



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA



“DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN UN RODEO DE BOVINOS DE CARNE CON UN CASO DE LISTERIOSIS NERVIOSA”

Por

**MAURICIO GILES BICO
VICTOR SANTIAGO RODRIGUEZ OVIEDO**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requerimientos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias (Orientación Producción Animal).

MODALIDAD Estudio de Caso

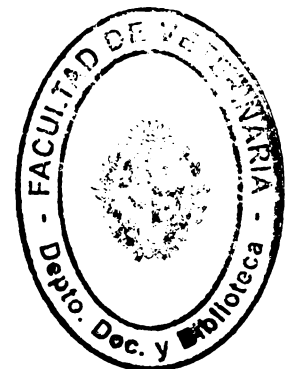
PAYSANDÚ

URUGUAY

2017

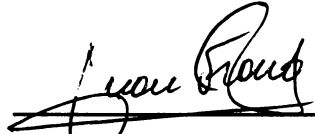


FV-33191



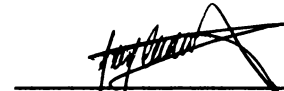
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dr. Juan Franco

Segundo Miembro (Tutor):




Dra. Carolina Matto

Tercer Miembro:



Dr. Javier García

Co-tutor:




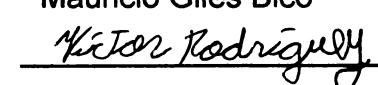
Dra. Lourdes Adrien

Fecha:

21/12/2017

Autores:



Mauricio Giles Bico


Víctor Santiago Rodríguez Oviedo

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A la Dra. Carolina Matto por aceptar ser nuestra tutora y guiarnos en este trabajo, dedicándonos tiempo y paciencia, así como apoyo académico para iniciarnos en el camino de la investigación.
- ✓ A la Dra. Lourdes Adrien por ser nuestra cotutora, dedicar su tiempo y conocimientos académicos los cuales nos permitieron poder avanzar con éxito en esta etapa.
- ✓ Al Dr. Rodolfo Rivero por permitirnos utilizar el Laboratorio DILAVE Paysandú para la realización de este trabajo, teniendo a completa disposición el uso de sus instalaciones, así como los materiales de laboratorio necesarios. También al resto del equipo que conforman un gran grupo de trabajo.
- ✓ A la Dra. Lucia Grille por sus consejos oportunos, así como su predisposición para ayudarnos en todo momento.
- ✓ Al Dr. Pablo Parodi por su constante apoyo y disposición.
- ✓ A familia Artia por abrirnos las puertas de su establecimiento para realizar este trabajo, así como toda la información requerida para el mismo.
- ✓ A la Br. Cyntia Artia, por ayudarnos en la toma de muestras y proporcionarnos datos concretos del establecimiento.
- ✓ Al Tec. Químico Marcos Schanzembach por ayudarnos en la traducción al inglés.
- ✓ A nuestra familia y amigos por brindarnos el apoyo en todo este proceso, el cual nos permitió culminar esta linda carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

1- RESUMEN	8
2- SUMMARY.....	9
3- INTRODUCCIÓN	10
4-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1 Caracterización de la producción bovina en Uruguay	12
4.2 Importancia de enfermedades nerviosas en los rumiantes.....	12
4.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
4.3.1 Historia.....	13
4.3.2 Descripción del agente	13
4.3.3 Patogenia	14
4.3.4 Factores de virulencia	15
4.4 Listeriosis en rumiantes	16
4.5 Enfermedad en humanos	19
4.6 Métodos diagnósticos	20
4.7 Control	20
5- OBJETIVOS.....	22
5.1 OBJETIVO GENERAL	22
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	22
6- MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Predio en estudio.....	23
6.2 Motivo de consulta.....	23
6.3 Muestreo del rodeo problema y del ambiente	24
6.4 Aislamiento microbiológico	25
6.4.1 Procedimiento.....	25
6.4.2 Identificación de cepas del género <i>Listeria</i>	25
6.5 PCR multiplex para determinación del perfil de serotipo.....	26
7- RESULTADOS.....	28
7.1 Caso clínico.....	28
7.2 Muestreo del rodeo problema y el ambiente	31
7.3 PCR multiplex para determinación del perfil de serotipo.....	31
8- DISCUSIÓN	32
9- CONCLUSIONES.....	36

INDICES DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1 Secuencias de los primers utilizados en PCR múltiple para determinación del perfil de serotipo de <i>L. monocytogenes</i>	27
Tabla 2: Resumen de aislamientos realizados por tipo muestra y especie del Género <i>Listeria</i>	31

FIGURAS

Figura 1: Patogenia de <i>Listeria monocytogenes</i>	15
Figura 2 Ubicación de Establecimiento Ñanderoga.....	23
Figura 3 Bovino, meninges congestivas de distribución difusa.....	29
Figura 4 Bovino, Obex: Manguitos perivascular, H&E 100X.....	30
Figura 5: Bovino, Bulbo: Microabsceso multifocales y manguitos perivascular, H&E 100X.	30
Figura 6: Bovino SNC (Puente). Inmunomarcación positiva a <i>L. monocytogenes</i> (áreas de color marrón) en el citoplasma de neutrófilos y linfocitos de un microabsceso, DAB, 400X.....	30
Figura 7: Bovino, Obex: Microabsceso multifocales, H&E 100X.	30
Figura 8: PCR Multiplex: Perfil de serotipo de los aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> obtenidos en el trabajo de tesis	32

1- RESUMEN

Listeria monocytogenes, es causante de una enfermedad relacionada al consumo de alimentos contaminados. Afecta gran número de especies, dentro de ellos se encuentran los rumiantes y el hombre. El objetivo de este trabajo fue confirmar la sospecha clínica de la enfermedad en un bovino con sintomatología nerviosa y detectar la presencia de portadores asintomáticos de *L. monocytogenes* en un rodeo de bovinos de carne. Así como la presencia de bacterias del genero *Listeria spp.* en alimentos y agua de bebida. El rodeo se encontraba pastoreando sobre un potrero de campo natural. Se realizó la necropsia de una vaca de cría que presentaba marcha en círculos constante, decúbito y muerte. En Sistema Nervioso Central se recuperaron colonias de *L. monocytogenes*, así como se observó meningoencefalitis supurativa con múltiples microabscesos en tronco encefálico e inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes*. En una segunda etapa se visitó el predio para coleccionar muestras de agua, pasturas y materia fecal de 27 vacas de cría que pertenecían al mismo rodeo donde se encontraba el animal enfermo para cultivo bacteriológico. Se detectaron dos vacas de cría que excretaban *L. monocytogenes* en materia fecal y seis vacas que excretaban *L. innocua*. En las muestras de pasturas no hubo aislamiento, mientras que en la muestra de agua de arroyo se recuperó *L. innocua*. El aislamiento de *L. monocytogenes* obtenido de SNC y uno de los recuperados en materia fecal de una vaca portadora asintomática se tipificaron como perfil de serotipo 4b, la restante se tipificó como perfil 1/2a. Estos serotipos coinciden con los más comúnmente reportados a nivel mundial en casos humanos y animales, así como en alimentos a nivel nacional. Se comprueba la presencia de *L. monocytogenes* en un caso clínico con sintomatología nerviosa, así como también se detectan vacas portadoras clínicamente sanas que excretan la bacteria en la materia fecal. En este caso no pudo determinarse la fuente de infección de los animales, pero el aislamiento de *L. innocua* en agua de bebida sugiere que esta podría ser la fuente ya que no se reportan diferencias en las condiciones de supervivencia a nivel ambiental. La presencia de bovinos portadores que excretan *L. monocytogenes* en materia fecal constituye un riesgo de contaminación de la carcasa por lo que es importante realizar control en la planta de faena.

2- SUMMARY

Listeria monocytogenes is the cause of a disease related to the consumption of contaminated foods. It affects a great number species such as ruminants and humans. The aim of this work was to confirm the clinical suspicion of the disease in a bovine with nervous symptoms and to detect the presence of asymptomatic carriers of *L. monocytogenes* in a herd of beef cattle. Additionally, feed and drinking water were analyzed for presence of bacteria of the *Listeria spp.* genera. The herd was found grazing over a paddock of natural grasslands. A necropsy was carried out on a cow that displayed circling, recumbency and died. *L. monocytogenes* were retrieved from its central nervous system. Suppurative meningoencephalitis with multiple microabscesses on the brainstem and *L. monocytogenes* positive immunostaining were found. At a second stage, a field trip to the farm was done to collect samples of water, pastures and feces from 27 cows that belonged to the same herd for bacteriological culture. Two cows that shed *L. monocytogenes* on fecal matter and six cows that shed *L. innocua* were detected. No isolation was obtained from samples of pastures, albeit *L. innocua* was retrieved from stream water sample. The isolates of *L. monocytogenes* obtained from the NCS and one retrieved from the fecal matter of an asymptomatic carrier cow were typified as the serotype 4b; the remaining one was typified as the 1/2a profile. These serotypes match up with the most commonly reported serotypes at a global level in human and animal cases, also in foods at a national level. It was proven the presence of *L. monocytogenes* in a clinical case with nervous symptomatology; also, clinically healthy carrier cows that shed the bacteria in feces were detected. In this instance, it could not be determined the source of the infection, but the isolate of *L. innocua* from drinking water suggests that it could be the source since there are no reports of differences in the survival conditions at an environmental level. The presence of bovine carriers that shed *L. monocytogenes* on fecal matter constitutes a risk of contamination of the carcass, therefore it is important to perform monitoring at the slaughter plant.

3- INTRODUCCIÓN

Uruguay forma parte de la principal región exportadora de alimentos del mundo, junto con Argentina, Brasil y Paraguay (Uruguay XXI, 2016). Tiene un reconocido prestigio internacional en el proceso productivo y la calidad de varios productos agropecuarios, teniendo una gran importancia social, económica y productiva. Históricamente ha sido un país ganadero principalmente bovino, con un sistema productivo sustentable, basado en animales que viven al aire libre durante todo el año, y que son alimentados en base a pasturas naturales. Este tipo de sistema posiciona a la carne proveniente de nuestro país como natural, altamente nutritiva y con un determinado margen de seguridad, dado por el sistema de trazabilidad, que permite conocer toda la información del producto desde el nacimiento del animal hasta que llega al consumidor final (Uruguay XXI, 2016). La carne bovina ha sido tradicionalmente el principal producto de exportación de Uruguay, pese a que en los últimos años las exportaciones de soja pasaron a liderar dicho ranking (Uruguay XXI, 2016). Contando al 2015 con un stock de bovinos de 11,9 millones, Uruguay se posiciona como uno de los 10 principales exportadores de carne bovina del mundo (DIEA, 2016). Otro factor de importancia es que nuestro país tiene un consumo per cápita de carne elevado (INAC, 2015; DIEA, 2016). Por ello las enfermedades que tienen impacto en la salud, en los animales como en el hombre cobran un rol esencial, dentro de ellas se encuentran las afecciones con sintomatología nerviosa. Este grupo importante de enfermedades que afectan a los bovinos, provocan grandes pérdidas económicas en todo el mundo (Glauco y col., 2010). A partir del diagnóstico de la Encefalopatía Espongiforme Bovina en 1986 y su asociación con la enfermedad del Creutzfeldt-Jakob (ECJ) en humanos, las enfermedades nerviosas cobraron mayor relevancia internacional dada las grandes pérdidas generadas en la producción bovina y el posible riesgo de zoonosis (Easton y col., 2012). Por lo tanto, estas enfermedades tienen importantes consecuencias políticas, económicas y sociales, generando requisitos de vigilancia epidemiológica a países exportadores, como lo es Uruguay (Easton y col., 2012).

