experimental por vía intragástrica no provoca signos clínicos de enfermedad ni lesiones comparables a las observadas por otras vías. No obstante, si es capaz de producir una infección subclínica con lesiones sistémicas leves, en las que es posible detectar, aunque inconstantemente, Ag de L.monocytogenes.

XI. En la infección murina experimental por vía intragástrica, L.monocytogenes accede al interior del organismo a través del epitelio de las placas de Peyer. Sin embargo, la infección por esta vía no provoca lesiones aparentes en todo el tracto gastrointestinal, incluidas las placas de Peyer. Desde estas últimas, las listerias se diseminan hacia el resto del organismo mediante los ganglios mesentéricos.

XII. L.monocytogenes y L.ivanovii, además de su capacidad para sobrevivir y proliferar en células fagocíticas, tienen también capacidad para penetrar y multiplicarse en otros tipos celulares, principalmente hepatocitos. Esta posibilidad de multiplicación en células epiteliales disminuye ostensiblemente la vulnerabilidad de las listerias patógenas a la acción microbicida del sistema inmunitario, hecho fundamental que condiciona grandemente la evolución y pronóstico final de la infección.

XIII. L.monocytogenes es la especie más patógena del género Listeria, y manifiesta un tropismo característico tanto por el hígado, como por todos los órganos linfoideos. L.ivanovii no es capaz de provocar lesiones en los órganos linfoideos pero sí en el hígado. Consecuentemente con ello, su grado de patogeneicidad es ostensiblemente inferior al de L.monocytogenes.

XIV. La técnica de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), debido a sus características de sensibilidad y especificidad en la detección de Ag, es una técnica muy útil para el diagnóstico y estudio de la patogenia de la listeriosis.

7. BIBLIOGRAFIA.

- Abadie S.M., Dalovisio J.R., Pankey G.A. and Cortez L.M. (1987) *Listeria monocytogenes Arthritis in a Renal Transplant Recipient*. J. INFECT. DIS., 156 (2), 413-414.
- Agarwal L.P., Sood N.N., Mahajan V.M. and Bhujwala R.A. (1979) Experimental keratitis and uveitis in rabbits with *Listeria monocytogenes*. I. IVANOV (ED.). PROCEEDINGS VII INT. SYMP. ON PROBLEMS ON LISTERIOSIS. VARNA (BULGARIA), 225-228.
- Al-Ghazali M.R. and Al-Azawi S.K. (1988) Storage effects of sewage sludge cake on the survival of *Listeria monocytogenes*. J. APPL. BACTERIOL., 65, 209-213.
- Allen P.M., Beller D.I., Braun J. and Unanue E.R. (1984) The Handling of *Listeria monocytogenes* by Macrophages: The Search for an Immunogenic Molecule in Antigen Presentation. J. IMMUNOL., 132 (1), 323-331.
- Audurier A., Pardon P., Marly J., Lantier F. et Loulergue J. (1981) Mesure de la Virulence Chez la Souris de Différentes Bactéries Appartenant au Genre *Listeria*. ANN. IMMUNOL. (INST. PASTEUR), 132 D, 191-200.
- Bach M.C. and Davis K.W. (1987) *Listeria Rhombencephalitis Mimicking Tuberculous Meningitis*. REV. INFECT. DIS., 9 (1), 130-133.
- Baker L.A., Campbell P.A. and Hollister J.R. (1977) Chemotaxigenesis and Complement Fixation by *Listeria monocytogenes* Cell Wall Fractions. J. IMMUNOL., 119 (5), 1723-1726.
- Bannister B.A. (1987) *Listeria monocytogenes meningitis associated with eating soft cheese*. J. INFECT., 15, 165-168.
- Barlow R.M. and McGorum B. (1985) Ovine Listerial Encephalitis: Analysis, Hypothesis and Synthesis. VET. REC., 116, 233-236.
- Basher H.A. and Fowler D.R. (1984) Pathogenicity of natural and experimental listeriosis in newly hatched chicks. RES. VET. SCI., 36, 76-80.
- Beckers H.J., Soentoro P.S.S., Delfgou-van and Asch E.H.M. (1987) The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. INT. J. FOOD MICROBIOL., 4, 249-256.
- Bennett M. and Baker E.E. (1977) Marrow-Dependent Cell Function in Early stages of Infection. CELL. IMMUN., 33, 203-210.

- Berche P., Gaillard J.L., Sansonetti P., Geoffroy C. and Alouf J.E. (1987a) Towards a better understanding of the molecular mechanisms of intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. ANN. INST. PASTEUR/MICROBIOL., 138, 242-245.
- Berche P., Gaillard J.L. and Sansonetti P.J. (1987b) Intracellular Growth of *Listeria monocytogenes* as a Prerequisite for in vivo Induction of T-Cell Mediated Immunity. J. IMMUNOL., 138 (7), 2266-2271.
- Bindseil E. and Errebo-Larsen H. (1979) Pathology of eight cases of listeric mastitis in bovines. I. IVANOV (ED.). PROCEEDINGS VII INT. SYMP. ON PROBLEMS ON LISTERIOSIS. VARNA (BULGARIA). 219, 221.
- Bispinger W. and Amtsberg G. (1988) Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals. PAUL PAREY ED., BERLIN, HAMBURG.
- Blanco M., Fernandez-Garayzabal J.F., Dominguez L., Briones V., Vazquez-Boland J.A., Blanco J.L., Garcia J.A. and Suarez G. (1989) A technique for the direct identification of haemolytic-pathogenic *Listeria* on selective plating media. LETTERS APPL. MICROBIOL., 9, 125-128.
- Blanden R.V., Lefford J.M. and Mackanes G.B. (1969) The Host Response to Calmette-Guerin Bacillus Infection in Mice. J. EXP. MED., 129, 1079-1101.
- Blanden D.C., Kampelmacher E.H. and Torres-Angel M.J. (1987) Listeriosis. J.A.V.M.A., 191 (12), 1546-1551.
- Blood D.C. and Radostits O.M. (1989) Veterinary Medicine (Seventh Edition) BAILLIÈRE TINDALL, LONDON, PHILADELPHIA, SYDNEY.
- Borman G., Olson C. and Segre D. (1960) The Trigeminal and Facial Nerves as Pathways for Infection of Sheep with *Listeria monocytogenes*. AM. J. VET. RES., 21, 993-1000.
- Bortolussi R., Issekutz A. and Faulkner G. (1986) Opsonization of *Listeria monocytogenes* Type 4b by Human Adult and Newborn Sera. INFECT. IMMUN., 52 (2), 493-498.
- Brackett R.E. (1988) Presence and Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food and Water. FOOD TECHNOL., April, 162-164.
- Brem A.M. and Eveland W.C. (1968) L Forms of *Listeria monocytogenes*. I. In vitro induction and propagation of L forms in all serotypes. J. INFECT. DIS., 118, 181-187.
- Buchmeier N.A. and Schreiber R.D. (1985) Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of

Listeria monocytogenes infection. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA., 82, 7407-7408.

Buckley P.J., Smith M.R., Braverman M.F. and Dickson S.A. (1987) Human Spleen Contains Phenotypic Subsets of Macrophages and Dendritic Cells That Occupy Discrete Microanatomic Locations. AMER. J. PATHOL., 128 (3), 505-519.

Busch R.H., Barnes D.M. and Sautter J.H. (1971) Pathogenesis and Pathologic Changes of Experimentally Induced Listeriosis in Newborn Pigs. AM. J. VET. RES., 32 (9), 1313-1320.

Cain D.B. and McCann V.L. (1986) An Unusual Case of Cutaneous Listeriosis. J. CLIN. MICROBIOL., 23 (5), 976-977.

Campbell P.A., Canono B.P. and Cook J.L. (1988) Mouse Macrophages Stimulated by Recombinant Gamma Interferon To Kill Tumor Cells Are Not Bactericidal for the Facultative Intracellular Bacterium *Listeria monocytogenes*. INFECT. IMMUN., 56 (5), 1371-1375.

Campbell P.A., Martens B.L., Cooper H.R. and McClatchy J.K. (1974) Requirement for Bone Marrow-Derived Cells in Resistance to *Listeria*. J. IMMUNOL., 112 (4), 1407-1414.

Campero C.M., Ballabene N., Demayo M.E., Cipolla A.I., Zamora A.S.y. and Odeon A.C. (1986) Infección experimental con *Listeria monocytogenes* en ovejas. REV. MED. VET. (BS.AS)., 67 (1), 6-14.

Cantoni C., Balzaretti C.e. and Valenti M. (1989) Episodio di listeriosi da consumo di insaccato a case of *L. monocytogenes* human infection associated with consumption of "testa in cassetta" (cooked meat porkproduct). ARCH. VET. ITALIANO., 40 (2).

Carvajal A. and Frederiksen W. (1988) Fatal Endocarditis Due to *Listeria monocytogenes*. REV. INFECT. DIS., 10 (3), 616-623.

Chan C., Kongshavn P.A.L. and Skamene E. (1977) Enhanced primary resistance to *Listeria monocytogenes* in T cell-deprived mice. IMMUNOL., 32, 529-537.

Chan Yu Yu and Cheers C. (1982a) Mechanism of Depletion of T Lymphocytes from the Spleen of Mice Infected With *Listeria monocytogenes*. INFECT. IMMUN., 38 (2), 686-693.

Chan Yu Yu and Cheers C. (1982b) Recovery from T Cell Depletion During Murine Listeriosis and Effects on a T-Dependent Antibody Response. INFECT. IMMUN., 38 (2), 694-698.

