



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN BOVINOS Y
AMBIENTE DE PREDIOS LECHEROS**

**Estudio En Establecimientos Del Departamento De Paysandú Y En Un
Caso Confirmado de Listeriosis Nerviosa**

CAROLINA MATTO ROMERO

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2016



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN BOVINOS Y
AMBIENTE DE PREDIOS LECHEROS**

**Estudio En Establecimientos Del Departamento De Paysandú Y En Un
Caso Confirmado de Listeriosis Nerviosa**

CAROLINA MATTO ROMERO

R. Rivero DMV, MSc G. Varela MD, MSc, PhD R. Giannechini, DMTV, MSc

Director de Tesis

Co-director

Co-director

2016

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Pablo Zunino; DMV, MS, PhD

Instituto de Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”

Ministerio de Educación y Cultura – Uruguay

Franklin Riet-Correa; DMV, MS, PhD

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – Uruguay

José Piaggio; DMTV, MS

Facultad de Veterinaria

Universidad de la República - Uruguay

2016

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

INFORME DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mis Tutores: Rodolfo Rivero, Edgardo Giannechini y Gustavo Varela por su constante apoyo, consejos, enseñanzas y tiempo brindado a lo largo del trabajo.

A la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, por el financiamiento del trabajo de investigación a través de la beca CSIC-PLANISA “Programa de Fortalecimiento de la Investigación de Calidad en Salud Animal”.

Al Laboratorio de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene “Profesor Arnoldo Berta” de la Facultad de Medicina, Universidad de la República, por el apoyo al trabajo de laboratorio. A todo su personal por el cálido recibimiento y el tiempo compartido juntos. En particular a Valeria Braga, Victoria Vico y María Inés Motta por su invaluable colaboración en el procesamiento del material.

Al Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino” de Paysandú por el apoyo logístico y de infraestructura, así como la capacitación, para llevar a cabo el muestreo y el trabajo de laboratorio.

A todos mis compañeros del Laboratorio Regional y del Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios de la Facultad de Veterinaria, por el apoyo que de una u otra forma permitió la realización de este trabajo.

A los colegas: Pablo de María, Alexis Basignani, Guillermo Chalkling, Carlos Taranco, Inés Parietti, Gloria Arnaud y Virginia Russi por la información brindada y ser el nexo con los propietarios de los predios seleccionados.

A todos los propietarios o responsables de los predios lecheros visitados que gentilmente permitieron la toma de muestras.

A Marcela Preliasco por la capacitación y colaboración en la técnica de Inmunohistoquímica.

A Silvana Carro de la Cátedra de Ciencia y Tecnología de la Leche y al personal de Biblioteca de la Facultad de Veterinaria por el aporte de material bibliográfico.

Por último, a toda mi familia y fundamentalmente a: mis padres Néstor y Mary por las enseñanzas que me han transmitido y acompañarme siempre. A Martin, mi pareja, por el apoyo incondicional y darme aliento para continuar. A mis suegros, Beatriz y Franklin por abrir las puertas de su casa y esperarme con algo calentito cada vez que estuve en Montevideo.

INDICE

RESUMEN.....	iv
SUMMARY	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Principales características del género <i>Listeria</i>	1
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	1
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	5
2.1 Estudios epidemiológicos realizados en rumiantes	5
2.2 Los rumiantes como posible reservorio de <i>Listeria monocytogenes</i> para los alimentos de consumo humano	7
2.3 Antecedentes Nacionales	7
3. HIPÓTESIS	10
4. OBJETIVO GENERAL.....	10
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	11
6.1 Muestreo en predios lecheros habilitados del Departamento de Paysandú	11
6.2 Muestreo de predios con casos confirmados de listeriosis en rumiantes	11
7. MATERIALES Y MÉTODOS	12
7.1 Muestreo en predios lecheros habilitados del Departamento de Paysandú.....	12
7.2 Muestreo en predio lechero con caso confirmado de listeriosis bovina.....	12
7.3 Muestras colectadas para aislamiento microbiológico	13
7.3.1 Muestras de bovinos	13
7.3.2 Muestras ambientales.....	14
7.4 Aislamiento microbiológico	15
7.4.1 Procedimiento	15
7.4.2 Identificación de especies del género <i>Listeria</i>	15
7.5 PCR múltiple para determinación del perfil de serotipo	16
7.6 PCR múltiple para detección de genes que codifican internalinas A, C y J.....	18
7.7 Electroforesis de campo pulsado (PFGE).....	18
7.8 Histopatología e Inmunohistoquímica de sistema nervioso central	20
8. RESULTADOS	21
8.1 Aislamientos por predio y características de los mismos.....	22

8.1.1 Establecimiento A.....	23
8.1.2 Establecimiento B.....	24
8.1.3 Establecimiento C.....	24
8.1.4 Establecimiento D.....	25
8.1.5 Establecimiento E.....	26
8.1.6 Establecimiento F.....	27
8.1.7 Establecimiento H.....	28
8.1.8 Establecimiento I.....	29
8.1.9 Establecimiento J.....	31
8.1.10 Establecimiento K.....	32
8.1.11 Establecimiento L.....	33
8.2 PCR múltiple para determinación del perfil del serotipo.....	34
8.3 PCR múltiple para detección de genes que codifican internalinas A, C y J.....	36
8.4 Electroforesis de campo pulsado (PFGE).....	38
9. DISCUSIÓN.....	40
10. CONCLUSIONES.....	46
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	47

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de bacterias del género *Listeria* y particularmente *Listeria monocytogenes*, en bovinos y en el ambiente de establecimientos lecheros. Se realizó un muestreo en dos etapas seleccionando por probabilidad proporcional al tamaño 10 establecimientos del Departamento de Paysandú, Uruguay. Se incluyó además en el estudio, un predio lechero de Canelones con un caso confirmado de listeriosis bovina. Se realizó una única visita a cada establecimiento donde se colectaron muestras para cultivo bacteriológico de materia fecal bovina, alimentos, leche de tanque de frío, agua de bebedero y suelo entrada-salida de sala de ordeño. En las muestras del sistema nervioso central (SNC) de un bovino con síntomas nerviosos compatibles con listeriosis, se realizó cultivo, histopatología e inmunohistoquímica. En el 82% de los predios (9/11) hubo aislamiento del género *Listeria* spp., mientras que el 36% de los predios (4/11) presentó al menos un aislamiento de *L. monocytogenes*. Se detectaron vacas en ordeño clínicamente sanas que excretan *L. monocytogenes* ó *L. innocua* en materia fecal. En el SNC del bovino se obtuvo aislamiento e inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes*, en la histopatología se observó meningoencefalitis supurativa con microabscesos en el tronco encefálico. Todos los aislamientos de *L. monocytogenes* en alimentos para consumo bovino se registraron en pastoreos de especies implantadas, por lo que no debería descartarse la enfermedad, en casos con síntomas clínicos compatibles y sin el antecedente de consumo de ensilados. No hubo aislamiento de *Listeria* spp. en leche de tanque ni agua de bebida de ninguno de los establecimientos. Se detectó *L. innocua* en 15 alimentos de consumo para bovinos y 7 muestras de suelo de entrada y salida a sala de ordeño, lo que indicaría que en ciertos casos estarían dadas las condiciones ambientales para la presencia de *L. monocytogenes*. Los serotipos recuperados fueron 1/2a y 4b, que son los más frecuentemente reportados y se asocian a casos clínicos en seres humanos y animales. Los resultados obtenidos en la electroforesis en campos pulsantes sugieren que existe diversidad genética en las poblaciones de la bacteria dentro de cada predio y entre ellos. Se demuestra la amplia distribución que tiene este agente y la importancia o peligro potencial que representa para la salud humana y animal.

SUMMARY

The aim of this work was to detect the presence of bacteria belonging to the genus *Listeria* spp., particularly *Listeria monocytogenes* in cattle and dairy farms environment. A two-stage sampling procedure was implemented, choosing ten dairy farms of Paysandú, Uruguay by proportional-to-size-likelihood. A case of listeriosis in a dairy farm of Canelones, Uruguay was included in the study. Each farm was visited once to collect samples of bovine feces, feedstuffs, water from water troughs, milking parlor soil and bulk tank milk for bacteriological culture. Culture, histopathology and immunohistochemistry were made in the sample of central nervous system (CNS) from the animal with nervous symptoms. *Listeria* spp., was isolated from 82% of farms (9/11) while, *L. monocytogenes* was in 36% of them (4/11). Healthy milking cows that shed *L. monocytogenes* or *L. innocua* in feces were detected. Isolation and positive immunostaining to *L. monocytogenes*, were detected in the bovine CNS, at histopathology there was suppurative meningoencephalitis with microabscesses in the brain stem. All isolates of *L. monocytogenes* in feedstuffs were detected in pastures, this implies that the disease should not be ruled out in cases with compatible symptoms and no silage feeding of cattle. There was not isolation in bulk tank milk and water troughs of any dairy farm. *L. innocua* were detected in fifteen feedstuffs and seven milking parlor soil samples, suggesting that in some cases the environmental conditions for the presence of *L. monocytogenes* would be present. Serotypes obtained were 1/2a and 4b, these are the most frequently reported and associated with cases in humans and animals. Pulsed field electrophoresis results suggest that there is a wide genetic diversity in bacterial population within each farm and between them. This work demonstrates how widespread the agent is and its importance or potential threat for human and animal health.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Principales características del género *Listeria*

El género *Listeria* está compuesto por bacilos cortos gram-positivos, no formadores de esporas y anaerobios facultativos. Junto al género *Brochothrix*, está provisoriamente asignado a la familia *Listeriaceae* dentro del Orden Bacillales, Clase Bacilli, Phylum Firmicutes (Wellington, 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* (Graves et al., 2010; Leclercq et al., 2010; Bertsch et al., 2013; Lang Halter et al., 2013; den Bakker et al., 2014; Orsi & Wiedmann, 2016). Son bacterias saprófitas distribuidas ampliamente en el ambiente. Se han aislado a partir de muestras de suelo, agua, efluentes, vegetación, gran variedad de alimentos, heces de humanos y animales (Vázquez-Boland et al., 2001; Lyautey et al., 2007b; den Bakker et al., 2014; Linke et al., 2014).

Las especies se clasifican en dos grupos denominados como: *Listeria sensu stricto* representado por *L. monocytogenes*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*, y *Listeria sensu lato* que contiene a *L. grayi* y 10 especies recientemente reportadas (Orsi & Wiedmann, 2016). Esta separación se basa en el relacionamiento de las distintas especies con *L. monocytogenes*, ya que fue la primera especie nombrada y la más importante desde el punto de vista de salud pública e impacto económico (Orsi & Wiedmann, 2016).

1.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes fue aislada por primera vez en un conejo enfermo por Murray y colaboradores en 1926, y fue reconocida como patógeno en veterinaria 10 años antes de que se relacionara con casos humanos (Orndorff et al., 2006). Además, la característica de ser una enfermedad asociada al consumo de alimentos contaminados, fue conocida por veterinarios a comienzos de la década de 1930 (Orndorff et al., 2006).

Listeria monocytogenes es la principal especie que se asocia a enfermedad en animales y humanos (Vázquez-Boland et al., 2001), aunque también se han descrito casos de listeriosis con aislamiento de *L. innocua* (Walker et al., 1994; Perrin et al., 2003; Hofer & Reis, 2005; Rocha et al., 2013a; Favaro et al., 2014). Se aisló en más de 50 especies animales, incluyendo mamíferos, aves, peces, crustáceos, ácaros e insectos (Hofer & Reis, 2005; Lyautey et al., 2007a).

Este agente posee factores de virulencia que permiten la invasión, multiplicación y dispersión intercelular 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 vacuola y proteína ActA responsable de la motilidad intracelular (Vázquez-Boland et al., 2001; Orndorff et al., 2006). Además cuenta con una familia de multigenes conocida como isla de internalinas (Vázquez-Boland et al., 2001). La Internalina A (*inlA*) es una proteína de superficie especie específica, que media la internalización de la bacteria en células del huésped; las Internalinas C y J (*inlC*, *inlJ*) participan en distintas etapas de la infección del huésped (Liu et al., 2007).

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 con la presentación de 3 síndromes separados que raramente se solapan: encefalitis, septicemia con abscesos miliares en vísceras o infección del útero gestante con aborto (Vázquez-Boland et al., 2001; Orndorff et al., 2006) (Figura 1).

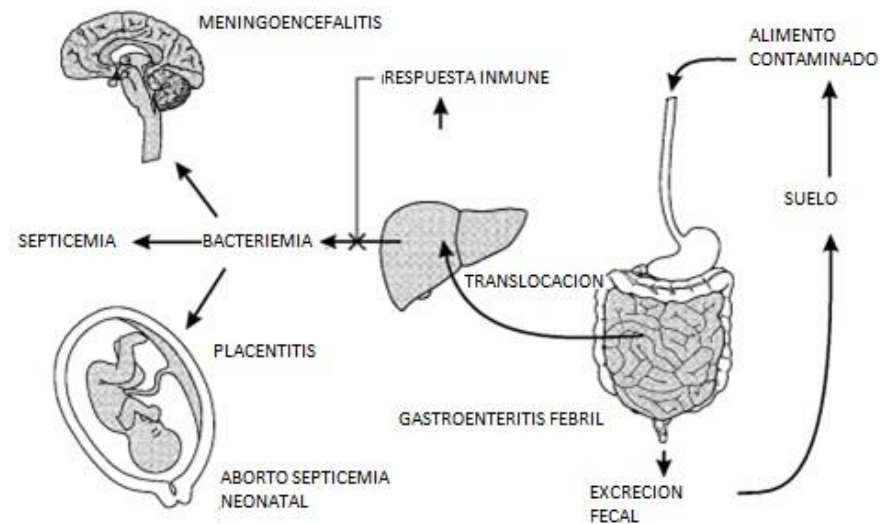


Figura 1: Patogénesis de la infección por *Listeria monocytogenes* en seres humanos y animales. Tomado de: Vázquez-Boland et al. (2001)

En humanos se caracteriza por ser una de las enfermedades transmitidas por alimentos con mayor tasa de letalidad. Con una presentación clínica que va desde una gastroenteritis febril a una bacteriemia fatal y meningitis en grupos de alto riesgo para la enfermedad invasiva, incluyendo adultos mayores y pacientes con enfermedades concomitantes. Las embarazadas infectadas con *L. monocytogenes* cursan un síndrome gripal o una infección asintomática, que resultan en aborto, partos prematuros, infección neonatal o muerte infantil (Cartwright et al., 2013). En el período 1998-2008 en Estados Unidos se confirmaron 24 focos de listeriosis humana, con 359 pacientes enfermos, 215 hospitalizaciones y 38 muertes (Cartwright et al., 2013).

Los rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos) son particularmente susceptibles a la infección (Vázquez-Boland et al., 2001). La forma clínica más común es la nerviosa (Oevermann et al., 2010). También se han reportado casos de abortos, septicemia neonatal, queratoconjuntivitis/uveítis y enteritis (Evans et al., 2004; Oevermann et al., 2010; Fairley et al., 2012; Fairley & Colson 2013; García et al., 2016).

Se describen 13 serotipos de *L. monocytogenes* basados en los antígenos somáticos “O” y flagelares “H” (Wellinghausen, 2011). Más del 95% de los casos clínicos en humanos y animales corresponden a los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Otros serotipos, como el 1/2c se encuentran esporádicamente como contaminantes en alimentos (Vázquez-Boland et al., 2001; Oevermann et al., 2010). Basado en que pocos serotipos son los responsables de los

casos de listeriosis, su determinación no es suficiente para realizar estudios epidemiológicos de brotes de la enfermedad (Graves & Swaminathan, 2001). Hasta ahora, la electroforesis en campos pulsantes, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) en inglés, es la técnica de subtipificación estándar utilizada para estos estudios a nivel mundial, debido a su mayor poder discriminatorio y reproducibilidad (Graves & Swaminathan, 2001; Fugett et al., 2007).