Las principales enfermedades infecciosas en Uruguay que afectan el sistema nervioso central de bovinos son rabia, meningoencefalitis por *Herpesvirus bovino* (BoHV), listeriosis y fiebre catarral maligna (FCM) (Easton y col., 2009; Easton y col., 2012). Entre este grupo se encuentra *Listeria monocytogenes*, relacionado al consumo de alimentos contaminados. Afecta gran número de especies, como los bovinos y el

hombre, teniendo una amplia variedad de signos clínicos, los que en general son similares entre las especies afectadas (Oevermann y col., 2010). Se puede aislar de una gran variedad de ambientes tales como suelo, agua, pasturas, ensilaje, materia fecal de animales y del hombre.

Los rumiantes son una de las especies más susceptibles a la enfermedad (Oevermann y col., 2010). La principal presentación clínica es la rhombencefalitis, afección de localización en el tronco encefálico, otras presentaciones menos comunes son casos de entéritis, abortos, uveítis (Mohammed y col., 2010; Oevermann y col., 2010; García y col., 2013). El tratamiento no suele tener buenos resultado luego de que se constata la presencia de signos nerviosos (Radostits y col., 2002). En Uruguay la red de laboratorios de DILAVE "Miguel C. Rubino" del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca en el periodo 1997-2013 se registró 51 focos de listeriosis en rumiantes con sintomatología nerviosa.

En humanos la listeriosis se presenta asociado a brotes alimenticios de gastroenteritis, meningoencefalitis y/o aborto atribuidos al consumo de productos lácteos y cárnicos, entre ellos quesos blandos y carnes contaminadas con *L. monocytogenes*. Afecta principalmente a mujeres embarazadas, neonatos y adultos inmunocomprometidos (Swaminathan y col., 2007). En Europa se reportan 4 casos por millón en seres humanos con tasa de mortalidad 20-30% (Disson y col., 2012). En Uruguay en 2016 se reportaron 13 casos de listeriosis invasiva en humanos de los cuales 3 fallecieron (MSP, 2017). Su estado omnipresente sumado a su resistencia a condiciones adversas hace que se considere un importante patógeno para la industria alimenticia generando grandes problemas, tanto económicos como para la inocuidad (Vázquez-Boland y col., 2001).

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *L. monocytogenes* en un animal con sintomatología nerviosa compatible, así como portadores asintomáticos en un rodeo de bovinos de carne, pastoreando a campo natural. Además, detectar la presencia de bacterias del genero *Listeria* spp en el medio ambiente del predio.

4-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Caracterización de la producción bovina en Uruguay

El sector ganadero en Uruguay tiene gran importancia social, económica y productiva, obteniendo por exportaciones un ingreso de 1.467.078 millones de dólares en el año 2015. Este sector generó una producción de carne de 1105 mil toneladas, que provienen de 43.100 predios ganaderos, representando un 82,3% del total de los establecimientos (DIEA, 2016). De esta producción 84% se destina a la exportación (INAC, 2015). Lo cual demuestra que la producción uruguaya tiene una fuerte orientación hacia el mercado externo, siendo uno de los principales países exportadores de productos cárnicos de la región (Uruguay XXI, 2016). A su vez es importante resaltar que Uruguay tiene un elevado consumo de carne en su población, registrándose en el año 2015 un consumo per cápita de 98.7 Kgs/Hab/Año, dentro de este 57,6 Kgs son carne vacuna (INAC, 2015). Teniendo en cuenta esto último, la producción de carne constituye un largo proceso en el cual se inicia con los rodeos de cría y termina en la mesa familiar, resaltando la importancia de esta producción para nuestro país (Rovira y col., 1996).

4.2 Importancia de enfermedades nerviosas en los rumiantes

Los cuadros con sintomatología nerviosa componen un grupo importante de enfermedades que afectan a los bovinos, provocando grandes pérdidas económicas en todo el mundo (Glauco y col., 2010).

Cuando se menciona signos nerviosos como expresión clínica, se abarca una variada gama de signos muy diferentes que van desde temblores, cambios posturales o de comportamiento, ceguera e incoordinación hasta ataxia o parálisis. La etiología de estas enfermedades se suele dividir en cuatro grandes grupos: infecciosas, metabólicas, parasitarias y tóxicas (Odriozola y col., 2013).

Este tipo de enfermedades han cobrado importancia a partir de la década de los 80 con la aparición de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) (Wells y col., 1987) y posterior asociación a Creutzfeldt-Jacob en humanos (vCJD) (Will y col., 1996). Lo que acrecentó su importancia política, económica, social y de salud pública. Con esto, autoridades sanitarias internacionales están solicitando a los países exportadores de carne, como es el caso de Uruguay, que demuestren evidencias de que sus rodeos son libres de EEB.

Las principales enfermedades infecciosas en Uruguay que afectan el sistema nervioso central de bovinos son rabia, meningoencefalitis por *Herpesvirus bovinum* (BoHV), listeriosis y fiebre catarral maligna (FCM) (Easton y col., 2009; Easton y col., 2012).

4.3 *Listeria monocytogenes*

4.3.1 Historia

Listeria toma su nombre en reconocimiento al cirujano Británico Joseph Lister por sus grandes aportes a la medicina moderna (Fernández, 2006). Fue descrita por primera vez en 1926, en la universidad de Cambridge, por el equipo de Murray y colaboradores. La misma fue aislada de conejos de laboratorio, a este microorganismo se lo denominó *Bacterium monocytogenes*. En 1957 Heinz Seeliger le asigna el nombre como actualmente se la conoce (Orndorff y col., 2006).

4.3.2 Descripción del agente

El género *Listeria spp* junto al género *Brochothrix*, está provisoriamente asignado a la familia "*Listeriaceae*" dentro del Orden *Bacillales*, Clase *Bacilli*, Phylum *Firmicutes*. Son bacterias intracelulares, bacilos cortos gram-positivo, móviles, no formadora de espora, anaerobios facultativos. (Wellinghausen, 2011). Hasta el momento se han identificado 17 especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* (con dos subespecies *ivanovii* y *londoniensis*), *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. floridensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* (con una subespecie *coloradonensis*), *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. newyorkensis*, *L. booriae*, *L. riparia*, y *L. grandensis* (Orsi y Wiedmann., 2016).

Listeria monocytogenes es la especie que principalmente se asocia a enfermedad en animales y humanos (Vázquez-Boland y col., 2001), aunque también se han descrito casos de listeriosis con aislamiento de *L. innocua* (Walker y col., 1994; Hofer y Reis., 2005; Rocha y col., 2013; Favaro y col., 2014).

Tiene una amplia distribución ambiental siendo aislados en suelo, aguas de desecho fluvial, efluentes, materia fecal y plantas de tratamiento de aguas. Además, se puede encontrar en aves, pescados, moluscos, crustáceos, insectos, leche, productos cárnicos, frutas y vegetales (Vázquez-Boland y col., 2001; Lyautey y col., 2007; den Bakker y col., 2014; Linke y col., 2014).

Estas bacterias están adaptadas para sobrevivir al procesamiento de alimentos. Toleran altas concentraciones de cloruro de sodio (10% NaCl), pH relativamente bajos (4,5 a 9,0) y son capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, el rango de temperatura para su desarrollo es de 1°C a 45°C (Vázquez-Boland y col., 2001). Además, poseen la capacidad de persistir largos periodos de tiempo en medio ambiente llegando a estar 11 meses y medio en tierra húmeda, 2 años en tierra seca y hasta 16 meses en materia fecal bovina. Sumado a la capacidad de formar biofilm hace que se califiquen como una seria amenaza para la seguridad alimenticia (Radostits y col., 2002; Swaminathan y col., 2007).

Se describen 13 serotipos de *L. monocytogenes* basados en los antígenos somáticos "O" y flagelares "H" (Wellinghausen, 2011). De estos solo tres (1/2 a, 1/2 b y 4b) representan más del 90% de los casos de listeriosis en humanos y animales. Por ello en los focos de listeriosis no basta solo con determinar el serotipo, sino que es necesario realizar estudios de subtipificación bacteriana para realizar vinculaciones epidemiológicas (Vázquez-Boland y col., 2001). El serotipo 4b es el causante de más del 50% de los casos en todo el mundo (Vázquez-Boland y col., 2001). En alimentos las cepas predominantemente aisladas pertenecen a el serotipo 1/2 a. Se sugiere que cepas de *L. monocytogenes* serotipo 4b están más adaptadas a huéspedes mamíferos que las cepas 1/2 apoyando la idea que algunas cepas de *L. monocytogenes* pueden ser más patógenas que otras (Borucki y col., 2003).

Listeria monocytogenes consta de al menos 4 linajes evolutivos (I, II, III y IV), la mayoría de los aislamientos de *L. monocytogenes* parecen pertenecer a los linajes I y II, que albergan los serotipos más comúnmente asociados con los casos clínicos humanos y animales, incluyendo el serotipo 1 / 2a (linaje II) y los serotipos 1 / 2 b y 4b (linaje I). Las cepas de Linaje II son comunes en los alimentos (Borucki y col., 2003; Orsi y col., 2011).

4.3.3 Patogenia

El ingreso vía gastrointestinal, se considera que es el sitio principal de entrada de *Listeria* en el huésped (Oevermann y col., 2010), aunque tradicionalmente se creía que la vía de entrada se debía a la infección de las terminales nerviosas causadas por abrasiones de la mucosa, al consumir alimentos contaminados, permitiendo la invasión de *L. monocytogenes* al nervio trigémino y así llegar al tronco encefálico (Vázquez-Boland y col., 2001; Radostits y col., 2002; Oevermann y col., 2010). En

casos raros, la exposición directa de la piel a *L. monocytogenes*, por ejemplo, a través de material abortivo contaminado, puede conducir a infecciones cutáneas (Oevermann y col., 2010). Luego que la bacteria ingresa al tubo digestivo, a nivel del intestino delgado se trasloca a la lámina propia y llega por el sistema porta hepático al bazo e hígado. En este punto dependiendo del estatus inmunitario del huésped, los linfocitos CD8+ logran controlar y resolver la infección, o se produce una bacteriemia y posterior enfermedad (Orndorff y col., 2006). *L. monocytogenes* tiene predilección por la placenta y el SNC (órganos diana secundarios) que determina los principales síndromes clínicos. Se cree que esta predilección refleja la capacidad inherente de *L. monocytogenes* para invadir el cerebro por propagación hematógica o por migración axonal y la barrera placentaria, probablemente por la interacción de las internalinas bacterianas y sus receptores celulares (Oevermann y col., 2010).

Se estima que el 1 al 15% de la población mundial es portador asintomático de *L. monocytogenes* (Lopez y col., 2005; Larraín y col., 2008; Allerberger y Wagner, 2010; Sánchez y Palencia., 2010; Dias y col., 2012).

