



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE *Listeria monocytogenes* EN LECHE DE CABRA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

GUICELA RAMÍREZ BERNAL

TUTOR: DR. VÍCTOR RUBÉN TENORIO GUTIÉRREZ
COMITÉ TUTORAL: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR
DR. JORGE FRANCISCO MONROY LÓPEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DE LA UNIDAD DE POSGRADO,
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Y

EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA DEL CENID-MICROBIOLOGÍA, INIFAP.

FUE FINANCIADO POR:

PROYECTO PAPIIT IN215005

Y

PROYECTO G38590-B DE LA CONVOCATORIA SEP CONACYT CIENCIA BÁSICA.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo

A la UNAM por brindarme la oportunidad de continuar superándome

A mis asesores: Doctor Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez y Doctora Clara Inés Álvarez Manrique, por todo su apoyo, compromiso y tiempo dedicado a este proyecto.

Al Comité Tutorial: Doctor Carlos Gerardo García Tovar y Doctor Jorge Francisco Monroy López, por su orientación y consejos.

A mis profesores por sus conocimientos compartidos

Dedico este trabajo a mi familia, a mis amigas(os) y a todas las personas que de alguna manera hicieron posible que se realizara.

ÍNDICE

	pág.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	
4.1 Enfermedades Transmitidas por Alimentos	5
4.2 Costos	6
4.3 Cabras	
4.3.1 Historia	8
4.3.2 Nutrición	8
4.3.3 Producción	9
4.3.4 Población Caprina y Producción de Leche a Nivel Mundial	10
4.3.5 Población Caprina y Producción de Leche en México	14
4.3.6 Asociaciones	17
4.3.7 Investigación	18
4.4 Producción de Alimentos de Origen Animal	19
4.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	
4.5.1 Epidemiología	20
4.5.2 Reservorio	22
4.5.3 Clasificación y Características de <i>Listeria monocytogenes</i>	26
4.5.4 Enfermedades Que Causa y Tratamiento	28
4.5.5 Patogenia y Factores de Virulencia	30
4.5.6 Proteína P60	32
4.5.7 Mecanismos de Adaptación	34
4.5.8 Respuesta Inmune	36
4.5.9 Regulación	39
4.6 Aislamiento, Identificación y Tipificación	40
5. OBJETIVOS	
5.1 Objetivo General	42
5.2 Objetivos Particulares	42
6. HIPÓTESIS	42
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1 Obtención del Antígeno a Partir de <i>Listeria monocytogenes</i>	
7.1.1 Cepas	43
7.1.2 Obtención del Antígeno (proteína p60)	43
7.1.3 Determinación de la Concentración del Antígeno	43
7.1.4 Determinación de la Pureza del Antígeno	44
7.1.5 Determinación de la Especificidad del Antígeno	44
7.2 Detección de Cabras Seropositivas a <i>Listeria</i> Mediante la Prueba de ELISA	
7.2.1 Muestreo (sueros)	45

7.2.2 Obtención del Suero Control Positivo	46
7.2.3 Estandarización de la Prueba de ELISA	46
7.2.4 Detección de Cabras Seropositivas a <i>Listeria</i>	46
7.3 Aislamiento de <i>Listeria</i> a Partir de Explotaciones con Animales Seropositivos	
7.3.1 Muestreo de Leche, Alimento y Materia Fecal	47
7.3.2 Aislamiento de <i>Listeria</i>	47
7.3.3 Selección de las Cepas Sospechosas de <i>Listeria</i> por Bioquímica y por el Método Crystal	48
7.4 Identificación y Tipificación de Cepas de <i>Listeria</i> por PCR y Enzimas de Restricción	
7.4.1 Extracción de DNA	49
7.4.2 Identificación de Género (<i>Listeria spp.</i>)	50
7.4.3 Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	51
7.4.4 Tipificación Parcial de <i>Listeria monocytogenes</i> por Enzimas de Restricción	51
7.4.5 PCR Anidado para la Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	52
7.4.6 Identificación de <i>Listeria ivanovii</i>	53
8. RESULTADOS	
8.1 Obtención del Antígeno a Partir de <i>Listeria monocytogenes</i>	
8.1.1 Concentración del Antígeno	54
8.1.2 Pureza del Antígeno	55
8.1.3 Especificidad del Antígeno	56
8.2 Cabras Seropositivas a <i>Listeria</i>	
8.2.1 Muestreo (Sueros)	56
8.2.2 Estandarización de la Prueba de ELISA	57
8.2.3 Detección de Cabras Seropositivas a <i>Listeria</i>	57
8.3 Aislamiento de <i>Listeria</i> a Partir de Granjas con Animales Seropositivos	
8.3.1 Muestreo de Leche, Alimento y Materia Fecal	62
8.3.2 Aislamiento y Selección de las Cepas Sospechosas de <i>Listeria</i>	65
8.4 Identificación y Tipificación de Cepas de <i>Listeria</i> por PCR y Enzimas de Restricción	
8.4.1 Extracción de DNA	70
8.4.2 Identificación de Género (<i>Listeria spp.</i>).	70
8.4.3 Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	75
8.4.4 Tipificación Parcial de <i>Listeria monocytogenes</i> por Enzimas de Restricción	75
8.4.5 PCR Anidado para la Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	79
8.4.6 Identificación de <i>Listeria ivanovii</i>	79
9. DISCUSIÓN	82
10. CONCLUSIONES	99
11. BIBLIOGRAFÍA	100

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

pág.

TABLAS

Tabla 1. Costo anual debido a diversos patógenos provenientes de alimentos	7
Tabla 2. Población de Cabras en el Mundo.	11
Tabla 3. Número de animales mamíferos de granja (millones) y Producción de Leche anual (1000 MT)	12
Tabla 4. Líderes en Producción de Leche de Cabra	13
Tabla 5. Cabras, Resumen Nacional: Producción, Precio, Valor	15
Tabla 6. Cabras, Producción por Estado (2005)	16
Tabla 7. Serovariedades de <i>Listeria</i>	26
Tabla 8. Listeriosis: caracterización de la enfermedad	28
Tabla 9. Obtención del suero control positivo	46
Tabla 10. Estandarización de la curva empleada en el método de "Bradford"	54
Tabla 11. Determinación de la concentración de la proteína p60 por el método de "Bradford".	55
Tabla 12. Muestras de suero de cabras	57
Tabla 13. Lecturas promedio de la Densidad Óptica del control positivo	58
Tabla 14. Frecuencia de las lecturas de la Densidad Óptica obtenidas con la prueba de ELISA en sueros de cabra.	59
Tabla 15. Resultados de la prueba de ELISA en sueros de cabra muestreados y del banco de sueros.	59
Tabla 16. Muestras de Leche, alimento y materia fecal de cabra	63
Tabla 17. Origen de las cepas aisladas	66
Tabla 18. Identificación de cepas sospechosas de <i>Listeria</i> aisladas de leche, alimento y materia fecal de cabra, por el método BBL Crystal.	68

FIGURAS

Figura 1. SDS-PAGE de la Proteína p60	55
Figura 2. Inmunotransferencia de la Proteína p60	56
Figura 3. Frecuencia de la Densidad Óptica obtenida en la Prueba de ELISA en muestras de suero del Estado de México y Querétaro	60
Figura 4. Frecuencia de la Densidad Óptica obtenida en la Prueba de ELISA en muestras de suero del Guanajuato1 y Guanajuato 2-3	61
Figura 5. Frecuencia de la Densidad Óptica obtenida en la Prueba de ELISA. Muestras de suero localizadas en las Regiones Muestreadas.	62
Figura 6. Muestreo de Leche, Alimento y Materia fecal de cabras	64
Figura 7. Sistema de Identificación BBL Crystal GP ID	67
Figura 8. Identificación de <i>Listeria</i> spp. mediante el Sistema de Identificación BBL Crystal	69
Figura 9. DNA Cromosómico de las cepas control y las cepas aisladas	71
Figura 10. Identificación del Género <i>Listeria</i> , productos de PCR	72
Figura 11. Identificación del Género <i>Listeria</i> , productos de PCR	73
Figura 12. Especificidad de los iniciadores específicos de <i>Listeria</i> spp.	74
Figura 13. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> , productos de PCR	76

Figura 14. Actividad de la enzima <i>Hind III</i> en el gen <i>iap</i> , productos restringidos	77
Figura 15. Tipificación Parcial de las cepas control de <i>Listeria monocytogenes</i>	77
Figura 16. Tipificación Parcial de las cepas aisladas de <i>Listeria monocytogenes</i>	78
Figura 17. Productos del PCR anidado para <i>Listeria monocytogenes</i>	80
Figura 18. Identificación de <i>Listeria ivanovii</i> , productos de PCR	81

1. RESUMEN

Listeria monocytogenes es considerado el agente causal de brotes severos y casos aislados de listeriosis en humanos y en animales, los cuales a menudo son transmitidos por alimentos contaminados. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar molecularmente cepas de *Listeria monocytogenes* en explotaciones caprinas con animales seropositivos a este microorganismo. Uno de los factores de virulencia de esta bacteria es una proteína extracelular llamada p60 y codificada por el gen *iap*. Dicha proteína fue empleada como antígeno para la prueba de ELISA, esta se obtuvo a partir de una cepa de *L. monocytogenes* hiperproductora. Se realizó un muestreo de sueros, en explotaciones de cabras localizadas en los estados de Guanajuato, Querétaro y Estado de México. Empleando la prueba de ELISA indirecta se obtuvo un 23.22% de muestras de suero positivas. Las muestras de leche, alimento y materia fecal obtenidas de explotaciones con animales seropositivos fueron utilizadas para el aislamiento de *Listeria* mediante el método ISO 11290. Las colonias sospechosas fueron evaluadas por el método rápido miniaturizado BBL Crystal, con el cual fueron identificadas como *Listeria spp.* 25 de las cepas aisladas. Dichas cepas fueron confirmadas y caracterizadas molecularmente; el género fue identificado con los iniciadores Unilis A y Lis1B que amplifican el gen *iap* (1450 pb), obteniéndose amplificación en las 25 cepas. La identificación de *Listeria monocytogenes* se llevó a cabo con los iniciadores MAR 1 y MAR 2, con los cuales se obtuvo amplificación en 7 de las 25 cepas probadas (bandas de 450 pb). Los productos de este PCR fueron tratados con la enzima *Hind* III para la tipificación parcial de las cepas de *L. monocytogenes*, la cual divide ésta especie en 2 grupos de serovariedades, el grupo 1 produce dos fragmentos (serovariedades 1/2a y 1/2c) y en el segundo grupo no se produce corte (serovariedades 1/2b, 3b y 4b). En este trabajo, únicamente en los controles (cepas de *L. monocytogenes* ATCC 244 y 43249) se produjo corte del amplificado y en las cepas de *L. monocytogenes* aisladas no hubo corte. Para aportar mayor especificidad a la prueba, fue realizado un PCR anidado empleando como plantilla los productos del PCR para la identificación del género los cuales fueron sometidos a un segundo PCR con los iniciadores que identifican la especie, obteniéndose nuevamente las bandas esperadas de 450 pb. Las cepas que no fueron identificadas como *Listeria monocytogenes* (18 cepas) fueron sometidas a un PCR para la identificación de *Listeria ivanovii*, en el cual se emplearon los iniciadores Lis 1B e Iva 1 y únicamente con la cepa control se obtuvo amplificación por lo que ninguna de las cepas aisladas pertenece a dicha especie.