La información generada con distintas técnicas de subtipificación bacteriana, han demostrado que existen 4 linajes evolutivos de *L. monocytogenes* con características ecológicas, genéticas y fenotípicas distintas (Tabla I) (Orsi et al., 2011). El linaje I incluye aislamientos de los serotipos 1/2b y 4b, se asocia a casos clínicos en humanos a nivel mundial, y a la forma nerviosa en rumiantes. Las cepas de este linaje tienen 100 veces más chance de causar enfermedad que las aislamientos del linaje II (Orsi et al., 2011; Rocha et al., 2013b). El linaje II es genéticamente más diverso e incluye los serotipos 1/2a y 1/2c; se observa más comúnmente en la naturaleza, alimentos y ambiente asociados (Lyautey et al., 2007b; Orsi et al., 2011; Linke et al., 2014). El linaje III representa un grupo clonal con posible especificidad de huésped y virulencia limitada en humanos, más comúnmente aislado de animales con síntomas clínicos (Jeffers et al., 2001; Orsi et al., 2011). En el mismo sentido, se piensa que el linaje IV tiene virulencia reducida para los seres humanos (Orsi et al., 2011).

Tabla I: Resumen de las características de los linajes de *Listeria monocytogenes*.

Linaje	Serotipos	Características genéticas	Distribución
I	1/2b, 3b, 3c, 4b	Baja diversidad y bajos niveles de recombinación entre el linaje	Comúnmente aislada de varias fuentes; sobre todo en casos humanos
II	1/2a, 1/2c, 3a	Mayor diversidad, mayores niveles de recombinación.	Comúnmente aislada de varias fuentes; sobre todo en alimentos y medioambientes naturales
III	4a, 4b, 4c	Muy diverso, niveles de recombinación entre el linaje I y II	Mayoría de los aislamientos obtenidos de rumiantes
IV	4a, 4b, 4c	Pocos aislamientos para análisis.	Mayoría de los aislamientos obtenidos de rumiantes

Adaptado de: Orsi et al. (2011).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 Estudios epidemiológicos realizados en rumiantes

Los primeros grandes brotes de listeriosis en seres humanos registrados entre 1979 y 1983 se relacionaron al consumo de vegetales crudos fertilizados con materia fecal de rumiantes o, a la ingestión de leche bovina sin pasteurizar, obtenida en predios donde se habían registrado casos de listeriosis en los animales. A partir de ese momento, existió evidencia clara de que *L. monocytogenes* se encontraba en los predios, vinculada con la producción primaria de alimentos (Skoovgard & Morgen, 1988; Cartwright et al., 2013).

Muchos trabajos han demostrado que los rumiantes sanos son portadores asintomáticos de bacterias del género *Listeria* incluyendo *L. monocytogenes*, excretándolas por materia fecal (Skoovgard & Morgen, 1988; Unnerstad et al., 2000; Nightingale et al., 2004; Hofer & Reis, 2005; Esteban et al., 2009). Dentro de los rumiantes, la especie bovina es la que tiene mayor prevalencia de animales portadores (Nightingale et al., 2004; Esteban et al., 2009), esto se relacionaría a una mayor prevalencia de *L. monocytogenes* a nivel ambiental en los predios que tienen bovinos (Nightingale et al., 2005). En estudios epidemiológicos realizados en tambos, la bacteria se ha recuperado a partir de alimentos y agua de bebida de los animales, cama, suelo, insectos, comederos, máquina de ordeño, tanque de frío, efluentes y heces de aves (Yoshida et al., 1998; Borucki et al., 2004; Nightingale et al., 2004; Latorre et al., 2009; Mohammed et al., 2009). Además se ha reportado que en los rodeos de bovinos lecheros se observa mayor prevalencia de portadores asintomáticos (Esteban et al., 2009).

Por otro lado, se ha descrito una mayor excreción fecal de *L. monocytogenes* por parte de los rumiantes, en los meses de invierno y comienzos de primavera, probablemente por una alta tasa de contaminación ambiental asociado a medidas de higiene pobres, baja de la inmunidad y alimentación con ensilados (Barlow & McGorum, 1985; Nightingale et al., 2005; Mohammed et al., 2009).

El consumo de productos lácteos contaminados con *L. monocytogenes* es una de las causas principales de listeriosis en seres humanos (Cartwright et al., 2013; ISID, 2015). En muchos predios lecheros se ha detectado la presencia de *L. monocytogenes* en leche de tanque de frío (Yoshida et al., 1998; Borucki et al., 2004; Mohammed et al., 2009). Van

Kessel et al. (2004) determinaron una prevalencia de 6,5% de *L. monocytogenes* en leche de tanque bovina durante un muestreo nacional realizado en Estados Unidos. La presencia de la bacteria en leche no se relacionaría a casos de mastitis, ya que esta forma clínica es muy poco común (Fedio et al., 1990). Su presencia indicaría contaminación de la leche con materia fecal bovina durante el ordeño, o fallas en la limpieza de la máquina de ordeño y/o tanque de frío que permitiría la formación de biofilm bacteriano (Yoshida et al., 1998; Mohammed et al., 2009; Latorre et al., 2010).

Basado en que la listeriosis es una enfermedad transmitida por alimentos, muchos estudios han determinado que los ensilados son la principal fuente de infección para los rumiantes (Wilesmith & Gitter, 1986; Nightingale et al., 2005; Ho et al., 2007a). Fundamentalmente se asocia a ensilados con falla en la anaerobiosis, lo que provoca que el pH no disminuya por debajo de 4,0 para limitar el crecimiento bacteriano (Ryser et al., 1997). En un estudio donde se evaluaron diferentes ensilados, se encontró diferencia significativa entre el pH promedio de las muestras con aislamiento de *L. monocytogenes* (pH 6,1) con respecto las muestras sin aislamiento (pH 4,4) (Borucki et al., 2005). Aunque, otros trabajos reportan presencia de *L. monocytogenes* en ensilados con pH menor a 4,0 (Skovgaard & Morgen 1988; Caro et al., 1990; Ryser et al., 1997).

Se ha observado asociación entre el consumo de ensilado contaminado por *L. monocytogenes* y la excreción fecal en animales asintomáticos (Ho et al., 2007a). La mayor cantidad de animales excretores generalmente se presenta en el día de consumo o 1-2 días después, y la excreción de la bacteria se caracteriza por ser intermitente (Ho et al., 2007a). Si bien la mayoría de los casos de listeriosis reportados en rumiantes se asocian al consumo de ensilados, se han registrado algunos casos donde la fuente de contaminación no era esta clase de alimento (Wiedmann et al., 1994; Yoshida et al., 1998), inclusive en algunos casos no pudo determinarse (Oevermann et al., 2010). Por otro lado, en Nueva Zelanda se han descrito casos de listeriosis en ovinos a pastoreo (Fairley et al., 2012).

Estudios de subtipificación bacteriana, muestran que los aislamientos que causan listeriosis en animales tienen una gran diversidad genética (Vela et al., 2001; Esteban et al., 2009). A través del uso del PFGE y la tipificación basada en la secuenciación del ADN (MLST) se ha demostrado que una cepa de *L. monocytogenes* puede afectar a distintas especies de rumiantes y provocar casos clínicos separados entre sí geográfica y temporalmente (Okwumabua et al., 2005; Rocha et al., 2013b).

2.2 Los rumiantes como posible reservorio de *Listeria monocytogenes* para los alimentos de consumo humano

Listeria monocytogenes tiene la capacidad de adaptarse y sobrevivir en ambientes extremos tales como altas concentraciones de sal (10% NaCl), pH entre 4,5 y 9,0, así como temperaturas de 1°C a 45°C (Vázquez-Boland et al., 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 (Borucki et al., 2003). Si bien las bacterias presentes en los productos crudos son inactivadas por la combinación tiempo-temperatura, estas características hacen que *L. monocytogenes* colonice y sobreviva dentro de las plantas elaboradoras de alimento (Borucki et al., 2003). Estas bacterias podrían contaminar la comida luego del procesamiento, constituyendo un riesgo para la salud de los seres humanos (Borucki et al., 2003; Ho et al. 2007b). En los últimos años, a nivel mundial se han reportado epidemias de listeriosis en humanos asociadas al consumo de productos lácteos, carnes ahumadas, panificados, frutas y vegetales tanto frescos como procesados (Cartwright et al., 2013; ISID, 2015).

Muchos trabajos han estudiado la posible vinculación entre los aislamientos realizados en los animales y ambiente de los predios agropecuarios con los casos humanos. A través de técnicas de PCR-RFLP, ribotipeado, PFGE o MLST se ha observado que bacterias aisladas en animales sanos o con listeriosis también se han identificado en pacientes humanos (Jeffers et al., 2001; Borucki et al., 2004; Nightingale et al., 2004; Okwumabua et al., 2005; Rocha et al., 2013b). Por otro lado, también se han detectado bacterias a nivel ambiental en tambos responsables por focos importantes de listeriosis en humanos, pero no como causa de listeriosis bovina (Borucki et al., 2004; Fugett et al., 2007). Posibles factores que explicarían este hallazgo serían dosis inadecuada, diferencias en el estadio inmune del huésped, pre adaptación de las bacterias o ruta de inoculación (Borucki et al., 2004).

2.3 Antecedentes Nacionales

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 (Reglamento Bromatológico Nacional, 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 prontos para comer, y un programa de autocontrol de las empresas para *L. monocytogenes* en el medioambiente. Recientemente se estableció un procedimiento para el monitoreo de *L. monocytogenes* en medioambiente 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/N° 098/16).

En una recopilación realizada por el Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina, entre los años 2010 y 2013, se centralizaron 137 aislamientos de *L. monocytogenes*, de los cuales 115 correspondieron a alimentos, 18 a casos humanos y 4 a ambientes. Todos positivos a factores de virulencia. En el 10% de las muestras de quesos analizadas se recuperaron *L. monocytogenes* 1/2b y 4b (Varela, Com. Pers., 2013). En el mismo sentido, Maquieira (2011) reportó la presencia de este patógeno en seis quesos (3,5%) de 170 muestras analizadas. Todas provenían de queserías habilitadas, algunas de las cuales elaboraban con leche cruda y otras con leche pasteurizada.

En nuestro país en medicina humana se han descrito casos esporádicos. En un estudio realizado en el período 2010-2013 sobre listeriosis invasiva en unidades de terapia intensiva se reportaron 11 pacientes afectados, todos con uno o más factores predisponentes, 7 de los cuales fallecieron (63% de letalidad) (Tejera et al., 2015). Existe también otro reporte de listeriosis invasiva durante el período 2008-2014 en el que se diagnosticaron 9 casos, 7 de los cuales fueron fatales (Caita et al., 2014)

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 et al., 1960). Posteriormente, se han descrito otros casos colectivos en ovinos (Dutra, 2011) y en un estudio retrospectivo que incluyó el análisis de los años 1999 a 2011 se notificaron 12 focos de listeriosis como causa de encefalitis en bovinos (Easton et al., 2012).

La red de laboratorios de DILAVE “Miguel C. Rubino” del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca en sus bases de datos en el período 1997-2013 registró 51 focos de listeriosis en rumiantes. Hasta ahora, no existen trabajos que caractericen los aislamientos

de *L. monocytogenes* en bovinos, ovinos y/o caprinos, así como tampoco aislamientos en el medio ambiente de los establecimientos agropecuarios.

Este trabajo de tesis toma como justificación para su estudio la información antes mencionada: mayor prevalencia de la bacteria en rodeos lecheros y su ambiente más próximo, consumo de lácteos contaminados con *L. monocytogenes* como una de las causas principales de listeriosis humana, sumado a un número considerable de focos de listeriosis en bovinos registrados en los últimos años, sin estudio epidemiológico pormenorizado.

3. HIPÓTESIS

Listeria monocytogenes está presente en el ambiente y en bovinos en sistemas de producción lechera de Uruguay.

4. OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en bovinos y en el ambiente de establecimientos productores de leche en el Departamento de Paysandú, así como en predios donde se registren casos de listeriosis animal.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar la presencia de vacas lecheras en producción que excretan *L. monocytogenes* de forma asintomática en materia fecal.

Detectar la presencia de *L. monocytogenes* en suelo, leche de tanque, alimentos y agua de consumo bovino.

En predios con casos confirmados de listeriosis, detectar la presencia de la bacteria en el resto del rodeo donde se registró el caso, así como también en suelo, alimentos y agua.

Determinar los perfiles de serotipos y la presencia de genes que codifican internalinas A, C y J en los aislamientos de *L. monocytogenes*.

Comparar por electroforesis de campo pulsado (PFGE) los aislamientos de *L. monocytogenes* del mismo serotipo para establecer su relacionamiento epidemiológico y variabilidad genética.

6. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Muestreo en predios lecheros habilitados del Departamento de Paysandú

Para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* se utilizó la metodología de muestreo en dos etapas, tomando como marco de muestreo los tambos habilitados remitentes a industria del Departamento de Paysandú. Se tomaron muestras de materia fecal de los bovinos, leche de tanque de frío y del ambiente de los predios seleccionados.

6.2 Muestreo de predios con casos confirmados de listeriosis en rumiantes

Durante el desarrollo del trabajo se registró una consulta por un caso sospechoso de listeriosis bovina en un establecimiento lechero de Progreso, Departamento de Canelones. El caso fue confirmado mediante estudios histopatológicos y aislamiento de *Listeria monocytogenes*, por lo que, como estaba previsto, se resolvió concurrir al predio para coleccionar muestras de otros animales y del ambiente.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Muestreo en predios lecheros habilitados del Departamento de Paysandú

Esta etapa se llevó a cabo desde Setiembre a Noviembre de 2014. La información de los predios productores de leche bovina fue brindada por la Sección Lácteos de Sanidad Animal (Oficina Paysandú), Dirección General de Servicios Ganaderos del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. El número de cabezas bovinas de cada predio se tomó de la Declaración Jurada Anual de DICOSE 2013.

En ese momento había 131 establecimientos lecheros habilitados, totalizando una población bovina que ascendía a 40.325 cabezas. Se seleccionaron 10 por predios mediante el método aleatorio simple con probabilidad proporcional al tamaño, utilizando el programa ProMESA 1.3 (León y Duffy, 2009). Algunas características de los establecimientos elegidos por el programa se muestran en la Tabla II.

Tabla II: Predios lecheros del Departamento de Paysandú seleccionados para el muestreo de detección de *Listeria monocytogenes*.

Establecimiento	Cantidad de Bovinos (Declaración Jurada 2013 DICOSE)	Seccional Policial
A	1278	4°
B	2982	6°
C	411	6°
D	198	7°
E	112	4°
F	3223	4°
H	1462	5°
J	447	5°
K	1412	5°
L	302	5°

7.2 Muestreo en predio lechero con caso confirmado de listeriosis bovina

En Octubre de 2014 el Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino” recibió una consulta por un caso sospechoso de listeriosis nerviosa en un establecimiento lechero de Progreso, Departamento de Canelones (34°37'47.77”S; 56°12'12.5”O). El mismo se confirmó por aislamiento de *L. monocytogenes*, estudios histopatológicos e inmunohistoquímica, por lo que se resolvió concurrir al predio para coleccionar muestras de otros bovinos y ambiente.

El animal afectado fue un toro de raza cruce (Bonsmara x Red Poll) que presentó síntomas neurológicos caracterizados por marcha en círculos constante y depresión. Se encontraba pastoreando en un potrero de 30 ha de Ryegrass (*Lolium multiflorum*) y Avena (*Avena sativa*) junto a 3 toros cruce (Bonsmara x Red Poll) y 60 vacas secas raza Jersey (rodeo problema). El animal no recibió tratamiento, el cuadro clínico tuvo una evolución de 3 días hasta que murió. El resto de los animales del rodeo se retiraron de ese potrero, sin registrar más casos clínicos.