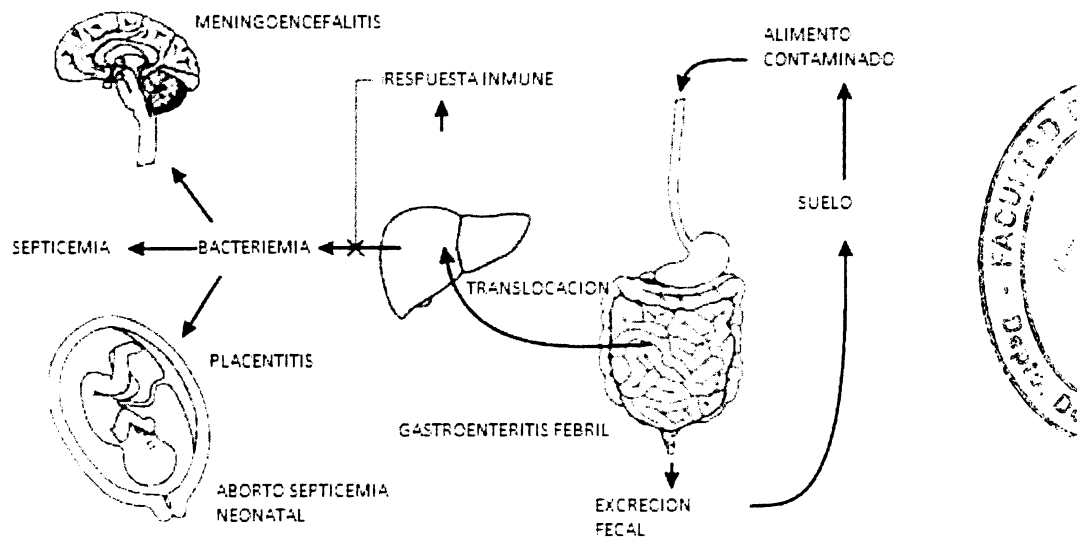


Figura 1: Patogenia de *Listeria monocytogenes* Tomado de Vázquez-Boland y col., 2001

4.3.4 Factores de virulencia

Este agente posee factores de virulencia que permiten la invasión, multiplicación y dispersión intracelular a nivel de las células del sistema inmune, así como también en células no fagocíticas como hepatocitos, enterocitos o células endoteliales. Estos

factores son Listeriolisina O y Fosfolipasas que intervienen en el escape de la vacuola; proteína ActA responsable de la motilidad intracelular; e internalinas A y B (*inlA* e *inlB*) que median la internalización bacteriana en células no fagocíticas (Vázquez-Boland y col., 2001; Orndorff y col., 2006).

Listeria monocytogenes tiene la capacidad de formar un conjunto de células asociadas a la superficie que están encerradas en sustancias poliméricas extracelulares hidratadas que pueden contener una o más de una comunidad de microbios (biofilm). El mismo no sólo funciona como una capa protectora frente al ambiente externo, sino también como una trampa para los nutrientes, causando muchos problemas en las industrias, por ejemplo, la contaminación microbiana en el equipo (Lee y col., 2013).

4.4 Listeriosis en rumiantes

En Uruguay el primer foco de listeriosis en rumiantes se reportó en el año 1960, donde se afectaron 54 ovinos que presentaron la forma nerviosa de la enfermedad (Leaniz y col., 1960).

Muchos trabajos han demostrado que los rumiantes sanos son portadores asintomáticos de bacterias del género *Listeria* incluidas cepas de *L. monocytogenes*, excretándolas por materia fecal (Skoovgard y Morgen., 1988; Unnerstad y col., 2000; Nightingale y col., 2004; Hofer y Reis., 2005; Esteban y col., 2009).

Esta enfermedad generalmente se presenta, relacionada al consumo de alimento contaminado con *L. monocytogenes* entre estos, uno de los descriptos con mayor frecuencia es el silo en mal estado, es decir con pH mayor a 4,5 y fermentación incompleta (Ribeiro y col., 2006; Odriozola, 2009; Mohammed y col., 2010; Oevermann y col., 2010; Pieruccion y col., 2017). Otros autores reportan casos donde no está relacionada con el consumo de ensilaje, siendo alimentados exclusivamente con pasturas sin ningún tipo de suplementación (Dutra, 2010; Rissi y col., 2010; Fairley y col., 2012; Margineda y col., 2012; Braz y col., 2017; Matto y col., 2017).

Dentro de los rumiantes, la especie bovina es la que tiene mayor prevalencia de animales portadores y dentro de estos los bovinos de leche (Nightingale y col., 2004; Esteban y col., 2009). La mayoría de los estudios han sido realizados en explotaciones lecheras, donde la prevalencia de portadores asintomáticos de *L. monocytogenes* sería de un 10% (Nightingale y col., 2004; Esteban y col., 2009; Latorre y col., 2009).

En bovinos de carne Mohammed y col. (2010), reportan que la prevalencia de portadores en materia fecal varía de 0 a 29%, teniendo un promedio de 3,4% en vacas y de 2,5% en terneros (Mohammed y col. 2010). En los feedlot describen una prevalencia más baja 0,3%. Otro estudio también en bovinos de carne realizado por Esteban y col. (2009) encontraron una prevalencia de 7,7%. La mayor prevalencia en los rodeos lecheros estaría explicada por mayor consumo de alimentos contaminados (Nightingale y col., 2004; Nightingale y col., 2005).

Al igual que en humanos, la enfermedad tiene una baja tasa de incidencia y generalmente se presenta de forma individual (Vázquez-Boland y col., 2001). Muchos autores especulan que para su presentación existen enfermedades subyacentes al igual que ocurre en humanos (Oevermann y col., 2010). Se han relacionado factores que pueden incidir en la presentación de la enfermedad, dentro de estos se encuentran, el mal estado nutricional, cambios bruscos de temperatura con frío y humedad alta. Estrés al final de la gestación y parto, transporte, periodos largos de inundaciones, con la coincidente escasez de alimento (Radostits y col., 2002). En cuanto a la época del año para su presentación se ha descrito una estacionalidad, concentrándose la mayoría de los casos en invierno y primavera (Radostits y col., 2002; Ribeiro y col., 2006; Rissi y col., 2010). En estudios realizados en nuestro país se reporta un comportamiento similar (Easton y col., 2009; Buroni, 2014).

Al igual que en humanos los serotipos más frecuentemente aislados en rumiantes pertenecen al linaje I y II, siendo el serotipo 4b responsable de la mayoría de los casos en bovinos y pequeños rumiantes, sugiriendo que estas cepas están más adaptadas a huéspedes mamíferos que las cepas 1/2a (Borucki y col., 2003; Nightingale y col., 2005).

La enfermedad generalmente ocurre en cinco presentaciones clínicas, de las cuales la encefalitis es la forma más común, seguida de abortos, mientras que la septicemia, mastitis y queratoconjuntivitis/ uveítis son de baja frecuencia (Oevermann y col., 2010). Las diferencias en las presentaciones clínicas pueden indicar diferente tropismo entre las cepas de *L. monocytogenes* (Guldimann y col., 2015). Estos síndromes raramente se superponen dentro del mismo animal o en el mismo rebaño. (Oevermann y col., 2010; Guldimann y col., 2015). La forma nerviosa caracterizada

por rhombencefalitis (es decir inflamación del tronco encefálico) es la presentación que se encuentra en la mayoría de los casos, por lo que *L. monocytogenes* debe considerarse potencialmente neurovirulenta, independientemente de su genotipo y fuente de aislamiento (Balandyté y col., 2011; Guldemann y col., 2015; Rocha y col., 2017). Por razones desconocidas, el período de incubación para la encefalitis es más largo en comparación con las otras formas clínicas (septicemia, aborto) y varía entre 1 y 7 semanas (Oevermann y col., 2010). Se caracterizan por lesiones unilaterales o bilaterales del tronco cerebral con repercusión en los pares craneanos. Las manifestaciones clínicas más comunes son los problemas masticatorios, falla en el cierre de la boca, hipoalgesia de la cara (afectación del par craneano V), caída unilateral de la oreja, del párpado superior y el labio (compromiso de par craneano VII), déficit palpebral y el reflejo amenaza (pares craneanos V y VII), problemas de deglución (pares craneanos IX y X), parálisis de la lengua (par craneano XII), marcha en círculos, inclinación de la cabeza y movimiento hacia un lado (sistema vestibular), nistagmo (par craneano VIII) y sialorrea (Oevermann y col., 2010). En la etapa terminal, los animales permanecen en decubito y pueden presentar convulsiones (Vázquez-Boland y col., 2001; Oevermann y col., 2010).

Al igual que en humanos se ha visto la forma entérica en rumiantes, aunque es poco común (Fairley y col., 2012; Garcia y col., 2013). La infección en rumiantes gestantes causa aborto, que ocurre predominantemente durante el último tercio de la gestación, y los fetos infectados generalmente desarrollan autólisis, bronconeumonía, hepatitis y esplenitis necrótica (Rocha y col., 2017).

El tratamiento en rumiantes tiene poco valor después de la aparición de signos neurológicos, pudiendo ser utilizados como profiláctico sulfonamidas, penicilina y tetraciclina, la adición de rifampicina es eficaz contra *L. monocytogenes* cuando se encuentra de forma intracelular. Sin embargo, la tasa de curación es baja luego del comienzo de los primeros signos clínicos (Radostits y col., 2002; Dhama y col., 2015).

En Uruguay la red de laboratorios de DILAVE "Miguel C. Rubino" del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, en el período 1997-2013 se registraron 51 focos de listeriosis en rumiantes con sintomatología nerviosa. La importancia de estos datos está subrayada por las pérdidas económicas significativas por la muerte de animales, el papel probable de los rumiantes como reservorio para las cepas patógenas

humanas y por lo tanto su impacto en la inocuidad de los alimentos (Oevermann y col., 2010; Balandyté y col., 2011).

4.5 Enfermedad en humanos

Listeriosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos con mayor tasa de mortalidad (media 30-40%) (Cartwright y col., 2013). En Europa se reportan 4 casos por millón y alrededor de 2500 casos por año en EEUU (Disson y col., 2012). Tiene una presentación clínica variable, desde una gastroenteritis febril autolimitada a cuadros invasivos potencialmente mortales como bacteriemia y meningitis en grupos de riesgo, incluyendo adultos mayores y pacientes inmunodeprimidos (Swaminathan y col., 2007; Allerberger y Wagner, 2010; Kramarenkoy col., 2013; Tejera y col., 2015). Las embarazadas infectadas con *L. monocytogenes* cursan un síndrome gripal o una infección asintomática, que puede resultar en aborto, parto prematuro, infección neonatal o muerte fetal (Cartwright y col., 2013). Pacientes enfermos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), son 100 a 1000 veces más propensos a contraer listeriosis en comparación con población normal, aunque curiosamente, ocurren en baja tasa, posiblemente asociado a los buenos planes de alimentación y terapias antimicrobianas preventivas. No obstante, aproximadamente el 20% de los casos de listeriosis pueden ocurrir en adultos sanos, no causando una enfermedad grave (Swaminathan y col., 2007; Allerberger y Wagner, 2010; Kramarenko y col., 2013). El 95% de los serotipos aislados en casos de seres humanos son 1/2b, 1/2a y 4b. Los reportes internacionales, asocian al serotipo 4b como responsable de la mayoría de estos casos (Santarum y col., 2012).