2. ABSTRACT

Listeria monocytogenes is considered severe outbreaks and isolated cases causative agent, in humans and animals, which often are transmitted by contaminated food. The aim in this work was isolate and characterizes *Listeria monocytogenes* strains in caprine farms with seropositive animals to this microorganism. One of the virulence factors in this bacterium is the extra cellular protein named p60, encoded by *iap* gen. This protein was employed in ELISA assay and was obtained from a recombinant strain. Serum samples were obtained from caprine farms localized in Estado de México, Guanajuato and Querétaro states. Using Indirect ELISA assay, it was obtained a 23.22% seropositivity rate to this pathogen. Milk, fed and faeces samples from farms with seropositive goats were employed for *Listeria* isolation using ISO 11290 method. Suspected colonies were tested by BBL Crystal Gram-Positive Identification System, with which 25 strains were identified as *Listeria spp.* The strains were molecularly confirmed and characterized; genus was identified using Unilis A and Lis 1B primers (1450 bp), obtaining amplification in 25 strains. *Listeria monocytogenes* identification was made using MAR 1 and MAR 2 primers, with which it was obtained amplification in 7 of 25 isolated strains (450 bp). This PCR products were digested with *Hind* III enzyme for strains partial typing, it divides *Listeria monocytogenes* strains in 2 serovar groups, in first group 2 fragments are produced (serovars 1/2a and 1/2b) and in second group, cut is not produced (serovars 1/2b, 3b and 4b). Only in control stains (*L. monocytogenes* ATCC 244 and *L. monocytogenes* 43249 strains) the restriction were produced, but amplified from isolated *Listeria monocytogenes* strains not were cutting in this work. In order to provide specificity to this assay it was carried out a Nested PCR, using DNA the PCR genus specific products; this was tested in a second species specific PCR for *Listeria monocytogenes* identification, obtaining again 450 bp bands. Strains not were identified as *Listeria monocytogenes* (18 strains) were tested by PCR for *Listeria ivanovii* identification, using Lis 1B and Iva 1 primers; only control strain produced amplification because of which neither isolated strains belongs to this species.

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas debido al consumo de alimentos contaminados tienen un gran impacto económico y en salud pública en todo el mundo (Mead *et al.*, 1999). Los alimentos crudos de origen animal son los que tienen más probabilidad de estar contaminados con microorganismos (CDC). La listeriosis es una infección bacteriana importante causada por el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* (Elezabeth *et al.*, 2007). Se han registrado brotes epidémicos causados por esta bacteria desde 1981 en varios países del mundo. Durante la última década la listeriosis ha aparecido como una enfermedad importante de origen alimentario de gran interés para la salud pública debido a la elevada letalidad (20-30%) a pesar de su baja incidencia, la cual requiere un diagnóstico rápido y terapia de antibióticos adecuada (Rodas-Suárez *et al.*, 2006). *L. monocytogenes* difiere en muchos aspectos de los demás patógenos transmitidos por alimentos ya que es omnipresente, resistente a condiciones ambientales adversas, microaeróbica, psicrótrofa, y tiene la capacidad para sobrevivir largos periodos en el ambiente, todo esto ha provocado que dicha bacteria sea una preocupación para la Industria Agroalimentaria y la Salud Pública (Doyle *et al.*, 2001; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

El género *Listeria* consta de seis especies de las cuales solo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* han sido reportadas hasta ahora como patógenas para el humano y los rumiantes (Beumer and Hazeleger, 2003). Este patógeno puede causar meningitis o encefalitis en pacientes inmunosuprimidos, abortos en mujeres embarazadas o infecciones generalizadas en neonatos infectados y gastroenteritis en personas sanas (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). La leche y los productos lácteos han sido frecuentemente implicados en numerosos brotes de listeriosis (Ryser and Marth, 1999). En diversos estudios ha sido reportada la incidencia de *Listeria* en leche cruda de cabras (Barbuddhe *et al.*, 2000; Gaya *et al.*, 1996).

En México, la leche cruda es ampliamente consumida y la incidencia de enfermedades causadas por leche contaminada es desconocida, es necesario realizar estudios para evaluar su impacto económico y en la salud pública. Sin embargo *Listeria monocytogenes* ya ha sido detectada en leche sin pasteurizar y en quesos frescos elaborados con leche de cabra y vaca (Vázquez *et al.*, 2001; Amaya *et al.*, 2003). Durante los últimos 12 a 15 años se ha visto una

mayor oferta de productos lácteos y cárnicos caprinos. La población caprina fue aproximadamente de 9 millones de cabezas en el año 2004 y la producción de leche representa su principal objetivo la cual es destinada a la producción de quesos y cajeta principalmente (SIAP 2004; Hernández 2007). De aquí la importancia de determinar la presencia de *L. monocytogenes* en la leche de estos animales previamente localizados en granjas seropositivas.

El aislamiento convencional y confirmación de *L. monocytogenes* involucra medios de cultivo selectivos de enriquecimiento con subcultivos en placas de agar selectivas seguidas por pruebas de identificación confirmatorias. Los sistemas de detección y/o identificación inmunológicos y los moleculares involucran los factores de virulencia del microorganismo, en el caso de *Listeria monocytogenes*, la proteína p60 es uno de ellos, debido a su posible papel en la invasión, el gen que la codifica fue nombrado *iap* (invasion-associated-protein) (Wenscher *et al.*, 1993; Bubert *et al.*, 1999).

4. ANTECEDENTES

4.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

La enfermedad transmitida por los alimentos (ETA) es ocasionada al consumir alimentos o bebidas contaminados, los contaminantes puede ser físicos, químicos o microbiológicos. Los alimentos crudos de origen animal son los que tienen más probabilidad de estar contaminados con microorganismos. Las enfermedades causadas debido al consumo de alimentos contaminados tienen un gran impacto económico y en salud pública en todo el mundo (CDC, 2004; Mead *et al.*, 1999).

La salud animal constituye un factor determinante en la seguridad alimentaria porque ciertas enfermedades, denominadas zoonosis, como la brucelosis, la salmonelosis y la listeriosis, pueden transmitirse a las personas a través de alimentos contaminados por los microorganismos que las producen. Aunque la transmisión a personas puede realizarse por distintas vías, las infecciones a través de los alimentos son una de las principales causas de enfermedad. El problema reside en que los alimentos pueden contaminarse con patógenos zoonóticos de varias formas. Si un animal sufre una enfermedad determinada, sus tejidos y, en particular, su carne o leche, pueden ser fuentes de infección para las personas si entran en la cadena alimentaria. Por ello la salud humana se liga directamente a la salud animal y a la producción de alimentos de origen animal (Chavarrías, 2006).

El interés por estudiar las enfermedades transmitidas por alimentos se ha incrementado considerablemente por varias razones, entre ellas el aumento de la población y el consiguiente crecimiento en la demanda de alimentos de buena calidad, con todas sus implicaciones comerciales. Una de las mayores prioridades sobre las enfermedades transmisibles es entenderlas mejor en términos de epidemiología, mecanismo de transmisión a las personas, diagnóstico, control y prevención. Se han descrito unas 200 zoonosis de distintos tipos, dependiendo del agente que las cause: bacterias, parásitos, virus y otros agentes poco convencionales, como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o mal de las «vacas locas». Cerca del 75% de las enfermedades que han afectado a seres humanos en los últimos 10 años han sido provocados por la presencia de patógenos en productos de

origen animal, uno de los mayores riesgos que existen actualmente es su enorme capacidad de difusión, lo que implica que se generen problemas de carácter global. Para los responsables sanitarios, la detección temprana de brotes de enfermedades animales es esencial para controlarlas. La Organización Internacional de Epizootias (OIE) ha reconocido recientemente que los servicios veterinarios juegan un papel clave dentro del sistema global de detección y control de las enfermedades animales. Un total de 11 enfermedades transmisibles de animales a humanos afectaron a 380,000 personas en la Unión Europea durante el año 2004. Las enfermedades que causan *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella*, *Yersinia*, *Trichinella*, *Echinococcus* y *Toxoplasma* fueron analizadas durante el año 2004 en la UE. *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos con los que se enfrentan los veterinarios que se desempeñan en la industria de alimentos (Chavarrías, 2006; Solís, 2007).

4.2 COSTOS

Se han estimado que las enfermedades de origen alimentario causan de 6 a 81 millones de enfermos y hasta 9 000 muertos cada año en los Estados Unidos de América (Gandhi and Chikindas, 2007). Los centros para la prevención y control de enfermedades (CDC) estiman que las enfermedades provenientes de alimentos son responsables de cerca de 76 millones de enfermos lo cual provoca cerca de 325,000 hospitalizaciones y 5000 muertes en los Estados Unidos cada año (Mead *et al.*, 1999).

El Servicio de Investigación Económica (ERS) del Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) es el que lleva a cabo la estimación de los costos de enfermedades producidas por alimentos en ese país. El estimado más reciente de costos médicos, pérdida de productividad y muertes prematuras por enfermedades causadas por cinco patógenos provenientes de alimentos es de 6.9 billones de dólares por año (Tabla 1). Estos estimados emplean la información de hospitalización y muertes proporcionados por la CDC. Solo algunos reportes de este tipo están disponibles en otros países; el impacto económico de 2.2 millones de enfermos causada por alimentos en Canadá fue considerado en 1.33 billones de dólares en 1985. También ha sido reportado que los 10 millones de casos en el Reino Unido podrían estar asociados a 1.9 billones de dólares gastados en ese país (Cliver and Riemann 2002).

Tabla 1. Costo anual debido a diversos patógenos provenientes de alimentos.

Patógeno	Estimado anual de enfermedades causadas por alimentos			Costos Billones de dólares
	Casos	Hospitalizaciones	Muertes	
<i>Campylobacter spp.</i>	1 963 141	10 539	99	1.2
<i>Salmonella</i>	1 341 873	15 608	553	2.4
<i>E. coli O157:H7</i>	62 458	1 843	52	0.7
<i>E. coli</i>	31 229	921	26	0.3
<i>Listeria monocytogenes</i>	2 493	2 298	499	2.3
Total	3 401 194	31 209	1229	6.9

Fuente: ERS. Economic Research Service (2001)

(<http://www.ers.usda.gov/Emphases/SafeFood/features.htm#start>)

Es importante hacer notar que muchas de las enfermedades provenientes de los alimentos son esporádicas y tal vez no son tomadas en cuenta como parte de un brote. Otros factores tales como el conocimiento del consumidor, vigilancia de las enfermedades por los departamentos de salud públicos locales y estatales, la variación en los periodos de incubación y severidad de la enfermedad, afectan el reporte de las enfermedades transmitidas por alimentos y los brotes (Olsen *et al.*, 2000). En los países en desarrollo, las enfermedades diarreicas representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, social y político (Vázquez y Cabral, 2001). En la industria pecuaria la listeriosis provoca pérdidas por el incremento de costos de producción de los animales, debido a las enfermedades y al incremento de la infertilidad y a los abortos (Orndorff *et al.*, 2006).