Se extrajo la cabeza y se remitió refrigerada al Laboratorio Regional Noroeste. Al arribar una parte del sistema nervioso central (SNC) (hemisferio cerebral, cerebelo y tronco encefálico) se derivó para estudios microbiológicos, y la otra se sumergió en formol tamponado al 10% para estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

7.3 Muestras colectadas para aislamiento microbiológico

Cada predio se visitó una única vez, tomando muestras de los bovinos y del ambiente.

7.3.1 Muestras de bovinos

La categoría a muestrear fue la de vaca en ordeño. Basado en la prevalencia de bovinos portadores reportadas en los trabajos de Nightingale et al. (2004); Lyautey et al. (2007a); Esteban et al. (2009) y Latorre et al. (2009), se determinó tomar muestra de materia fecal de 30 vacas por predio, asumiendo como supuesto, que la prevalencia de portadores en los rodeos era del 10% (Dohoo et al., 2003). La elección de los animales fue aleatoria, contemplándose que todos los lotes fueran muestreados, en el caso de que hubiera lotes con alimentación distinta.

En el predio con el caso confirmado de listeriosis bovina se tomaron 15 muestras de materia fecal de bovinos del lote donde se encontraba el animal enfermo (rodeo problema) y otras 15 del lote de vacas en ordeño. Los animales fueron seleccionados aleatoriamente.

En cada predio se colectó una muestra de leche de tanque de frío del último ordeño.

A continuación se describen los procedimientos que se utilizaron para la recolección de muestras:

1. La materia fecal se tomó del recto de cada animal con guante individual y se depositó en bolsas plásticas estériles individuales

2. Leche de tanque de frío. Previo agitado de la leche en el tanque, se sumergió un cucharón limpio y desinfectado, se tomó la muestra y se depositó en un frasco estéril con tapa rosca.

Cada muestra se identificó y se mantuvo refrigerada en conservadoras a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

7.3.2 Muestras ambientales

Se tomaron muestras de agua del bebedero más próximo a la sala de ordeño (entrada o salida de la misma), suelo del corral de entrada y salida de la sala de ordeño y alimentos que estaban consumiendo las vacas en ordeño el día de la visita. En el predio con el caso confirmado de listeriosis se colectaron los alimentos de las vacas en ordeño y también del rodeo donde se encontraba el animal afectado (rodeo problema).

A continuación se describen los procedimientos utilizados para la colecta de las diferentes muestras:

1. Agua de bebedero. Se sumergió un frasco estéril con tapa rosca en el agua, allí se abrió la tapa y se cerró antes de sacarlo al exterior.
2. Suelo del corral de entrada y salida a la sala de ordeño. Se colectó la zona superficial del suelo en varios puntos seleccionados aleatoriamente de los corrales, en bolsa plástica estéril.
3. Alimentos. Se colectaron en forma individual en bolsa plástica estéril.
 - En el caso de alimentos ensilados, las muestras se tomaron directamente del mismo, a una distancia de 5 cm aproximadamente de la capa externa.
 - Para la toma de muestras de las pasturas, se recorrió toda la franja o potrero que estaban pastoreando las vacas en ese momento y se colectó el forraje en 10 puntos distintos determinados aleatoriamente. El forraje colectado se encontraba a una distancia de 5 cm del suelo, no incluía raíces, materia fecal, ni restos de suelo.
 - Los alimentos que se suministraban durante el ordeño se colectaron en los depósitos finales previo a su administración, y luego de ser mezclados (en el caso de que estuvieran compuestos por más de un componente).

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

7.4 Aislamiento microbiológico

7.4.1 Procedimiento

Esta actividad se realizó en la sección Bacteriología del Laboratorio Regional Noroeste DILAVE “Miguel C. Rubino”, Paysandú, Uruguay. Las muestras se procesaron dentro de las 24 horas luego de la colecta.

El cultivo de las muestras de agua, suelo, SNC, alimentos y materias fecales se realizó siguiendo el protocolo de Nightingale et al. (2004) y USDA (2013).

De cada predio se analizaron 6 pool de materia fecal. Cada pool estaba constituido heces de 5 vacas.

La mitad del SNC, 25 g de cada pool de materias fecales u otros sólidos, y 25 ml de agua se colocaron en bolsas estériles Stomacher (Stomacher, UK). A cada muestra se le agregó aseptícamente 225 ml de caldo de enriquecimiento primario Listeria UVM I (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 aseptícamente una alícuota de 100 µl a 10 ml de caldo de enriquecimiento secundario Listeria UVM II (Oxoid, UK), incubándose por otras 24 horas en aerobiosis a 30°C. Luego se sembraron 100 µl de UVM II 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. Se utilizaron cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644 como control positivo y medio de cultivo sin inocular como control negativo.

Para el análisis de las muestras de leche de tanque se utilizó el protocolo descrito por Van Kessel et al. (2004). Se sembraron 250 µl de leche por triplicado en placas de agar Oxford Modificado (Oxoid, UK) y se incubaron a 37°C durante 48 horas revisando las mismas a las 24 y 48 horas. Al mismo tiempo, colocaron 10 ml de cada muestra en 90 ml de caldo de enriquecimiento UVM (Acumedia, EEUU) a 37°C durante 48 horas y luego se hicieron reaislamientos en placas de agar Oxford Modificado (Oxoid, UK).

7.4.2 Identificación de especies del género *Listeria*

Las colonias con morfología sospechosa en agar Oxford Modificado (Oxoid, UK): blancas, pequeñas y rodeadas de un halo marrón negruzco (hidrólisis de la esculina) fueron reaisladas 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 fenotípicas de identificación (Anexo 1, Tabla 1):

- 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.

7.5 PCR múltiple para determinación del perfil de serotipo

Las pruebas de PCR para determinar perfil de serotipo y presencia de internalinas se realizaron entre Octubre y Diciembre de 2014.

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 previamente por Doumith et al. (2004).

Para la extracción de ADN los aislamientos 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 μM para el *lmo0737*, *ORF2819* y *ORF2110*; 1.5 μM para *lmo1118*; y 0.2 μM para *prs* (Tabla III).

Tabla III: 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
<i>lmo 0737</i>	For:AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	<i>L. monocytogenes</i>	No conocida, sin similitud
	Rev:ACGATTTCTGCTTGCCATCC			
<i>lmo1118</i>	For:AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	<i>L.monocytogenes</i>	No conocida, sin similitud
	Rev:CGGCTTGTTTCGGCATACTTA			
<i>ORF 2819</i>	For:AGCAAAATGCCAAAAGTGT	471	<i>L.monocytogenes</i>	Supuesto regulador transcripcional
	Rev:CATCACTAAAGCCTCCCATTG			
<i>ORF 2110</i>	For:AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	<i>L.monocytogenes</i>	Supuesta proteína secretada
	Rev:CATCCATCCCTTACTTTGGAC			
<i>prs</i>	For:GCTGAAGAGATTGCGAAAGAG	370	Todas las especies de <i>Listeria</i>	Supuesta fosforibosil pirofosfato sintetasa
	Rev:CAAAGAACCTTGGATTTGCGG			

^a For: forward; Rev: reverse

Tomado de: Doumith et al. (2004)

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 $\mu\text{l/ml}$) durante 15 minutos, se destiñeron con agua destilada durante 20 minutos, se observaron con luz ultravioleta y se fotografiaron.

7.6 PCR múltiple para detección de genes que codifican internalinas A, C y J

En los aislamientos de *L. monocytogenes* se determinó la presencia de los genes que codifican para internalina A (*inlA*) para confirmación de especie, así como internalinas C y J (*inlC* e *inlJ*) para determinar su potencial patógeno, según técnica descrita por Liu et al. (2007). Se utilizaron los siguientes cebadores: 5'ACGAGTAACGGGACAAATGC3' y 5'CCCGACAGTGGTGCTAGATT3' para *inlA* (800bp); 5'AATTCCCACAGGACACAACC3' y 5'CGGGAATGCAATTTTTCATA3' para *inlC* (517pb); 5'TGTAACCCCGCTTACACAGTT3' y 5'AGCGGCTTGGCAGTCTAATA3' para *inlJ* (238 pb). La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 0.8 U de Taq DNA polimerasa, buffer de PCR 1×, 200 µM de cada dNTP y aproximadamente 10 ng de ADN bacteriano junto a 40 pmol de cada cebador para *inlA*, 30 pmol para los correspondientes a *inlC* y 20 pmol para *inlJ*. Las reacciones de amplificación se realizaron en termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, EEUU), el programa consistió en 1 ciclo de 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos y 72 °C por 50 segundos; y 1 ciclo de 72 °C por 2 minutos. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y posteriormente revelados con bromuro de etidio.

7.7 Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Para la subtipificación molecular de *Listeria monocytogenes*, se utilizó la técnica de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés-pulsed field gel electrophoresis-) del Center for Disease Control and Prevention (EEUU) descrita en PulseNet. El mismo se realizó en Abril de 2015.

Los aislamientos de *L. monocytogenes* se sembraron en placas de agar infusión cerebro corazón (BHIA) y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se tomaron colonias con hisopo estéril y se transfirieron a tubos con 2 ml de buffer TE (10 mM Tris;1 mM EDTA, pH 8,0). Con espectrofotómetro se ajustó la densidad óptica de las suspensiones bacterianas a 1,3-1,4 a 610 nm de longitud de onda.

Posteriormente, se descongeló la solución madre de lisozima (20 mg/ml) y de proteinasa K (20 mg/ml). Se transfirieron 400 µl de cada suspensión bacteriana y se agregó 20 µl de solución de lisozima. La mezcla se incubó en baño con agua a 55-60°C durante 10 a 20 minutos. Luego se agregaron 20 µl de proteinasa K. Por último se agregaron 400 µl de agarosa al 1% (BioRad, EEUU) con 0,5% de SDS (termostatizada a 55-60°C).

Inmediatamente se colocó parte de la mezcla en un pocillo del molde para “plugs” previamente identificado y se dejó solidificar a temperatura ambiente por 15 minutos.

En un tubo se agregaron 5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8,0; 1% Sarcosina), 25 µl de proteinasa K y el “plug” correspondiente. Se incubaron en baño con agua a 54°C (+/-1°C) con agitación constante (150-175 rpm), durante 2 horas. Los “plugs” se lavaron dos veces con 15 ml de agua estéril ultrapura (precalentada entre 54-55°C) durante 10 minutos. Luego, se lavaron 4 veces con 15 ml de buffer TE (precalentado entre 54-55°C) en baño con agua a temperatura de 50-54°C durante 15 minutos, con agitación constante. Cuando se completó el último lavado, se decantó el TE y se agregaron 5 ml de TE nuevo a temperatura ambiente pH 8,0 a cada tubo.

Se rotularon 12 tubos con la identificación de los aislamientos (6 para digestión con la enzima *AscI* y 6 para digestión con la enzima *ApaI*) y 3 tubos para el estándar *Salmonella* serovar Braenderup utilizando como enzima de restricción *XbaI*. Se realizó una dilución 1:10 del buffer de restricción que acompaña a la enzima *AscI* y del buffer de la enzima *ApaI* respectivamente, con agua estéril ultrapura. Se agregaron 200 µl del buffer diluido a cada tubo y un fragmento del plug. Las muestras que iban a ser digeridas con *AscI* y *XbaI* se incubaron a 37°C y las que iban a ser digeridas con *ApaI* a 25°C, ambas durante 10-15 minutos.

Luego se retiró todo el buffer con pipeta y se agregaron 200 µl de la mezcla con la enzima *AscI*. Cada tubo se colocó flotando en baño con agua a 37°C durante 2 horas. A los otros 6 tubos se les retiró el buffer y se agregaron 150 µl de la mezcla con la enzima *ApaI*. El tubo se colocó en flotación en baño de agua a 25°C durante 2 horas. Para los tubos con el estándar (*Salmonella* Braenderup H9812), se procedió de igual forma, incubándose en baño con agua a 37°C durante 2 horas.

El gel para la corrida se preparó con agarosa certificada para pulsed field (1,5 g) (BioRad, EEUU) en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X (150 ml).

Previo a la colocación del gel, se encendió la bomba y el módulo de frío del equipo de electroforesis (BioRad, EEUU), se agregaron 2 litros de buffer TBE 0.5X, para asegurar un flujo a la cámara de 1 litro/minuto de buffer TBE a 14°C. Las condiciones para la electroforesis fueron: tiempo inicial de pulsado 4 segundos, tiempo final de pulsado 40 segundos, voltaje 6 V, ángulo de inclusión 120°, tiempo de corrida 19 horas.

Para el revelado del gel se agregó 40 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) a 400 ml de agua ultrapura y se sumergió totalmente el gel durante 20-30 minutos. Luego se lavó con agua destilada por 60 a 90 minutos, cambiando el agua cada 20-30 minutos.

Se fotografió el gel y los patrones de bandas de los 6 aislamientos se analizaron y compararon utilizando el software BioNumerics (Applied Maths, EEUU). Los clusters se realizaron utilizando el unweighted-pair group method algorithm (UPGMA), coeficiente de correlación de Dice con una tolerancia de 1% y una optimización de 0,5%. Para su clasificación epidemiológica también se utilizaron los criterios de Tenover et al. (1995). Los aislamientos que presentaron una similitud mayor o igual a 80% se consideraron del mismo pulsogrupo.

7.8 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, obex y médula cervical 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 et al. (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.

8. RESULTADOS

En los 11 establecimientos visitados se recolectaron 397 muestras: 11 de leche de tanque, 11 de suelo, 12 agua de bebedero, 319 de materias fecales de bovinos y 44 de alimentos (Tabla IV y V).

Tabla IV: Muestras de alimentos colectadas en los predios lecheros visitados en el Departamento de Paysandú.

Establecimiento	Alimentación
A	Lote 1 (ración sala): PC+ maíz molido+SM; Lote 2 (ración sala) RC+PC+SM+sorgo; Lote 3 (ración sala): PC+SM; Silo SPE; Silo MPE; ALF (Pastoreo)
B	Silo MPE } Heno MH } Mixer administración en comederos ALF (pastoreo) (potrero vaquillonas) ALF (pastoreo potrero vacas) Ración peleteada comercial en sala
C	ACH+TR (pastoreo) Ración sala: AFTR
D	Silo SPE AV (pastoreo); AFTR } Maíz quebrado } En sala
E	Silo SPE AV (pastoreo mañana); TB+AV (pastoreo tarde); Ración peleteada comercial en sala
F	Silo MPE TR+TB+FS (pastoreo) Ración peleteada comercial en sala
H	ALF (pastoreo) Silo SGH+AFTR (previo entrada sala)
J	AV+TB (pastoreo) Ración peleteada comercial+ Maiz molido (sala de ordeño)
K	ALF (1 potrero pastoreo) TB+RG+L (2 potreros pastoreo) PG } Silo SGH } Mixer administración en comederos Silo MPE }
L	ALF (pastoreo mañana) ACH+TR (pastoreo tarde) SF (pastoreo tarde-noche) Ración en polvo comercial en sala; Silo CPE+RC+Silo SGH (mixer)

PC: pellet de citrus (subproducto de la citricultura); SM: sal mineral; RC: raicilla de Cebada (*Hordeum vulgare*); SPE: Sorgo (*Sorghum* spp.) planta entera; MPE: Maíz (*Zea mays*) planta entera; ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*); MH: Moha (*Setaria italica*); ACH: Achicoria (*Cichorium intybus*); TR: Trébol Rojo (*Trifolium pratense*); AFTR: afrechillo de Trigo (*Triticum* spp.); AV: Avena (*Avena sativa*); TB: Trébol blanco (*Trifolium repens*); FS: Festuca (*Festuca arundinacea*); SGH: Sorgo (*Sorghum* spp.) grano húmedo; RG: Ryegrass (*Lolium* spp.); L: Lotus (*Lotus corniculatus*); PG: pellet de Girasol (*Heliantus annuus*); SF: Sorgo forrajero (*Sorghum* spp.); CPE: Cebada (*Hordeum vulgare*) planta entera.