En Uruguay, en el año 2016 fueron reportados 13 casos de listeriosis invasiva en humanos de los cuales 3 fallecieron (MSP, 2017), normalmente se reportan 5 o 6 casos por año (Mota y col., 2016). Muchaamba y col., (2017) reportan 10 casos en Uruguay por dos cepas de patrones similares pertenecientes al serotipo 1/2b. Un estudio realizado por Braga y col. (2017) en nuestro país, coincide con que la mayoría de los aislamientos en alimentos pertenecen a linajes I y II, teniendo el 4b un predominio 5 a 1 en cuanto a los otros serotipos (1/2b, 1/2a). El 11,2% del total de los alimentos analizados fue positivo (Braga y col. 2017), esta cifra es menor con lo reportado en otros países, por ejemplo, en China con un 22% de aislamientos en

alimentos, del cual el 38% son alimentos congelados (Chen y col., 2015). En paralelo Braga y col., (2017) analizaron los casos clínicos graves en humanos, encontrando que más de la mitad de los casos fue producido por el serotipo 1/2b, seguidos por 4b y por último 1/2a, contraponiéndose a lo encontrado en otros países, en donde son producidos en su mayoría por cepas 4b (Braga y col., 2017).

Para el diagnóstico son útiles muestras como sangre, líquido cefalorraquídeo, placenta, lavados gástricos, son utilizadas para realizar aislamiento, el PCR se presenta como una alternativa rápida para la detección de *Listeria* a partir de muestras clínicas (Allerberger y Wagner, 2010).

4.6 Métodos diagnósticos

Dentro de los métodos diagnósticos se puede identificar el microorganismo mediante aislamiento en medios de enriquecimiento específicos para *Listeria* tanto para la forma nerviosa, septicémica y abortiva, además de la identificación a nivel histopatológico de lesiones características en tronco encefálico y la utilización de inmunohistoquímica para detección de *L. monocytogenes* en dichos cortes (Radostits y col., 2002).

Debido a que 3 serotipos de *L. monocytogenes* son los responsables de más del 90% de los casos en humanos y animales, para el estudio epidemiológico de la enfermedad es necesario subtipificar los aislamientos (Vázquez-Boland y col., 2001). Siendo la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) la técnica de subtipificación más comúnmente empleada y la que tiene un mayor poder discriminatorio (Tenover y col., 1995; Cardozo y col., 2013). Esta técnica hace posible comparar los resultados de diferentes estudios al tiempo que permite un contexto biológico para las relaciones filogenéticas o genéticas (Boruki y col., 2003).

4.7 Control

El control es difícil debido a la ubicuidad de la bacteria en el medio ambiente, falta de un método simple de identificar la presencia de contaminación por *Listeria* en el ambiente y una pobre comprensión de los factores de riesgo de infección (Fernández., 2010; Dhama y col., 2015). Teniendo en cuenta esto, es necesario emplear medidas que disminuyan la contaminación de alimentos, agua de bebida de animales, eliminación adecuada de materiales contaminados. Los animales no deben

alimentarse con alimentos en descomposición. El ensilado en mal estado no debería ser suministrado a los animales (Dhama y col.,2015).

En industria realizar implementación de buenas prácticas para la desinfección y eliminación del patógeno, pudiéndose utilizar amonios cuaternarios (QACs), aunque ya hay reportes de resistencia a los mismos (Mereghetti y col., 2000). Muchos factores pueden reducir el efecto de un desinfectante, siendo el más importante, la presencia de material orgánico y el crecimiento de biofilm. Una desinfección inadecuada puede producir resistencia al desinfectante como resultado de la selección o adaptación mediante exposición regular a concentraciones subletales (Aase y col., 2000; Mereghetti y col., 2000; Lundén y col., 2003). Por otra parte, la utilización de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas denominadas bacteriocinas, como el caso de pediocina y nisina han demostrado buenos resultados controlando al microorganismo (Dhama y col., 2015).

A nivel de elaboración de alimentos domestico el riesgo de contaminación cruzada puede reducirse al mantener los alimentos usados para cocinar lejos de los demás. Lavado de manos junto con cuchillos y tablas de cortar después del manejo de alimentos sin cocinar. Debe haber una orientación para Individuos de alto riesgo sobre una alimentación segura y saludable. Información específica sobre alimentos de alto riesgo que deben evitarse. La asesoría prenatal en la prevención de la listeriosis es esencial ya que muchas madres por lo general desconocen la enfermedad o medidas sobre cómo prevenirlas (Fernandez, 2006; Gandhi y col., 2007; Dhama y col., 2015).

En Uruguay la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos para consumo humano está regulada por el Reglamento Bromatológico Nacional (Decreto 315/994). La norma sólo hace referencia específicamente a chacinados y quesos, donde explicita ausencia de *L. monocytogenes* (n=5, c=0, m=0); para los demás alimentos se rige por ausencia de microorganismos patógenos (Uruguay, 1994). Además, los productos cárnicos listos para el consumo están regulados por la Norma Reglamentaria N° 1/2013 (Dirección General de Servicios Ganaderos, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). La misma establece un programa de control oficial para *L. monocytogenes* y *Salmonella* en alimentos cárnicos y un programa de autocontrol de las empresas para *L. monocytogenes* en el medioambiente. Recientemente se estableció otro

procedimiento para el monitoreo de *L. monocytogenes* en medio ambiente de establecimientos que elaboran alimentos de origen cárnico listos para el consumo, habilitados por la División Industria Animal para exportación a Estados Unidos (Resolución DGSG/Nº 098/16). Nuestro país registra un elevado consumo de lácteos en la población, donde en el año 2015, ascendió a 233 lts/año (DIEA, 2016). El 18% de este consumo proviene de leche o productos lácteos no industrializados, dónde el queso artesanal forma parte importante, conformando un riesgo elevado para la población ya que utiliza leche sin pasteurizar para su elaboración (E. Giannechini 2017 com. Pers.), posibilitando el crecimiento de *Listeria spp* (Allerberger y Wagner, 2010; Barneche y Villagrán, 2012).

5- OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de *L. monocytogenes* en un rodeo de bovinos de carne con un caso sospechoso de listeriosis nerviosa y en el ambiente del establecimiento.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Recabar datos epidemiológicos, clínicos y patológicos del caso clínico, así como del rodeo y del predio.
- En animales con sintomatología clínica compatible con listeriosis realizar estudios bacteriológicos e histopatológicos para confirmar o descartar la sospecha.
- Detectar la presencia de bovinos portadores asintomáticos que excreten *L. monocytogenes* por materia fecal en el rodeo problema.
- Detectar *L. monocytogenes* en el ambiente (alimentos y agua de bebida), donde se encuentra el rodeo problema.
- Caracterizar los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos en cuanto a serotipo.

6- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Predio en estudio

El estudio del caso se realizó en el establecimiento “Ñanderoga”, de orientación agrícola-ganadera, dedicado a la cría bovina con 614 hectáreas, ubicado en las coordenadas (32°01'45" S, 57°25'17" W) dentro de la 8ª sec. Policial del Departamento de Paysandú.



Figura 2 Ubicación de Establecimiento Ñanderoga.

El caso se presentó en un potrero de 100 hectáreas de campo natural con 70 vacas de cría preñadas, algunas con cría al pie, ovejas y caballos. Las mismas se encontraban pastoreando en campo natural, sin recibir suplementación. El agua de bebida se obtenía del arroyo Gualeguay.

6.2 Motivo de consulta

El 29 de setiembre de 2016 el Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino”, recibió una consulta por un bovino hembra, raza Hereford, ocho dientes, con ternero al pie. La vaca presentaba marcha en círculos constantes, no podía alimentarse, ni tomar agua, el animal no fue tratado. Posteriormente adopta posición de decúbito

permanente y horas más tarde, muere. No se constató dentro del rodeo otro animal afectado.

El 30 de setiembre de 2016 se visitó el predio y se realizó la necropsia.

Durante la necropsia se colectaron muestras (1cm x 1cm) de todos los órganos parenquimatosos y se sumergieron en formol bufferado al 10%. Se extrajo sistema nervioso central (SNC) que se dividió en 2 mitades, una se colocó en formol y la otra en bolsa estéril refrigerada para aislamiento bacteriológico.

6.3 Muestreo del rodeo problema y del ambiente

Nueve días después, se concurreó al predio a extraer muestras de materia fecal de bovinos (vacas de cría) que se encontraban pastoreando junto al animal enfermo, de pasturas del potrero y del agua de bebida.

Para el cálculo de la cantidad de animales que se debían muestrear para detectar portadores asintomáticos, se utilizó la fórmula de Dohoo y col., (2003)

$$n = (1 - (1 - \alpha)^{1/D}) \times (N - (D - 1) \div 2)$$

$$n = (1 - (1 - 0,95)^{1/0,1}) \times (70 - (0,1 - 1) \div 2)$$

Donde:

n= tamaño de la muestra

α = nivel de confianza (0,95)

D= número de animales portadores en la población 10%(0,1)

N=tamaño de la población. (70)

Para este cálculo se asumió en base a la bibliografía (Nightingale y col., 2004; Esteban y col., 2009; Latorre y col., 2009) que la prevalencia de portadores en el rodeo es del 10%, con un intervalo de confianza de 95% y que la sensibilidad de la prueba (aislamiento en este caso) es del 90%, obteniéndose un número (n) de 27 animales a muestrear.

La elección de las vacas de cría a muestrear fue aleatoria. La materia fecal se tomó del recto de cada animal con guante individual y se depositó en bolsas plásticas estériles individuales.

Se tomó una muestra de agua del arroyo Gualeguay que corre por el potrero. Para la recolección de esta muestra se sumergió un frasco estéril con tapa a rosca, allí se abrió la tapa y se cerró antes de sacarlo al exterior.

Se colectaron dos muestras de pastura (campo natural) del potrero donde se encontraba el animal afectado. Para la toma de muestras, se recorrió el potrero, colectando el forraje en 10 puntos distintos determinados aleatoriamente. El mismo se encontraba a una distancia de 5 cm del suelo, no incluía raíces, materia fecal, ni restos de suelo.

Luego, cada muestra fue identificada y se mantuvo refrigerada en conservadoras a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

6.4 Aislamiento microbiológico

6.4.1 Procedimiento

Esta actividad se realizó en la sección Bacteriología del Laboratorio Regional Noroeste. El procesamiento de las muestras de agua, pasturas, SNC, materias fecales se realizó siguiendo el protocolo de Nightingale y col., (2004) y USDA (2013).

La mitad del SNC, 25 g de cada muestra de materia fecal o pastura y 25 mL de agua se colocaron en bolsas estériles Stomacher (Stomacher®, UK). A cada muestra se le agregó asépticamente 225 mL de caldo de enriquecimiento *Listeria* (Oxoid®, UK). Las muestras se homogeneizaron durante 30 segundos a 200 rpm en Stomacher Circulator 400 (Stomacher®, UK) y se incubaron durante 24 horas en aerobiosis a 30°C en estufa. Al día siguiente se transfirió asépticamente una alícuota de 100 µL a 10 mL de caldo de enriquecimiento secundario FRASER (Oxoid®, UK) incubándose por otras 24 horas en aerobiosis a 30°C. Luego se sembraron 100 µL de FRASER en placa de agar Oxford Modificado (Oxoid®, UK). Las placas se incubaron a 35°C, en aerobiosis durante 48 horas. A las 24 y 48 horas fueron inspeccionadas para detectar crecimiento bacteriano.