4.3 CABRAS

4.3.1 HISTORIA

Las cabras y las ovejas fueron los primeros animales en ser domesticados por los humanos como ganado de granja, originadas de unas pocas razas de cabras silvestres en la región que ahora es Irak, Irán, Siria y este de Turquía. La producción de leche de cabras manejada por personas inició cuando comenzó la domesticación y por miles de años han sido el sustento de la población. Fueron desarrolladas a través del mundo, cientos de diferentes razas de cabras, totalizando ahora más de 900 millones de cabezas. Su evolución en productividad se desarrolló con el tiempo y de ser un sustento familiar se convirtieron en cabras altamente productivas en algunos países como Suiza, uno de los países líder en el desarrollo y evolución de las razas de propósito lechero más productivas en el mundo; las razas de cabras llamadas “mejoradas” como la Alpina, Saanen, Toggenburg y Obershali, han sido exportadas a otros países para mejorar la calidad y aumentar la productividad de las razas nativas, las cuales normalmente son de doble propósito, para carne y leche, pero a niveles de baja productividad por las condiciones de alimentación y pastoreo. El incremento en la producción de leche para consumo directo y para su transformación en mantequilla, yogurt y quesos se convirtió en el objetivo principal para desarrollo de mejores cabras lecheras. Durante los últimos 150 años, la selección genética y mejores condiciones de alimentación han dado lugar a diversas razas superiores en algunos países en aspectos de productividad de leche o carne, proporcionando un gran potencial para la evolución y respondiendo a una creciente demanda de mercado y especial popularidad de los quesos elaborados con leche de cabra. La evolución de las cabras alrededor del mundo y su papel en el desarrollo agrícola y la nutrición humana, han sido los temas de interés en los estudios de años recientes para proveer estímulos y apoyos para el progreso, especialmente en países en vías de desarrollo (Haelein, 2007).

4.3.2 NUTRICIÓN

Aunque se tiene comúnmente la creencia que las cabras comen de todo, en realidad son muy selectivas en su consumo y siempre tratan de ingerir las partes más digestibles y

nutritivas de los forrajes. Esto responde a sus altas necesidades de nutrientes acordes a su menor tamaño y su alta productividad. Las cabras son ramoneadoras por excelencia y gracias a sus labios sensibles y ágiles, pueden consumir pequeñas hojas y retoños aun en la presencia de espinas. En algunas ocasiones incluso trepan a los árboles mismos para poder acceder al follaje que está fuera de su alcance desde el suelo. En comparación a las ovejas, las cabras tienen un rango de alcance físico mucho mayor pues se pueden parar en dos patas, al igual que lo hacen otros ramoneadores salvajes como el venado y los antílopes. En diversas partes del mundo, donde se crían cabras bajo confinamiento, la gente ha comprobado que la mejor nutrición y los rendimientos más atractivos se obtienen al ofrecer a las cabras, hojas de árboles o arbustos forrajeros en lugar de los tradicionales pastos. Existen numerosos ejemplos de ensayos en donde la respuesta animal, ya sea en ganancia de peso o en producción de leche, aumenta a medida que se reemplaza el pasto con los residuos de cosecha con follajes. En términos generales se puede decir, que si las cabras se crían en la manera adecuada, la raza, siempre y cuando sea lechera, no es una limitante para obtener buenos resultados (Sánchez, 1999).

4.3.3 PRODUCCIÓN

Además de las ventajas asociadas al tamaño pequeño, las cabras tienen varias ventajas adicionales que las hacen particularmente importantes en comunidades rurales pobres comparadas con otros rumiantes domésticos, dichas ventajas incluyen: 1) La adaptabilidad a diversas combinaciones de temperatura y humedad; 2) Habilidad para caminar grandes distancias; 3) Eficiente utilización de campos marginales debido a su capacidad de metabolizar compuestos secundarios de las plantas; 4) Tasa de productividad alta y por lo tanto bajo riesgo de inversión, mostrando una alta eficiencia energética de producción de leche, los rendimientos de leche por lo general son de 3 a 4 litros por cabra por día; 5) Canales pequeñas lo cual lo hace conveniente para su venta o consumo en un periodo de tiempo corto (un factor importante en áreas rurales sin almacenamiento a bajas temperaturas); 6) Intervalos de generación pequeños y alto índice reproductivo; 7) El instinto de congregación y la docilidad al manejo rutinario, especialmente en la ordeña, lo que las hace idóneas para el cuidado por niños, mujeres y ancianos; y 8) La leche de alta digestibilidad y valor nutritivo. A diferencia de las vacas donde las razas lecheras especializadas de las zonas templadas tienen serias limitaciones en las condiciones

tropicales, las razas de cabras lecheras se adaptan fácilmente y dan excelentes resultados siempre y cuando se les aloje, alimente y maneje apropiadamente. Las razas Alpina, Nubia, Saanen y Toggenburg son ejemplos de razas que se están usando exitosamente en los trópicos, lo mismo que sus cruza. Las cabras son altamente adaptables a un amplio rango de ambientes y parecen resistir la sequía más que las vacas. En situaciones de mezcla de especies, ellas complementan a las vacas y las ovejas más que competir con ellas por alimentos, por su inherente habilidad para utilizar una amplia variedad de especies de plantas. Además ciertos genotipos de cabras tienen un número de características físicas y fisiológicas especiales que les permite sobrevivir en condiciones áridas y salinas. Actualmente no hay estimados exactos de la contribución de las cabras como sustento en general y alimentos para los humanos específicamente, esto es principalmente por el uso de productos de cabra a nivel casero rural que no es registrado y a nivel nacional muchos de estos productos circulan a través de mercados informales (Lebbie, 2004; Boyazoglu *et al.*, 2005).

4.3.4 POBLACIÓN CAPRINA Y PRODUCCIÓN DE LECHE A NIVEL MUNDIAL

La FAO reportó que en los años 90's se contaba con 500 millones de cabezas de ganado caprino en el mundo, sin embargo, la cifra se ha elevado a 900 millones. China y la India destacaron por el mayor número de cabezas de ganado frente a los demás países del mundo en 2004 (Tabla 2) (FAOSTAT, 2004). Las cabras son la ganadería con mayor importancia en los países en desarrollo; de 1980 a 1999 la población mundial de cabras incrementó un 55% y la producción de leche de cabra aumentó un 58% (Tabla 3).

Tabla 2. Población de Cabras en el Mundo.

País	No. Cabezas
China	183,207,008
India	120,000,000
Paquistán	54,700,000
Sudan	42,000,000
Bangla Desh	34,500,000
Nigeria	28,000,000
Irán	26,000,000
Indonesia	13,500,000
Somalia	12,700,000
República de Tanzania	12,550,000
Bali	12,036,000
Kenia	11,000,000
Etiopia	9,626,000
México	9,500,000
Brasil	9,087,000
Mongolia	9,000,000
Turquía	8,800,000
Afganistán	7,300,000
Yemen	7,300,000
Níger	6,900,000

Fuente: <http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>

Tabla 3. Número de animales mamíferos de granja (millones) y Producción de leche anual (1000 T).

	1980	1999	Cambio (%)
Número de animales			
Cabras	458	710	55
Búfalos	122	159	30
Cerdos	796	913	15
Bovino	1216	1338	10
Ovejas	1096	1069	-3
Producción de Leche			
Cabra	7720	12161	58
Búfalo	44296	60334	36
Vaca	423034	480659	14
Oveja	7887	8026	12

Fuente: FAO 2001. (Haenlein, 2004).

Los sectores lecheros de cabra y oveja en la Unión Europea son los más dinámicos y estructurados en el mundo gracias a la posición general de la calidad de sus productos en el mercado. Las cabras lecheras predominan y la producción de leche de esta especie ha aumentado debido a un alto desarrollo en Portugal, Grecia, Italia, Bulgaria, Chipre, Francia y España; en el Mediterráneo los productos de cabra son asociados con agroturismo en regiones montañosas. Algunos países como Francia y Holanda han sentado las bases de una industria bien organizada de producción de leche de cabras, procesado, comercialización, promoción e investigación, gracias a políticas innovadoras de desarrollo, lo cual ha creado una fuerte clientela consumidora, lo que debería ser copiado por el beneficio en general a la nutrición humana y a los productores de leche de cabras (Dubeuf *et al.*, 2004; Haenlein, 2004; Debeuf and Le Jaouen 2006; Sorensen *et al.*, 2006).

La producción de leche de cabra parece ser mucho más grande que la reportada en estadísticas oficiales por su gran cantidad de consumo no registrado, especialmente en países en desarrollo (Tabla 4). Más que cualquier otro animal mamífero de granja, las cabras son el principal proveedor de productos lácteos y cárnicos para la población rural. Por

muchas razones la caprinocultura es muy importante, ya que es un complemento para la familia rural de bajo ingreso. Las estadísticas indican que las cabras producen cerca de 17 y 12% de la carne y leche del África tropical respectivamente. Además, las características bioquímicas y fisiológicas únicas de la leche de cabra son conocidas, especialmente los altos niveles de cadenas cortas y medianas de ácidos grasos de los cuales se ha reconocido valor médico para muchos desordenes y enfermedades de la población. La importancia de las cabras como proveedores de productos lácteos y cárnicos ha sido documentada en muchas actas de conferencias nacionales e internacionales y se ha reflejado en el amplio incremento en el número de cabras y en la producción de leche durante los últimos 20 años comparados con otros animales mamíferos (Haenlein, 2004; Lebbie, 2004; Hernández 2007).

Tabla 4. Líderes en Producción de Leche de Cabra

País	Leche de Cabra 1000T/año
India	3128
Bangladesh	1328
Sudan	1151
Pakistán	818
Francia	480
Grecia	460
Irán	398
Somalia	390
España	350
Países del Mediterráneo Norte ^a	1840
Países del Mediterráneo Sur ^b	618
México	131

a: Portugal, España, Francia, Italia, Yugoslavia, Rumania, Macedonia, Bulgaria, Grecia.

b: Turquía, Siria, Líbano, Israel, Jordania, Egipto, Libia, Túnez, Argelia, Morocco.

Fuente: FAO 2001. (Haenlein, 2004) y SAGARPA.

4.3.5 POBLACIÓN CAPRINA Y PRODUCCIÓN DE LECHE EN MÉXICO

En el rubro de la caprinocultura, México ocupa el segundo lugar en América Latina por el número de animales con los que cuenta y los productos obtenidos (Tabla 5). De acuerdo a cifras del Consejo Mexicano de Criadores de Ganado Caprino (COMECAPRI), durante los últimos 12 a 15 años se ha visto una mayor oferta de productos lácteos y cárnicos caprinos. La producción nacional estimada es de 200 millones de litros de leche y 45 mil toneladas de carne en canal. En el país se reportan nueve millones de cabezas de ganado, cifra similar a las que contabilizó Brasil, pero que es superior a los tres millones de cabezas de ganado en la Unión Americana (Hernández 2007). La producción de carne y leche como otras actividades del subsector ganadero, se da en una amplia gama de sistemas productivos, que van desde los altamente tecnificados e integrados (Coahuila), hasta las economías de tipo campesino orientadas principalmente hacia el autoabastecimiento de la familia campesina. Los principales estados productores de ganado caprino en pie y carne son Coahuila, Oaxaca y San Luís Potosí; en cuanto a leche de cabra se refiere, Coahuila, Durango y Guanajuato son los que mayor producción tienen a nivel nacional (Tabla 6).