Tabla V: Muestras de alimentos colectadas en el predio lechero con caso confirmado de listeriosis bovina en el Departamento de Canelones.

Establecimiento	Alimentación
I	VO: AV (Pastoreo), Silopack (ALF+TB), Ración peleteada comercial en sala RP: AV (Pastoreo)* Potrero problema: AV+RG

VO: vacas en ordeño; AV: Avena (*Avena sativa*); ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*); TB: Trébol blanco (*Trifolium repens*); RP: Rodeo problema (toros+vacas secas) RG: Ryegrass (*Lolium spp.*). (*) El rodeo problema se cambió de potrero luego de que el animal enfermo murió.

Se realizaron 143 cultivos correspondiendo 12 a muestras de agua, 11 a muestras de leche de tanque, 11 a suelo, 44 a muestras de alimento, 64 pools de materias fecales de bovinos y la mitad del SNC remitido. Se obtuvieron 6 aislamientos de *Listeria monocytogenes* (4,2%) y 56 de *Listeria innocua* (39%). En ninguna muestra de agua de bebederos y leche de tanque se recuperaron bacterias correspondientes al género *Listeria*. En 7 de 11 muestras (64%), el cultivo de suelo de entrada y salida a sala de ordeño fue positivo a *L. innocua*. Con respecto a los alimentos para consumo de los bovinos, en 15 se recuperaron *L. innocua* (34%) y dos resultaron positivos para *L. monocytogenes* (4,5%). De los 64 pools de materia fecal, hubo aislamiento de *L. innocua* en 34 (53%), mientras que 3 (4,6%) fueron positivo para *L. monocytogenes*. En el SNC del bovino con síntomas nerviosos se recuperó *L. monocytogenes* (Tabla VI).

Tabla VI: Resumen de aislamientos realizados por tipo muestra y especie del género *Listeria*.

	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Negativo	Total
Leche de tanque	0	0	11	11
Agua	0	0	12	12
Suelo	7	0	4	11
Alimentos	15	2	27	44
Pool de materia fecal	34	3	27	64
Sistema nervioso central	0	1	0	1
Total	56	6	81	143

8.1 Aislamientos por predio y características de los mismos

En cuanto a los aislamientos por predio, de los 11 establecimientos visitados en 9 (82%) se obtuvieron aislamientos del género *Listeria*. El 36% (4/11) de los predios presentó al menos un aislamiento de *L. monocytogenes* (Tabla VII).

Tabla VII: Resumen de predios con aislamiento según especie del género *Listeria*.

	<i>L. innocua</i> y <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	Negativo	Total
Predios con aislamiento	4	5	2	11

8.1.1 Establecimiento A

En la Tabla VIII, se representan los aislamientos obtenidos en el predio “A”. El día de la visita se ordeñaban 712 vacas con un manejo de 3 lotes según producción y etapa de lactancia. En el lote de menor producción se encontraban también los animales en tratamiento. Las raciones que se administraban en sala, estaban constituidas por varios componentes (Tabla IV) que se mezclaban en el suelo, en una pieza semiabierta contigua a la sala de ordeño. El mezclado se realizaba por parte del personal con palas de mano. La entrada y salida a sala de ordeño era de cemento, donde principalmente se acumulaba materia fecal de las vacas y en menor medida tierra. Los ensilados se encontraban en bolsas plásticas para almacenamiento de granos tipo Silobolsa (Silobolsa®, Argentina). Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes. Se obtuvieron aislamientos de *L. innocua* en 8 muestras, correspondiendo a: alimentos (ración sala Lotes 1 y 3), suelo de entrada y salida a sala de ordeño y 5 pool de materias fecales. No hubo aislamiento de *L. monocytogenes* (Tabla VIII).

Tabla VIII: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento A.

MUESTRA	RESULTADO
Leche de tanque	Negativo
Agua	Negativo
Silo SPE	Negativo
Silo MPE	Negativo
ALF (pastoreo)	Negativo
Ración sala Lote 1	<i>L. innocua</i>
Ración sala Lote 2	Negativo
Ración sala Lote 3	<i>L. innocua</i>
Suelo	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 1	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 2	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 3	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 4	Negativo
Pool materia fecal 5	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 6	<i>L. innocua</i>

SPE: Sorgo (*Sorghum* spp.) planta entera; MPE: Maíz (*Zea mays*) planta entera; ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*).

8.1.2 Establecimiento B

En este establecimiento se manejaban 2 lotes: uno de vacas y otro de vaquillonas, totalizando 704 hembras en ordeño el día de la visita. Parte de la entrada y salida a sala de ordeño era de cemento y otra parte de tierra. En las zonas de piso de tierra había gran cantidad de materia fecal y barro, debido a que el agua de lavado escurría hacia allí. La ración administrada en sala de ordeño era peleteada. Se almacenaba en un silo aéreo y llegaba a los comederos mediante un sistema de cañería automático. El silo de maíz (MPE) era de tipo trinchera (excavación en la tierra cubierto por nylon plástico para silos). Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

Se obtuvieron 2 aislamientos de *L. monocytogenes*: una en pool fecal y una en la franja de alfalfa (pastoreo) de las vacas en ordeño (Tabla IX). Además, se aislaron 9 *L. innocua* distribuidas en: suelo de entrada y salida de sala de ordeño, 3 en alimentos (ración sala, heno y pastoreo de alfalfa de las vaquillonas en ordeño) y en 5 pool de materias fecales de vacas y vaquillonas en ordeño (Tabla IX).

Tabla IX: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento B.

MUESTRA	RESULTADO
Agua	Negativo
Silo MPE	Negativo
Ración sala	<i>L. innocua</i>
Heno MH	<i>L. innocua</i>
ALF (pastoreo vacas)	<i>L. monocytogenes</i>
ALF (pastoreo vaquillonas)	<i>L. innocua</i>
Suelo	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 1	<i>L. monocytogenes</i>
Pool materia fecal 2	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 3	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 4	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 5	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 6	<i>L. innocua</i>
Leche de tanque	Negativo

MPE: Maíz (*Zea mays*) planta entera; MH: Moha (*Setaria italica*);
ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*).

8.1.3 Establecimiento C

En este establecimiento no hubo aislamiento de bacterias del género *Listeria* (Tabla X). Era un tambo familiar con 19 vacas en ordeño que se manejaban en un solo lote, donde todas pastoreaban en el mismo potrero. No se administraban ensilados por no tener producción propia de granos en el año 2014. La ración suministrada durante el ordeño

(afrechillo de trigo “AFTR”), se almacenaba en un depósito plástico en la sala de ordeño. El suelo de entrada y salida a la sala era de tierra con presencia de materia fecal, el día de la visita no presentaba áreas húmedas. Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

Tabla X: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento C.

MUESTRA	RESULTADO
ACH+TR (pastoreo)	Negativo
Ración sala (AFTR)	Negativo
Suelo	Negativo
Pool materia fecal 1	Negativo
Pool materia fecal 2	Negativo
Pool materia fecal 3	Negativo
Pool materia fecal 4	Negativo
Agua	Negativo
Leche de tanque	Negativo

ACH: Achicoria (*Cichorium intybus*); TR: Trébol Rojo (*Trifolium pratense*); AFTR: afrechillo de Trigo (*Triticum* spp.).

8.1.4 Establecimiento D

En este establecimiento el rodeo en ordeño era de 96 vacas que constituían un único lote con el mismo régimen alimenticio. La ración administrada durante el ordeño (afrechillo de trigo y maíz molido) se mezclaba por medio de palas por parte del personal, en el suelo de un área contigua a la sala de ordeño. El maíz molido y el silo de sorgo (SPE) se almacenaban en bolsas plásticas para granos de tipo Silobolsa (Silobolsa®, Argentina). El suelo de entrada y salida a sala de ordeño era de tierra con presencia de materia fecal, al momento de la visita estaba seco. Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

En pool fecal se obtuvo un aislamiento de *L. monocytogenes* y 3 de *L. innocua* distribuidas en: alimento (afrechillo de trigo) y dos en pool de materias fecales (Tabla XI).

Tabla XI: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento D.

MUESTRA	RESULTADO
Silo SPE	Negativo
AV (pastoreo)	Negativo
Maíz molido (sala)	Negativo
AFTR (sala)	<i>L. innocua</i>
Suelo	Negativo
Agua	Negativo
Leche de tanque	Negativo
Pool materia fecal 1	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 2	Negativo
Pool materia fecal 3	Negativo
Pool materia fecal 4	Negativo
Pool materia fecal 5	<i>L. monocytogenes</i>
Pool materia fecal 6	<i>L. innocua</i>

SPE: Sorgo (*Sorghum* spp.) planta entera; AFTR: afrechillo de Trigo (*Triticum* spp.); AV: Avena (*Avena sativa*).

8.1.5 Establecimiento E

Este tambo ordeñaba 42 vacas el día de la visita, los animales tenían un mismo manejo alimenticio. El silo de sorgo (SPE) se almacenaba en bolsas plásticas para granos de tipo Silobolsa (Silobolsa®, Argentina), y se administraba a las vacas en comederos unas horas previo a cada ordeño. La ración suministrada en sala era pelleteada, comercial. Se encontraba en bolsas de 25 kg, eran abiertas durante el ordeño y distribuidas en los comederos previo a la entrada de las vacas a la sala. El suelo de entrada y salida a sala de ordeño era de tierra, había escasa cantidad de materia fecal y estaba seco. Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

Se recuperaron 8 aislamientos de *L. innocua*: 2 en alimentos (silo de sorgo planta entera y ración administrada en sala), 5 en pool fecal y un aislamiento de suelo de entrada y salida a sala de ordeño. No se obtuvieron aislamientos de *L. monocytogenes* (Tabla XII).

Tabla XII: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento E.

MUESTRA	RESULTADO
Leche de tanque	Negativo
Agua	Negativo
AV (pastoreo)	Negativo
TB+AV (pastoreo)	Negativo
Silo SPE	<i>L. innocua</i>
Ración sala	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 1	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 2	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 3	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 4	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 5	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 6	Negativo
Suelo	<i>L. innocua</i>

AV: Avena (*Avena sativa*); TB: Trébol blanco (*Trifolium repens*);
SPE: Sorgo (*Sorghum* spp.) planta entera.

8.1.6 Establecimiento F

En el momento de la visita el predio ordeñaba 398 vacas y manejaba dos lotes: vacas y vaquillonas en ordeño. El silo de maíz (MPE) se almacenaba en bolsas plásticas para granos de tipo Silobolsa (Silobolsa®, Argentina). Mientras que la ración administrada en sala, estaba en un silo aéreo y por un sistema de cañerías llegaba a un depósito general donde se distribuía a los comederos por medio de baldes. La entrada y salida a sala de ordeño era de cemento, se observó acúmulos de materia fecal durante el ordeño, luego que este finalizaba, se lavaba todo el suelo quedando limpio. Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

Se obtuvo un aislamiento de *L. monocytogenes* en pool fecal de vacas. Mientras que se recuperaron *L. innocua* en muestra de suelo de entrada y salida a la sala de ordeño, en dos muestras de alimento y dos pooles fecales (Tabla XIII).

Tabla XIII: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento F.

MUESTRA	RESULTADO
Leche de tanque	Negativo
Agua	Negativo
Silo MPE	<i>L. innocua</i>
Ración sala	<i>L. innocua</i>
TR+TB+FS (pastoreo)	Negativo
Suelo	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 1	Negativo
Pool materia fecal 2	Negativo
Pool materia fecal 3	<i>L. monocytogenes</i>
Pool materia fecal 4	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 5	Negativo
Pool materia fecal 6	<i>L. innocua</i>

MPE: Maíz (*Zea mays*) planta entera; TR: Trébol Rojo (*Trifolium pratense*);
 TB: Trébol blanco (*Trifolium repens*); FS: Festuca (*Festuca arundinacea*).

8.1.7 Establecimiento H

Al momento de la visita, en el predio se ordeñaban 140 vacas que se manejaban en un único lote. Previo a la entrada a sala de ordeño se administraba una ración constituida por sorgo grano húmedo y afrechillo de trigo. En esta área el suelo era de tierra, presentaba materia fecal y barro debido al drenaje del agua utilizada en la sala de ordeño. El sorgo grano húmedo se almacenaba en bolsas plásticas para granos de tipo Silobolsa (Silobolsa®, Argentina) y el afrechillo de trigo en bolsas plásticas de 25 kg. Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

Se aislaron 6 colonias de *L. innocua*, una en la ración administrada previo a la entrada a sala de ordeño, suelo y cuatro en pool fecal de vacas en ordeño. No se recuperaron colonias de *L. monocytogenes* (Tabla XIV).

Tabla XIV: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento H.

MUESTRA	RESULTADO
Leche de tanque	Negativo
Agua	Negativo
ALF (pastoreo)	Negativo
Ración previo entrada sala	<i>L. innocua</i>
Suelo	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 1	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 2	Negativo
Pool materia fecal 3	Negativo
Pool materia fecal 4	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 5	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 6	<i>L. innocua</i>

ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*); Ración previo entrada sala (sorgo grano húmedo + afrechillo de Trigo).

8.1.8 Establecimiento I

A partir de la muestra de sistema nervioso central (SNC) del animal enfermo se recuperó *L. monocytogenes* (Tabla XV). En el estudio histopatológico del SNC se observó a nivel de tronco encefálico (puente, bulbo raquídeo y obex) meningitis supurativa moderada, difusa; múltiples manguitos perivasculares compuestos por células mononucleares; presencia de múltiples microabscesos y focos de malacia (Figura 2).

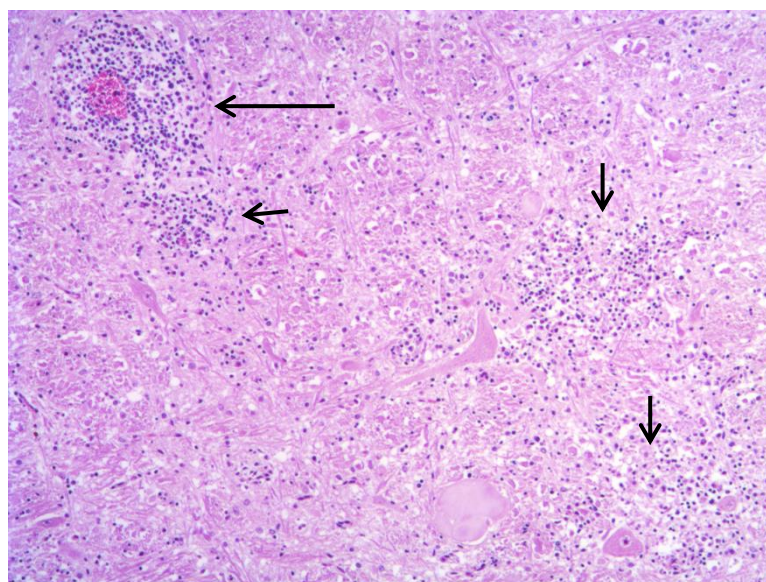


Figura 2: Bovino SNC (Puente). Manguito perivascular (flecha grande) y múltiples microabscesos (flechas pequeñas) constituidos por linfocitos y neutrófilos, H&E, 150X.

En la inmunohistoquímica se observó marcación positiva a *L. monocytogenes* en los microabscesos a nivel de puente y obex (Figura 3).