6.4.2 Identificación de cepas del género *Listeria*

Las colonias con morfología sospechosa en agar Oxford Modificado: blancas, pequeñas y rodeadas de un halo marrón negruzco (hidrólisis de la esculina) fueron repicadas en placas de agar sangre ovina al 7% y se incubaron 24 horas a 37°C en estufa. Sobre las colonias sospechosas de *Listeria* (blancas, pequeñas) se realizaron las siguientes pruebas para la identificación de especies:

- Tinción de Gram
 - Prueba de catalasa
 - Presencia/ausencia de un halo estrecho de β hemólisis
 - Producción de ácido a partir de D-glucosa, L-ramnosa, manitol y D-xilosa
 - Test de CAMP con *Staphylococcus aureus* (productor de β -lisina) aislado en el área bacteriología del Laboratorio Regional Noroeste y *Rhodococcus equi* ATCC 6939.
- Las colonias identificadas como *L. monocytogenes* fueron remitidas a la sección Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene “Prof. Arnoldo Berta” Facultad de Medicina, Universidad de la República, para la realización de estudios moleculares.

6.5 PCR multiplex para determinación del perfil de serotipo

Las pruebas de PCR para determinar perfil de serotipo se realizaron entre junio y agosto de 2017. Se utilizó un procedimiento de PCR múltiple para diferenciar los cuatro grupos de serovares más importantes de *Listeria monocytogenes*: 1/2a; 1/2b; 1/2c y 4b, según técnica descrita por Doumith y col., (2004).

Para la extracción de ADN las cepas de *L. monocytogenes* se sembraron en placas de agar infusión cerebro corazón (BHIA) y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se tomaron 3 a 5 colonias de idéntica morfología con ansa descartable y se resuspendieron en 50 μ l de solución de lisis (dodecil sulfato de sodio al 0,25% y NaOH 0,05 N). La suspensión se incubó a 99°C durante 15 minutos, se agregaron 100 μ l de agua ultrapura tipo MilliQ a cada tubo y se centrifugaron a 12.000 rpm por 10 minutos. Cada sobrenadante se conservó a -20°C hasta su utilización como molde (2 μ l) en las distintas reacciones de amplificación.

Como controles se incluyeron las siguientes cepas de referencia: *L. monocytogenes* serotipo 1/2a (CIP 89381), *L. monocytogenes* serotipo 1/2b (CIP 90602), *L. monocytogenes* 1/2c (CIP 89756) y *L. monocytogenes* serotipo 4b (CIP 88868).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo 1,25 U de Taq DNA polimerasa, 0.2 mM de cada dinucleótido trifosfatado (dNTP's), y 50 mM Tris-HCl–10 mM KCl–50 mM (NH₄)₂SO₄ –2 mM MgCl₂ por tubo, a pH 8,3. Los cinco sets de primers se utilizaron a las siguientes concentraciones finales: 1 μ M para el *L. monocytogenes* o0737, ORF2819 y ORF2110; 1.5 μ M para *L. monocytogenes* o1118; y 0.2 μ M para *prs*

Para las reacciones de amplificación se utilizó un termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems®, EEUU) y el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos; seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 53°C por 75 segundos y 72°C por 75 segundos cada uno; con un ciclo de extensión final de 72°C durante 7 minutos.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis sumergida en geles de agarosa al 2%. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 100V y 40 mA en buffer TBE 0,5X (90 mM base Trizma, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA a pH 8.3) durante al menos 1 hora. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µl/ml) durante 15 minutos, se destiñeron con agua destilada durante 20 minutos, se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

Tabla 1 Secuencias de los primers utilizados en PCR múltiple para determinación del perfil de serotipo de *L. monocytogenes*.

Gen objetivo	Secuencia Primer (5'-3')a	Tamaño producto (pb)	Especificidad serovar	Proteína codificada por gen objetivo
lmo 0737	For:AGGGCTTCAAGGACTTACCC Rev:ACGATTTCTGCTTGCCATCC	691	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a; 1/2c; 3a y 3c	No conocida, sin similaridad
lmo1118	For:AGGGGTCTTAAATCCTGGAA Rev:CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c y 3c	No conocida, sin similaridad
ORF 2819	For:AGCAAAATGCCAAAACCTGT Rev:CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	Supuesto regulador transcripcional
ORF 2110	For:AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev:CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	<i>L. monocytogenes</i> 4b, 4d y 4e	Supuesta proteína
prs	For:GCTGAAGAGATTGCGAAAGAG Rev:CAAAGAACCTTGGATTTGCGG	370	Todas las especies de <i>Listeria</i>	Supuesta Fosforibosil Pirofosfato sintetasa

For: forward; Rev: reverse

Tomado de: Doumith y col., (2004).

6.6 Histopatología e inmunohistoquímica de sistema nervioso central

Se realizó en la sección Patología del Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino". Se tomaron muestras representativas de las principales regiones anatómicas del sistema nervioso central: corteza frontal, corteza parietal, corteza

occipital, corpus striatum, tálamo, mesencéfalo, puente, cerebelo y obex que fueron fijadas en formol bufferado al 10% y procesadas en forma rutinaria para estudio histopatológico, cortadas a 5 micras de espesor y coloreadas por Hematoxilina y Eosina (H&E). La inmunohistoquímica se realizó siguiendo el protocolo de Easton y col., (2012). Los cortes de tronco encefálico se desparafinaron de forma rutinaria y se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 10% en metanol durante 15 minutos. Luego se lavaron con agua destilada y se sumergieron en leche descremada al 5% por 25 minutos. Se lavaron nuevamente y se incubaron con el anticuerpo primario *Listeria monocytogenes* (Difco®, EEUU) a una dilución de 1/200 durante una hora a 37°C. Luego se incubaron con el anticuerpo secundario (LSAB) (Dako®, EEUU) 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente y se sumergieron en streptavidina-Peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dako®, EEUU) otros 20 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado de la reacción se incubaron las láminas con solución cromógena DAB (Dako®, EEUU) durante 5 a 10 minutos y como contraste se utilizó Hematoxilina de Harris. Los cortes se deshidrataron rutinariamente y se montaron para su observación al microscopio.

7- RESULTADOS

7.1 Caso clínico

El animal presento en la necropsia realizada mucosas oculares congestivas. En cavidad abdominal se observó intestino delgado y grueso con escaso contenido. Al corte de los preestómagos no se observaron lesiones de significación. El hígado presentaba escasos trayectos fibrosados. En cavidad torácica destacaban áreas enfisematosas en ambos pulmones. En la apertura de cavidad craneana se observó meninges congestivas (Figura 3):

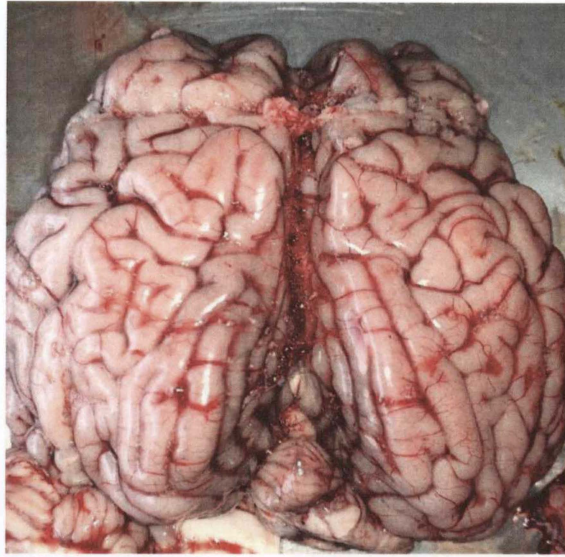


Figura 3 Bovino, meninges congestivas de distribución difusa

En los estudios bacteriológicos realizados, en el SNC se aislaron colonias de *Listeria monocytogenes*.

En el estudio histopatológico del SNC se observó a nivel de tronco encefálico (puente, bulbo raquídeo y obex) severa rhombencefalitis caracterizada por meningitis supurativa moderada, difusa; múltiples manguitos perivasculares compuestos por células mononucleares; presencia de múltiples microabscesos y focos de malacia (Figura 4, 5 y 7). En la inmunohistoquímica se observó inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes* en el citoplasma de neutrófilos y linfocitos de múltiples microabscesos (Figura 6).

En la histopatología en el resto de los órganos se observó en intestino delgado enteritis eosinofílica discreta difusa, en intestino grueso colitis eosinofílica difusa discreta, presencia de granulomas en submucosa con formas parasitarias de tipo nemátodo. Pulmón con neumonía intersticial difusa discreta, con áreas enfisematosas. En riñón degeneración tubular discreta, difusa. En hígado degeneración grasa multifocal, moderada fibrosis periportal.



Figura 4 Bovino, Obex: Manguitos perivascular, H&E 100X.



Figura 5: Bovino, Bulbo: Microabsceso multifocales y manguitos perivascular, H&E 100X.

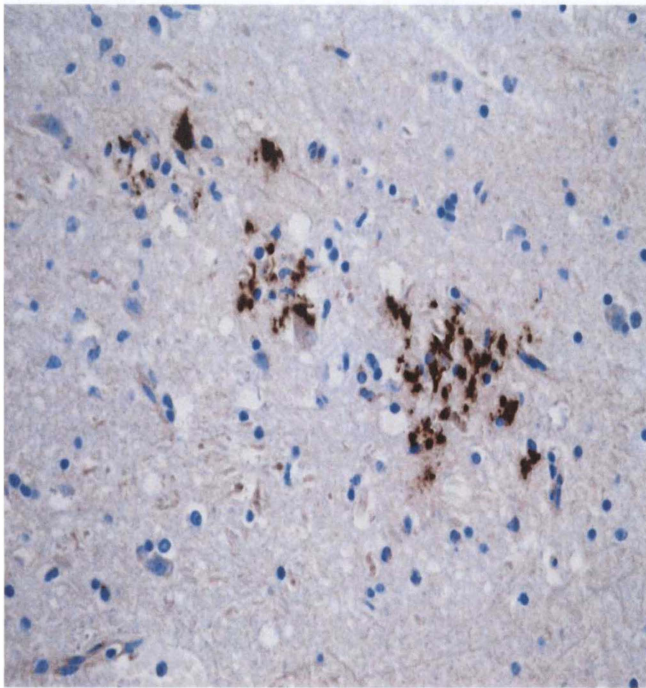


Figura 6: Bovino SNC (Puente). Inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes* (áreas de color marrón) en el citoplasma de neutrófilos y linfocitos de un microabsceso, DAB, 400X.