Charlton K.M. (1977) Spontaneous Listeric Encephalitis in Sheep (Electron Microscopic Studies). VET. PATHOL., 14, 429-434.

Charlton K.W. and Garcia.M.M. (1977) Spontaneous Listeric Encephalitis and Neuritis in Sheep. VET. PATHOL., 14, 297-313.

Cheers C. and McKenzie I.F.C. (1978) Resistance and Susceptibility of Mice to Bacterial Infection: Genetic of Listeriosis. INFECT. IMMUN., 19 (3), 755-762.

Cheers C. and Stanley E.R. (1988) Macrophage Production during Murine Listeriosis: Colony-Stimulating Factor 1 (CSF-1) and CSF-1-Binding Cells in Genetically Resistant and Susceptible Mice. INFECT. IMMUN., 56 (11), 2972-2978.

Cheers C. and Waller R. (1975) Activated Macrophages in Congenitally Athimic "Nude" Mice and in Lethally Irradiated Mice. J. IMMUNOL., 115 (3), 844-847.

Cheers C., Haigh A.M., Kelso A., Metcalf D., Stanley E.R. and Young A.M. (1988) Production of Colony-Stimulating Factors (CSFs) during Infection: Separate Determinations of Macrophage-, Granulocyte-, Granulocyte-Macrophage-, and Multi-CSFs. INFECT. IMMUN., 56 (1), 247-251.

Cheers C., McKenzie I.F.C., Paulov H., Waid C. and York J. (1978) Resistance and Susceptibility of Mice to Bacterial Infection: Course of Listeriosis in Resistant or Susceptible Mice. INFECT. IMMUN., 19 (3), 763-770.

Chen-Woan M., Sajewski D.H. and McGregor D.D. (1985) T-cell co-operation in the mediation of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. IMMUNOL., 56, 33-42.

Chung H.T., Samlowski W.E. and Daynes R.A. (1986) Modification of the Murine Immune System by Glucocorticosteroids: Alteration of the Tissue Localization Properties of Circulating Lymphocytes. CELL. IMMUNOL., 101, 571-585.

Cohen J.J., Rodriguez G.E., Kind P.D. and Campbell P.A. (1975) Listeria Cell Wall Fraction: A B Cell Mitogen. J. IMMUN., 114 (3), 1132-1134.

Cole R.K. (1941) Listeria (Listerella) Infection in the Fowl. POULTRY SCI., 20, 28-31.

Cooper G.L. (1989) An Encephalitic Form of Listeriosis in Broiler Chickens. AVIAN DIS., 33, 182-185.

Cordy D.R. and Osebold J.W. (1959) The Neuropathogenesis of Listeria Encephalomyelitis in Sheep and Mice. *J. INFECT. DIS.*, 104, 164-173.

Cossart P. and Mengaud J. (1989) *Listeria monocytogenes*. A Model for the Molecular Study of Intracellular Parasitism *MOL. BIOL. MED.*, 6, 463-474.

Cossart P., Vicente M.F., Mengaud J., Baquero F., Perez-Diaz J.C., and Berche P. (1989) Listeriolysin O Is Essential for Virulence of *Listeria monocytogenes*: Direct Evidence Obtained by Gene Complementation *INFECT. IMMUN.*, 57 (11), 3629-3636.

Cottin J., Aubry C., Rive M., Carbonnelle B. et Deshaies P. (1986) Recherche de *Listeria monocytogenes* dans placentas de bovins prélevés lors d'avortements. COURTIEU A.L., ESPAZE E.P., REYNANAND A.E. (EDS). "LISTERIOSIS 1985-1986". PROCEEDINGS 9TH. INTER. SYMP. PROBLEMS ON LISTERIOSIS. NANTES (FRANCIA), SEP. 1985.

Cox L.J. (1989) A Perspective on Listeriosis. *FOOD TECHNOL.*, December.

Czuprynski C.J. and Balish E. (1981a) Interaction of Rat Platelets with *Listeria monocytogenes*. *INFECT. IMMUN.*, 33 (1), 103-108.

Czuprynski C.J. and Balish E. (1981b) Killing of *Listeria monocytogenes* by conventional and Germfree Rat Sera. *INFECT. IMMUN.*, 33 (2), 348-354.

Czuprynski C.J. and Balish E. (1981c) Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* for Gnotobiotic Rats. *INFECT. IMMUN.*, 32 (1), 323-331.

Czuprynski C.J. and Brown J.F. (1987) Dual regulation of anti-bacterial resistance and inflammatory neutrophil and macrophage accumulation by L 3T4⁺ and Lyt 2⁺ *Listeria* immune T Cells. *IMMUNOL.*, 60, 287-293.

Czuprynski C.J., Brown J.F. and Roll J.T. (1989) Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, 7, 213-223.

Czuprynski C.J., Canono B.P., Henson P.M. and Campbell P.A. (1985) Genetically determined resistance to listeriosis is associated with increased accumulation of inflammatory neutrophils and macrophages which have enhanced listericidal activity. *IMMUNOL.*, 55, 511-518.

Davies W.A., Ackerman V.P. and Nelson D.S. (1981) Mechanism for Nonspecific Immunity to *Listeria monocytogenes* in Rats

Mediated by Platelets and the Clotting System. INFECT. IMMUN., 33 (2), 477-481.

Degen R. (1972) Involvement of the central nervous system in neonatal Listeriosis. ACTA MICROBIOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE., 19, 411-417.

Dijkstra R.G. (1986) A fifteen years survey of isolations of *Listeria monocytogenes* out of animals and the environment in the northern Netherlands (1970-1984). COURTIEU A.L., ESPAZE E.P., REYNAND A.E. (EDS). "LISTERIOSIS 1985- 1986". PROCEEDINGS 9TH. INTER. SYMP. PROBLEMS ON LISTERIOSIS. NANTES (FRANCIA), SEP. 1985.

Glugonska H., Chmiela M., Kieronska D.R., zalska B. and Rudnicka W. (1988) Innate Anti-Listerial Resistance of Mice Differing in Their Susceptibility to Listeriosis. AR. IMMUN. THER. EXP., 3, 151-159.

Domingo M., Ramos J.A., Dominguez L., Ferrer L. and Marco A. (1986) Demonstration of *Listeria monocytogenes* with the PAP Technique in Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissues of Experimentally Infected Mice J. VET. MED., 33, 537-542.

Dominguez L. (1984) Aislamiento e identificación microbiana en el género *Listeria* (Tesis Doctoral). ED. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Dominguez L., Fernandez-Garayzabal J.F., Blanco M.M., Briones V., Vazquez-Boland J.A., Blanco J.L. and Suarez G. (1990) Overlay technique for direct detection and identification of haemolytic *Listeria*: on selective plating medium. Z. LEBENSM. UNTERS. FORSCH., 190.

Dominguez L., Fernandez J.F., Vazquez J.A., Rodriguez E. et Suarez G. (1985) Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir du lait cru destiné à la consommation humaine. CAN. J. MICROBIOL., 31 (10), 938-941.

Dominguez L., Suarez G., Fernandez J.F. and Rodriguez E. (1984) New Methodology for the Isolation of *Listeria* Microorganisms from Heavily Contaminated Environments. APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 47 (5), 1188-1190.

Dominguez L., Vazquez J.A., Fernandez J.F., Echaleon P., Gomez-Lucia E., Rodriguez E.F. and Suarez G. (1986) Microplate Technique to Determine Hemolytic Activity for Routine Typing of *Listeria* Strains. J. CLIN. MICROBIOL., 24 (1), 99-103.

Doyle M.P. (1988) Effect of Environmental and Processing Conditions on *Listeria monocytogenes*. FOOD TECHNOL., April 1988, 169-172.

- Doyle M.P. and Schoeni J.L. (1986) Selective-Enrichment Procedure for Isolation of L.M. from fecal and Biologic Specimens. APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 51 (5), 1127-1129.
- Doyle M.P. and Schoeni J.L. (1987) Comparison of Procedures for Isolating *Listeria monocytogenes* in Soft, Surface-Ripened Cheese. J. FOOD. PROTECT., 50 (1), 4-6.
- Dustoer M.M. and Blazkovec A.A. (1978) Acquired Cellular Resistance, Delayed Hypersensitivity, and Altered Macrophage Migration in *Listeria monocytogenes* Infected Guinea Pigs. INFECT. IMMUN., 21 (1), 10-16.
- Egberts, H.J.A., Brinkhoff M.G.M., Mouwen J.M.V.M., Van Dijk J.E. and Koninkx J.F.J.G. (1985) Biology and Pathology of the intestinal M-cell. A review. VET. QUARTERLY, 7 (4), 333-336.
- Emmerling P., Finger H. and Hof H. (1977) Cell-Mediated Resistance to Infection with *Listeria monocytogenes* in Nude Mice. INFECT. IMMUN., 15 (2), 382-385.
- Emody L., Németh A. and Fischer J. (1979) Histopathological Investigation of Mice Infected with Virulent and Avirulent *Listeria monocytogenes* Strains. I. IVANOV (ED.), PROCEEDINGS VII INT. SYMP. ON PROBLEMS ON LISTERIOSIS. VARNA (BULGARIA), 249-253.
- Farber J.M. And Losos J.Z. (1988) *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. CMAJ, 138, 413-418.
- Farber J.M., Johnston M.A., Purvis U. and Loit A. (1987) Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. INT. J. FOOD MICROBIOL., 5, 157-163.
- Farr A.G., Kiely J.M. and Unanue E.R. (1979a) Macrophage-T Cell Interactions Involving *Listeria monocytogenes*- Role of the H-2 Gene Complex. J. IMMUNOL., 122 (6), 2395-2404.
- Farr A.G., Wechter W.J., Kiely J.M. and Unanue E.R. (1979b) Induction of Cytocidal Macrophages after in vitro Interactions between *Listeria*-Immune T Cells and Macrophages-Role of H-2. J. IMMUNOL., 122 (6), 2405-2412.
- Fenlon D.R. (1985) Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J. APPL. BACTERIOL., 59, 537-543.
- Fenlon D.R. (1986) Rapid quantitative assessment of the distribution of *listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. VET. REC., 118, 240-242.