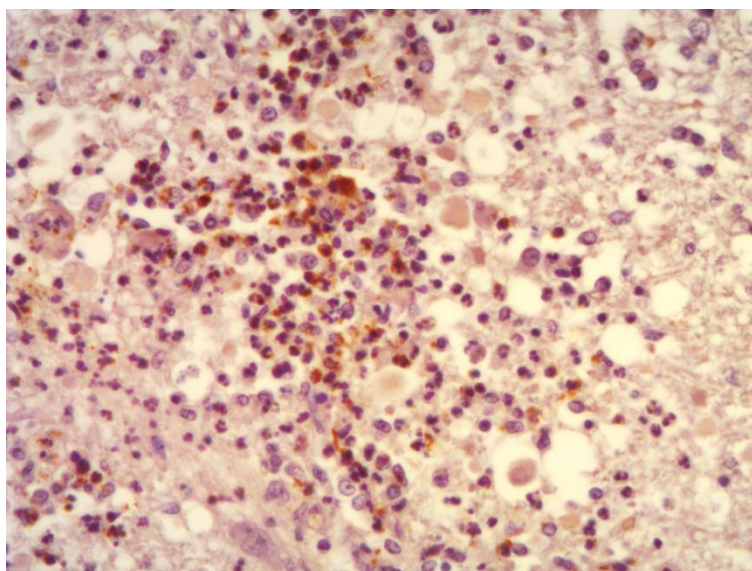


Figura 3: Bovino SNC (Puente). Inmunomarcación positiva a *L. monocytogenes* (áreas de color marrón) en el citoplasma de neutrófilos y linfocitos de un microabsceso, DAB, 400X.

Este predio se visitó 9 días después de haber recibido la muestra. En el momento de la visita, se ordeñaban 154 vacas manejadas en un único lote. El rodeo donde se registró el caso clínico, constituido por 60 vacas secas y 3 toros (rodeo problema) había sido cambiado de potrero luego que el animal afectado murió. Ambos rodeos pastoreaban en potreros de Avena (*Avena sativa*) diferentes. El rodeo en ordeño recibía además, pastura ensilada en silo pack y ración pelleteada comercial en sala. Esta ración se almacenaba en un silo aéreo y por un sistema automatizado de cañerías se distribuía directamente a los comederos. El suelo de entrada y salida a sala era de cemento, no se observó acúmulos de materia fecal ni materia orgánica. Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

En las muestras colectadas, se aislaron 6 *L. innocua* (pastoreo actual del rodeo problema y de las vacas en ordeño, pools de materias fecales del rodeo problema y rodeo en ordeño). En la pastura donde se encontró el toro enfermo (potrero problema) se obtuvo *L. monocytogenes* (Tabla XV).

Tabla XV: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento I.

MUESTRA	RESULTADO
Sistema nervioso central bovino	<i>L. monocytogenes</i>
Leche de tanque	Negativo
Agua PP	Negativo
Agua SO	Negativo
AV (pastoreo RP actual)	<i>L. innocua</i>
AV+RG (PP)	<i>L. monocytogenes</i>
Silo pack (ALF+TB)	Negativo
Ración sala	Negativo
AV (pastoreo VO)	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 1 (RP)	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 2 (RP)	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 3 (RP)	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 4 (VO)	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 5 (VO)	Negativo
Pool materia fecal 6 (VO)	Negativo
Suelo	Negativo

PP: potrero problema (potrero donde se observó el animal enfermo); SO: sala ordeño; AV: Avena (*Avena sativa*); RP: rodeo problema (lote secas y toros); RG: Ryegrass (*Lolium spp.*); ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*); TB: Trébol blanco (*Trifolium repens*); VO: rodeo de vacas en ordeño.

8.1.9 Establecimiento J

Al momento de la visita se ordeñaban 198 vacas que se manejaban en un único lote. La ración administrada en el ordeño se mezclaba en una sala contigua, en el suelo, con pala por parte del personal. No se administraban ensilados. El suelo de entrada y salida a sala de ordeño era parte de cemento y parte de tierra, en esta última se observó abundante materia fecal y barro. Las pasturas no eran fertilizadas con materia fecal de rumiantes ni con efluentes.

Se aisló *L. innocua* en una muestra de alimentos (ración administrada en sala), una en suelo de entrada y salida a sala de ordeño y dos en pools de materia fecal. No se obtuvieron aislamientos de *L. monocytogenes*. (Tabla XVI).

Tabla XVI: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento J.

MUESTRA	RESULTADO
Leche de tanque	Negativo
Agua	Negativo
Suelo	<i>L. innocua</i>
Ración sala (pellet comercial + maíz quebrado)	<i>L. innocua</i>
AV+TB (pastoreo)	Negativo
Pool materia fecal 1	Negativo
Pool materia fecal 2	Negativo
Pool materia fecal 3	Negativo
Pool materia fecal 4	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 5	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 6	Negativo

AV: Avena (*Avena sativa*); TB: Trébol blanco (*Trifolium repens*).

8.1.10 Establecimiento K

Este predio ordeñaba 652 vacas, separadas en 3 lotes según producción y etapa de lactancia. En el lote de menor producción se encontraban también los animales en tratamiento. El suelo de entrada y salida a sala era de cemento, pero mientras un lote se ordeñaba otro esperaba en un corral previo de piso de tierra. En este último había abundante barro, materia fecal y orina. Con respecto a los alimentos, el pellet de girasol (PG) se almacenaba dentro de un galpón en el suelo, mientras que los ensilados (MPE y SGH) se almacenaban en bolsas plásticas de tipo Silobolsa (Silobolsa®, Argentina). Todos los lotes luego del ordeño de la mañana consumían en comederos el pellet y ensilados previamente mezclados en mixer (Tabla IV). El lote de alta producción (lote 1) pastoreaba la pradera identificada como Trébol blanco+ Ryegrass+ *Lotus corniculatus* 1 (TB+RG+L), mientras que el lote de mediana y baja producción (lote 2 y 3) pastoreaban pradera de igual composición identificada con el 2 (Tabla XVII).

Se recuperó *L. innocua* en el suelo de entrada y salida de la sala de ordeño; mientras que en las muestras de alimento se obtuvo *L. innocua* del silo de sorgo grano húmedo (Silo SGH). En 5 pool fecal se aisló *L. innocua* (Tabla XVII).

Tabla XVII: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento K.

MUESTRA	RESULTADO
Leche de tanque	Negativo
Agua	Negativo
Suelo	<i>L. innocua</i>
ALF (pastoreo)	Negativo
TB+RG+L (1) (pastoreo)	Negativo
TB+RG+L (2) (pastoreo)	Negativo
PG	Negativo
Silo MPE	Negativo
Silo SGH	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 1	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 2	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 3	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 4	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 5	<i>L. innocua</i>
Pool materia fecal 6	Negativo

ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*); TB: Trébol blanco (*Trifolium repens*); RG: Ryegrass (*Lolium* spp.); L: Lotus (*Lotus corniculatus*); PG: pellet de Girasol (*Heliantus annuus*); MPE: Maíz (*Zea mays*) planta entera; SGH: Sorgo (*Sorghum* spp.) grano húmedo.

8.1.11 Establecimiento L

Al momento de la visita el predio contaba con 290 vacas en ordeño, manejadas en un único lote.

Los ensilados (planta entera de Cebada (CPE) y sorgo grano húmedo (SGH)) se mezclaban en un mixer junto a la raicilla de Cebada previo a su administración. La entrada y salida a sala de ordeño era de cemento, no se observó presencia de materia fecal ni materia orgánica.

No se recuperaron bacterias del género *Listeria* en ninguna de las muestras cultivadas (Tabla XVIII).

Tabla XVIII: Aislamientos del género *Listeria* en el Establecimiento L.

MUESTRA	RESULTADO
Leche de tanque	Negativo
Agua	Negativo
ALF (pastoreo)	Negativo
ACH+TR (pastoreo)	Negativo
SF	Negativo
Ración sala	Negativo
Silo CPE+RC+Silo SGH	Negativo
Suelo	Negativo
Pool materia fecal 1	Negativo
Pool materia fecal 2	Negativo
Pool materia fecal 3	Negativo
Pool materia fecal 4	Negativo
Pool materia fecal 5	Negativo
Pool materia fecal 6	Negativo

ALF: Alfalfa (*Medicago sativa*); ACH: Achicoria (*Cichorium intybus*); TR: Trébol Rojo (*Trifolium pratense*); SF: Sorgo forrajero (*Sorghum* spp.); CPE: Cebada (*Hordeum vulgare*) planta entera; RC: raicilla de Cebada (*Hordeum vulgare*); SGH: Sorgo (*Sorghum* spp.) grano húmedo.

8.2 PCR múltiple para determinación del perfil del serotipo

Los dos aislamientos de *L. monocytogenes* del establecimiento B obtenidos en la pastura de las vacas y del pool fecal fueron tipificadas como serotipo 1/2a (Figura 4).

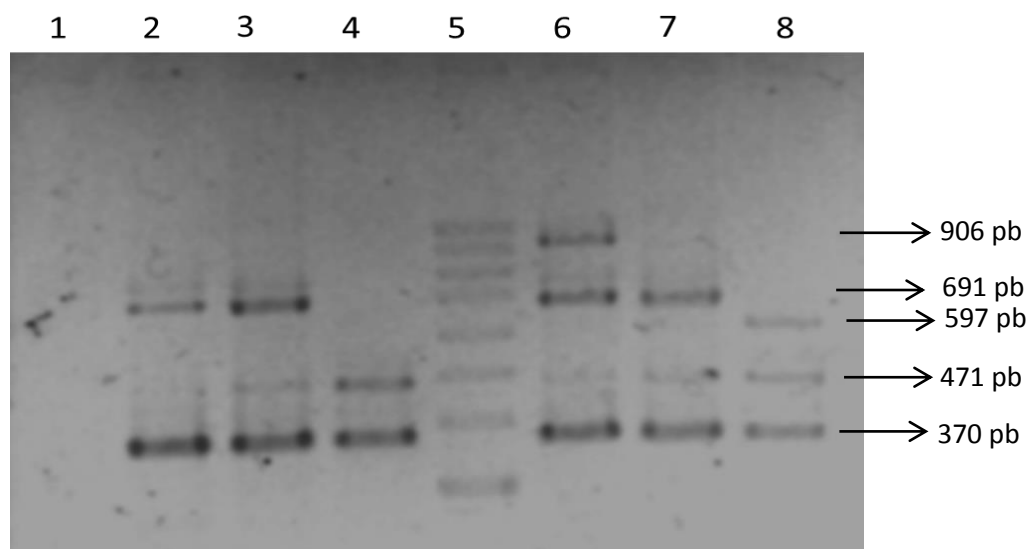


Figura 4: PCR múltiple perfil de serotipo de *Listeria monocytogenes* aisladas en Establecimiento B. Carril 1: Control Negativo; Carril 2: Control serotipo 1/2a Carril 3: Aislamiento pastoreo Alfalfa vacas; Carril 4: Control serotipo 1/2b; Carril 5: Ladder; Carril 6: Control serotipo 1/2c; Carril 7: Aislamiento pool fecal; Carril 8: Control serotipo 4b.

El aislamiento de pool fecal del Establecimiento D y del sistema nervioso central del bovino afectado en el Establecimiento I correspondieron al serotipo 4b (Figura 5).

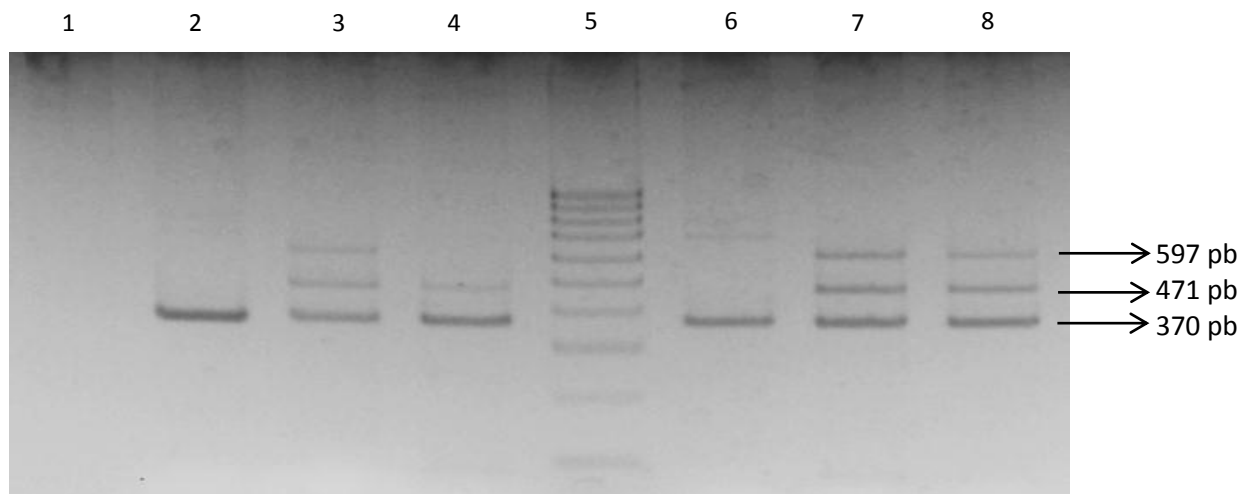


Figura 5: PCR múltiple perfil de serotipo de *Listeria monocytogenes* aisladas en Establecimiento D y en SNC de bovino con encefalitis (Establecimiento I). Carril 1: control negativo; Carril 2: serotipo 1/2a; Carril 3: Aislamiento de SNC bovino (Establecimiento I); Carril 4: control serotipo 1/2b; Carril 5: Ladder; Carril 6: control serotipo 1/2c; Carril 7: Aislamiento de pool fecal Establecimiento D; Carril 8: control serotipo 4b.

El aislamiento obtenido de la pastura donde ocurrió el caso de listeriosis (Establecimiento I) se tipificó como 4b, mientras que el aislamiento del pool fecal N°3 del Establecimiento F correspondió al serotipo 1/2a (Figura 6).

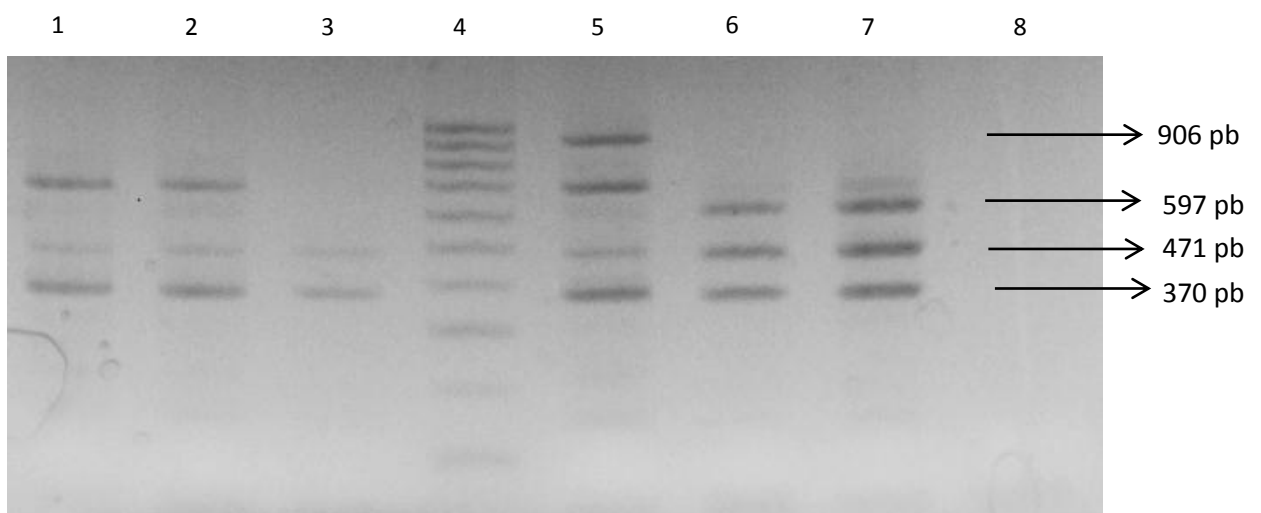


Figura 6: PCR múltiple perfil de serotipo de *Listeria monocytogenes* aisladas en Establecimiento F e I. Carril 1: control serotipo 1/2a; Carril 2: Aislamiento de pool fecal Establecimiento F; Carril 3: control serotipo 1/2b; Carril 4: Ladder; Carril 5: control serotipo 1/2c; Carril 6: Aislamiento de pastoreo potrero problema (Establecimiento I); Carril 7: control serotipo 4b; Carril 8: Control negativo.