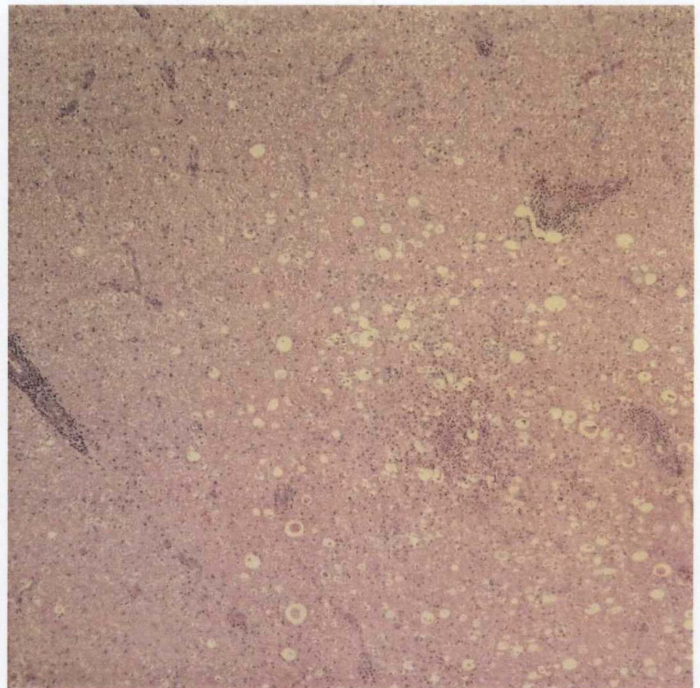


Figura 7: Bovino, Obex: Microabsceso multifocales, H&E 100X.

7.2 Muestreo del rodeo problema y el ambiente

Se realizaron 30 cultivos correspondiendo a 1 muestra de agua, 2 muestras de pasturas y 27 muestras individuales de materias fecales de vacas. Se aislaron 2 cepas de *Listeria monocytogenes* (6,6 %) y 7 de *Listeria innocua* (23,3 %) (Tabla 2). En la muestra agua se recuperó *Listeria innocua*. En las muestras de pasturas no se aislaron bacterias del genero *Listeria*. De las 27 muestras de materia fecal, hubo aislamiento de *L. innocua* en 6 (22,2%) de ellas, mientras que 2 (7,4%) fueron positivo para *L. monocytogenes*.

Tabla 2: Resumen de aislamientos realizados por tipo muestra y especie del Género *Listeria*.

	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Negativo</i>	<i>Total</i>
Agua	1	0	0	1
Pastura	0	0	2	2
Materia fecal	6	2	19	27
Total	7	2	21	30

7.3 PCR multiplex para determinación del perfil de serotipo

El aislamiento obtenido del sistema nervioso central se tipifico como perfil de serotipo 4b, así como uno de los aislamientos de materia fecal. El otro aislamiento obtenido de materia fecal se tipifico como perfil 1/2a (Figura 8):

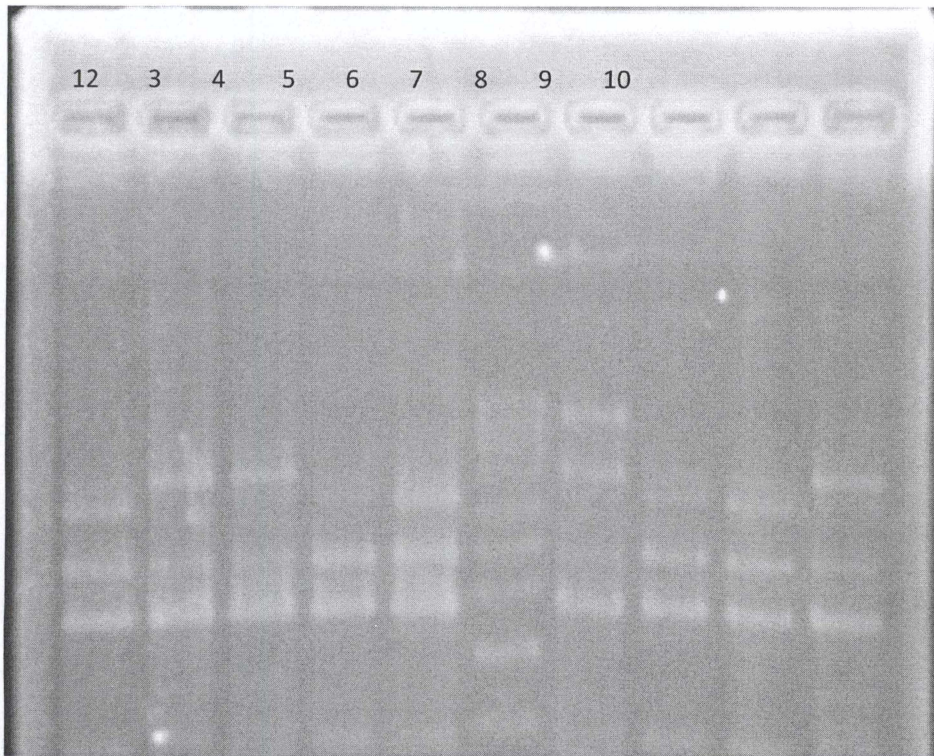


Figura 8: PCR Multiplex: Perfil de serotipo de los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenidos en el trabajo de tesis. Línea 1: *L.monocytogenes* recuperada del sistema nervioso central. Línea 2: Control positivo de serotipo 1/2a. Línea 3: *L.monocytogenes* recuperada de materia fecal bovina portador. Línea 4: Control positivo de serotipo 1/2b. Línea 5: *L.monocytogenes* recuperada de materia fecal bovina portador. Línea 6: Marcador molecular. Línea 7: Control positivo serotipo 1/2c. Línea 8: Control positivo de seotipo 4b. Línea 9: Control positivo de serotipo 4b. Línea 10: Control positivo de serotipo 1/2a.

8- DISCUSIÓN

Se confirmó la sospecha clínica de listeriosis nerviosa en una vaca de cría con ternero al pie, no observándose abortos en el rodeo. Este es el primer reporte de la enfermedad en ganado de carne en Uruguay, ya se ha descrito en ovinos (Leaniz y col., 1960; Dutra y col., 2010) y en bovinos de leche (Matto y col., 2017). El aislamiento en SNC se asoció a las lesiones histológicas y la marcación inmunohistoquímica observado en tronco encefálico. La rhombencefalitis es la forma más común de listeriosis en rumiantes (Oevermann y col., 2010). En Uruguay *L. monocytogenes* es uno de los principales agentes causales de encefalitis en bovinos (Easton y col., 2012). Teniendo en cuenta que solo enfermó un bovino en un total de 70 que formaban el rodeo, se sospecha que ese animal presentaba alguna afección que lo hizo susceptible a la infección, debido a que este agente es un patógeno oportunista

(Vázquez-Boland y col., 2001; Oevermann y col., 2010), esto no pudo determinarse en los estudios realizados. Se ha reportado que los casos de listeriosis en rumiantes tienen una mayor prevalencia en invierno e inicio de la primavera, debido a una mayor excreción fecal del agente y en consecuencia mayor contaminación ambiental (Nightingale y col., 2005), coincidiendo con los hallazgos de este trabajo.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue detectar animales clínicamente sanos de *L. monocytogenes* en el rodeo. Si bien existe variación diaria en la liberación de *L. monocytogenes* en heces, el muestreo de un único día sirve para tener conocimientos si la bacteria está circulando en el rodeo (Esteban y col., 2009). Se encontraron dos vacas de cría portadores asintomáticos de *L. monocytogenes* dentro del rodeo. Esto representa un riesgo, ya que permitiría la amplificación y dispersión del agente a través de la excreción fecal, perpetuando el ciclo de transmisión de la bacteria en medio ambiente (Ivanek y col., 2006; Balandyté y col., 2011). En un estudio realizado por Nightingale y col. (2004) reporta que en todos los predios (bovinos, ovinos y caprinos) con casos de listeriosis la prevalencia de *L. monocytogenes* en ambientes y animales fue significativamente mayor. En los predios con casos se detectó mayor prevalencia de bovinos portadores asintomáticos que en los predios control. Esteban y col. (2009) en un muestreo en el País Vasco reportaron una prevalencia en bovinos lecheros portadores de 5,1% a 72% y de 7,7% para ganado de carne. Mohammed y col. (2010) describen una prevalencia de portadores de 3,4 % en establecimientos ganaderos y 0,3 % en feedlot, siendo este trabajo uno de los pocos realizados en este tipo de explotaciones. Se detectaron 6 vacas de cría que excretaban *L. innocua* en materia fecal, aunque es una especie clasificada como no patógena, se han reportado casos de listeriosis nerviosa en humanos y rumiantes (Walker y col., 1994; Rocha y col., 2013; Favaro y col., 2014).

Este caso se presentó en un bovino alimentado a campo natural, sin la administración de ensilado ni suplementos. En la bibliografía esta enfermedad se asocia al consumo de ensilado en mal estado (Nightingale y col., 2004; Ribeiro y col., 2006). En Uruguay el pastoreo en los establecimientos ganaderos es principalmente a campo natural superando el 90% de la superficie (Rovira, 2012). En Nueva Zelanda, Argentina y Uruguay se han comunicado casos de listeriosis en rumiantes asociados a condiciones de pastoreo (Dutra y col., 2010; Fairley y col., 2012; Braz y col., 2017;

Matto y col., 2017). En focos de listeriosis en rumiantes reportados por Wiedmann y col. (1994) y Yoshida y col. (1998), las fuentes de contaminación para los animales tampoco fueron los ensilados, aunque no se pudo determinar la causa. En la base de datos del Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino" entre los años 2013 a 2017 registro 16 focos de listeriosis en rumiantes, donde en 9 se encontraban alimentándose exclusivamente a pastoreo, sin la administración de ensilados ni suplementos.

En el presente estudio no se detectó en las muestras de pasturas analizadas, esto podría explicarse debido a que la pastura no fue la fuente de infección o que no se tomaron la cantidad de muestras suficientes del potrero problema. Mohammed y col., (2010) encontrón que el 28% de los predios analizados presentaban al menos una muestra positiva de *L. monocytogenes* en pasturas, dentro de esta muestra se reportó una prevalencia de 5,3%. Se detectó la presencia de *L. innocua* en muestra de agua del arroyo, este hallazgo podría indicar una posible fuente de infección, debido a que *L. innocua* tiene condiciones similares de supervivencia en medio ambiente que *L. monocytogenes*, siendo capaz de sobrevivir a condiciones extremas (altas y bajas temperaturas, niveles elevados de pH y concentraciones de cloruro de sodio), pero generalmente se considera no patógeno (Rocha y col., 2013; Favaro y col., 2014). Lyautey y col., (2007); den Bakker y col., (2014); Linke y col., (2014) en agua fluviales han recuperado especies no patógenas como *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. floridensis* *L. aquatica*, entre otras, así como también especies patógenas como *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*. Stea y col. (2015) en Canadá encontraron *Listeria spp* en 35 % de muestras de agua de cuencas urbanas y 72,1% en áreas rurales. Estos autores concuerdan que el agua constituye posibles fuentes de infección para humanos y animales.