Fernandez J.F., Dominguez L., Vazquez J.A., Blanco J.L. et Suarez G. (1985) *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. CAN. J. MICROBIOL., 32 (2), 149-150.

Fernandez J.F., Dominguez L., Vazquez J.A., Rodriguez E.F., Briones V., Blanco J.L. and Suarez G. (1987) Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. J. APPL. BACTERIOL., 63, .

Fleming D.W., Cochi S.L., MacDonald K.L., Brondum J., Hayes P.S., Plikaytis B.D., Holmes M.B., Audurier A., Broome C.V. and Reingold A.L. (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis N. ENGL. J. MED., 312 (7), 404-407.

Fossum S. (1980) The Architecture of Rat Lymph Nodes. IV. Distribution of Ferritin and Collodial Carbon in the Draining Lymph Nodes after Foot-pad Injection. SCAND. J. IMMUNOL., 12, 433-441.

Fujiki T. and Tanaka A. (1988) Antibacterial Activity of Recombinant Murine Beta Interferon. INFECT. IMMUN., 56 (3), 548-551.

Gaillard J.L., Berche P., Mounier J., Richard S. and Sansonetti P. (1987) In Vitro Model of Penetration and Intracellular Growth of *Listeria monocytogenes* in the Human Enterocyte Like Cell Line Caco-2 INFECT. IMMUN., 55 (11), 2822-2829.

Gallager P.G. and Watanakunakorn C. (1988) *Listeria monocytogenes* Endocarditis: A Review of the Literature 1950-1986. SCAND. J. INFECT. DIS., 20, 359-368.

Galsworthy S.B. (1987) Role of the cell surface in virulence of *Listeria monocytogenes*. ANN. INST. PASTEUR/MICROBIOL., 138, 273-276.

Gates G.A., Blenden D.C. and Kintner L.D. (1967) Listeric Myelitis in Sheep. J.A.V.M.A., 150 (2), 200-204.

George S.M., Lund B.M. and Brocklehurst T.P. (1988) The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. LETTERS APPL. MICROBIOL., 6, 153-156.

Gershon R.K., Lance E.M. and Kondo K. (1974) Immuno-Regulatory Role of Spleen Localizing Thymocytes. J. IMMUNOL., 112 (2), 546-554.

Gitter M. (1976) *Listeria monocytogenes* in "oven-ready" poultry. VET. REC., 23, 336.

- Gitter M. (1985) Listeriosis in Farm Animals in Great Britain. ED. COLLINS C. H., SOC. APPL. BACTERIOL., 191-200.
- Gitter M., Bradley R. and Blampied P.H. (1980) *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. VET. REC., 170, 390-393.
- Gitter M., Richardson C. and Boughton E. (1986a) Experimental infection of pregnant ewes with *Listeria monocytogenes*. VET. REC., 118, 575-578.
- Gitter M., Stebbings R.S., Morris J.A., Hannam D. and Harris C. (1986b) Relationship between ovine listeriosis and silage feeding. VET. REC., 118, 207-208.
- Goday A., Lozano F., Santamaria J., Gallart T. and Tolosa E. (1987) Transient Immunologic Defect in a Case of *Listeria Rhombencephalitis*. ARCH. NEUROL., 44, 666-667.
- Goossens P.L., Marchal G. and Milon G. (1988) Early Influx of *Listeria*-Reactive T Lymphocytes in Liver of Mice Genetically Resistant to Listeriosis. J. IMMUNOL., 141 (7), 2451-2455.
- Gornley E., Mengaud and Cossart P. (1989) Sequences Homologous to the Listeriolysin O Gene Region of *Listeria monocytogenes* Are Present in Virulent and Avirulent Haemolytic Species of the Genus *Listeria* RES. MICROBIOL. (INST. PASTEUR), 140, 631-643.
- Gray M.L. (1958) Listeriosis in fowls. A review. CORNELL. VET., 38, 297-314.
- Gray M.L. and Killinger A.H. (1966) *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. BACTERIOL. REV., 30, 309-371.
- Gray M.L., Singh C.h. and Thorp F. (1956) Abortion and Pre-or Postnatal Death of Young Due to *Listeria monocytogenes*. III. Studies in Ruminants. AM. J. VET. RES., 17, 510-516.
- Gronstol H. (1979) Listeriosis in sheep (*Listeria monocytogenes* excretion and immunological state in healthy sheep). ACT. VET. SCAND., 20, 168-179.
- Götze O., Bianco C. and Cohn Z.A. (1979) The Induction of Macrophage Spreading by Factor B of the Properdin System. J. EXP. MED., 149, 372-386.
- Handa T., Mitsuyama M., Watanabe Y., Koga T. and Nomoto K. (1987) A significant role of the macrophage accumulation induced by MCF in the protection of mice against *Listeria monocytogenes* in Vivo. CELL. IMMUNOL., 106, 330-342.

- Hansen P.B., Jensen T.H., Lykkegaard S. and Kristensen H.S. (1987) Listeria monocytogenes Meningitis in Adults. SCAND. J. INFECT. DIS., 19, 55-60.
- Hardonk M.J., Dijkhuis F.W., Grond J., Roudstaal J. and Poppema S. (1986) Evidence for a migratory capability of rat Kupffer cells to portal tracts and hepatic lymph nodes. VIRCHOWS ARCH. [CELL PATHOL.], 51, 429-442.
- Havell E.A. (1986) Synthesis and Secretion of Interferon by Murine Fibroblasts in Response to Intracellular Listeria monocytogenes. INFECT. IMMUN., 54 (3), 787-792.
- Herman P.G. (1980) Microcirculation of Organized Lymphoid Tissues MONogr. ALLERGY, 16, 126-142.
- Hether N.W., Campbell P.A., Baker L.A. and Jackson L.L. (1983) Chemical Composition and Biological Functions of Listeria monocytogenes Cell wall Preparations. INFECT. IMMUN., 39 (3), 1114-1121.
- Heymer B., Hof H., Emmerling P. and Finger H. (1976) Morphology and Time Course of Experimental Listeriosis in Nude Mice. INFECT. IMMUN., 14, 832-835.
- Higgins J.M. and Graham A.S. (1929) Lymphatic Drainage from the peritoneal cavity in the dog ARCH. SURG., 19, 453-465.
- Higgins R., Goyette G., Sauvageau R. and Lemaire T. (1987) Septicemia Due to L.monocytogenes in a Newborn Foal. CAN. VET. J., 28 (1-2), 63.
- Hird D.W. (1987) Review of Evidence for Zoonotic Listeriosis. J. FOOD PROTEC., 50 (5), 429-433.
- Hof H. (1984) Virulence of different strains of Listeria monocytogenes serovar 1/2a MED. MICROBIOL. IMMUNOL., 173, 207-218.
- Hof H. and Chatzipanagiotou S. (1987) The role of surface structures of Listeria spp. for pathogenicity. ANN. INST. PASTEUR/MICROBIOL., 138, 268-273.
- Ho J.L., Shands K.N., Friedland G., Eckind P. and Fraser D.W. (1986) An Outbreak of Type 4b Listeria monocytogenes Infection Involving Patients From Eight Boston Hospitals. ARCH. INTERN. MED., 146, 520-524.
- Holmberg L.A., Springer T.A. and Ault K.A. (1981) Natural Killer Activity in the Peritoneal Exudates of Mice Infected with Listeria monocytogenes: Characterization of the Natural Killer Cells by Using a Monoclonal Rat Anti-Murine Macrophage Antibody (M1/70). J. IMMUNOL., 127 (5), 1792-1799.

Huiskamp R. and Van Ewijk W. (1985) Repopulation of the Mouse Thymus after Sublethal Fission Neutron Irradiation. I. Sequential Appearance of Thymocyte Subpopulations J. IMMUNOL., 134, 2161-2169.

Hume D.A., Robinson A.P., Macpherson G.G. and Gordon S. (1983) The Mononuclear Phagocyte System of the Mouse Defined by Immunohistochemical Localization of Antigen F4/80. Relationship Between Macrophages, Langerhans Cells, Reticular Cells, and Dendritic Cells in Lymphoid and Hematopoietic Organs J. EXP. MED., 158, 1522-1536.

Husu J.R. (1990) Epidemiological Studies on the Occurrence of *Listeria monocytogenes* in the Feces of Dairy Cattle. J. VET. MED., 37, 276-282.

Husu J.R., Seppänen J.T., Sivelä S.K. and Rauramaa A.L. (1990) Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* on Dairy Farms. J. VET. MED., 37, 268-275.

Hutchison D.L. and Myers R.L. (1987) Prostaglandin-Mediated Suppression of Macrophage Phagocytosis of *Listeria monocytogenes*. CELL. IMMUNOL., 110, 68-76.

Jeleff , Von W., und Djurov A. (1968) Morphologische Veränderungen der Feten bei spontaner Listeriose infektion der Schafe. "PROBLEME DER LISTERIOSE". SYMPOSIUM, LEIPZIG. S. LIEBE, R. DEGEN (EDS). GEORGE THIEME VERLAG, , 233-239.

Jensen and Swift s. (1988) Diseases of sheep (Third Edition). Lea & Febiger, Philadelphia. , , .