8.3 PCR múltiple para detección de genes que codifican internalinas A, C y J

Los aislamientos recuperados a partir del pool fecal de vacas y de pastura (Alfalfa) en el Establecimiento B, así como el aislamiento del SNC del bovino con síntomas nerviosos fueron positivo a la presencia de los genes que codifican Internalina A, C y J (Figura 7).

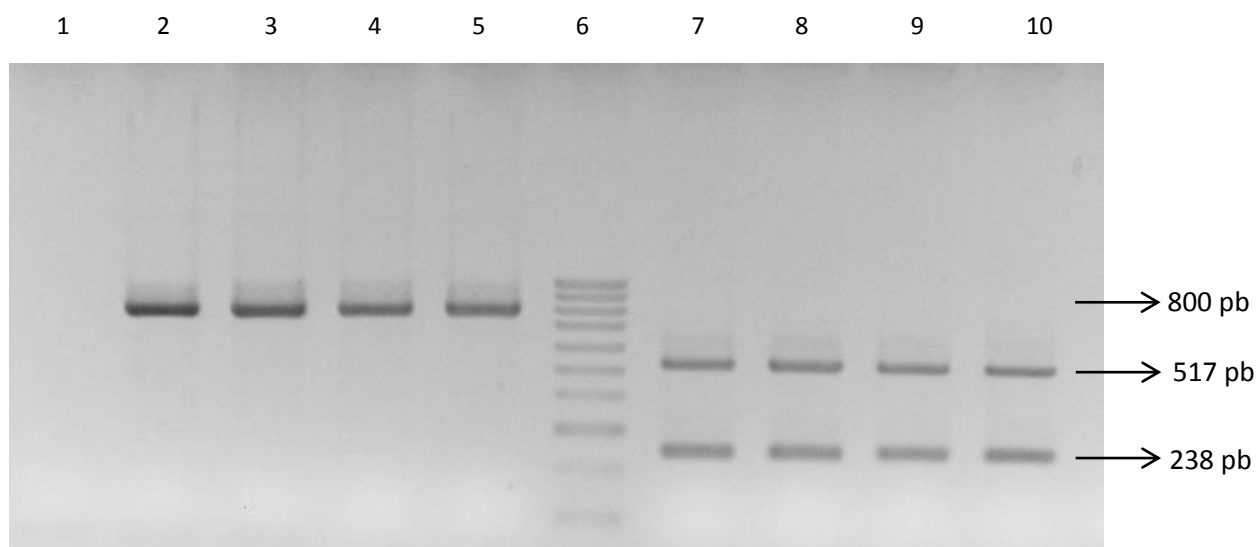


Figura 7: PCR múltiple Internalinas A, C y J. Carril 1: Control negativo; Carril 2 Control positivo *inlA*; Carril 3: Aislamiento pastoreo Establecimiento B; Carril 4: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento B; Carril 5: Aislamiento de SNC bovino (Establecimiento I); Carril 6: Ladder Carril 7: Control positivo *inlC* (517 pb) e *inlJ* (238 pb); Carril 8: Aislamiento pastoreo Establecimiento B; Carril 9: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento B; Carril 10: Aislamiento de SNC bovino (Establecimiento I).

Los aislamientos recuperados en el Establecimiento D y en el Establecimiento F, ambos a partir de pools fecales de vacas fueron positivos a la presencia de genes que codifican Internalina A, C y J (Figura 8 y 9).

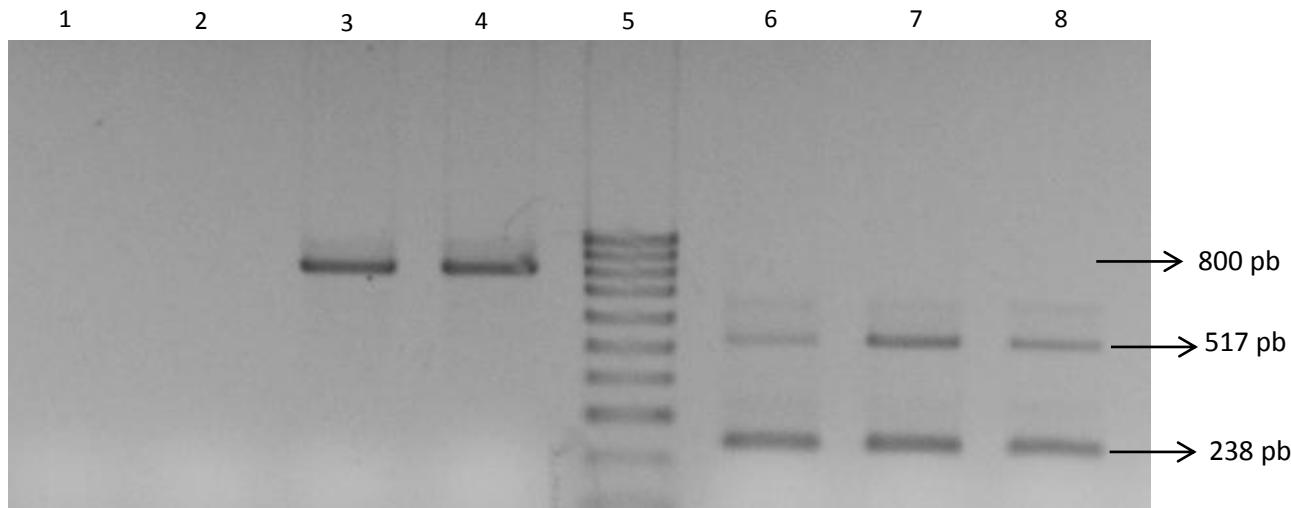


Figura 8: PCR múltiple Internalinas A, C y J. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento D; Carril 3: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento F; Carril 4: Control positivo *inLA* (800 pb); Carril 5: Ladder; Carril 6: Control positivo *inLC* (517 pb) e *inLJ* (238 pb); Carril 7: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento D; Carril 8: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento F.

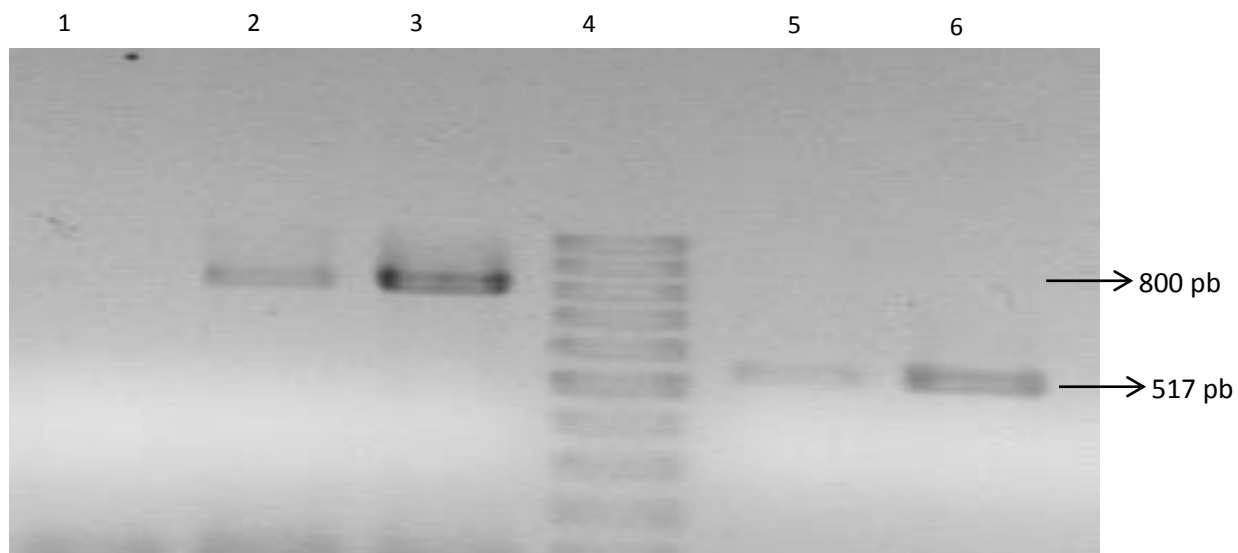


Figura 9: PCR múltiple Internalinas A, C y J. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Control positivo *inLA* (800 pb); Carril 3: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento D; Carril 4: Ladder; Carril 5: Control positivo *inLC* (517 pb); Carril 6: Aislamiento pool fecal vacas Establecimiento D.

El aislamiento recuperado de la pastura (Avena+ Rye grass) donde se encontraba el bovino con listeriosis nerviosa (Establecimiento I) fue negativo al gen que codifica Internalina A (la prueba se repitió tres veces siempre con resultado negativo), pero fue positivo a la presencia de genes que codifican Internalinas C y J (Figura 10).

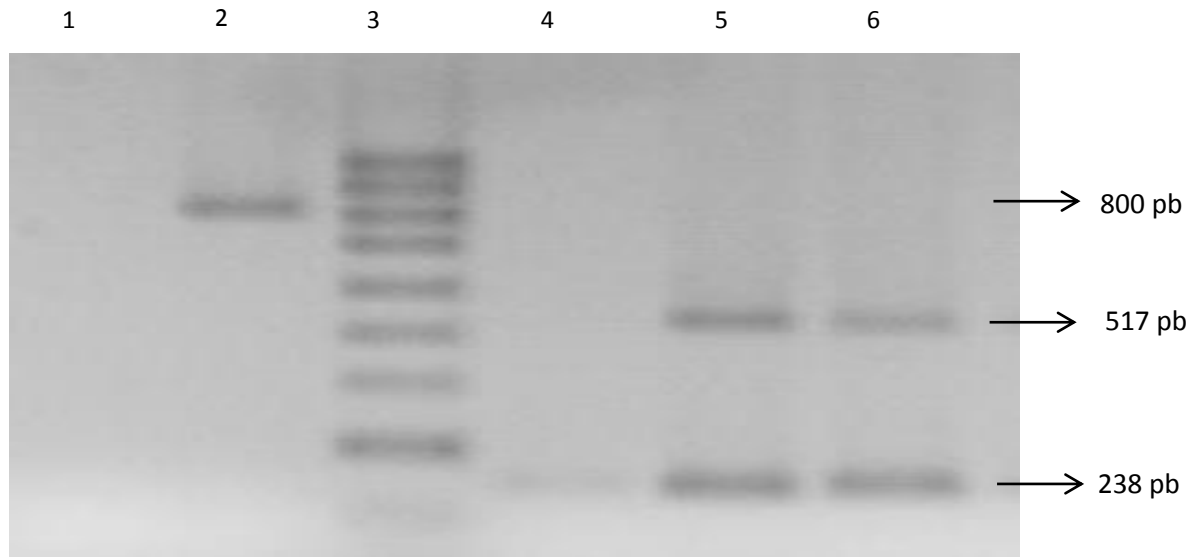


Figura 10: PCR múltiple Internalinas A, C y J. Carril 1: Control negativo; Carril 2: Control positivo *inlA* (800 pb); Carril 3: Ladder; Carril 4: Aislamiento pastura Establecimiento I; Carril 5: Control positivo *inlC* (517 pb) e *inlJ* (238 pb); Carril 6: Aislamiento pastura Establecimiento I.

8.4 Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Con la digestión de las enzimas *AscI* y *Apal* se obtuvieron 5 patrones diferentes (Anexo 1, Figura 1). Dentro de los aislamientos de *L. monocytogenes* del perfil de serotipo 4b, el recuperado en SNC del bovino con meningoencefalitis del Establecimiento I tuvo un 92,9% de similitud con el obtenido en la pastura, por lo que ambos corresponden al mismo pulsogrupo y se clasificaron epidemiológicamente como estrechamente relacionados. En cambio, el aislamiento del establecimiento D, recuperado de un pool fecal de vacas, mostró un 70,6% de similitud con los anteriores, por lo que se clasificó epidemiológicamente como no relacionado y se encuentra en un pulsogrupo diferente (Figura 11).

Con respecto a los aislamientos del perfil de serotipo 1/2a, los obtenidos en el Establecimiento B (pool fecal de vacas en ordeño y pastura consumida por las vacas) presentaron 100% de similitud en el número y tamaño de los fragmentos de ADN entre sí, por lo que desde el punto de vista epidemiológico se clasifica como indistinguible, o sea es la misma cepa que está presente en los alimentos y animales (Figura 11 y 12). Por otro lado, el aislamiento del pool fecal de vacas del Establecimiento F presentó una similitud del 64% con los aislamientos del Establecimiento B, por lo que epidemiológicamente no están relacionadas y se ubica en un pulsogrupo diferente (Figura 12).

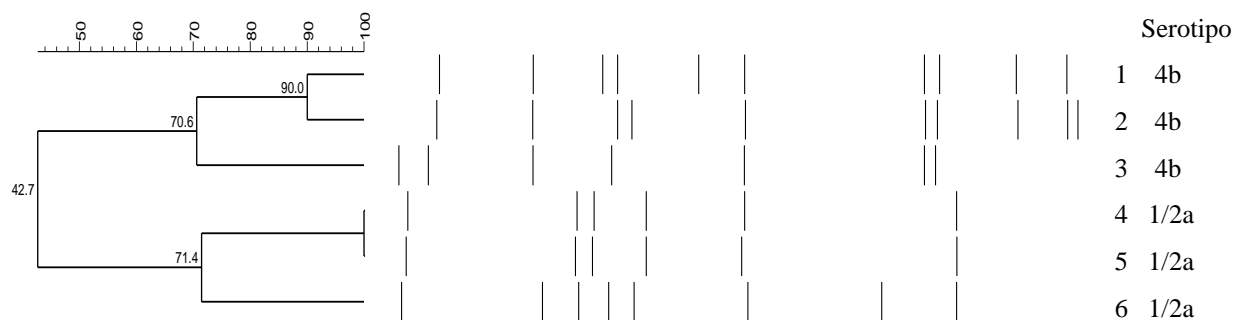


Figura 11: Dendrograma de los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenido en la electroforesis de campo pulsado digeridas con *AscI*. 1: Pastura Establecimiento I perfil serotipo 4b; 2: Aislamiento SNC bovino perfil serotipo 4b Establecimiento I; 3: Pool fecal vacas Establecimiento D perfil serotipo 4b; 4: Pool fecal vacas Establecimiento B perfil serotipo 1/2a; 5: Pastura Establecimiento B perfil serotipo 1/2a; 6: Pool fecal vacas Establecimiento F perfil serotipo 1/2a.