De los tres aislamientos de *L. monocytogenes*, el caso clínico y un portador asintomático fueron tipificados como perfil de serotipo 4b y la restante (portador asintomático) como 1/2a. Estos serotipos se encuentran entre los más frecuentemente aislados en humanos y animales (Borucki y col., 2003). El serotipo 4b es frecuente en focos de listeriosis en humanos a nivel mundial, tiende a producir brotes y casos severos de la enfermedad, así como también se asocia la forma nerviosa en rumiantes (Vázquez-Boland y col., 2001; Oevermann y col., 2010). En Uruguay, el serotipo 4b ocupa el segundo lugar de frecuencia como agente de patologías en seres humanos

(Mota y col., 2016; Braga y col., 2017). Por otro lado, Nightingale y col. (2004) observaron mayor prevalencia del serotipo 1/2a en rumiantes clínicamente sanos. La presencia del serotipo 1/2a circulando en los animales y ambiente de los predios, constituye además un riesgo importante para la contaminación de los productos de origen animal. Este serotipo tiene mayor capacidad de adherirse a superficies inertes como acero inoxidable y formar biofilms, contaminando el ambiente de las industrias procesadoras y los alimentos (Borucki y col., 2003; Orsi y col., 2011). Varios autores reportan que el serotipo 4b demostró tener una mayor patogenicidad cuando se transfirió del almacenamiento en frío a la temperatura corporal (37°C) que los aislamientos de serotipo 1/2a, lo que explicaría por qué la mayoría de los casos clínicos se relacionan al serotipo 4b a pesar que en alimentos es más prevalente el serotipo 1/2a (Buncic y col 2001., Mereghetti y col., 2000). Sería importante realizar estudios de subtipificación mediante el uso de la electroforesis de campo pulsado (PFGE) para determinar el relacionamiento epidemiológico entre los aislamientos obtenidos de animales portadores y el caso clínico.

En un estudio realizado en Uruguay en alimentos se encontró que el 87% de las *L. monocytogenes* analizadas corresponden a los serotipos 1/2b y 4b. A diferencia de lo que ocurre en algunos países del hemisferio norte, *L. monocytogenes* serotipo 4b parece ser más prevalente en alimentos en países de América del Sur, incluido Uruguay, este serotipo puede tener una mayor tendencia a causar brotes cuando están presentes en los alimentos (Braga y col., 2017). En nuestro país como en otras partes del mundo los casos graves de listeriosis en los humanos se han atribuido a serotipos 1/2a, 1/2b y 4b (Braga y col., 2017).

El hecho de detectar bovinos portadores asintomáticos que excreten *L. monocytogenes* en materia fecal tendría repercusión a nivel de la industria de la carne, ya que en el proceso de faena a través de cueros contaminados con materia fecal se podría contaminar la canal (Cernicchiaro, 2016). Otras posibles fuentes de contaminación se producirían por intestinos rotos, contenido del estómago que fluye a través del esófago después de la eliminación de la cabeza, contaminación de los equipos en las plantas procesadoras, permitiendo que la carga microbiana permanezca en la superficie de las canales (Gallego y col., 2005; Cernicchiaro, 2016). Como ya se mencionó, esta bacteria tiene la capacidad de tolerar altas concentraciones de sal, pH entre 4,5 y 9, temperaturas de 1 a 45°C (Vázquez-Boland)

col., 2001). Además, puede producir una matriz extracelular polimérica (biofilm), que la hace persistente en el ambiente, resistente a la desecación, rayos UV, tratamientos con antibióticos y agentes sanitizantes (Boruki y col., 2003). Estas características hacen que *L. monocytogenes* colonice y sobreviva dentro de las plantas elaboradoras de alimentos, constituyendo un riesgo de contaminación de la carcasa (Boruki y col., 2003). Por lo que el personal en industria debería estar capacitado en las características de *L. monocytogenes*, así como los lugares donde puede alojarse, su resistencia a diversas condiciones ambientales y las medidas para evitar contaminar el producto (Mattos, 2013).

9- CONCLUSIONES

Ante la sospecha clínica de la enfermedad se logró el aislamiento de *Listeria monocytogenes* del sistema nervioso central, confirmando el diagnóstico en un rodeo de bovinos de carne.

Se detectaron vacas de cría portadoras asintomáticas que excretan *L. monocytogenes* o *L. innocua* en materia fecal. Esto contribuye a la dispersión y perpetuación del agente en el ambiente del predio.

No se aisló *L. monocytogenes* en agua y alimentos, aunque si se obtuvieron aislamientos de *L. innocua* en agua. Este hallazgo es importante por las condiciones similares de supervivencia en el ambiente de este microorganismo con *L. monocytogenes*.

Los aislamientos de *L. monocytogenes* correspondieron a los serotipos 4b y 1/2a, que se encuentran dentro de los más comúnmente reportados a nivel nacionales e internacionales.

10- SERÍA IMPORTANTE

Continuar los estudios epidemiológicos y el comportamiento de la enfermedad en Uruguay en nuestros sistemas de producción, ya que muchos casos no están relacionados a los factores predisponentes descritos tradicionalmente en la bibliografía.

Realizar estudios de la importancia que tiene la presencia de bovinos portadores asintomáticos que excreten *L. monocytogenes* en materia fecal, ya que estos podrían contaminar las carcasas en playas de faena a través de cueros contaminados o instalaciones donde sea posible la formación de biofilm.



11- BIBLIOGRAFÍA

1. Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., Rørvik, L (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int JFood Microbiol.* 62(1-2): 57-63.
2. Allerberger, F., Wagner, M (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.* 16: 16–23.
3. Balandyté, L., Brodard, I., Frey, J., Oevermann, A., Abril, C (2011). Ruminant Rhombencephalitis-Associated *Listeria monocytogenes* Alleles Linked to a Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Complex. *Appl Reinar Microbiol.* 77 (23): 8325-8335.
4. Barneche, M., Villagrán, M (2012). Evaluación De La Calidad Higiénico Sanitaria De Quesos Artesanales De Pasta Dura Elaborados En La Zona De Colonia Uruguay. Tesis de Grado. Universidad De La República Facultad De Veterinaria, 47 p.
5. Borucki, MK., Peppin, JD., White, D., Loge, F., Call, DR (2003) Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12): 7336-7342.
6. Buncic, S., Avery, S., Rocourt, J., Dimitrijevic, M (2001). Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int JFood Microbiol.* 65(3): 201-212.
7. Buroni, F (2014). Caracterización De La Demanda De Diagnóstico En Bovinos y Ovinos En El Período 1993-2013, Utilizando Una Base Be Batos Relacional En El Litoral Oeste Del Uruguay. Tesis de Grado. Universidad De La República, Facultad De Veterinaria, 64 p.

8. Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M., Legnani, M., Schelotto F., Lancibidad, G., Varela, G (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Braz J Microbiol.* 48 (4): 689-694.
9. Braz, M., Chayer, R., Moreira, A., Stilwell (2017). Descripción de un caso de Listeriosis en bovinos de cría en pastoreo del sudeste de la provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet (Bs As).* 98(2): 7-11.
10. Cardozo, A., Ramón, L., Poutou, R., Carrascal, A., Zambrano, D (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Univ. Sci.* 18 (2): 203-222.
11. Cartwright, EJ., Jackson, KA., Johnson, SD., Graves, LM., Silk, BJ., Mahon, BE (2013). Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg. Infec. Dis.* 19: 1-9.
12. Cernicchiaro, N (2016). Aspectos relevantes de la transmisión microbiana del animal y el ambiente a la carcasa: su repercusión en la producción de carne. 44° Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, pp.91-97.
13. Chen, M., Wu, Q., Zhang, J., Wu, S., Guo, W (2015). Prevalence, enumeration and phenotypic and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from raw foods in southern China. *Front Microbiol* 6: Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586447/pdf/fmicb-06-01026.pdf> Fecha de consulta: 20/11/2017.
14. Den Bakker, HC., Warchocki, S., Wright, EM, Allred, AF., Ahlstrom, C., Manuel, CS., Stasiewicz, MJ, Burrell, A., Roof, S., Strawn, LK., Fortes, E., Nightingale, KK., Kephart, D, Wiedmann, M (2014) Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov. *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) From agricultural and natural environments in the United States. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64:1882-1889.

15. Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M., Barbuddhe, S., Veer Singh Malik, S (2015). Listeriosis in animals, its importance for public health (foodborne zoonoses) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet Q.* 35: 211-235.
16. Díaz, A., Chávez, M., Saucedo, E (2012). *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. *Ciencia y Tecnología.* 9(2):23-38. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:5ltEps3iCtMJ:revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/download/268/269+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=uy&client=firefox-b> Fecha de consulta: 25/10/17.
17. DIEA-MGAP. (2016). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>. Fecha de consulta: 20/06/2017.
18. Disson, O., Lecuit, M (2012). Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence*, 3 (2): 213-221.
19. Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H (2003) Sampling. En: Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown, AVC, p.27-52.
20. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(8): 3819-3822.
21. Dutra, F., (2010). *Archivo Veterinario del Este, DILAVE*, 2(3) Disponible en: https://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/8_b5addb8e/archivosAdjuntos/n-3.pdf. Fecha de consulta: 12/10/17.
22. Easton, C., Alonzo, P., Godiño, L., Paullier, C (2009). Diagnóstico de casos con signos nerviosos en bovinos y ovinos remitidos a la DILAVE «Miguel C. Rubino»

entre los años 2001 y 2008. 37° Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p.156-159.

23. Easton, C., Preliasco, M., Paullier, C., Marcolongo-Pereira, C., Nakazato, L., Rivero, R (2012). Estudio retrospectivo para la identificación de agentes infecciosos que provocan encefalitis en bovinos de Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 48 (186): 13-18.
24. Esteban, JI., Oporto, B., Arduiz, G., Juste RA., Hurtado, A (2009). Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *BMC Vet. Res.* 5(2): Disponible en: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1746-6148-5-2?site=bmcvetres.biomedcentral.com> Fecha de consulta: 20/11/17.
25. Fairley, RA., Pesavento, PA., Clark, RG (2012). *Listeria monocytogenes* infection of the alimentary tract (Enteric listeriosis) of sheep in New Zealand. *J. Comp. Path.* 146: 308-313.
26. Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., Fontana, C (2014). First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Rep.* Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmmcr/1/2/jmmcr003103.pdf?expires=1511207201&id=id&accname=guest&checksum=9A5927C5D35B239CB1485EF0A13DC922> Fecha de consulta: 20/11/17.
27. Fernández, EC (2006). Listeriosis. 9° Jornadas de Enseñanza Clínica de Grandes Animales. Rio Cuarto, Argentina. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/comun_varias_especies/11-listeriosis.pdf Fecha de consulta: 20/03/2017.
28. Gallego, M., Manrique, P., Torres, O., Ramírez, M (2005). *Listeria monocytogenes* En canales de ganado Holstein en una planta de sacrificio en la sabana de Bogotá (Colombia). *Revista U.D.C.A.* 8 (2): 95-101.

29. Gandhi, M., Chikindas, M (2007). Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J of Food Microbiol.* 113 (1): 1-15.
30. García, J., Odriozola, E., Moreira, A., Micheloud, J., Maggio, J., Malena, R., Lischinsky, T., Campero, C (2013). Listeriosis entérica en novillitos en pastoreo suplementados con silaje. Disponible en: <http://www.lab9dejulio.com.ar/informacion-tecnica/listeriosis-enterica-en-novillitos-en-pastoreo-suplementados-con-silaje> a287 Fecha de consulta: 20/10/17
31. Glauco, J., Galiza, M., Antonio, F., Dantas, S., Riet-Correa, F (2010). Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesq. Vet. Bras.* 30 (3): 267-276.
32. Guldemann, C., Bärtschi, M., Frey, M., Zurbriggen, A., Seuberlich, T., Oevermann, A (2015). Increased spread and replication efficiency of *Listeria monocytogenes* in organotypic brain-slices is related to multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) complex. *BMC Microbiol.* 15: 134.
33. Ho, AJ., Ivanek, R., Gröhn, YT., Nightingale, KK., Wiedmann, M (2007) *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L monocytogenes* subtypes. *Prev. Vet. Med.* 80:287-305.
34. Hofer, E., Reis, CMF (2005). Especies e serovares de Listeria isolados de animais doentes e portadores no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25 (2):79-83.
35. INAC. Instituto Nacional De Carnes (2015). Anuarios Estadístico Agrícola. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/13087/1/cierre-2015-consumo.pdf>. Fecha de consulta: 25/8/2017.