Jensen T.H., Hansen P.B. and Brodersen P. (1988) Ondine's curse in *Listeria monocytogenes* brain stem encephalitis. ACTA NEUROL. SCAND., 77, 505-506.

John J.P. (1988) *Listeria monocytogenes*. En P.J. Vinken, G.W. Bruyn and H.L. Klawans (Eds.) "Handbook of Clinical Neurology", Vol. 8 (52), 89- 101. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

Jones S.M. and Woodbine M. (1961) Microbiological Aspects of *Listeria monocytogenes* with special reference to Listeriosis in Animals. VET. REV. ANNOTATIONS (COMMONWEALTH BUREAU OF ANIMAL HEALTH), 7.

Jubb K.V.F., Kennedy P.C. and Palmer N. (1985) Pathology of Domestic Animals (Third Edition). Academic Press, New York, London, Toronto, San Diego. , , .

Jungi T.W. (1980) Nonrecirculating Memory T Lymphocytes in Cellular Resistance to Infection. CELL. IMMUNOL., 55, 499-505.

Jungi T.W. and Jungi R. (1981) Immunological memory to *Listeria monocytogenes* in rodents. IV. Studies on origin and fate of tissue positioned T memory cells. IMMUNOL., 44, 789-798.

Jungi T.W. and Jungi R. (1982) Genetic Control of Cell-Mediated Immunity in Rats: Involvement of RT1.B Locus Determinants in the Proliferative Response of T Lymphocytes to *Listeria* Antigens. INFECT. IMMUN., 38 (2), 521-529.

Jungi T.W. and McGregor D.D. (1977) Generation of Macrophage Chemotactic Activity in Situ in *Listeria*-Immune Rats. CELL. IMMUNOL., 33, 322-339.

Jungi T.W. and Pepys M.B. (1981) Delayed hypersensitivity reactions to *Listeria monocytogenes* in rats decomplicated with cobra factor and in C5-deficient mice. IMMUNOL., 43, 271-279.

Kathariou M.K.S. and Goebel W. (1988) Hemolysin Supports Survival But Not Entry of the Intracellular Bacterium *Listeria monocytogenes*. INFECT. IMMUN., 56 (1), 79-83.

Kathariou S., Rocourt J., Hof B. and Goebel W. (1988) Levels of *Listeria monocytogenes* Hemolysin Are Not Directly Proportional to Virulence in Experimental Infections of Mice. INFECT. IMMUN., 56 (2), 534-536.

Kaufmann S.H.E. (1983) Effective Antibacterial Protection Induced by a *Listeria monocytogenes*-Specific T Cell Clone and Its Lymphokines. INFECT. IMMUN., 39 (3), 1265-1270.

Kaufmann S.H.E. (1984) Acquired Resistance to Facultative Intracellular Bacteria: Relationship Between Persistence, Cross-Reactivity at the T-Cell Level, and Capacity to Stimulate Cellular Immunity of Different *Listeria* Strains. INFECT. IMMUN., 45 (1), 234-241.

Kaufmann S.H.E. (1987) Possible Role of Helper and Cytolytic T Lymphocytes in antibacterial Defense: Conclusions Based on a Murine Model of Listeriosis. REV. INFECT. DIS., 9 (5), 5650-5659.

Kaufmann S.H.E. (1988a) Listeriosis: new findings-current concern. MICROBIAL PATHOGENESIS., 5, 225-231.

Kaufmann S.H.E. (1988b) Immunity Against Intracellular Bacteria: Biological Effector Functions and Antigen Specificity of T Lymphocytes. CURRENT TOPICS IN MICROBIOL. IMMUNOL., 138, 142-175.

Kaufmann S.H.E. and Brinkmann (1984) Attempts to Characterize the T-Cell Population and Lymphokine Involved

in the Activation of Macrophage Oxygen Metabolism in Murine Listeriosis. *CELL. IMMUNOL.*, 88, 545-550.

Kaufmann S.H.E. and Hann H. (1982) Biological Functions of T-Cell Lines With Specificity for the intracellular Bacterium *Listeria monocytogenes* in Vitro and in Vivo. *J. EXP. MED.*, 153, 1754-1765.

Kaufmann S.H.E., Bahn H., Simon M.M., Röllinghoff M. and Wagner H. (1982) Interleukin 2 Induction in Lyt 1+ 2,3+ T cells from *Listeria monocytogenes*-Immune Mice. *INFECT. IMMUN.*, 37 (3), 1292-1294.

Kaufmann S.H.E., Simon M.M. and Hann H. (1979) Specific Lyt 123+ T-Cells are involved in protection against *L. monocytogenes* and in Delayed-Type Hypersensitivity to listerial antigens. *J. EXP. MED.*, 150, 1033-1038.

Kearns R.J. and Leu R.W. (1984) Modulation of Natural Killer Activity in Mice following Infection with *Listeria monocytogenes*. *CELL. IMMUNOL.*, 84, 361-371.

Kent W. (1987) Ovine Listeric Encephalitis. *COMPENDIUM FOOD ANIMAL.*, 9(1), 28-32.

Klatt E.C., Paulova Z., Teberg A.J. and Yonekura M.L. (1986) Epidemic Perinatal Listeriosis at Autopsy. *HUM. PATHOL.*, 17, 1278-1281.

Klein J. (1982) Immunology. The Science of Self-Nonself Discrimination. John Wiley & Sons, New York, Toronto.

Klerx J.A.P.M., Beukelman C.J., Van Dijk H., Van Overveld F.J., Van der Maaden W.J. and Willers J.M.N. (1985) Increased Local Complement Levels upon Intraperitoneal Injection of Mice with *Listeria monocytogenes* and Regulation by Polyanions. *INFECT. IMMUN.*, 49 (3), 841-843.

Koga T., Mitsuyama M., Handa T., Yayama T., Muramori K. and Nomoto K. (1987) Induction by killed *Listeria monocytogenes* of effector T cells mediating delayed-type hypersensitivity but not protection in mice. *IMMUNOL.*, 62, 241-248.

Kongshavn P.A.L., Sadarangani C. and Skamene E. (1980) Genetically Determined Differences in Antibacterial Activity of Macrophages Are Expressed in the Environment in Which the Macrophage Precursors Mature. *CELL. IMMUNOL.*, 53, 341-349.

Kostiala A.A.I. and McGregor D.B. (1975) The Mediator of Cellular Immunity: IX. The Relationship between Cellular Hypersensitivity and Acquired Cellular Resistance in Rats Infected with *Listeria monocytogenes*. *J. EXP. MED.*, 141, 1249-1260.

Kratz S. and Kurlander R.J. (1988) Characterization of the Pattern of Inflammatory Cell Influx and Cytokine Production During The Murine Host Response to *Listeria monocytogenes*. *J. IMMUNOL.*, 141 (2), 598-606.

Kwantes N. and Isaac M. (1975) Listeria infection in West Glamorgan. PROCEEDINGS 6TH. INT. SYMP. ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS, 1974. IN "PROBLEMS OF LISTERIOSIS", ED. WOODBINE, M. LEICESTER: LEICESTER UNIVERSITY PRESS.

Ladds P.W., Dennis S.M. and Njoku C.O. (1974) Pathology of listeric infection in domestics animals. *VET. BULL.*, 44 (2), 67-74.

Lane F.C. and Unanue E.R. (1972) Requirement of Thymus (T) Lymphocytes for Resistance to Listeriosis. *J. EXP. MED.*, 135, 1104-1112.

Lawrence D.A. and Schell R.F. (1978) Susceptibility of C5-deficient Mice to Listeriosis: Modulation by Concanavalin A. *CELL. IMMUNOL.*, 39, 336-344.

Lefford M.J., Warner S. and Amell L. (1979) Listeria Pneumonitis: Influence of Route of Immunization on Resistance to Airborne Infection. *INFECT. IMMUN.*, 25 (2), 672-679.

Leimeister-Wächter M., Chakraborty T. and Goebel W. (1987) Detection and presence of two haemolytic factors in *Listeria* spp. *ANN. INST. PASTEUR/MICROBIOL.*, 138, 252-255.

Lepay D.A., Steinman R.M., Nathan C.F., Murray H.W. and Cohn Z. (1985) Liver Macrophages in Murine Listeriosis. (Cell-Mediated Immunity Is Correlated with an influx of Macrophages Capable of Generating Reactive Oxygen Intermediates). *J. EXP. MED.*, 161, 1503-1512.

Lovett J. (1988a) Isolation and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. *FOOD TECHNOL.*, April, 172-176.

Lovett J. (1988b) Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* in Dairy Products. *J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM.*, 71 (3), 658-660.

Lovett J. (1989) *Listeria monocytogenes*. En Michael P. Doyle ed. Foodborne bacterial pathogens. New York, Marcel Dekker Inc., 283-310.

Lucas A., Bouley G., Quinchon C., Feugeas J., Gourdon R. et Toucas L. (1955) Etude sur la Listériose et *Listeria monocytogenes* dans quelques espèces animales. *REC. MED. VÉT.* VIGOT FRÈRES, EDITEURS., XXXI.