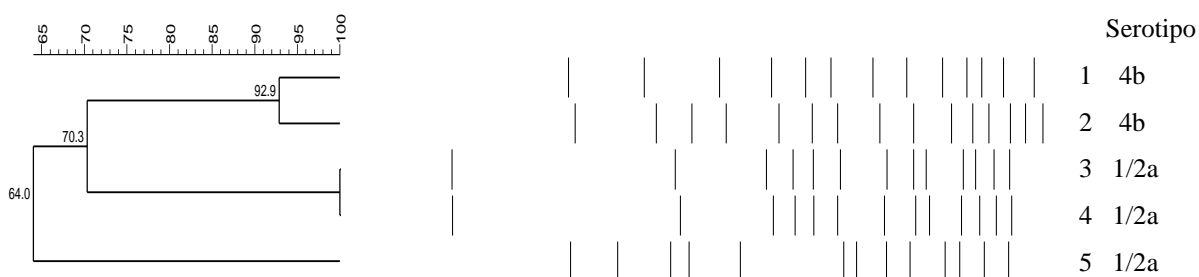


Figura 12: Dendrograma de los aislamientos de *L. monocytogenes* obtenido en la electroforesis de campo pulsado digeridas con *ApaI*. 1: Pastura Establecimiento I perfil serotipo 4b; 2: Aislamiento SNC bovino perfil serotipo 4b Establecimiento I; 3: Pool fecal vacas Establecimiento B perfil serotipo 1/2a ; 4: Pastura Establecimiento B perfil serotipo 1/2a; 5: Pool fecal vacas Establecimiento F perfil serotipo 1/2^a.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se confirma la hipótesis, detectando presencia de bacterias del género *Listeria* en los bovinos y ambiente de nueve (9/11) predios lecheros estudiados. En cuatro predios (4/11) se detecta *L. monocytogenes* en bovinos y ambiente de cuatro predios. Los aislamientos se registraron tanto en predios sin antecedentes de listeriosis, como en un predio con un caso reciente de la forma nerviosa, en concordancia con el trabajo de Nightingale et al. (2004). Además, en 3 predios del departamento de Paysandú se detectaron vacas portadoras clínicamente sanas que excretan *L. monocytogenes* por materia fecal, situación descrita en estudios realizados en tambos en otros países (Nightingale et al. 2004; Latorre et al., 2009; Mohammed et al., 2009). La presencia de bovinos portadores constituiría un riesgo, ya que perpetúan los ciclos de transmisión de esta bacteria en los predios a través de la excreción fecal mientras pastorean ó, indirectamente a través del uso del estiércol como abono para las pasturas (Ivanek et al., 2006).

Si bien el trabajo de Ho et al. (2007a) demostró que la excreción fecal de *L. monocytogenes* es intermitente, tomando en cuenta el número de animales muestreados en los predios donde no se detectaron animales portadores, se podría especular que la prevalencia de portadores dentro de estos rodeos era menor al 10% (Dohoo et al., 2003). Esteban et al. (2009) en un muestreo en el País Vasco reportan una prevalencia de bovinos portadores variable (de 5,1% a 72%), mientras que Lyautey et al. (2007a) y Latorre et al. (2009) una prevalencia menor al 10%.

Con respecto al caso de listeriosis nerviosa, el aislamiento en SNC se asoció a las lesiones histológicas y la marcación inmunohistoquímica observada. La meningoencefalitis con microabscesos a nivel de tronco encefálico es la forma más común de listeriosis en rumiantes (Oevermann et al., 2010), además en Uruguay *L. monocytogenes* es uno de los principales agentes causales de encefalitis en bovinos (Easton et al., 2012). Tomando en cuenta que solo enfermó un bovino en un total de 64 que formaban el rodeo, se sospecha que ese animal presentaba alguna patología que lo hizo susceptible a la infección, debido a que este agente es un patógeno oportunista (Vázquez-Boland et al., 2001; Oevermann et al., 2010). Esto no pudo determinarse ya que no se remitieron órganos ni otros materiales para realizar otros estudios en el laboratorio.

En dos predios se detectó *L. monocytogenes* en alimentos consumidos por los bovinos. Uno de ellos fue un predio con vacas portadoras asintomáticas de *L. monocytogenes* 1/2a en materia fecal (Establecimiento B) y el otro, el predio con el caso clínico de listeriosis por serotipo 4b (Establecimiento I). En ambos, los alimentos contaminados eran pasturas implantadas (Alfalfa en el primero y Rye grass + Avena en el segundo). Debido a que ninguna de las pasturas fue fertilizada con estiércol o efluentes, es probable que la excreción fecal de *L. monocytogenes* por parte de los bovinos del rodeo fue la fuente de contaminación (Ivanek et al., 2006). En el predio B los pulsotipos obtenidos en los aislamientos en animales y alimento fueron genéticamente idénticos, por lo que epidemiológicamente se clasificó como indistinguible según Tenover et al. (1995); esto indica que este alimento puede actuar como vehículo de infección para los animales. En el caso del predio I, el patrón de PFGE obtenido en el aislamiento de la pastura se clasificó como estrechamente relacionado con el recuperado del SNC. La variación en el patrón de bandas de ADN entre ambos aislamientos podría explicarse porque la recolección de muestras en el predio ocurrió nueve días después del diagnóstico del caso, y en ese período pudo haber modificaciones genéticas en las poblaciones de *L. monocytogenes* (Tenover et al., 1995; Vela et al., 2001). Por lo tanto, en ambos predios se relacionaría la presencia de *L. monocytogenes* en los bovinos al consumo de pasturas implantadas, y no al consumo de ensilados contaminados como se describe en otros reportes (Nightingale et al., 2004; Nightingale et al., 2005; Ho et al., 2007a), ya que en ninguno de estos alimentos analizados se obtuvo aislamiento de *L. monocytogenes*. Este hallazgo es relevante ya que el 50% de la alimentación de los bovinos lecheros en Uruguay está basado en el pastoreo directo de especies forrajeras (INALE, 2015). En el mismo sentido, en Nueva Zelanda también se han comunicado casos de listeriosis en ovinos asociados a condiciones de pastoreo (Fairley et al., 2012). En focos de listeriosis en rumiantes reportados por Wiedmann et al. (1994) y Yoshida et al. (1998), las fuentes de contaminación para los animales tampoco fueron los ensilados. Se sospecha que los rumiantes perpetúan la transmisión de la bacteria en los predios a través de la excreción fecal mientras pastorean (Ivanek et al., 2006). La presencia de *L. monocytogenes* en las pasturas, sugiere que no debería descartarse la presencia de la enfermedad en rumiantes, en casos con síntomas clínicos compatibles (marcha en círculos, parálisis facial unilateral, abortos) sin antecedentes de consumo de ensilados.

En otros dos predios lecheros estudiados (F y D) se detectaron animales excretores de *L. monocytogenes* pero no fue posible determinar la fuente de contaminación. Esto podría

explicarse porque hay una baja proporción de bovinos que excretan *L. monocytogenes* en materia fecal en ausencia de factores de riesgo como estrés o consumo de alimentos contaminados (Ho et al., 2007a; Ivanek et al., 2007).

En nueve predios se detectó la presencia de *L. innocua* a nivel de materia fecal y de alimentos para consumo bovino. En cinco predios *L. innocua* se recuperó de un único alimento de distintas características como ración, pasturas o ensilados. Trabajos de Ho et al. (2007a) e Ivanek et al. (2007) reportan que la excreción fecal de *L. monocytogenes* tarda entre 24 a 96 horas luego de ingresar al tracto digestivo. Por lo que se podría pensar que en estos predios, este alimento era la fuente de infección.

Las raciones administradas en sala durante el ordeño, fue el tipo de alimento que registró mayor cantidad de aislamientos de *L. innocua*. Este resultado se relacionaría a las condiciones de almacenamiento de estos alimentos, principalmente higiene y humedad, que permiten el desarrollo de este agente (Ivanek et al., 2006). De los 11 alimentos ensilados analizados, 3 (27%) fueron positivos a *L. innocua*. Si bien en este trabajo no se realizaron análisis de calidad de los ensilajes, la presencia de esta especie indicaría que en estos alimentos estarían dadas las condiciones para el desarrollo de *L. monocytogenes* (Ryser et al., 1997). Por otro lado, el tipo de ensilado también influye en la presencia o no de la bacteria; *L. monocytogenes* es un problema más frecuente en silo embalado (o silobolsa) que en silo de trinchera, por tener el primero una mayor superficie expuesta a deterioro aeróbico que el segundo (Fenlon, 1985). En este trabajo, los 3 ensilados con aislamiento del género *Listeria* eran de tipo silobolsa.

Cabe destacar que de los 64 pooles de materias fecales bovinas analizadas, el 53% fue positivo a *L. innocua*, este número es relevante ya que se han reportado casos de listeriosis por esta especie en rumiantes y seres humanos (Walker et al., 1994; Perrin et al., 2003; Hofer & Reis, 2005; Rocha et al., 2013a; Favaro et al., 2014).

El hecho de que no se aislaron colonias de *Listeria* spp. en ninguna de las muestras de leche de tanque, estaría relacionado por un lado, a una rutina de ordeño higiénica que impidió la contaminación con materia fecal, y por otro, a una buena limpieza de la máquina de ordeño y tanque de frío que impidió la formación de biofilms bacterianos (Yoshida et al., 1998; Latorre et al., 2009; Latorre et al., 2010). El aislamiento de *L. monocytogenes* en leche de vacas sanas es extremadamente raro ya que la ubre no sería un órgano blanco específico de la bacteria (Fedio et al., 1990; Latorre et al., 2009). Además,

la prevalencia de *L. monocytogenes* en leche de tanque esta descrita como baja, según lo comunicado por Van Kessel et al. (2004) en un muestreo realizado en Estados Unidos, con un 6,5% de aislamientos en leche de tanque. Si bien en este trabajo solo se analizaron 11 muestras, los resultados obtenidos son significativos desde el punto de vista de la salud pública, ya que la presencia de la bacteria en leche cruda constituye un riesgo de contaminación para las plantas procesadoras, así como también, para la contaminación luego del procesamiento de los alimentos (Borucki et al., 2003; Ho et al., 2007b).

En el agua de bebida tampoco hubo aislamientos de *Listeria* spp., en concordancia con estudios realizados en predios con rumiantes por Yoshida et al. (1998) y Nightingale et al. (2005). Esto se vincularía a que el agua no estaba contaminada con materia fecal de las vacas. En otros trabajos con aislamiento de *L. monocytogenes*, se registró contaminación en agua con materia fecal (Latorre et al., 2009; Mohammed et al., 2009). En este trabajo el agua para consumo bovino se colectó de bebederos, con menores posibilidades de contaminación fecal. En sistemas fluviales se 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*, lo que constituyen posibles fuentes de infección para humanos y animales (Lyautey et al., 2007b; den Bakker et al., 2014; Linke et al., 2014).

La recuperación de *L. innocua* en siete muestras de suelo de entrada y salida a la sala de ordeño, se asociaría por un lado a la presencia de materia fecal de las vacas, y también a condiciones medioambientales que favoreció el desarrollo del género *Listeria* como humedad, temperatura, pH y composición de los suelos (mezcla de humus y arena) (Latorre et al., 2009; McLaughlin et al., 2011; Linke et al., 2014). Estudios realizados por McLaughlin et al. (2011) demostraron que no hay diferencias en la capacidad de sobrevivencia en el suelo entre *L. monocytogenes* y *L. innocua*. Por lo tanto, en los predios donde se registraron aislamientos a nivel de suelo de entrada y salida a sala de ordeño, estarían dadas las condiciones ambientales que permitirían el desarrollo de *L. monocytogenes*.

Los serotipos de *L. monocytogenes* aislados (1/2a y 4b) se encuentran dentro de los más frecuentemente recuperados en animales y humanos, además de asociarse a casos clínicos (Okwumabua et al., 2005; Oevermann et al., 2010; Cartwright et al., 2013). Dos

aislamientos de *L. monocytogenes* 1/2a se recuperaron de animales clínicamente sanos y el restante de alimento para los bovinos. En el mismo sentido, Nightingale et al. (2004) y Borucki et al. (2005) observaron mayor prevalencia de este serotipo en rumiantes clínicamente sanos. Se describe que este serotipo se observa comúnmente en la naturaleza, alimentos y ambientes asociados (Orsi et al., 2011; Linke et al., 2014), así como también, se asocia a la forma nerviosa y septicémica en rumiantes (Rocha et al., 2013b). 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 ó plástico pvc y formar biofilms, liberando bacterias en forma planctónica, contaminando el ambiente de las industrias procesadoras y los alimentos (Borucki et al., 2003; Orsi et al., 2011).

Dos de los aislamientos del serotipo 4b se obtuvieron en el predio con caso de listeriosis y el restante, de un predio sin antecedentes de enfermedad. Este serotipo 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 a la forma nerviosa en rumiantes (Vela et al., 2001; Hofer & Reis, 2005; Okwumabua et al., 2005; Rocha et al., 2013b). En el predio sin antecedentes de listeriosis este serotipo se detectó en materia fecal de vacas clínicamente sanas. Aunque en este rodeo estaba circulando un patógeno potencial, su sola presencia no determina el desarrollo de enfermedad (Vázquez-Boland et al., 2001; Nightingale et al., 2004); pero, la excreción fecal de este agente, contribuiría a su dispersión en el medioambiente del predio (Nightingale et al., 2004; Ivanek et al., 2006). En Uruguay, este serotipo ocupa el segundo lugar de frecuencia como agente de patologías en seres humanos Braga V. Com. Pers (2015).

Las internalinas son productos proteicos de genes presentes en cepas de *Listeria* patógenas (Vázquez-Boland et al., 2001). Cinco aislamientos de *L. monocytogenes* fueron positivos a la presencia de genes que codifican para internalina A (*inlA*), lo que confirma que los aislamientos correspondieron a *L. monocytogenes* (Liu et al, 2007). El aislamiento de la pastura del Establecimiento I también correspondió fenotípicamente a *L. monocytogenes* a pesar de ser negativo a la presencia de genes que codifican para *inlA*, esto se basa en los resultados de las pruebas bioquímicas y del PCR de perfil de serotipo, donde fue positivo al gen *ORF 2110* presente en *L. monocytogenes* del serotipo 4b (Doumith et al., 2004) (Figura 6). Se han identificado mutaciones que dan lugar a internalinas truncadas (López et

al., 2006). Los ribotipos de *L. monocytogenes* con codones de parada en las secuencias de sus genes *inlA* que darían lugar a proteínas truncadas, son más frecuentes entre las cepas de origen alimentario que entre las de origen clínico (López et al., 2006). Probablemente esta cepa tenga una deleción parcial o completa o porte una variante del gen que no amplificó los cebadores utilizados, por lo que sería interesante secuenciar todo el genoma de esta cepa o la secuencia que incluye el gen para *inlA*. Los seis aislamientos fueron positivos a la presencia de genes que codifican para los factores de virulencia internalinas C y J, por lo tanto todos son potencialmente patógenos (Liu et al., 2007).

De los 6 aislamientos recuperados se obtuvieron 5 patrones de bandas diferentes por PFGE, sin observar patrones comunes entre los establecimientos. Estos resultados concuerdan con trabajos de otros autores, donde se reporta una alta diversidad genética de *L. monocytogenes* en los predios a nivel ambiental (Nightingale et al., 2004; Borucki et al., 2005; Fugett et al., 2007; Ho et al., 2007a). En este trabajo se registró también, variabilidad genética de *L. monocytogenes* entre los rodeos, atribuido a una gran diversidad génica en las cepas presentes en el tracto gastrointestinal de los bovinos (Vela et al., 2001; Nightingale et al., 2004; Borucki et al., 2005; Esteban et al., 2009).