A través de la Asociación de Fomento Ganadero Mexicano (FOGAMEX) se realizó un primer embarque de ovinos y caprinos procedentes de 14 ganaderías de seis estados de la República a Quito, Ecuador. La apertura de nuevos canales de comercialización son el resultado de su alta genética, estatus sanitario y la participación de productores pecuarios en expos y agroferias de países de Centro y Sudamérica. Ganaderos mexicanos iniciaron la exportación de ganado de alta genética, con 111 ovinos y 12 caprinos procedentes de: Querétaro, Guanajuato, Jalisco, Hidalgo, San Luís Potosí y Aguascalientes. El valor de esta operación representa un ingreso para el país de dos millones de pesos, con estas nuevas exportaciones las ventas internacionales se han incrementando, en el primer año de operar la Asociación (2001) se exportó un millón de pesos y para 2006 se estimaron exportaciones superiores a los 40 millones de pesos a varios países. Se están generando nuevas oportunidades para el ganado en pie mexicano en países de América Latina, principalmente de ovinos y caprinos; se ha exportado ganado en pie a la mayoría de los países de Centro América (en donde han participado ganaderos de Nuevo León, Chiapas, Yucatán y Tabasco), además de semen y embriones; en Colombia se llevan seis exportaciones y a

Ecuador ya se inició. Los ganaderos y las autoridades trabajan coordinadamente para la conservación y el mejoramiento de la sanidad animal, y con respecto a la genética, México desde hace más de 40 años ha importado ganado caprino de Canadá, Estados Unidos, Europa, Centro y Sudamérica. Asimismo, se importa semen de varios países del mundo, principalmente de Norteamérica, Europa y Australia. Con la combinación de esos genes y la selección por los ganaderos mexicanos se ha logrado que la genética de México actualmente esté dentro de las más reconocidas del mundo. El desarrollo de la genética y su exportación representa para el país y para el sector pecuario una oportunidad de lograr mayores beneficios económicos; sin embargo, otro paso importante es industrializar la carne de ganado en pie y exportarla a países como Asia o Europa donde se obtienen mayores ganancias (Sagarpa-Ergomix, 2006).

Tabla 5. Cabras, Resumen Nacional: Producción, Precio, Valor

Año	Leche			Ganado en pie			Carne en canal		
	Producción miles de litros	\$/kg	Valor de la producción (miles de pesos)	Producción toneladas	\$/kg	Valor de la producción (miles de pesos)	Producción toneladas	\$/kg	Valor de la producción (miles de pesos)
2000	131,177	3.35	439,205	76,48	15.34	1,172,854	38,760	31.03	1,202,533
2001	139,873	3.68	515,188	76,407	15.63	1,194,531	38,839	31.27	1,214,593
2002	146,468	3.70	541,994	82,200	16.12	1,324,799	42,234	31.91	1,347,516
2003	151,842	3.85	584,043	82,489	16.70	1,377,745	42,195	33.17	1,399,684
2004	160,960	4.17	671,708	80,527	17.81	1,434,464	42,029	34.33	1,442,784
2005	164,247	4.72	775,372	80,025	18.69	1,495,457	42,389	35.97	1,524,691
2006	163,485						42,429		

Fuente: Elaborado por el Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) con información de las Delegaciones de la SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx>

Tabla 6. Cabras, Producción por Estado (2005)

Producción Ganado en Pie		Producción de Leche		Producción de Carne	
Estado	tons.	Estado	Litros (miles)	Estado	tons.
Coahuila	7,939	Baja California	498	Coahuila	4,330
Chihuahua	2,966	B. California Sur	2,217	Chihuahua	1,536
Durango	3,129	Coahuila	53,110	Durango	1,764
Guanajuato	4,056	Chihuahua	11,548	Guanajuato	1,872
Guerrero	6,577	Durango	40,414	Guerrero	3,373
Hidalgo	2,740	Guanajuato	24,031	Hidalgo	1,332
Jalisco	3,836	Hidalgo	72	Jalisco	2,174
México	1,089	Jalisco	5,980	México	561
Michoacán	4,369	México	-	Michoacán	2,373
Nuevo León	2,521	Michoacán	3,713	Nayarit	544
Oaxaca	7,742	Nuevo León	4,608	Nuevo León	1,413
Puebla	6,217	Puebla	1,471	Oaxaca	4,335
Querétaro	316	Querétaro	569	Puebla	3,418
San Luís Potosí	7,128	San Luís Potosí	3,186	Querétaro	169
Sinaloa	3,311	Sonora	1,342	San Luís Potosí	3,647
Tamaulipas	3,705	Tamaulipas	152	Tamaulipas	2,002
Veracruz	1,294	Tlaxcala	4,281	Veracruz	666
Zacatecas	6,053	Veracruz	2,051	Zacatecas	3,065
Nacional	80,025	Nacional	164,247	Nacional	42,389

FUENTE: SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), con información de las delegaciones de la SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx>

4.3.6 ASOCIACIONES

En México se ha constituido el Consejo Mexicano de Criadores de Ganado Caprino, (COMECAPRI). Uno de sus objetivos es fomentar que los intereses de los caprinocultores se vean reflejados en las políticas públicas de apoyo a la ganadería de forma específica y concreta, para facilitar la inclusión de esta especie en los programas de apoyo a la ganadería y fortalecer a las organizaciones locales y estatales a través de la adhesión a este Consejo (Revista cabra, 2004).

La Asociación Americana de Cabras Lecheras (ADGA American Dairy Goat Association), es actualmente la tercera mayor organización de ganado de registro, sólo después de las asociaciones de vacas Holstein y las Jersey. Dicha asociación ha jugado un papel de suma importancia en la percepción del público hacia las cabras lecheras y sus productos, contribuyendo directamente a crear campañas de información para este propósito. Cuenta con más de 14,000 miembros de más de 50 estados de la Unión Americana, además de Argentina, Bermuda, Canadá, Costa Rica, México, Nueva Zelanda, Puerto Rico y Rusia. Anualmente se registran más de 40,000 animales y se llevan registros de más de 20,000 traspasos de propiedad de animales. Desde su creación, se han registrado más de un millón de animales. Son seis las razas de cabras lecheras que se reconocen: Alpina, Saanen, La Mancha, Nubia, Obershali y Toggenburg. Su presupuesto anual es de aproximadamente de 1.1 millones de dólares y trabaja directamente con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para calcular la información genética sobre producción y fenotipo. Más de 6,000 cabras son calificadas cada año, sanciona más de 1,200 eventos y concursos en ferias y exhibiciones cada año en los Estados Unidos de América y lleva a cabo un evento anual al cual asisten más de 1500 ejemplares de todas las razas mencionadas anteriormente. Lo anterior demuestra la importancia de las cabras en la producción de leche a nivel internacional (ADGA, 2004).

La evolución de las cabras en el mundo y su papel en el desarrollo agrícola y la nutrición humana ha sido el interés de diversos estudios en años recientes para proveer estímulos y apoyo para desarrollo futuro, especialmente en países en desarrollo, enfocados principalmente en contribuciones y potenciales de las cabras lecheras, en particular a través

de la fundación de la Asociación Internacional de Cabras (IGA), la cual patrocina la Conferencia Internacional de Cabras (IGC), realizada cada cuatro años (Haenlein, 2007).

4.3.7 INVESTIGACIÓN

A pesar del importante papel socioeconómico de las explotaciones de cabras alrededor del mundo, es bien reconocido que la investigación en cabras (básica o aplicada) es limitada, en comparación a investigación en otras especies animales y sus sistemas de producción. En el año 2000, los países con bajos ingresos produjeron el 33% de los artículos técnicos publicados en cabras alrededor del mundo, mientras que tienen 81% de la población mundial de cabras y los países con altos niveles de ingresos produjeron el 46% de todos los artículos, teniendo solo 1% de la población mundial de cabras. Generalmente, la calidad y eficiencia de la investigación en cabras es muy variable aunque la situación ha mejorado durante los últimos 20 años. El banco de datos de Commonwealth Agricultural Bureaux (CAB) parece ser el mejor para la recopilación de artículos publicados sobre cabras y su evolución durante los últimos 20 años, por su método de selección y evaluación de artículos. En el periodo de 1992 a 2000, aumentó el número de artículos sobre cabras publicados en Asia y Europa, mientras que la producción relativa de artículos de Norteamérica, África y Oceanía disminuyó. Con respecto a las áreas científicas cubiertas, los artículos tratan con mayor frecuencia acerca de la patología y nutrición de las cabras y la mayoría de los artículos acerca de patología se enfocan a describir una enfermedad o un caso clínico en una o más cabras, o en la situación patológica de un área geográfica, y solo un número limitado de ellos se refiere a la identificación del patógeno o la manera de erradicar las enfermedades. En el mismo periodo el número de artículos sobre productos de cabra (leche, carne y pelo), aumentó globalmente, pero la mayoría de ellos describen los productos mientras solo algunos son dedicados al mejoramiento de tecnologías, los procesos de elaboración, seguridad en alimentos o calidad. 20% de los artículos generados en relación a la producción de rumiantes trata acerca de las cabras y este tipo de artículos han incrementado un 15% con respecto a todos los artículos dedicados a pequeños rumiantes (Morand-Fehr and Lebbie, 2004).

4.4 PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

En el mundo industrializado, la producción de alimentos de origen animal permanece en niveles relativamente estables. Sin embargo, los sistemas productivos están sufriendo cambios por lo que respecta a su ubicación, el tamaño de los rebaños y a la especialización. El aumento de la competencia en un mercado global podría disminuir los ingresos de los granjeros a través de una disminución en el precio de los productos y aumento de costos, esto estimula a los granjeros a cambiar a sistemas de producción más productivos; además se han incrementado las críticas acerca de su impacto en el medio ambiente y los consumidores están preocupados acerca de cuanto la producción afecta el bienestar animal y la seguridad alimentaria. Las ETAs son una fuente significativa de morbilidad y mortalidad en el mundo desarrollado. Una revisión actual en el campo de los sistemas de ganadería identifica un gran foco en los sistemas de ganadería orgánicos. En la unión Europea ha habido un crecimiento de 25-30% en dichos sistemas durante la última década. Estas tendencias propician además la aparición de regiones con zonas de alta densidad ganadera, hecho que despierta inquietud por sus posibles repercusiones ambientales. Por todo lo anterior, se están elaborando reglamentos y sistemas de buenas prácticas ganaderas (Sorensen *et al.*, 2006).