- MacDonald D.W., Wilton G.S., Howell J. and Klavano G.G. (1972) Listeria monocytogenes isolations in Alberta 1951-1970 CAN. VET. J., 13 (3), 69-71.
- MacDonald T.T. and Carter P.B. (1980) Cell-Mediated Immunity to Intestinal Infection. INFECT. IMMUN., 28 (2), 516-523.
- Mackaness G.B. (1962) Cellular Resistance to Infection. J. EXP. MED., 116, 381-406.
- Mackaness G.B. (1964) The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. J. EXP. MED., 120, 105-120.
- Mackaness G.B. (1969) The Influence of Immunologically Committed Lymphoid cells on Macrophage Activity in Vivo. J. EXP. MED., 129, 973-992.
- Mackaness G.B. and Hill W.C. (1969) The Effect of Anti-Lymphocyte Globulin on Cell-Mediated Resistance to Infection. J. EXP. MED., 129, 993-1012.
- Macleod N.S.M., Watt J.A. and Harris J.C. (1974) Listeria monocytogenes type 3 as a cause of abortion in sheep. VET. REC., 95, 365-367.
- Magee D.M. and Wing (1987) T Cell lines generated in vitro confer specific protection against Listeria monocytogenes in mice. CLIN. RES., 35 (3), 482.
- Magee D.M. and Wing E.J. (1988) Cloned L3T4+ T Lymphocytes Protect Mice Against Listeria monocytogenes by secreting IFN-Gamma. J. IMMUNOL., 14 (9), 3203-3207.
- Mainou-Fowler T., Macgowan A.P. and Postlethwaite R. (1988) Virulence of Listeria spp.: course of infection in resistant and susceptible mice. J. MED. MICROBIOL., 27, 131-140.
- Malewitz T.D., Gray M.L. and Smith E.M. (1957) Experimentally Induced Listeriosis in Turkey Poult. POULTRY SCI., 36, 416-419.
- Mandel T.E. and Cheers C. (1980) Resistance and Susceptibility of Mice to Bacterial Infection: Histopathology of Listeriosis in Resistant and Susceptible Strains. INFECT. IMMUN., 30 (3), 851-861.
- Marco A., Ramos J.A., Dominguez L., Domingo M. and Gonzalez L. (1988) Immunocytochemical Detection of Listeria monocytogenes in Tissue with the Peroxidase-antiperoxidase Technique. VET. PATHOL., 25, 385-387.
- Marth E.H. (1988) Disease characteristics of Listeria monocytogenes. FOOD TECHNOL., April, 165-168.

Martin R. and Podzamezer D. (1987) Listeriosis en el adulto. MEDICINE, 76, 78-87.

Matsuura K., Ezaki T. and Kotani M. (1989) Splenic outer periaрterial lymphoid sheet (PALS): An immunoproliferative microenvironment constituted by antigen- laden marginal metallophilic and ED2-positive macrophages in the rat. CELL. TISSUE RES., 257, 459-470.

McGregor D.D. and Logie P.S. (1974) The Mediator of Cellular Immunity. VII. Localization of Sensitized Lymphocytes in Inflammatory Exudates. J. EXP. MED., 139, 1415-1430.

McGregor D.D. and Logie P.S. (1975) The Mediator of Cellular Immunity. X. Interaction of Macrophages and Specifically Sensitized Lymphocytes. CELL. IMMUNOL., 18, 454-463.

McGregor D.D., Crum E.D., Jungi T.W. and Bell R.G. (1978) Transfer of Immunity Against *Listeria monocytogenes* by T Cells Purified by a Positive Selection Technique. INFECT. IMMUN., 22 (1), 209-218.

McLauchlin J. (1987) *Listeria monocytogenes* recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J. APPL. BACTERIOL., 63, 1-11.

McLauchlin J., Audurier A. and Taylor A.G. (1986a) The evaluation of a phage-typing system for *Listeria monocytogenes* for use in epidemiological studies. J. MED. MICROBIOL., 22, 357-365.

McLauchlin J., Audurier A. and Taylor G. (1986b) Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infection in Britain 1967-1984; the use of serotyping and phage typing. J. MED. MICROBIOL., 22, 367-377.

McLauchlin J., Black A., Green H.T., Nash J.Q. and Taylor A.G. (1988a) Monoclonal antibodies show *Listeria monocytogenes* in necropsy tissue samples. J. CLIN. PATHOL., 1988, 983-988.

McLauchlin J., Saunders N.A., Ridley A.M. and Taylor A.G. (1988b) Listeriosis and food-borne transmission LANCET, January, 177-178.

Medina S., Vas S.I. and Robson H.G. (1975) Effect of Nonspecific Stimulation on the Defense Mechanisms of Inbred Mice. J. IMMUNOL., 114 (6), 1720-1725.

Mengaud J., Vicente M.F. and Cossart P. (1989a) Transcriptional Mapping and Nucleotide Sequence of *Listeria monocytogenes* hlyA Region Reveal Structural Features That May Be Involved in Regulation INFECT. IMMUN., 57 (12), 3695-3701.

Mengaud J., Vicente M.F., Chenevert C., Geoffroy F., Baquero J.C., Perez-Diaz J.C. and Cossart P. (1989b) A Genetic Approach to Demonstrate the Role of Listeriolysin O in the Virulence of *Listeria monocytogenes*. ACTA MICROBIOLOGICA HUNGARICA, 36, 177-182.

Middlebrook G., Salmon B.J. and Kreisberg J.I. (1974) Sterilization of *Listeria monocytogenes* by Guinea Pig Peritoneal Exudate Cell Cultures. CELL. IMMUNOL., 14, 270-283.

Mielke M.E.A., Ehlers S. and Hahn H. (1988) T-Cells Subset in Delayed-Type Hypersensitivity, Protection, and Granuloma Formation in Primary and Secondary *Listeria* Infection in Mice: Superior Role of Lyt-2⁺ Cells in Acquired Immunity. INFECT. IMMUN., 56 (8), 1920-1925.

Miki K. and Mackaness G.B. (1964) The Passive Transfer of Acquired Resistance to *Listeria monocytogenes*. J. EXP. MED., 120, 93-103.

Miller J.K. and Burns J. (1970) Histopathology of *Listeria monocytogenes* After Oral Feeding to Mice. APPL. MICROBIOL., 19 (3), 772-775.

Mitsuyama M., Takeya K., Nomoto K. and Shimotori S. (1978) Three phases of phagocyte contribution to resistance against *Listeria monocytogenes*. J. MICROBIOL., 106, 165-171.

Miyata M., Mitsuyama M., Ogata N., Nomoto K. and Takeya K. (1982) Two steps in the generation of acquired cellular resistance against *Listeria monocytogenes*: accumulation and activation of macrophages. IMMUNOL., 47, 247-253.

Müller H.E. (1988) Absence of *Listeria* species in lower animals. ANN. INST. PASTEUR/ MICROBIOL., 139, 727-730.

Molello J.A. and Jensen R. (1964) Placental Pathology. IV. Placental Lesions of Sheep Experimentally Infected with *Listeria monocytogenes*. AM. J. VET. RES., 25, 441-449.

Morgan J.H. (1977) Infectious keratoconjunctivitis in cattle associated with *Listeria monocytogenes*. VET. REC., 100, 113-114.

Mulder C.J.J. and Zanen H.C. (1986) *Listeria monocytogenes* neonatal meningitis in the Netherlands. ECR. J. PEDIATR., 145, 60-62.

Munk M.E. and Kaufmann S.H.E. (1988) *Listeria monocytogenes* reactive T lymphocytes in healthy individuals. MICROBIAL PATHOGENESIS, 5, 49-54.

Nakane A. and Minagawa T. (1984) The Significance of Alpha/Beta Interferons and Gamma Interferon Produced in Mice Infected with *Listeria monocytogenes*. *CELL. IMMUNOL.*, 88, 29-40.

Nakane A., Minagawa T. and Kato K. (1988) Endogenous Tumor Necrosis Factor (Cachectin) Is Essential to Host Resistance against *Listeria monocytogenes* Infection. *INFECT. IMMUN.*, 56 (10), 2563-2569.

Nelson W.E., Behrman R.E. and Vaughan U.C. (1989) *Tratado de Pediatría*. Vol. 1 (13a Edición). Ed. Interamericana - McGraw-Hill, Madrid, Lisboa, Caracas.

Newborg M.F. and North R.J. (1980) On the Mechanism of T Cell-Independent Anti-*Listeria* Resistance in Nude Mice. *J. IMMUNOL.*, 124 (2), 571-576.

Nickol A.D. and Bonventure P.F. (1977) Anomalous High Native Resistance of Athymic Mice to Bacterial Pathogens. *INFECT. IMMUN.*, 18 (3), 636-645.

Nilsson A. and Karlsson K.A. (1959) *L.monocytogenes* Isolations from Animals in Sweden during 1948 to 1957. *NORD. VET. MED.*, 11, 305-315.

Njoku C.O. and Dennis S.M. (1972) Listeric Abortion Studies in Sheep. IV. Histopathologic Comparison of Natural and Experimental Infection. *CORNELL. VET.*, 63, 211-219.

Njoku C.O. and Dennis S.M. (1973) Listeric Abortion Studies in Sheep. II. FetoPlacental Changes. *CORNELL. VET.*, 63, 171-192.

Njoku C.O. and Dennis S.M. (1979) Effect of route of inoculation on the pathology of listeric abortion. I. IVANOV (ED.). *PROCEEDINGS VII INT. SYMP. ON PROBLEMS ON LISTERIOSIS*. VARNA (BULGARIA), 234-241.

Njoku C.O., Dennis S.M. and Cooper R.F. (1972) Listeric Abortion Studies in Sheep. I. Materno-Fetal Changes. *CORNELL. VET.*, 52, 608-627.

Njoku C.O., Dennis S.M. and Noordsy J.L. (1973) Listeric Abortion Studies in Sheep. III. Feto Placental- Myometrial Interaction. *CORNELL. VET.*, 63, 193-210.