10. CONCLUSIONES

1. Bacterias del género *Listeria* y específicamente *L. monocytogenes* están presentes en bovinos y en el ambiente de predios lecheros habilitados remitentes a planta del Departamento de Paysandú y en un predio con caso de la enfermedad. Se demuestra la amplia distribución que tiene este agente y la importancia o peligro potencial que representan para la salud humana y animal.
2. Se detectó la presencia de bovinos portadores clínicamente sanos que excretan *L. monocytogenes* por materia fecal. Esto constituye un riesgo potencial de contaminación de la leche y de distribución del patógeno en el ambiente de los sistemas de producción lechera.
3. Los aislamientos de *L. monocytogenes* en alimentos para consumo bovino se registraron en pastoreos de especies implantadas como Alfalfa, Avena y Rye grass. Este hallazgo es relevante ya que el 50% de la alimentación de los bovinos lecheros en Uruguay está basado en el pastoreo directo de especies forrajeras. Por lo tanto, no debería descartarse la presencia de la enfermedad, en casos con síntomas clínicos compatibles, sin antecedentes de consumo de ensilados.
4. La presencia de *L. innocua* en alimentos para consumo bovino y suelo de entrada y salida a sala de ordeño, sugiere que estarían dadas las condiciones ambientales para la presencia y persistencia de *L. monocytogenes*.
5. En las muestras de leche de tanque estudiadas no hubo aislamiento de bacterias del género *Listeria*, esto se asociaría a un ordeño higiénico así como a una correcta limpieza y mantenimiento de la máquina de ordeño y tanque de frío.
6. Los serotipos de *L. monocytogenes* recuperados en este trabajo, corresponden a los más frecuentemente reportados a nivel mundial, son potencialmente patógenos y están asociados a casos clínicos en seres humanos y animales.
7. De los 6 aislamientos de *L. monocytogenes* se obtuvieron 5 patrones de PFGE diferentes, lo que indicaría que existe diversidad genética en las poblaciones de la bacteria dentro de cada predio y entre ellos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barlow M, McGorum B (1985) Ovine listerial encephalitis: analysis, hypothesis and synthesis. *Vet. Rec* 116: 233-236.
- Bertsch D, Rau J, Eugster MR, Haug MC, Lawson PA, Lacroix C, Meile L (2013) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 526–532.
- 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.
- Borucki MK, Reynolds J, Gay CC, McElwain KL, Kim SH, Knowles DP, Hu J (2004) Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. *J. Food Prot.* 67(11): 2496-2499.
- Borucki MK, Gay CC, Reynolds J, McElwain KL, Kim SH, Call DR, Knowles DP (2005) Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains from a high-prevalence dairy farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10): 5893-5899.
- Caita L, Legnani M, Mota M, Braga V, Seija V (2014) Aislamientos de *L. monocytogenes* en Hospital de Clínicas 2008-2013 y caracterización molecular de cepas. Enfoque multidisciplinario de las Enfermedades Emergentes desde la Biología Molecular a la Vigilancia Epidemiológica Nacional. Lima-Perú.
- Caro MR, Zamora E, León L, Cuello F, Salinas J, Megias D, Cubero MJ, Contreras A (1990) Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in vegetable byproduct silages containing preservative additives and destined for animal feeding. *Ani. Feed. Sci. Tech.* 31:285-291.
- 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.

- 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.

- Dirección General de los Servicios Ganaderos, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2016). Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,dgsg,dgsg-resoluciones-de-la-direccion-general-2016,O,es,0>. Fecha de visita 10/03/2016

- Dohoo I, Martin W, Stryhn H (2003) Sampling. En: Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Ed. AVC, 1ª ed. Prince Edward Island, Cap. 2, pp.27-52.

- 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.

- Dutra F (2011) Enfermedades diagnosticadas, ovinos, Listeriosis. *Archivo Veterinario del Este*. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/dgsg/DILAVE/Laboratorios/Archivo%20Veterinario%20del%20Este%20-%203T_2011.pdf. Fecha de visita: 01/07/2015.

- Easton MC, 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.

- 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.* doi: 10.1186/1746-6148-5-2.

- Evans K, Smith M, McDonough P, Wiedmann M (2004) Eye infections due to *Listeria monocytogenes* in three cows and one horse. J Vet. Diagn. Invest. 16: 464-469.
- Fairley RA, Colson M (2013) Enteric listeriosis in a 10-month-old calf. New Zealand Vet. J. 61(6): 376-378.
- 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.
- Favaro M, Sarmati L, Sancesario G, Fontana C (2014) First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept. JMM Case Rep. doi: 10.1099/jmmcr.0.003103
- Fedio WM, Schoonderwoerd M, Shute RH, Jackson H (1990) A case of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. Can. Vet. J. 31:773-775.
- Fenlon DR (1985) Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J. Appl. Bacteriol. 59: 537-543.
- Fugget EB, Schoonmaker-Bopp D, Dumas NB, Corby J, Wiedmann M (2007) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, food, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. J. Clin. Microbiol. 45(3): 865-873.
- García JA, Micheloud JF, Campero CM, Morrell EL, Odriozola ER, Moreira AR (2016) Enteric listeriosis in grazing steers supplemented with spoiled silage. J. Vet. Diagn. Invest. 28:65-69.
- Graves LM, Hesel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar M I, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, Den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Saunders BD (2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural

environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 1280–1288.

- Graves LM, Swaminathan B (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 55-62.
- Ho AJ, Ivanek R, Gröhn YT, Nightingale KK, Wiedmann M (2007a) *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.
- Ho AJ, Lappi VR, Wiedmann M (2007b) Longitudinal monitoring of *Listeria monocytogenes* contamination patterns in a farmstead dairy processing facility. *J. Dairy Sci.* 90: 2517-2524.
- Hofer E, Reis CMF (2005) Espécies e serovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 25 (2):79-83.
- Instituto Nacional de la Leche (INALE) (2015). Disponible en: <http://www.inale.org/innovaportal/v/3204/4/innova.front/uruguay-lechero.html>. Fecha de visita: 07/08/2015.
- International Society for Infectious Diseases (ISID). Disponible en: www.isid.org. Fecha de visita: 21/10/2015.
- Ivanek R, Gröhn YT, 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.
- Ivanek R, Gröhn YT, Ho AJ, Wiedmann M (2007) Markov chain approach to analyze the dynamics of pathogen fecal shedding-Example of *Listeria monocytogenes* shedding in a herd of dairy cattle. *J. Theo. Biol.* 245:44-58.

- Jeffers GT, Bruce JL, McDonough PL, Scarlett J, Boor KJ, Wiedmann M (2001) Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiol.* 147:1095-1104.
- Lang Halter E, Neuhaus K, Scherer S (2013) *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63: 641–647.
- 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.
- Latorre AA, Van Kessel JS, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK, Boor KJ, Jarayao BM, Houser BA, Daugherty CS, Schukken YH (2010) Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 93:2792-2802.
- Leaniz R, Selinke H, Chaves O, Pintos JO, Bello S (1960) Listeriosis en ovinos. Su comprobación en el Uruguay. *Publicación Cátedra de Enfermedades Infecto-contagiosas de la Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.* 14p.
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Le Flèche-Matéos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M, Allerberger F (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 2210–2214.
- León EA, Duffy SJ (2009) ProMESA 1.3 (Programa de Muestreo Estadístico en Sanidad Animal). *Unidad de Epidemiología, CICVyA, INTA, Argentina.*
- Linke K, Rückerl 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.

- Liu D, Lawrence ML, Austin FW, Ainsworth AJ (2007) A multiplex PCR for species and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. J Microbiol Methods. 71:133-140.
- López V, Suárez M, Chico-Calero I, Navas J, Martínez-Suarez JV (2006) *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? Rev. Argent. Microbiol. 38(4):224-234.
- 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 (2007a) Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. Can. J. Microbiol. 53:1158-1167.
- Lyautey E, Lapen DR, Wilkes G, McCleary K, Pagotto F, Tyler K, Hartmann A, Piveteau P, Rieu A, Robertson WJ, Medeiros DT, Edge TA, Gannon V, Topp E (2007b) Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the south nation river watershed, Ontario, Canada. Appl. Environ. Microbiol. 73(17): 5401-5410.
- Maquieira AM (2011) Hallazgos de *Listeria monocytogenes* en Quesos Artesanales en Uruguay. Trabajo Final de Carrera de Especialista en Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (CEICA), Universidad Buenos Aires, UBA, Argentina.
- McLaughlin HP, Casey PG, Cotter J, Gahan CGM, Hill C (2011) Factors affecting survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in soil samples. Arch. Microbiol. 193: 775-785.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Ganaderos, Norma Reglamentaria N°1/2013: Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/gxpfiles/mgap/content/audio/source0000000014/AUD0000070000001999.pdf>. Fecha de visita: 22/02/2016.
- Mohammed HO, Stipetic K, McDonough PL, Gonzalez RN, Nydam DV, Atwill ER (2009) Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. Am. J. Vet. Res. 70(3):383-388.

- 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.
- 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.
- Oevermann A, Zurbriggen A, Vandevelde M (2010) Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? Interdisciplinary perspectives on infectious diseases. doi: 10.1155/2010/632513.
- Orndorff PE, Hamrick TS, Washington Smoak I, Havell EA (2006) Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. Vet. Microbiol. 114:1-15.
- Orsi RH, Wiedmann M (2016) Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100: 5273-5287.
- Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M (2011) *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. Int. J. Med. Microbiol. 301:79-96.
- Okwumabua O, O'Connor M, Shull E, Strelow K, Hamacher M, Kurzynski T, Warshauer D (2005) Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from food animal clinical cases: PFGE pattern similarity to strains from human listeriosis cases. FEMS Microbiology Letters 249:275-281.
- Perrin M, Bemer M, Delamare C (2003) Fatal case of *Listeria innocua* bacteriemia. J. Clin. Microbiol. 41: 5308-5309.

- Pulse Net, Center for Disease Control and Prevention. Disponible en: www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf. Fecha de visita: 28/04/2015.
- Reglamento Bromatológico Nacional (1994). Disponible en: <http://www.maldonado.uy/documentos/pdf/ordenanzas/315.pdf>. Fecha de visita: 02/06/2015.
- Rocha PRD, Dalmaso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero MT, Capucchio MT (2013a) Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. Res. Vet. Sci. 94: 111–114.
- Rocha PRD, Lomonaco S, Bottero MT, Dalmaso A, Dondo A, Grattarola C, Zuccon F, Iulini B, Knabel SJ, Capucchio MT, Casalone C (2013b) Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* strains constitute a genetically homogeneous group related to human outbreak strains. Appl. Environ. Microbiol. 79(9):3059-3066.
- Ryser ET, Arimi SM, Donnelly CW (1997) Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay and grass silage. Appl. Environ. Microbiol. 63(9): 3695-3697.
- 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.
- 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) (1):62-69.
- 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.

- Unnerstad H, Romell A, Ericsson H, Danielsson-Tham ML, Tham W (2000) *Listeria monocytogenes* in faeces from clinically healthy dairy cows in Sweden. Acta vet. scand. 41:167-171.
- USDA (2013) Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/1710bee8-76b9-4e6c-92fc-fdc290dbfa92/MLG-8.pdf?MOD=AJPERES>. Fecha de visita: 02/09/2014.
- Van Kessel JS, Karns JS, Gorski L, McCluskey BJ, Perdue ML (2004) Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk of US dairies. J. Dairy Sci. 87:2822-2830.
- 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.
- Vela AI, Fernandez-Garayzabal JF, Vazquez JA, Latre MV, Blanco MM, Moreno MA, de la Fuente L, Marco J, Franco C, Cepeda A, Rodriguez Moure AA, Suarez G, Dominguez L (2001) Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 67(12):5840-5843.
- 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.
- Wellinghausen, N (2011) *Listeria* and Erysipelotrix. En: Manual of Clinical Microbiology, 10th edition. ASM Press, United States. Pp 403-412.
- 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.

- Wilesmith JW, Gitter M (1986) Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain. Vet. Rec 119: 467-470.

- 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.

ANEXO 1

Tabla 1: Diferenciación de especies del género *Listeria* por pruebas bioquímicas*

	β -HEM	ESC	CAT	GLU	XIL	RAM	MAN	CAMP (<i>S. aureus</i>)	CAMP (<i>R. equi</i>)
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	V
<i>L. innocua</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>L. grayi</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	+	+	+	-	V	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>L. marthii</i>	-	+	+	+	ND	ND	-	ND	ND

Adaptado de: Wellinghausen (2011). β -Hem: beta hemólisis en agar sangre ovina; ESC: hidrólisis de esculina; CAT: test de catalasa; GLU: acidificación de glucosa; XIL: acidificación de xilosa; RAM: acidificación de ramnosa; MAN: acidificación de manitol; V: resultado variable; ND: no determinado.

*El resto de las especies reportadas en la bibliografía mencionada se identificó por secuenciación genómica (ADNr 16S) y pruebas fenotípicas.

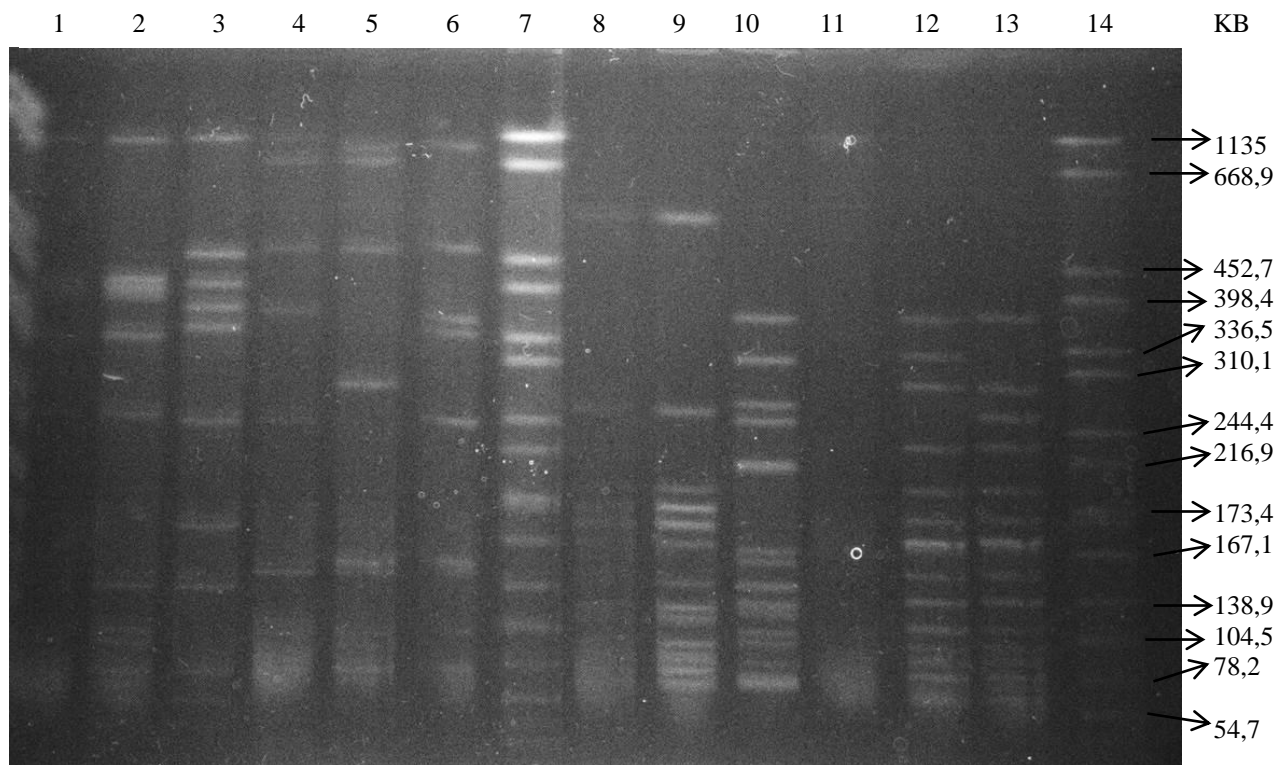


Figura 1: Electroforesis de campo pulsado de los aislamientos de *L. monocytogenes*: Carril 1 al 6 digestión con *AscI*; Carril 7 y 14, Standard *Salmonella* Braenderup H9812; Carril 8 al 13 digestión con *ApaI*. Carril 1: Pastura Establecimiento B; Carril 2 Pool fecal Establecimiento B; Carril 3: Pool fecal Establecimiento F; Carril 4 Pool fecal Establecimiento D; Carril 5: Pastura Establecimiento I; Carril 6: Aislamiento SNC bovino; Carril 8: Pastura Establecimiento B; Carril 9: Pool fecal Establecimiento B; Carril 10: Pool fecal Establecimiento F; Carril 11: Pool fecal Establecimiento D; Carril 12: Pastura Establecimiento I; Carril 13: Aislamiento SNC bovino.