La leche de cabra y las granjas caprinas han sido poco evaluadas por mucho tiempo y muy poca especialización ha sido observada hasta finales de los 50s. Europa posee solo 2.5% de los rebaños de cabras a nivel mundial pero proporciona el 18% de la producción de leche en el mundo. Es el único continente donde la leche de cabra tiene una importancia económica alta debido principalmente a la posición conductora e innovadora para la organización y valorización de los productos elaborados con leche de cabra. Las principales innovaciones en el manejo de cabras han sido desarrolladas entre la década de los 60s y los 80s, algunas de ellas son el ordeño mecánico, control de reproducción y sincronización de estro, inseminación artificial, selección, nutrición, lactancia artificial, congelación de la leche, controles higiénicos y sanitarios y otras innovaciones en los procesos de elaboración de quesos (Dubeuf *et al.*, 2004; Debeuf and Le Jaouen 2006).

4.5 *Listeria monocytogenes*

4.5.1 EPIDEMIOLOGÍA

Listeria monocytogenes fue aislada e identificada como el agente etiológico de la listeriosis en 1924 (Murray *et al.*, 1926; Pirie, 1927), sin embargo, fue reconocido como una causa importante de infección neonatal hasta después de la Segunda Guerra Mundial en Alemania (Potel, 1952), y en 1960 se confirmó que era contraída por vía oral. Una serie de brotes en países industrializados durante las décadas de los 70s y 80s estableció definitivamente que este microorganismo era el responsable de dicha enfermedad causada por alimentos (Schelch, 1984; Rocourt and Cossart, 1997). La primera cepa de *Listeria ivanovii*, fue identificada en los 60s en un cordero con listeriosis congénita (Murray *et al.*, 1926; Ivanov, 1962). El desarrollo de terapias inmunosupresivas para transplantes de órganos condujo a una gran expansión de población con inmunidad suprimida y en consecuencia la identificación de dicha condición como principal factor de riesgo para adquirir la enfermedad (Louria *et al.*, 1967; Stamm *et al.*, 1982). Posteriormente la epidemia causada por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) ha aumentado marcadamente la población inmunodeficiente, con un riesgo relativo de desarrollar dicha enfermedad 500 veces más alto en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida en comparación con la población general (Jurado *et al.*, 1993).

El uso de procedimientos adecuados, tiempo suficiente y un poco de perseverancia por investigadores, hace posible el aislamiento de *Listeria spp.* incluyendo *L. monocytogenes* de la mayoría de las formas de vida animal y vegetal. Existe una aparente asociación entre el consumo de ensilado y la existencia de listeriosis en rumiantes, lo cual fue observado desde 1922, sin embargo este enlace entre el consumo de ensilado y dicha enfermedad en ganado doméstico no fue confirmada hasta 1960 (Gray, 1960). Aunque diversos artículos publicados durante los siguientes 15 años documentaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en vegetación empleada principalmente para su consumo por animales (Welshimer, 1968), los científicos de esos tiempos no estaban interesados en la incidencia de *Listeria* en productos destinados al consumo por humanos, principalmente porque tales productos no habían sido ligados positivamente a listeriosis humana. Aunque 18 de 41 Canadienses murieron por listeriosis en 1981 después del consumo de ensalada de col, de la cual fue aislada e identificada *L. monocytogenes*, no fue hasta el brote en California relacionado con queso

(1985) que los investigadores comenzaron a desarrollar más que un interés pasivo en el significado de su presencia en la salud pública (Ryser and Marth, 1999). Posteriores brotes fueron ligados a quesos, carne, leche, nuggets de pollo y pescado y no fue hasta 2001 que se convirtió en una enfermedad notificable a nivel nacional (Gellin *et al.*, 1991).

La incidencia de este microorganismo en EU fue de 7 - 7.4 casos por millón de 1986 a 1990 y se realizaron 31 retiros de alimentos por contaminación con *Listeria* entre 1999 y 2002 (Gellin *et al.*, 1991; Schuchat *et al.*, 1992). En los países europeos y Canadá, la incidencia fue de 2 a 7 casos por millón en las últimas dos décadas (Jensen *et al.*, 1994). La infección es más común en niños (100 casos por millón) y gente mayor (14 casos por millón); mujeres embarazadas son más propensas que la población en general. Globalmente, no es una enfermedad típica proveniente de alimentos, es esporádica y rara, pero severa; su prevalencia está declinando en países industrializados en los cuales las medidas de control de los alimentos han sido implementadas (Gellin *et al.*, 1991; Lorber, 1997; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Wing and Gregory, 2002). La severidad y proporción de casos fatales de la enfermedad requiere que esta sea controlada, sin embargo, por las características del organismo, es difícil esperar que todos los alimentos estén libres de *Listeria* (Ryser and Marth 1999; Montville and Matthews, 2005).

Los reportes de listeriosis en mujeres embarazadas en Estados Unidos indican 12 a 17 % de casos, mientras que en Europa se reporta una incidencia de 0.5 a 3%. En México no existen estadísticas confiables, sólo hay reportes aislados como los realizados en 1989 por el Hospital Infantil de México (HIM) en forma conjunta con el Instituto Nacional de Perinatología; en siete casos se identificaron como factores de riesgo antecedentes de procesos infecciosos de vías urinarias, así como datos de corioamnionitis al inicio de trabajo de parto. Posteriormente, el HIM realizó otro reporte de tres casos de *Listeria* neonatal por exámenes de laboratorio (Escárcega *et al.*, 1999).

Una mujer de 57 años, en el mes previo a la admisión al hospital consumió queso de cabra mexicano que compró en una calle de Houston, Texas. Al ingresar al hospital sus síntomas fueron anorexia, náusea, diarrea, fiebre y fatiga generalizada y se aisló *L. monocytogenes* a partir de su sangre. El diagnóstico de infección causada por *L. monocytogenes* es hecho por el cultivo del organismo de un sitio del cuerpo normalmente

estéril (fluido cerebroespinal, sangre o tejido cuando es infección focal). La listeriosis tiene un periodo de incubación largo, lo cual dificulta la identificación del patógeno y el trazado del alimento contaminado (Hines and Atmar, 1995; Gandhi and Chikindas, 2007).

La mayoría de las infecciones en humanos provocadas por alimentos son asociadas con alta prevalencia pero baja mortalidad, la situación es diferente para la listeriosis, la cual es una infección rara pero seria, asociada con una letalidad de hasta 30% y hay un largo tiempo entre el cual es ingerido el alimento y la persona enferma; además la listeriosis permanece siendo poco o mal diagnosticada sobre todo en el inicio de la infección, esto conduce al retraso en la administración de terapia antimicrobiana, lo cual es absolutamente crítico para una recuperación favorable del huésped. Todo esto provoca un alto impacto económico a pesar de una prevalencia relativamente baja (Lorber, 1997; Wing and Gregory, 2002).

4.5.2 RESERVORIO

L. monocytogenes está ampliamente distribuida, se encuentra comúnmente en tierra, agua, aguas negras, materia vegetal, particularmente la que se encuentra en descomposición. Estos ambientes son considerados su hábitat natural. La tierra es referida frecuentemente como fuente de contaminación particularmente para el ensilado, la tierra agrícola fértil recibe material vegetal en descomposición, desechos de animales y aguas negras. El ensilado descompuesto aeróbicamente soporta el desarrollo de una alta cantidad del microorganismo, ha sido citado como una fuente de infección en numerosos casos de listeriosis en animales de granja y podría ser el origen de contaminación capaz de diseminarse a lo largo de la cadena alimentaria. Además, el organismo puede sobrevivir durante periodos de tiempo más grandes, bajo condiciones ambientales adversas, comparado con microorganismos no formadores de esporas de importancia en enfermedades provenientes de alimentos. La resistencia junto con la habilidad de colonizar, multiplicarse y persistir en la superficie del alimento y equipos de procesado durante largos periodos hace a este microorganismo un contaminante particular en la industria de alimentos (Ryser and Marth 1999; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, el alimento para animales más estrechamente relacionado con listeriosis es el ensilado (Loken and Grostol, 1982), en este, las condiciones anaerobias estimulan la rápida multiplicación de las bacterias ácido lácticas nativas o las inoculadas, estas convierten el azúcar de las plantas en ácido láctico causando una rápida disminución del pH, los ensilados bien conservados generalmente tienen un $\text{pH} \leq 4.5$, estas condiciones inhiben el crecimiento de bacterias alterantes. Los ensilados en climas fríos y húmedos tienen menos cantidad de azúcares y mayor cantidad de humedad provocando una fermentación pobre y lenta, haciendo al ensilado más susceptible a la contaminación por *Listeria monocytogenes*, comparados con los ensilados de maíz y pasto que crecen en países con climas cálidos. *Listeria* muere en ensilados bien fermentados, sin embargo si el pH se incrementa antes de que todas las células sean eliminadas entonces las sobrevivientes se multiplicarán. Dijkstra (1971) demostró que *L. monocytogenes* puede sobrevivir 4-6 años en ensilados contaminados naturalmente; Fenlon *et al.*, (1996) observó que el organismo podía sobrevivir más de un año en bolsas, las cuales habían sido empleadas para envolver grandes cantidades de ensilado (Ryser and Marth 1999).

Este patógeno entra en las plantas procesadoras de alimentos a través de la tierra en la ropa y los zapatos de los trabajadores y en los vehículos, también puede entrar con tejido animal y vegetal crudo contaminado y en portadores humanos. El alto nivel de humedad y nutrientes en estos lugares promueve su crecimiento y a menudo es detectada en la mayoría de las áreas, tales como drenajes, pisos, condensado en paredes o techos, agua estancada y equipo ya que se adhiere a las superficies, incluyendo acero inoxidable, cristal y caucho. Puede encontrarse en canales por contaminación fecal durante la matanza y se puede encontrar en zonas limpias o sucias de los rastros, especialmente en las manos de los trabajadores (Montville and Matthews, 2005).

No sobrevive el tratamiento térmico usado para preparar alimentos seguros, por lo que la contaminación en los alimentos procesados se da principalmente por contaminación postproceso. Crece más rápidamente en leche pasteurizada que en leche no pasteurizada a 7°C. La población bacteriana en leche refrigerada, que es contaminada después de la pasteurización, puede incrementarse 10 veces en 7 días a 4°C. Este microorganismo es particularmente difícil de eliminar de las plantas procesadoras porque se adhiere a las superficies que contactan con los alimentos y forma biofilms en áreas difíciles de limpiar,

tales como las tuberías, esto hace difícil la sanitización y dichas superficies se convierten en focos potenciales de diseminación. Aunado a esto, la *Listeria* se encuentra a menudo en la materia prima usada en las plantas procesadoras, por lo cual hay amplias oportunidades para reintroducir el microorganismo a plantas donde fue previamente erradicado; sin embargo cuando en los alimentos hay una carga elevada de microorganismos de alteración, como *Lactobacillus* o *Pseudomonas*, éstos compiten por el espacio y los nutrientes de los alimentos, por lo que *Listeria* difícilmente podrá desarrollarse a niveles elevados (Montville and Matthews, 2005; Rodríguez, 2007).