Somoto K., Shimamoto Y., Taniguchi K., Kubo C., Kawauchi H., Mitsuyama M. and Takeya K. (1983) Development of Immunity against *Listeria monocytogenes* in Athymic Nude versus neonatally Thymectomized Mice. *CELL. IMMUNOL.*, 75, 134-143.

North R.J. (1970) The Relative Importance of Blood monocytes and Fixed Macrophages to the Expression of

Cell-Mediated Immunity to Infection. *J. EXP. MED.*, 132, 521-534.

North R.J. (1973) Importance of Thymus-Derived Lymphocytes in Cell-Mediated Immunity to Infection. *CELL. IMMUNOL.*, 7, 166-176.

North R.J. (1975) Nature of "Memory" in T-Cell-Mediated Antibacterial Immunity: Anamnestic Production of Mediator T Cells. *INFECT. IMMUN.*, 12 (4), 754-760.

North R.J. and Deissler J.F. (1975) Nature of "Memory" in T-Cell-Mediated Antibacterial Immunity: Cellular Parameters That Distinguish Between the Active Immune Response and a State of "Memory". *INFECT. IMMUN.*, 12 (4), 761-767.

North R.J. and Kirstein D.P. (1977) T-Cell-Mediated Concomitant Immunity to Syngeneic Tumors: I. Activated Macrophages as the Expressors of Nonspecific Immunity to Unrelated Tumors and Bacterial Parasites. *J. EXP. MED.*, 145, 275-292.

Ortel S. and Wilhelms D. (1986) Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verbreitung von Serovaren und Phagovaren von *Listeria monocytogenes* bei Schaf und Rind. *MH. VET. MED.*, 41, 567-571.

Osebold J.W. and Inouye T. (1954a) Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* Infections in Natural Hosts. I. Rabbit Studies. *J. INFECT. DIS.*, 95, 52-66.

Osebold J.W. and Inouye T. (1954b) Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural hosts. II. Sheep Studies. *J. INFECT. DIS.*, 95, 67-78.

Pals S.T., Horst E., Scheper R.J. and Meijer C.J.L.M. (1989) Mechanisms of Human Lymphocyte Migration and their Role in the Pathogenesis of Disease *IMMUNOL. REV.*, 108, 111-133.

Paquet A.J.R., Raines K.M. and Brownback P.C. (1986) Immunopotentiating Activities of Cell Walls, Peptidoglycans, and Teichoic Acids from Two Strains of *Listeria monocytogenes*. *INFECT. IMMUN.*, 54 (1), 170-176.

Paterson J.S. (1937) *Listerella* Infection in Fowls. *VET. REC.*, 49, 1533-1534.

Pellas T.C. and Weiss L. (1990a) Deep Splenic Lymphatic Vessels in the Mouse: A Route of Splenic Exit for Recirculating Lymphocytes. *AMER. J. ANAT.*, 187, 347-354.

Pellas T.C. and Weiss L. (1990b) Migration Pathways of Recirculating Murine B Cells and CD4+ and CD8+ T Lymphocytes. *AMER. J. ANAT.*, 187, 355-373.

- Petit J.C. (1980) Resistance to Listeriosis in Mice That Are Deficient in the Fifth Component of Complement. *INFECT. IMMUN.*, 27 (1), 61-67.
- Petit J.C. and Ubanue E.R. (1974) Effects of Bacterial Products on Lymphocytes and Macrophages: Their Possible Role in Natural Resistance to *Listeria* Infection in Mice. *J. IMMUNOL.*, 113 (3), 984-992.
- Pietrangeli C., Pang K.C., Skamene E. and Kongshavn P.A.L. (1983) Characteristics of Mononuclear Phagocytes Mediating Antilisterial Resistance in Splenectomized Mice. *INFECT. IMMUN.*, 39 (2), 742-749.
- Pimentel J., Pimentel T., Salgado M.J., Chaves P., Santos J. and Coelho M.H. (1989) Atteinte des noyaux gris et du tronc cérébral au cours d'une infection à *Listeria monocytogenes*. *ANN. PATHOL.*, 9 (1), 54-56.
- Pohjanvirta R. and Huttunen T. (1985) Some aspects of murine experimental Listeriosis. *ACTA VET. SCAND.*, 26, 563-580.
- Poirier M.K. and Myers R.L. (1980) Splenic regulation of cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes*. *IMMUNOL.*, 40, 117-121.
- Portnoy D.A., Jacks P.S. and Hinrichs D.J. (1988) Role of Hemolysin for the Intracellular Growth of *Listeria monocytogenes*. *J. EXP. MED.*, 167, 1459-1471.
- Prentice G.A. and Neaves P. (1988) *Listeria monocytogenes* in food: its significance and methods for its detection. *BULL. INT. DAIRY FED.*, 223, 1-28.
- Rácz P., Tenner K. and Méro E. (1972) Experimental *Listeria Enteritis*. I. An Electron Microscopic Study of the Epithelial Phase in Experimental *Listeria* Infection. *LAB. INVEST.*, 26 (6), 694-700.
- Ralovich B. (1986) Listeriosis research: Present situation and perspective. *ANN. IMMUNOL. HUNG.*, 26, 911-925.
- Ramos J.A., Domingo M., Dominguez L., Ferrer L. and Marco A. (1988) Immunohistologic Diagnosis of Avian Listeriosis. *AVIAN PATHOL.*, 17, 992.
- Rapp J. and Kersten D. (1985) Listerial Septicaemia in Few-day-old Suckling Pigs. *VET. MED. REV.*, 1, 10-12.
- Rebhun W.C. and Delahunta A. (1982) Diagnosis and treatment of bovine listeriosis. *J.A.V.M.A.*, 180, 395-398.
- Rhodes J.M., Bennedsen J., Olesen , Larsen S., Riisgaard S. and Spärck J.V. (1979) Correlation Between In Vivo and In

Vitro Functional Test for Activated Macrophages. *INFECT. IMMUN.*, 23 (1), 34-40.

Ridgway E.J. and Brown J.M. (1989) *Listeria monocytogenes meningitis* in the acquired immune deficiency syndrome: limitations of conventional typing methods in tracing a foodborne source. *J. INFECT.*, 19, 167-171.

Ritter M.A., Rozing J., Henk-Jan and Schuurman (1988) The true function of the thymus? *IMMUNOL. TODAY*, 9, 189-193.

Rocourt J. and Seeliger H.P.R. (1985) Distribution des espèces du genre *Listeria*. (Classification of Different *Listeria Species*). *ZBL. BAKT. HYG. A*, 259, 317-330.

Rocourt J., Schrettenbrunner A., Hof H. and Espaze E.P. (1987) Une nouvelle espèce du Genre *Listeria*: *Listeria seeligeri*. *PATH. BIOL.*, 35 (7), 1075-1080.

Roncoroni A.J., Michans M., Bianchini H.M., Smayevsky J. and Leardini N. (1987) Infecciones por *L.monocytogenes*. Experiencia de 15 años. *MEDICINA (BUENOS AIRES)*, 47, 239-242.

Rudnicka W., Chmiela M. and Dlugonska H. (1985) *Listeria Antigen-Binding Cells* in the Spleens of Normal and Immunized Mice Resistant or Susceptible to Listeriosis. *IMMUNOL. LET.*, 11, 57-62.

Rudnicka W., Dlugonska H. and Bartosz M. (1988) Phagocytosis and killing of *Listeria* by Guinea Pig Macrophages and Neutrophils. *ARCH. IMMUNOL. THER. EXP.*, 36, 161-166.

Sadarangani C., Skamene E. and Kongshavn P.A.L. (1980) Cellular Basis for Genetically Determined Enhanced Resistance of Certain Mouse Strains to Listeriosis. *INFECT. IMMUN.*, 28 (2), 381-386.

Sainte-Marie G. and Peng F.S. (1986) Diffusion of a lymph-carried antigen in the fiber network of the lymph node of the rat. *CELL TISSUE RES.*, 245, 481-486.

Schlech W.F. (1984) New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. *CLIN. INVEST. MED.*, 7 (4), 321-324.

Schlech W.F. (1988) Virulence Characteristics of *Listeria monocytogenes*. *FOOD TECHNOL.*, April, 176-178.

Schleicher J. und Schneider V. (1968) Experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der Listeriose des Zentralnervensystems beim Schaf. "PROBLEME DER LISTERIOSE" INT. SYMP., LEIPZIG. S. LIEBE, R. DEGEN (EDS.). GEORG THIEME VERLAG., 257-264.