36. Ivanek, R., Gröhn, Y.T., Wiedmann, M (2006) *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. Food. Path. Dis. 3(4): 319-336.
37. Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pölsama, P., Elias, T (2013). *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. Food Control. 30 (1): 24-29.
38. Larraín, D., Abarzúa, F., De Jourdan, F., Merino, P., Belmar, C., García, P (2008). Infecciones por *Listeria monocytogenes* en mujeres embarazadas: experiencia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Rev. Chil. Infectol. 25(5):336-341. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182008000500003&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S071610182008000500003> Fecha de consulta: 20/11/17.
39. Latorre, AA., Van Kessel, JAS., Karns, JS., Zurakowski, MJ., Pradhan, AK., Zadoks, RN., Boor, KJ., Schukken, YH (2009) Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. Appl. Environ. Microbiol. 75 (5):1315-1323.
40. Leaniz, R., Selinke, H., Chaves, O., Pintos, JO., Bello, S (1960). Listeriosis en ovinos. Su comprobación en el Uruguay. Montevideo, Cátedra de Enfermedades Infecto-contagiosas de la Facultad de Veterinaria, 14p.
41. Lee, HY., Chai, LC., Pui, C.F., Mustafa, S., Cheah, Y.K., Nishibuchi, M., Radu, S (2013). Formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 at different incubation temperatures and concentrations of sodium chloride. Braz J Microbiol. 44 (1): 51 – 55.
42. Linke, K., Ruckerl, I., Brugger, K., Karpiskova, R., Walland, J., Muri-Klinger, S., Tichy, A., Wagner, M., Stessl, B (2014). Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 80(18): 5583-5592.

43. López, A., Mompeán, E., Martínez, M., Hernández, A., Rodríguez, F., Abad, L., Pérez, J., López, E., Gómez, C (2005). Meningoencefalitis por *Listeria* en el lupus. *An. Med. interna (Madrid)*. 22(8): 379-382.
44. Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., Korkeala, H (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int J Food Microbiol.* 82 (3): 265-272.
45. Lyautey, E., Hartmann, A., Pagotto, F., Tyler, K., Lapen, DR, Wilkes, G., Piveteau, P., Rieu, A., Robertson, WJ., Medeiros, DT., Edge, TA., Gannon, V., Topp, E (2007). Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. *Can. J. Microbiol.* 53:1158-1167.
46. Margineda, C., Cantón, G., Lischinsky, L., Moreira, A., Campero, C (2012). Listeriosis en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Vet.* 23 (1): 32-37.
47. Matto, C., Varela, G., Mota, MI, Giannechini, R., Rivero, R (2017). Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in a pastured bull. *J. Vet. Diagn. Investig.* 29(2) 228–231.
48. Mattos, G (2013). *Listeria monocytogenes* en la industria cárnica. *C y A.* 14(47): 28-31.
49. Mereghetti, L., Quentin, R., Marquet-Van Der Mee, N., Audurier, A (2000). Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (11): 5083 – 5086.
50. Mohammed, H., Atwill, E., Dunbar, L., Ward, T., McDonough, P., Gonzalez, R., Stipetic, K (2010). The risk of *Listeria monocytogenes* infection in beef cattle operations. *J Appl Microbiol.* 108(1):349-56.

51. Mota, M., Braga, V., Vico, V., Caiata, L., Schelotto, F., Algorta, G., Varela, G (2016). Listeriosis invasiva en Uruguay: origen y subtipificación de los aislamientos de *Listeria monocytogenes*. 16° Congreso Uruguayo de Patología Clínica. Montevideo, Uruguay.
52. MSP, (2017). Boletín Epidemiológico Mayo 2017. Disponible en: http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20Mayo%202017.7%20corregido%20por%20Quiana%201_.pdf. Fecha de consulta: 20/06/2017.
53. Muchaamba, F., Guldemann, C., Tasara, T., Mota, M, Braga, V., Varela, G., Algorta G., Klumpp, J., Jermini, M., Stephan, R (2017). Full-Genome Sequence of *Listeria monocytogenes* Strain H34, Isolated from a Newborn with Sepsis in Uruguay. *Genome Announc.* 5 (24): 44-17.
54. Nightingale, KK., Schukken. YH., Nightingale, CR., Fortes, ED., Ho, AJ., Her, Z., Gröhn, YT., McDonough, PL., Wiedmann, M (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8):4458-4467.
55. Nightingale, KK., Fortes, ED., Ho, AJ., Schukken, YH., Gröhn, YT., Wiedmann, M (2005). Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227:1808-1814.
56. Odriozola, E (2009). Problemas sanitarios en bovinos vinculados a la intensificación ganadera. *Anales de la ANAV de Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria Argentina.* Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/27658/Documento_completo.pdf?sequence1. Fecha de consulta: 10/4/2017.
57. Odriozola, E (2013). *Enfermedades De Los Bovinos Con Signos Nerviosos.* Buenos Aires, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca Presidencia de la Nación. Disponible en: <http://proyectotse.org.ar/wp->

58. Oevermann, A., Zurbriggen, A., Vandvelde, M (2010). Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: A zoonosis on the rise? *Interdiscipl Perspect Infect Dis*. ID 632513 Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2010/632513/> Fecha de consulta 20/11/17.
59. Orndorff PE, Hamrick TS, Washington Smoak I, Havell EA (2006) Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet. Microbiol.* 114:1-15.
60. Orsi, RH., den Bakker, HC., Wiedmann, M (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301:79-96.
61. Orsi, RH., Wiedmann, M (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 5273-5287.
62. Pieruccion, F., Moron, C., Easton, C (2017). Listeriosis En: Corderas Milchschaft Estabuladas. 45° Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, 186-188p.
63. Radostits, OM., Gay, CC., Blood, DC., Hinchcliff, KW (2002). *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino.* 9^{na} ed. Madrid, Interamericana 1206p.
64. Ribeiro, L., Rodrigues, N., Fallavena, L., Oliveira, S., Brito, A (2006). Listeriose em rebanho de ovinos leiteiros na região serrana do Rio Grande do Sul: relato de caso. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 58(3), 316-319.

65. Rissi D., Kommers, G., Marcolongo-Pereira, C., Schild, A., Barros, L., (2010). Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos. *Pes Vet Bras* 30(1):51-56p.
66. Rocha, C., Mol, J., Garcia, L., Costa, L., Santos, R., Paixão, T (2017). Comparative experimental infection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in bovine trophoblasts. *PLoS ONE* 12 (5): e0176911.
67. Rocha, PRD., Dalmaso, A., Grattarola, C., Casalone, C., Del Piero, F., Bottero, MT., Capucchio, MT (2013). Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Res. Vet. Sci.* 94: 111–114.
68. Rovira, J (1996). *Reproducción y Manejo de los Rodeos de Cria*. Montevideo, Hemisferio Sur, 288p.
69. Rovira, J (2012). *Manejo Nutritivo De Los Rodeos De Cria En Pastoreo*. Montevideo. Hemisferio Sur 336p.
70. Sánchez, B., Palencia, E (2010). Infecciones por *Listeria*. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. *Medicine (Madrid)*, 10(50):3368-3372. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Listerias_Medicine2010.pdf Fecha de consulta: 6/6/17.
71. Santorum, P., García, R., López-Alonso, Victoria., Martínez-Suárez, J (2012). Review. Dairy farm management and production practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk and beef. *Span J Agric Res.* 10(2): 360-371.
72. Skovgaard, N., Morgen, CA (1988). Detection of *Listeria* spp. in faces from animals., in feeds., and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food. Microbiol.* 6:229-242.

73. Stea, E., Purdue, L., Jamieson, R., Yost, C., Hansen, L (2015). Comparison of the Prevalences and Diversities of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in an Urban and a Rural Agricultural Watershed. *Appl Environ Microbiol* 81(11): 3812-3822.
74. Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 9(10):1236-1243.
75. Tejera, D., Alonso, F., Silva, M., Modernel, J., Limongi, G., Bertullo, M., Villalba, F., Cancela, M (2015). Listeriosis Invasiva en unidades de terapia intensiva: revisión de una serie de casos. *An Facultad Med (Univ Repúb Urug)* 2 (1):62-69.
76. Tenover, FC., Arbeit, RD., Goering, RV., Mickelsen, PA., Murray, BE., Persing, DH., Swaminathan, B (1995). Interpreting Chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9):2233-2239.
77. Unnerstad, H., Romell, A., Ericsson, H., Danielsson-Tham, ML., Tham, W (2000). *Listeria monocytogenes* in faces from clinically healthy dairy cows in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 41:167-171.
78. Uruguay (1994). Reglamento Bromatológico Nacional. Montevideo, Uruguay. Disponible en: [http://www.ecotech.uy/docs/alimentos/Decreto Bromatologico tercera edicion 2009.pdf](http://www.ecotech.uy/docs/alimentos/Decreto_Bromatologico_tercera_edicion_2009.pdf) Fecha de consulta: 14/10/17.
79. Uruguay XXI (2016). Informe Agronegocios. Oportunidades de inversión Agronegocios. Disponible en: http://www.camaramercantil.com.uy/uploads/cms_news_docs/Informe-Agronegocios-Diciembre-2016-Uruguay-XXI.pdf Fecha de consulta: 12/09/17.
80. Vázquez-Boland, JA., Kuhn, M., Berche, P, Chakraborty,, T, Domínguez-Bernal,, G., Goebel,, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J (2001).

Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14(3):584-640.

81. Walker, JK., Morgan, JH., McLauchlin, J., Grant, KA., Shallcross, JA (1994). *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. Vet. Microbiol. 42: 245-253.
82. Wellinghausen, N (2011). *Listeria* and *Erysipelotrix*. En: Murray, P. Manual of Clinical Microbiology. 10^a ed. Washington, ASM, p 403-412.
83. Wells, G., Scotta, C., Johnson, C., Gunning, R., Hancock, R., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R (1987). A novel progressive spongiforme encephalopathy in cattle. Vet. Rec. 121: 419-420.
84. Wiedmann, M., Czajka, J., Bsat, N., Bodis, M., Smith, MC., Divers, TJ., Batt, CA (1994). Diagnosis and epidemiological association of *Listeria monocytogenes* strains in two outbreaks of listerial encephalitis in small ruminants. J. Clin. Microbiol. 32(4):991-996.
85. Will, R., Ironside, J., Zeidler, M., Cousens, S., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, PG (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet. 347: 921-925.
86. Yoshida, T., Kato, Y., Sato, M., Hirai, K (1998). Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. J. Vet. Med. Sci 60(10):1165-1168.