Puede ser excretada en las heces de las personas sanas, mujeres embarazadas, pacientes con gastroenteritis, trabajadores de rastros, laboratoristas que manejan esta bacteria, manipuladores de alimentos y pacientes bajo hemodiálisis; la bacteria ha sido aislada de 2 a 6% de muestras fecales de personas sanas. Los portadores amplifican los brotes a través de transmisión secundaria. La transmisión primaria es a través de los alimentos al primer huésped, la transmisión secundaria es de las heces del primer huésped a otra persona. También ha sido encontrada en las heces de una amplia variedad de especies de animales sanos, en un porcentaje alto (10-52%), dado que la vegetación es un hábitat natural para la bacteria, no es sorprendente que animales pastando sean portadores sanos, tales como borregos, cabras y bovinos. La influencia de la dieta en la excreción de *L. monocytogenes* ha sido estudiada particularmente en rumiantes (Ryser and Marth 1999; Montville and Matthews, 2005).

Aunque es improbable que la leche de los animales que muestran claros signos de listeriosis llegue al consumidor, la literatura científica contiene numerosos informes en los cuales el ganado de leche aparentemente sano y ligeramente infectado eliminan *L. monocytogenes* intermitentemente en su leche durante varios meses, por lo cual parece que tales portadores asintomático poseen la mayor importancia o atención para la salud pública. *L. monocytogenes* ha sido reportada en muestras de leche cruda de vaca, de cabra y de borrega y *L. innocua* ha sido aislada de leche cruda más frecuentemente que *L. monocytogenes* en algunos países como Canadá, Brasil, Costa Rica, Egipto, México, Nueva Zelanda e Italia (Greenwood *et al.*, 1991; Ryser and Marth 1999).

La leche y los productos lácteos han sido frecuentemente implicados en numerosos brotes de Listeriosis, algunos ejemplos son: Leche pasteurizada, Massachusetts, USA, 1983 (Fleming *et al.*, 1985), Queso suave, Suiza, 1983-1987; Queso estilo mexicano, California, USA 1985 (Linnan *et al.*, 1988); Leche con chocolate pasteurizada, Illinois, USA 1994 (Dalton *et al.*, 1997); Queso Vacherin Mont d'Or, Suiza 1987, Queso Brie de Maux y Pont l'Évêque, Francia 1995-1997. La leche y sus derivados fueron los alimentos que primero se investigaron y los más ampliamente estudiados. La contaminación de leche cruda con esta bacteria resulta de origen exógeno (incluyen los piensos que pueden contener 10^5 ufc/g, las heces de animales portadores asintomáticos y el ambiente de la granja) o intramamario (pueden ser excretadas hasta 10^4 ufc/ml de leche) (Ryser and Marth, 1999; Doyle *et al.*, 2001; Jay, 1994; Bourry and Poutrel, 1996).

En diversos estudios también han demostrado que la leche cruda de cabras puede contener ocasionalmente *L. monocytogenes*, con índices de incidencia que van de 0 – 7.8%, estos niveles de contaminación son similares a aquellos reportados para leche de vaca (Gaya *et al.*, 1996; Barbuddhe *et al.*, 2000). Abou-Eleinin *et al.* (1998), recuperaron *Listeria spp.* en 35 de 445 muestras de leche de cabra empleando tres métodos de enriquecimiento; 17 muestras contenían *L. monocytogenes* y 8 *L. monocytogenes* y *L. innocua*. La proporción de contaminación por este microorganismo fue mayor en invierno (14.3%) y primavera (10.4%) que en otoño (5.3%) y verano (0.9%) con similares observaciones reportadas para leche de vaca. El 62.6% y 37.4% de las *L. monocytogenes* que después fueron caracterizadas, pertenecieron a las serovariedades 1 y 4 respectivamente; El ribotipado automatizado también indicó cinco ribotipos distintos, dos clínicamente importantes de los cuales fueron eventualmente trazados al ambiente de la granja (Ryser and Marth 1999).

En México ya ha sido aislado este patógeno de leche de vaca, en un estudio realizado en el estado de Jalisco, de las 100 muestras analizadas de leche sin pasteurizar de vaca, fueron positivas 7 para *L. innocua* y 2 para *L. welshimeri* (Morales *et al.*, 1995); en otro estudio llevado a cabo en los alrededores de la Ciudad de México, de las 1300 muestras de leche sin pasteurizar de vaca, fueron positivas 23% para *Listeria spp.*, de estas, 13% fueron positivas para *L. monocytogenes*, 6% para *L. ivanovii*, 4% para *L. seeligeri* y 1% para *L. innocua* (Vázquez *et al.*, 2001). También ha sido reportada la presencia de *L. monocytogenes* en quesos panela elaborados con leche de vaca, con un 65% de muestras positivas a

Listeria: *L. murrayi* 20%, *L. innocua* 15%, *L. grayi* 15%, y *L. monocytogenes* 15% (serotipos 1/2a, 1/2b, 4b). (Saltijeral *et al.*, 1999).

4.5.3 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* pertenece a una subrama de las Bacterias Gram positivas está relacionado con los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochotrix*; comprende seis especies y dos subespecies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (*L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londiniensis*), *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, y *L. grayi*. Dentro del género, sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenos en el humano y los rumiantes. Las 16 serovariedades de *Listeria* están basadas en la expresión de antígenos somáticos (O) y flagelares (H) con trece serovariedades de *L. monocytogenes* (Tabla 7). Aproximadamente 95% de los aislados de humanos pertenecen a las serovariedades 4b, 1/2a, y 1/2b. Principalmente las serovariedades 4b son encontradas en la mayoría de los brotes provenientes de alimentos a nivel mundial y en más del 50% de los casos esporádicos de listeriosis, mientras que las serovariedades del grupo 1/2 (1/2a, 1/2b y 1/2c) son mayormente asociadas con casos esporádicos (Rocourt and Cossart, 1997; Cliver and Riemann 2002; Schmid *et al.*, 2005).

Tabla 7. Serovariedades de *Listeria*.

<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
1/2a, 1/2b y 1/2c	5	1/2a, 1/2b y 1/2c		1/2b	
3a, 3b y 3c					
4a,4ab,4b,4c,4d,4e		4b y 4d	4ab	4c	
7		6b	6a y 6b	6a y 6b	

Listeria es un bacilo regular pequeño (0.5 μm de diámetro y 1-2 μm de largo) con terminaciones redondeadas; las células se encuentran solas, en cadenas cortas o tal vez unidas en forma de V, Y o en palizadas, y algunas veces las células son cocoides. No produce esporas y no forma cápsula, generalmente móvil a 20°C, catalasa positiva y oxidasa negativa (Way *et al.*, 2004; Ryser and Marth 1999). Es una bacteria anaeróbica facultativa; una de las propiedades clave es su habilidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (0-45°C); su desarrollo óptimo es a 30-37°C, sin embargo crece lentamente a baja temperatura. La congelación no reduce significativamente el tamaño de la población bacteriana, la sobrevivencia o daño durante el almacenamiento por congelación depende del alimento y velocidad de congelación. Es eliminada a 60°C (Annous *et al.*, 1997; Montville and Matthews, 2005). También resiste relaciones relativamente extremas de pH y sal (pH 4.4-9; crece 10% NaCl; sobrevive 20-30% NaCl), pero su crecimiento óptimo se lleva a cabo a pH neutro y una concentración de 0.5% de NaCl. No es inhibido su desarrollo significativamente por el dióxido de carbono (McClure *et al.*, 1991; Cliver and Riemann 2002).

En cuanto a nutrientes, son requeridos para su crecimiento: carbohidratos, aminoácidos (cisteína, glutamina, isoleucina, leucina y valina) y vitaminas (biotina, riboflavina, tiamina y riboflavina) (Seeliger and Jones, 1986). El hierro y algunos aminoácidos (arginina, histidina, metionina y triptofano) estimulan el crecimiento de *L. monocytogenes*, la glucosa y glutamina son requeridas como fuentes primarias de carbono y nitrógeno; el carbón activado o celobiosa no tiene efecto en su crecimiento pero modula la expresión de sus genes de virulencia (Cewart and Foster, 1985; Park and Kroll, 1993; Ripio *et al.*, 1996; Huillet *et al.*, 1999).

Todas las especies de *Listeria* son fenotípicamente muy similares, pero pueden ser distinguidas por las pruebas producción de ácido de xilosa, ramnosa, manósido, y manitol. Las similitudes fenotípicas se deben a la alta homología genómica entre las diferentes especies. La hemólisis es una característica para la identificación de los aislados; *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri* son hemolíticas, sin embargo solo las dos primeras son patógenas. *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* pueden ser fácilmente distinguidas por la producción de ácido de xylosa, ramnosa y manósido. Se han propuesto pruebas especiales para distinguir *L. monocytogenes* de *L. innocua* e incluyen detección de actividad de la

fosfolipasa C, hidrólisis de D-alnina-p-nitroanilida e hidrólisis de naftilamida (API Listeria) (Ryser and Marth 1999).

4.5.4 ENFERMEDADES QUE CAUSA Y TRATAMIENTO

La listeriosis es caracterizada por dos síndromes primarios, uno de forma invasiva y otro no invasivo los cuales son descritos en la tabla 8. *Listeria monocytogenes* infecta a los humanos a través de alimentos contaminados, provocando meningitis o encefalitis en pacientes inmunosuprimidos, abortos en mujeres embarazadas e infecciones generalizadas en neonatos. Si no es controlada apropiadamente por el sistema inmune, la infección podría causar septicemia. Los alimentos contaminados con una carga elevada del patógeno también pueden infectar personas sanas provocando gastroenteritis, los síntomas pueden ser similares a un resfriado, vómito y/o diarrea (Aureli *et al.*, 2000; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Wing and Gregory, 2002).

Tabla 8. Listeriosis: caracterización de la enfermedad.

Periodo de Incubación 30 días		Periodo de Incubación 18-20 horas
No asociado Mujeres Embarazadas	Asociado a Mujeres Embarazadas	
<p>Neumonía</p> <p>Conjuntivitis</p> <p>Endocarditis</p> <p>Meningitis</p> <p>Meningoencefalitis</p> <p>Infección del sistema nervioso central</p> <p>Bacteremia primaria con fiebre</p> <p>Septicemia</p>	<p>Resfriado</p> <p>Dolor de cabeza</p> <p>Dolor de espalda</p> <p>Amnionitis</p> <p>Aborto espontáneo</p> <p>Nacimiento del bebé muerto</p> <p>Comienzo temprano neonatal (Infección: sepsis, granulomatosis infantisepctica).</p> <p>Comienzo tardío neonatal (infección: meningitis).</p>	<p>Fiebre</p> <p>Gastroenteritis: fiebre, fatiga, malestar, dolor de cabeza, nausea, calambres, vómito, diarrea.</p>

Fuente: (Labbé and García, 2001).

Las manifestaciones de listeriosis clínica en cabras y borregos son esencialmente las mismas: encefalitis, septicemia y aborto, así como infecciones asintomáticas. Los primeros indicadores de la septicemia son depresión, pérdida del apetito, un descenso en la producción de leche y se eleva la temperatura corporal, también pueden tener diarrea; en las cabras preñadas podría atravesar la placenta entrar al feto donde se replica y causar aborto. En estudios experimentales con cabras preñadas, la localización de *Listeria monocytogenes* en la placenta provoca la elevación de Prostaglandina F₂, la disminución de niveles de progesterona y promueve contracción miometrial y aborto (Engeland *et al.*, 1997).