- Schleicher J., Günther H., und Potel K. (1968) Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Haus- und Versuchstieren. XII. Mitteilung: Experimentelle Infektionen an *N. hypoglossus* und im Aufzweigungsgebiet weiterer Gehirnnerven bei Schafen. ARCHIV. EXPER. VET. MEDIZ., 22, 1027-1050.
- Schleicher J. und Urbaneck D. (1966) Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Haus- und Versuchstieren. X. Mitteilung: Experimentell erzeugte zerebrale Listeriose beim Schaf durch neurale und paraneurale Infektionen mit geringen Kulturdosen an Zonen des Nervus Trigeminus. ARCHIV. EXP. VETER. MED., 20, 23-40.
- Schmidt-Wolf G., Seeliger H.P.R. und Schrettenbrunner A. (1987) Menschliche Listeriose-Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland, 1969-1985. ZBL. BAKT. MIKROBIOL. HYG. A, 265, 427-486.
- Schönberg A. (1988a) Zur aktuellen situation der Listeriose-eine Übersicht. BERL. MÜNCH. TIERÄRZTL. WSCHR., 101, 82-84.
- Schönberg A. (1988b) Prevention and Control of Listeriosis. TURKISH J. INFECT., 2 (4), 533-540.
- Schönberg A. (1989) Method to determine virulence of *Listeria* strains. INT. J. FOOD. MICROBIOL., 8, 281-284.
- Seastone C.V. (1935) Pathogenic organisms of the Genus *Listerella*. J. EXP. MED., 62, 203-212.
- Seeliger H.P.R. and Jones D. (1986) Genus *Listeria*. En Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. EDS. SNEATH P.H.A., MAIR N.S., SHARPE M.E., HOLT J.G. WILLIAMS & WILKINS CO., BALTIMORE. LONDON. LOS ANGELES, 2.
- Seeliger H.P. (1987) Etat actuel de nos connaissances sur les listerias et la listérose. BULL. ACAD. NATLE. MED., 171 (7), 799-806.
- Selbitz H.J. (1986) Immunologische Grundlagen der Bekämpfung der Listeriose. MH. VET. MED., 41, 217-219.
- Selbitz H.J., Steinbach G. und Meyer H. (1986) Quantitative bakteriologische Untersuchungen an experimentell infizierten Labortieren. ARCH. EXP. VET. MED., 40 (4), 575-586.
- Skamene E. and Chayasirisobhon W. (1977) Enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* in splenectomized mice. IMMUNOL., 33, 851-858.
- Skamene E. and Kongshavn P.A.L. (1979) Phenotypic Expression of Genetically Controlled Host Resistance to *Listeria monocytogenes*. INFECT. IMMUN., 25, 345-351.

Skamene E., Chayasirisobhon W. and Kongshavn P.A.L. (1978) Increased phagocytic activity of splenectomized mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *IMMUNOL.*, 34, 901-907.

Skamene E., Kongshavn and Sachs D.H. (1979) Resistance to *Listeria monocytogenes* in Mice: Genetic Control by Genes that Are Not Linked to the H-2 complex. *J. INFECT. DIS.*, 139 (2), 228-231.

Skovgaard N. and Morgen C.A. (1988) Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *INT. J. FOOD MICROBIOL.*, 6, 229-242.

Slade P.J. and Collins-Thompson D.L. (1987) Two-Stage Enrichment Procedures for Isolating *Listeria monocytogenes* from Raw Milk. *J. FOOD PROTEC.*, 50 (11), 904-908.

Smith C.W. and Metzger J.F. (1963) Identification of *Listeria monocytogenes* in experimentally infected animal tissue by immunofluorescence. *PROCEEDINGS INT. SYMP. ON LISTERIC INFECTION*, 179-182.

Smitch R.E., Reynolds I.M. and Clark G.W. (1968) Experimental Ovine Listeriosis. I. Inoculation of Pregnant Ewes. *CORNELL. VET.*, 58, 169-179.

Smith R.E., Reynolds I.M., Clark G.W. and Milbury J.A. (1970) Experimental Ovine Listeriosis. IV. Pathogenesis of fetal infection. *CORNELL. VET.*, 60, 450-462.

Soto Hernandez J.L., Nunley D., Gutierrez C.C., Berk S.L. and Berk M.D. (1988) *Listeria Monocytogenes* Peritonitis. *AM. J. GASTROENTEROL.*, 83 (2), 180-182.

Spitalny G.L. and North R.J. (1977) Subversion of Host-Defense Mechanisms by Malignant Tumors: An Established Tumor as a Privileged Site for Bacterial Growth. *J. EXP. MED.*, 145, 1264-1277.

Stöber M. (1985) Differential Symptomatology of Some Diseases of the Central Nervous System of Cattle. Listeriosis. *VET. MED. REV.*, 1, 3-9.

Stevenson M.M., Kongshavn A.L. and Skamene E. (1981) Genetic Linkage of Resistance to *Listeria monocytogenes* with Macrophage Inflammatory Responses. *J. IMMUNOL.*, 127 (2), 402-407.

Urbaneck D. (1962) Zur Neuropathogenese der Listeriose (Histologische Untersuchungen am N. trigeminus bei spontanen zerebraler Form der Listeriose erkrankten Schafen) *ARCH. EXP. VET. MED.*, 16, 61-80.

Urbaneck D. (1963) Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Haus- und Laboratoriumstieren. IV. Mitteilung: Versuche zur Klärung der Neuropathogenese der zentralnervösen Listerioseform bei Schafen durch Applikation von Listerien im Bereich der äu ßeren Haut und verschiedener Schleimhäute des Kopfes (paraneurale Infektion). ARCH. EXP. VET. MED., 17, 35-53.

Urbaneck D., Lehnert C., Rittenbach P., und Schleicher J. (1963) Morphologische und bakteriologische Befunde bei der spontanen Gehirnlisteriose der Schafe. ARCH. EXP. VET. MED., 17, 717-750.

Urbaneck D., Schleicher J., und Fuchs G. (1966) Ein Beitrag zur experimentellen Listeriose bei Haus- und Versuchstieren. IX. Mitteilung: Infektionsversuche an partiell neurektomierten Gehirnnerven bei Schafen. ARCH. EXP. VET. MED., 20, 1-22.

Vandegraaff R., Borland N.A. and Browning J.W. (1981) An outbreak of listerial Meningo-encephalitis in Sheep. AUST. VET. J., 57, 94-96.

Van Dissel J.T., Stikkelenbroeck J.J.M., Michel B.C., Van Den Barselaar M.T.H., Leijh P.C.J. and Van Furth R. (1987) Inability of recombinant interferon-Gamma to activate the antibacterial activity of mouse peritoneal macrophages against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. J. IMMUNOL., 139 (5), 1673-1678.

Van Ewijk W., Van Soest P.L. and Van Den Engh G.J. (1981) Fluorescence Analysis and Anatomic Distribution of Mouse T Lymphocyte Subsets Defined by Monoclonal Antibodies to the Antigenes Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, and T-200 J. IMMUNOL., 127, 2594-2604.

Van Kessel K.P.M., Antonissen C.J.M., Van Dijk H., Rademaker P.M. and Willers J.M.N. (1981) Interactions of Killed *Listeria monocytogenes* with the Mouse Complement System. INFECT. IMMUN., 34 (1), 16-19.

Van Rooijen N. (1987) The "in situ" Immune Response in Lymph Nodes: A Review. ANAT. REC., 218, 359-364.

Vazquez-Boland J.A., Dominguez L., Rodriguez-Ferri E.F. and Suarez G. (1989) Purification and Characterization of Two *Listeria ivanovii* Cytolysins, a Sphingomyelinase C and a Thiol-Activated Toxin (Ivanolysin O). INFECT. IMMUN., 57 (12), 1-8.

Volpe J.J. (1987) Neurology of the Newborn. (Second Ed.). ED. W.B. SAUNDERS COMPANY.

- Wentworth P.A. and Ziegler H.K. (1987a) The Antigenic and Mitogenic Response of Murine T and B Lymphocytes to Soluble Proteins of *Listeria monocytogenes*. *J. IMMUNOL.*, 138 (8), 2671-2678.
- Wentworth P.A. and Ziegler H.K. (1987b) Induction of Macrophage Ia Expression by Lipopolysaccharide and *Listeria monocytogenes* in Congenitally Athymic Nude Mice. *J. IMMUNOL.*, 138 (10), 3167-3173.
- West H.J. and Obwolo M. (1987) Bilateral facial paralysis in a cow with listeriosis. *VET. REC.*, 120, 204-205.
- Wing E.J., Waheed A. and Shadduck R.K. (1984) Changes in Serum Colony-Stimulating Factor and Monocytic Progenitor Cells During *Listeria monocytogenes* Infection in Mice. *INFECT. IMMUN.*, 45 (1), 180-184.
- Wirsing von König C.H. and Finger H. (1986) *Listeria monocytogenes* as a Model for Cell-Mediated Resistance to Infection. *ANN. IMMUNOL. HUNG.*, 26, 897-909.
- Wirsing von Koenig C.H., Heymer B., Hof H. and Finger H. (1983) Course of Infection and Development of Immunity in Experimental Infection of Mice with *Listeria* Serotypes. *INFECT. IMMUN.*, 40 (3), 1170-1177.
- Woan M.C. and McGregor D.D. (1981) T Cell-Mediated Cytotoxicity Induced by *Listeria monocytogenes*: I. Activation of *Listeria* Antigen-Responsive T Cells. *J. IMMUNOL.*, 127 (6), 2319-2325.
- Woan M.C. and McGregor D.D. (1984) The Mediators of Acquired Resistance to *Listeria monocytogenes* Are Contained within a Population of Cytotoxic T Cells. *CELL. IMMUNOL.*, 87, 538-545.
- Woan M.C., McGregor D.D. and Forsum V. (1981a) T Cell-Mediated Cytotoxicity Induced by *Listeria monocytogenes*: II. Specificity of Cytolytic Effector Cells. *J. IMMUNOL.*, 127 (6), 2325-2330.
- Woan M.C., McGregor D.D. and Goldschneider I. (1981b) T Cell-Mediated Cytotoxicity Induced by *Listeria monocytogenes*: III. Phenotypic Characteristics of Mediator T Cells. *J. IMMUNOL.*, 127 (6), 2330-2334.
- Woan M.C., McGregor D.D., Harris W.V. and Greiner D.L. (1986) Monoclonal antibody analysis of *Listeria monocytogenes*-induced cytotoxic lymphocytes. *IMMUNOL.*, 57, 505-513.
- Woan M.C., Sajewski D.H. and McGregor D.D. (1985) T-Cell co-operation in the mediation of acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. *IMMUNOL.*, 56, 33-42.

Wolf J.L. and Bye W.A. (1985) The Membranous Epithelial (M) Cell and the Mucosal Immune System. ANN. REV. MED., 35, 95-112.

Wood P.R., Spanidis V., Frangos K. and Cheers C. (1986) The In Vitro Bactericidal Activity of Peritoneal and Spleen Cells from Listeria-Resistant and Susceptible Mouse Strains. CELL. IMMUNOL., 99, 160-169.

Muilleret A., Després P., Monteiro L., Bouzakoura C.e.t. and Wildi E. (1969) Contribution à l'étude du diagnostic bacteriologique et histologique de la listériose à l'occasion d'une enzootie ovine. SCHWEIZER ARCH. TIERHEILK., 111, 622-641.

Yamamoto K., Kato K. and Kimura T. (1985) killed Listeria-induced suppressor T cells involved in suppression of delayed-type hypersensitivity and protection against Listeria infection. IMMUNOL., 55, 609-619.

Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T., Nomoto K. and Takeya K. (1980) Relationship between non-specific activity of macrophages and immune responses to *L. monocytogenes*. IMMUNOL., 40, 295-301.

Young A.M. and Cheers C. (1986) Colony-Forming Cells and Colony-Stimulating Activity during Listeriosis in Genetically Resistant or Susceptible Mice. CELL. IMMUNOL., 97, 227-237.

Zachar Z. and Savage D. (1979) Microbial Interference and Colonization of the Murine Gastrointestinal Tract by *Listeria monocytogenes*. INFECT. IMMUN., 23 (1), 168-174.

Ziegler K. and Unanue E.R. (1981) Identification of a Macrophage Antigen-Processing Event Required for I Region-Restricted Antigen Presentation to T Lymphocytes. J. IMMUNOL., 127 (5), 1869-1875.

Zinkernagel R.M., Althage A., Adler B., Blanden R.V., Davidson W.F., Kees U., Dunlop M.B.C. and Shreffler D.C. (1977) H-2 Restriction of Cell-mediated immunity to an Intracellular Bacterium. (Effector T Cells are Specific for *Listeria* Antigen in Association with H-2I Region-Coded Self-Markers.). J. EXP. MED., 145, 1353-1367.

8. ANEXOS

8.1. Fijador

8.1.1. Formol tamponado al 10%, pH 6.8-7.0 (Bancroft y Stevens, 1982)

Formalina al 40%	100 ml.
Agua destilada	900 ml.
Fosfato monosódico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 1\text{H}_2\text{O}$)	4 gr.
Fosfato disódico (PO_4HNa_2)	6.5 gr.

8.2. Adhesivos

8.2.1. Albúmina glicerinada de Mayer (Luna, 1968)

Clara de huevo	50 ml.
Glicerina	50 ml.
Timol	un cristal

Mezclar la clara de huevo y la glicerina y filtrar con un papel de filtro (Si se filtra al vacío se acelera el proceso). Añadir el cristal de timol y conservar a 4°C.

8.2.2. Solución de poli-L-lisina al 0.1% (Huang y col., 1983)

Poli-L-lisina hidrobromuro.....	10 gr.
(Peso molecular 70.000-150.000)	100 ml.

Conservar la solución a -20°C

8.3. Soluciones y colorantes utilizados en las técnicas histológicas de rutina

8.3.1. Hematoxilina de Mayer (Luna, 1968)

Cristales de hematoxilina	1 gr.
Agua destilada	1.000 ml.
Yodato sódico	0.2 gr.
Alumbre potásico ($\text{SO}_4\text{AlK} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	50 gr.
Ácido cítrico	1 gr.
Hidrato de cloral	50 gr.

Disolver el alumbre en el agua sin calentar. Añadir la hematoxilina y cuando este disuelta añadir el yodato sódico, el Ácido cítrico y el hidrato de cloral. Mantener en agitación hasta que esté bien disuelto.

8.3.2. Eosina al 1% (Modificado de Luna, 1968)

Eosina Y	1 gr.
----------------	-------

Agua destilada	100 ml.
Ácido acético	1-2 gotas

Mezclar todos los componentes y agitar.

8.3.3. Solución de Hucker - Conn (Bancroft y Stevens, 1982)

Cristal violeta	2 gr.
Etilanol 95%	20 ml.
Oxalato amónico	0,8 gr.
Agua destilada	80 ml.

Disolver el yoduro en 2-3 ml de agua y luego disolver los cristales de yodo. Añadir el resto del agua destilada.

8.3.4. Solución yodada de lugol (Bancroft y Stevens, 1982)

Yodo metálico	1 gr.
Yoduro potásico	2 gr.
Agua destilada	100 ml.

Disolver el cloruro potásico en 2-3 ml. de agua destilada y después añadir dos cristales de yodo metálico y diluir con el resto del agua destilada.

8.4. Soluciones y tampones para inmunohistología

8.4.1. Tampón tris-salino (TBS) 0.05M / pH 7.6

Solución madre (TB)

Tris (hidroximetil)-aminoetano	15.14 gr.
Agua destilada	152.5 ml.
Ácido clorhídrico 1N	115 ml.

Se ajusta el pH a 7.6 con el ácido clorhídrico de manera que conviene empezar a controlar el pH a partir de los 95 ml.

Solución de trabajo (TBS)

Tampón Tris (Solución madre)	100 ml.
Cloruro sódico 0.15M	900 ml.

8.4.2. Tampón imidazol 0.07M / pH 7.1

Imidazol	1.5 gr.
Ácido clorhídrico 1N	11.25 ml.
Agua destilada	336 ml.

Ajustar el pH, si es necesario, a 7.1

8.4.3. Solución inhibidora de la peroxidasa endógena
 {.....}

Metanol purísimo	236 ml.
Hidrógeno peroxido al 33% p/v.....	4 ml.

8.4.4. Solución de diaminobenzidina (DAB)
 (Graham y Karnovsky, 1966)

Tampón imidazol	240 ml.
3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro(DAB)	0.12 gr.
Peróxido de hidrógeno	84 ul.

Disolver el DAB en el tampón imidazol. El peróxido de hidrógeno se añade justo antes de emplear la solución.

8.5. Referencias del material utilizado

8.5.1. Reactivos

Acetona	Ref. 141007	(Panreac)
Ácido acético glacial	Cod. 131008	(Panreac)
Ácido cítrico.....	Cod. 403725	(Carlo Erba)
Ácido clorhídrico (1N).....	Cod. 181021	(Panreac)
Alcohol etílico	Cod. 131086	(Panreac)
Alcohol metílico purísimo ...	Cod. 131091	(Panreac)
Alumbre crómico	Art. 1036	(Merck)
Alumbre potásico.....	Art. 1047	(Merck)
Benceno	Cod. 131192	(Panreac)
Benzoato de metilo.....	Cod. 141949	(Panreac)
Cloruro sódico	Cod. 141659	(Panreac)
Cristales de Hematoxilina....	Art. 4305	(Merck)
Cristal violeta	Ref. 1408	(Merck)
DAB	D-5637	(Sigma)
(3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorot)		

Eosina amarilla	Art. 9093	(Merck)
Eukitt	Kindler GmbH y Co., Friburgo	
Fosfato monosódico	Cod. 131965	(Panreac)
Fosfato disódico	Cod. 131679	(Panreac)
Formaldehido al 40%	Art. 3999	(Merck)
Gelatina purísima	Cod. 142060	(Panreac)
Glicerina	Cod. 453751	(Panreac)
Hematoxilina de Mayer	Art. 4305	(Merck)
Hidrato de cloral	Art. 2425	(Merck)
Imidazol	Ref. 56750	(Fluka)
Oxalato amónico	Ref. 1192	(Merck)
Peroxido de hidrógeno	Cod. 141076	(Panreac)
Paraplast Plus	Ref. HRI 9685-502004 Monoject Scientific	
Poli-L-Lisina hidrobromuro ..	Ref. 1274	(Sigma)
Timol	Art. 8167	(Merck)
TRIS	Art. 8382	(Merck) (tris (hidroximetil)- aminoetano)
Xileno purísimo	Cod. 141769	(Panreac)
Yodo metálico	Ref. 455959	(Erba)
Yoduro potásico	Cod. 131542	(Panreac)
Yodato sódico	Art. 6525	(Merck)

8.5.2. Antisueros

Suero de conejo anti <i>L.monocytogenes</i> 1/2a ...	Fac. Vet. Madrid
Suero de conejo anti <i>L.monocytogenes</i> 3a	Fac. Vet. Madrid
Suero de conejo anti <i>L.monocytogenes</i> 4b	Fac. Vet. Madrid
Suero de conejo anti <i>L.ivanovii</i> 5	Fac. Vet. Madrid
Suero de cabra anti IgG de conejo	

GAR/IgG (Fc) Ref. N09-097 Nordic

Complejo peroxidasa antiperoxidasa de conejo

R/PAP Ref. N15-004 Nordic

8.5.3. Aparatos

Agitador magnético Selecta Mod. Agimatic S-243

Balanza de precisión Sartorius ... Mod. 1409 MP8

Congelador (-80°C)..... Revco Mod. ULT 1386

Congelador/Frigorífico..... New Pol..... Mod. NP 350

Estufa de 20-60°C Selecta Mod. S-207

Inclusor de parafina automático

British American Optical..... Mod. Histokinette

Microtomo de rotación Reichert-Jung. Mod. 1130/Biocut

pH-metro Crison Mod. micropH 2000

Pipetas de precisión Brand

Unidad formadora de bloques . Reichert-Jung. Mod. Histostat
0035 Buffalo



UNIVERSITAT AUTÒNOMA
DE BARCELONA

BIBLIOTECA

1108

REG. 199945

SIG. _____ REF. 125