La meningoencefalitis es la forma más frecuentemente reportada de listeriosis en cabras con una letalidad de casi 60%, tal vez las cabras sean más susceptibles que los borregos a la encefalitis causada por *Listeria*, basadas en la severidad del daño cerebral en cabras. En un brote de encefalitis y aborto en un rebaño mixto de borregos y cabras en Irak la morbilidad (30 vs 17%) y mortalidad (21 vs 15%) fue mayor en cabras que en borregos (Yousif *et al.*, 1984). La recuperación más frecuente de *L. monocytogenes* serotipo 1/2b a partir de cabras que de borregos también ha sido documentada (Shigidi, 1979; Ryser and Marth 1999).

La terapia con antibióticos es a menudo inefectiva por diversas razones, sin embargo, la razón más importante podría ser la habilidad del microorganismo de multiplicarse intracelularmente y diseminarse de célula a célula sin pasar por el sistema protector de las células huésped; esta propiedad no solo limita la selección de los antibióticos, también es necesario una respuesta inmune vigorosa del huésped, la cual es comúnmente adecuada para prevenir los signos clínicos de la infección (Nightingale *et al.*, 2004).

Ya que la encefalitis listeriana es una enfermedad debilitante rápida en rumiantes, el tratamiento debe ser iniciado lo más pronto posible. *L. monocytogenes* es sensible a clortetraciclina, por vía intravenosa en dosis de 10 mg/kg de peso por día durante 5 días siendo efectiva para la meningoencefalitis en ganado; si es empleada la penicilina se requieren de dosis altas, porque es difícil mantener niveles terapéuticos en el cerebro (Ryser and Marth 1999). La mayoría de las listerias son sensibles a los aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, cloramfenicol y penicilinas, aunque su sensibilidad podría variar entre cepas. Para tratar la listeriosis a menudo se usa la combinación de ellos (Charpentier

et al., 1995; Hof *et al.*, 1997; Troxler *et al.*, 2000). Son naturalmente resistentes a antibióticos tales como las cefalosporinas o las sulfamidas, la resistencia al ácido nalidíxico es utilizada para enriquecer medios empleados con este microorganismo. Aunque la resistencia a antibióticos en este caso no es aún un problema clínico, se han encontrado cepas resistentes a nuevas tetraciclinas o trimetoprim (Charpentier and Courvalin, 1999).

4.5.5 PATOGENIA Y FACTORES DE VIRULENCIA

Mientras que hay diversas manifestaciones clínicas de la listeriosis, las características comunes de la enfermedad son: 1) un alimento contaminado como fuente, y una vía de entrada oral; 2) colonización del intestino; 3) paso a través del intestino; 4) replicación en el hígado y en el bazo; 5) resolución (dependiente de la inmunidad mediada por células T) o diseminación a otros órganos a través de la sangre. En los humanos, los pasos 2 y 4 a menudo producen síntomas (enteritis o resfriado, respectivamente); en los animales la detección en estos estados es difícil y los signos de la enfermedad típicamente involucran secuelas, siendo las más comunes el aborto y la encefalitis (Orndorff *et al.*, 2006).

En el campo de la patogénesis bacteriana, este microorganismo se ha convertido en uno de los patógenos intracelulares más estudiados y es uno de los ejemplos más notables de bacterias que explotan las funciones de las células de mamíferos, por ello, un punto particular de investigación está centrado en los mecanismos celulares y moleculares de la interacción de *Listeria monocytogenes* con diferentes células huésped de mamíferos. Esta bacteria usa sofisticadas herramientas para manipular dichas células. Los alimentos contaminados son la mayor fuente de infección y por ello el tracto gastrointestinal es considerado como el sitio primario de entrada en el huésped. Después de la ingestión, la bacteria puede cruzar la barrera intestinal, los receptores varían con respecto a la primera fase de la infección, en diversos estudios se han encontrado que la bacteria ataca preferentemente los linfonódulos agregados; cualquiera que sea el mecanismo usado, el cruce de la barrera epitelial provee a la bacteria con un portal de entrada al sistema linfático y a la sangre. Después las bacterias son interiorizadas por macrófagos en los cuales son capaces de sobrevivir y multiplicarse, posteriormente son transportadas por la sangre a los linfonódulos regionales, al hígado y al bazo, y puede llegar a lugares más lejanos como son

el cerebro o la placenta. Por consiguiente la infección no está localizada en el sitio de entrada sino que implica la entrada y multiplicación en una gran variedad de tipos de células y tejidos, debido a esto es considerada una de las bacterias más invasoras conocidas (Ryser and Marth, 1999; Doyle *et al.*, 2001; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Groisman *et al.*, 2001; Kuhn and Goebel, 2004).

El primer paso en la interacción de la bacteria con las células huésped de mamíferos es normalmente la adhesión a la superficie de las células, este microorganismo entra mediante fagocitosis tanto en las células fagocíticas como en los fagocitos no especializados, en el caso de estas últimas, el proceso es desencadenado por la bacteria (fagocitosis inducida), y para ello requiere de proteínas superficie específicas que se unen a receptores de mamíferos; estas interacciones inducen una serie de eventos de señalización en las células de mamíferos culminando en el rearrreglo del citoesqueleto de actina de las células huésped, engolfando la bacteria y dejando esta en una vacuola unida a la membrana dentro de la célula. Este proceso de invasión es mediado por proteínas de superficie de la familia multigenica de internalinas (InIA, InIB codificadas por los genes *inI*). Se ha encontrado que InIA no sólo induce la invasión en las células epiteliales *in vitro*, también es necesaria para la penetración de la barrera epitelial intestinal. Una vez dentro de la célula huésped, *L. monocytogenes* lisa rápidamente la vacuola formada durante su entrada, utilizando la citolisina Listeriolisina O (LLO) (codificada por el gen *hly*), la cual actúa junto con dos fosfolipasas (codificadas por los genes *plc*). Dentro del citosol de la célula huésped, este patógeno se multiplica con tiempos de generación cercanos a aquellos observados en medios enriquecidos. Probablemente la característica más ampliamente reconocida es su habilidad para moverse dentro del citosol de la célula huésped empleando para ello la maquinaria de polimerización de la actina de la célula huésped. Esta habilidad permite a la bacteria moverse al azar a través del citoplasma. La reorganización del citoesqueleto de actina es mediado por la proteína de superficie listeriana llamada Act A (codificada por el gen *actA*) esta proteína recluta diversas proteínas celulares incluyendo el complejo Arp2/3, que es el regulador central de la polimerización de la actina de la célula huésped; este complejo es activado por la unión a la Act A y esto induce la polimerización de la actina en un polo de la bacteria provocando la formación de la Cola de actina F. Cuando el movimiento de la bacteria alcanza la membrana citoplasmática, su movimiento hacia adelante induce la formación de protrusiones en forma de dedos en la superficie de la célula huésped, con la

bacteria en la punta. Las células cercanas engolfan esas protrusiones, permitiendo con ello que la bacteria se disemine de célula a célula sin una fase extracelular, protegiéndola así de la respuesta inmune del huésped. Las *Listerias* que han penetrado a la célula vecina por este mecanismo, se encuentran encerradas en una vacuola de doble membrana, la LLO y diversas fosfolipasas lisan esta vacuola, liberando la bacteria dentro del citosol donde son iniciados nuevamente la replicación y el movimiento intracelular (Wuenscher *et al.*, 1993; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Groisman *et al.*, 2001; Cossart *et al.*, 2003; Cossart and Sansonetti, 2004; Kuhn and Goebel, 2004; Schmid *et al.*, 2005).

La regulación de la expresión de los genes de virulencia en *L. monocytogenes* es bastante compleja, ya que la expresión de las proteínas necesarias para los diferentes pasos del ciclo de vida intracelular es controlado temporal y espacialmente. El factor regulatorio positivo PrfA es el regulador central, la expresión y actividad de PrfA está influenciada por una variedad de señales fisicoquímicas fuera y dentro de la células infectadas. Esta se une a secuencias consenso (PrfA box) encontradas en las regiones regulatorias de todos los genes dependientes de PrfA, las diferencias en estas secuencias, junto con el estado activado de la proteína PrfA, determina el nivel de expresión de cada uno de los genes que regula (*hly*, *plc*, *mlp*, *actA*, algunos miembros de la familia multigénica de las internalinas *inl* y el sistema glucosa fosfato, además diversos genes para los cuales su papel en la virulencia aun no se conoce). La expresión de PrfA es dependiente de la temperatura, controlada por un RNA termosensor recientemente identificado, formado por una región sensible a la temperatura en el mRNA *prfA*, el cual inhibe la traducción a baja temperatura, pero no a 37°C (Wuenscher *et al.*, 1993; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Kuhn and Goebel, 2004; Schmid *et al.*, 2005; Groisman *et al.*, 2001).

4.5.6 PROTEÍNA P60

La proteína p60 es codificada por el gen *iap* (proteína asociada a la invasión) la cual, es transcrita independientemente del activador transcripcional PrfA y cuya expresión es controlada a nivel postranscripcional (Kholer *et al.*, 1991; Bubert *et al.*, 1997; Bubert *et al.*, 1999). Es secretada por la bacteria y también está asociada con la pared celular bacteriana. Es un polipéptido de 484 aminoácidos con un punto isoeléctrico de 9.3, contiene una

secuencia señal de 27 aminoácidos y un dominio que consiste en 19 repeticiones de Thr-Asn (Kuhn and Goebel, 1989; Ruhland *et al.*, 1993; Wuescher *et al.*, 1993). La secreción es mediada por el recientemente identificado sistema de secreción auxiliar SecA2, el cual media la secreción de por lo menos 17 proteínas secretadas y de superficie de *L. monocytogenes* (Lenz *et al.*, 2003). La proteína p60 es expresada por todas las especies de *Listeria* con secuencias de proteína específicas para cada especie (Bubbert *et al.*, 1992a; Bubbert *et al.*, 1994; Gutekunst *et al.*, 1992).

De acuerdo con su actividad en el peptidoglicano (murein hidrolasa), ha sido demostrado que p60 es importante para la formación del septo durante la división bacteriana y por ello para la viabilidad bacteriana y bajo ciertas condiciones, tiene actividad bacteriolítica (Wenscher *et al.*, 1993; Bubert *et al.*, 1999). Por mucho tiempo, se pensó que no se podían obtener mutantes carentes del gen *iap*, sugiriendo con esto que la proteína era esencial para la viabilidad bacteriana, por lo que el papel de la proteína p60 fue evaluado primero en mutantes rugosas, expresando bajos niveles de la proteína y formando estructuras largas y filamentosas, compuestas de cadenas bacterianas. Las mutantes rugosas son menos virulentas y penetran menos eficientemente a las células no fagocíticas (fibroblastos 3T6 y células epiteliales Caco-2), sugiriendo su papel en la invasión bacteriana (Kuhn and Goebel 1989; Gutekunst *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 1995). Posteriormente fue obtenida una mutante Δiap viable, permitiendo estudios más precisos del papel de esta proteína en la virulencia. Después de la fagocitosis por las células epiteliales y los macrófagos, la mutante escapó del fagosoma al citosol con la misma eficiencia que las cepas silvestres, y también creció intracelularmente a un ritmo similar al de las cepas silvestres, sin embargo los movimientos intracelulares y la diseminación de célula a célula fueron reducidas drásticamente en varias líneas celulares, la mutante falló en la inducción de la formación de las colas de actina, sin embargo la bacteria fue cubierta con filamentos de actina. En una cepa a la que se le restableció el gen *iap* y que produce niveles normales de la proteína p60, el movimiento intracelular, la diseminación de célula a célula y la distribución polar de ActA fueron completamente restablecidas. El análisis *in vitro* de la distribución de ActA en los filamentos de la cepa mutante mostró que la pérdida de la formación del septo bacteriano conduce a la acumulación de ActA en los presuntos sitios de división. En base a los resultados obtenidos en esta investigación se propuso reasignar el nombre al gen *iap* y el que sugieren es *cwhA* (cell wall hydrolase A) (Lenz *et al.*, 2003; Pilgrim *et al.*, 2003).

Como una murein hidrolasa podría funcionar en la patogénesis de la listeriosis en una forma similar a este tipo de proteínas. Esta murein hidrolasa listeriana causa fijación al complemento y quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares humanos, es un adyuvante de las células B, es mitogénica, activa macrófagos *in vitro* y es un inmunoestimulante no específico. La liberación de esta proteína de la pared celular *in vivo* y/o intracelularmente podría causar inflamación y modulación de la respuesta inmune. Se ha reportado que los anticuerpos específicos a p60 pueden actuar como opsoninas y tomar parte en la prevención de infecciones sistémicas en individuos inmunocompetentes (Kolb-Maurer *et al.*, 2001; Wenscher *et al.*, 1993). Además, es un antígeno protector importante que induce ambas respuestas inmunes protectoras T-CD8 y Th1, demostrando que ambas, inmunidad humoral y celular son importantes en la protección contra la infección por este patógeno (Harty and Pamer, 1995; Bouwer and Hinrichs, 1996; Geginat *et al.*, 1998; Geginat *et al.*, 1999).

La autolisina codificada por el gen *slp*, es una proteína de 45 kDa con actividad lítica en peptidoglicano, es homóloga de la p60 y de proteínas secretadas por bacterias Gram positivas de actividad desconocida como la p54 de *Enterococcus faecium* y Usp45 de *Lactococcus lactis*. La proteína p45 se encuentra en todas las especies de *Listeria* excepto en *L. grayi*. Es encontrada en ambas formas, secretada y asociada con la pared celular, en una unión fuerte pero no covalente; su comportamiento es semejante al de la p60 y a los dos efectores principales de la invasión de *L. monocytogenes*, InIA e InIB (Schubert *et al.*, 2000).

4.5.7 MECANISMOS DE ADAPTACIÓN

Los lípidos en la membrana de las células bacterianas están en un estado cristalino fluido, lo cual es importante para mantener su fluidez y funciones, los cambios en la temperatura conducen a una alteración en la composición de dichos lípidos, para mantener la fluidez ideal, requerida para la apropiada actividad de las enzimas y transporte de solutos a través de la membrana. (Annous *et al.*, 1997; Beales, 2004). *L. monocytogenes* tiene la habilidad de crecer en un amplio rango de temperatura, debido a los cambios en la expresión de algunos genes y la inducción de proteínas. Produce proteínas de choque térmico (Csps) en respuesta a una rápida disminución de la temperatura y proteínas de aclimatación a bajas temperatura (Caps) que son sintetizadas durante el crecimiento balanceado a dichas

condiciones (Bayles *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2002). La supervivencia de la bacteria bajo condiciones ambientales adversas involucra cambios en la transcripción de genes lo cual es posible por la asociación del factor de estrés general, sigma B (σ^B) con la RNA polimerasa, este es estimulado en respuesta a una disminución de temperatura, sugiriendo con esto, que la acumulación de crioprotectores o solutos compatibles (glicina betaina y carnitina) es una de sus funciones durante el crecimiento a bajas temperaturas (Becker *et al.*, 2000; Angelidis and Smith, 2003; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004; Gandhi and Chikindas, 2007).

Este patógeno puede encontrarse con ambientes que tienen un pH bajo como son alimentos ácidos, jugos gástricos (durante su paso en el estómago) y en el fagosoma del macrófago, donde la bacteria responde y sobrevive en estos ambientes utilizando diversos mecanismos de adaptación, un ejemplo de ello es la inducción de la respuesta a tolerancia ácida (ATR) en la cual las células son resistentes a condiciones ácidas severas (O'Driscoll *et al.*, 1996; Cotter and Hill, 2003). Dicha respuesta involucra diversos cambios en la célula, uno de ellos es el aumento en la síntesis de la proteína GroEL (inducida también durante el crecimiento a baja temperatura), además se ha visto que esta adaptación a ambientes ácidos, incrementa la resistencia a temperaturas altas, choque osmótico (25-30% NaCl) y al estrés por alcohol, lo cual sugiere que la adaptación al medio ácido proporciona protección cruzada contra otros factores de estrés. Esto tiene implicaciones importantes para la industria de alimentos, particularmente si los alimentos reciben tratamientos ácidos durante su procesamiento (Phan-Thanh and Mahouin, 1999; Phan-Thanh *et al.*, 2000; van Schaik *et al.*, 1999). Los microorganismos mantienen su pH intracitoplásmico mediante el mecanismo de homeostasis conseguido por un transporte de protones a través de la membrana celular (Shabala *et al.*, 2002). Para sobrevivir a estos ambientes *L. monocytogenes* también utiliza el sistema glutamato descarboxilasa (GAD), el cual está compuesto por 3 genes *gadA*, *gadB* y *gadC*. Diversos estudios muestran que este sistema es vital para su resistencia en ambientes ácidos y para su paso a través del ambiente gástrico y así poder infectar el intestino delgado (Cotter *et al.*, 2001). Además ha sido identificado un sistema regulatorio que consta de dos componentes *lisR* y *lisK*, los cuales codifican un regulador de respuesta y una histidina cinasa respectivamente, estos dos componentes pueden detectar cambios en el ambiente como estrés a etanol, oxidativo y por pH bajo, mediante la histidina cinasa asociada a la membrana, y el regulador de respuesta permite a la célula responder mediante la alteración en la expresión de genes (Cotter *et al.*, 1999; Gandhi and Chikindas, 2007).

La respuesta de los microorganismos al estrés osmótico también involucra cambios fisiológicos y variación en los patrones de expresión de genes, lo cual conduce a un incremento o disminución en la síntesis de varias proteínas y a esto se le llama osmoadaptación. Han sido identificadas mediante microsecuenciación y espectrometría de masas cerca de 12 proteínas, las cuales son inducidas en condiciones de estrés osmótico (Duche *et al.*, 2002a, b; Gardan *et al.*, 2003). Se han realizado diversos estudios con respecto al papel que tienen los solutos compatibles en la osmoadaptación, estos son compuestos solubles que no tienen carga neta a pH fisiológico y pueden ser acumulados en altas concentraciones sin afectar las funciones celulares. Las células bacterianas toman los osmolitos del ambiente externo como respuesta a este tipo de estrés y esto ayuda al balance osmótico dentro de dichas células (Bayles and Wilkinson 2000). El factor σ^B en *L. monocytogenes* es importante para la utilización de la betaina y la carnitina como osmoprotectores (Becker *et al.*, 1998; Kasmierczak *et al.*, 2003; Gardan *et al.*, 2003; Gandhi and Chikindas, 2007).

La secuencia genómica completa del cromosoma de *L. monocytogenes* y la especie más relacionada a ella, *L. innocua*, abre nuevas posibilidades para la investigación de la virulencia listeriana. La secuenciación de 2 944 528 pares de base del cromosoma circular de *L. monocytogenes* reveló la presencia de 2853 genes codificantes de proteínas, cerca del 35% de los cuales no se tienen determinada su función (Kuhn and Goebel 2004).

4.5.8 RESPUESTA INMUNE

L. monocytogenes ha sido utilizada por décadas por los inmunólogos para estudiar características de inmunidad mediada por células, como resultado de su vida intracelular. Es irónico que estos estudios mientras revolucionaron el entendimiento del sistema inmune, no revelaron la patogénesis normal de la listeriosis. Estos investigadores desarrollaron infecciones con inoculaciones parenterales más que orales y estudiaron la habilidad innata o adaptativa del sistema inmune para limitar la infección al hígado o al bazo. Mientras más rutas naturales están siendo descritas, muchos estudios aún emplean inoculaciones parenterales (Czuprynski *et al.*, 2003; Orndorff *et al.*, 2006; Badovinac *et al.*, 2003, Lara Tejero and Pamer, 2004).

Las defensas del huésped contra *L. monocytogenes* involucran inmunidad innata no específica e inmunidad mediada por células T, adquirida específicamente. Las respuestas inmunes innatas son montadas casi inmediatamente después del comienzo de la infección y sirven para controlar la fase aguda de la infección, hasta que una respuesta inmune mediada por células T, especialmente adquirida, es generada para erradicar los patógenos que residen intracelularmente. Después de su alojamiento en el hígado y el bazo, *Listeria monocytogenes* entra y se multiplica en células fagocíticas profesionales (Granulocitos, polimorfonucleares [PMNs], macrófagos y células dendríticas [DC]), así como en otro tipo de células (enterocitos, hepatocitos). El control de la infección por esta bacteria depende de la rápida activación de los mecanismos inmunes innatos, principalmente a través de receptores tipo toll-like receptors (TLRs). Los receptores TLRs son expresados en diferentes células involucradas en la inmunidad innata y reconocen estructuras moleculares asociadas a patógenos. Las señales generadas a través de ellos, median la inducción de citosinas proinflamatorias y otros mediadores inmunes. TLR2 es particularmente importante en la protección contra infecciones por bacterias Gram positivas, incluyendo *L. monocytogenes* (Takeuchi *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2004). TLR2 reconoce diversas moléculas asociadas a bacterias, incluyendo ácidos lipoteicoicos, lipoproteínas y peptidoglicano, la señalización de este acciona NF- κ B dependiente de mecanismos inmunes innatos incluyendo la producción de citocinas proinflamatorias (Ej. factor de necrosis tumoral [TNF]) y quimiocinas que son esenciales para el reclutamiento de PMN y monocitos, para el primer paso de la infección. En el primer día de la infección, la actividad de células Natural Killer es elevada y esas células citolíticas producen Interferón Gama (IFN- γ), lo cual a su vez dota a los macrófagos con un aumento en la capacidad para producir citocinas (TNF y IFN- γ) y moléculas (óxido nítrico) que tienen un papel fundamental en la inmunidad innata (Dunn and North, 1991; Havell, 1993; Orndorff *et al.*, 2006).

Los macrófagos y las células dendríticas también funcionan como células presentadoras de antígenos en la generación de inmunidad mediada por células T específicas antilisteria. En las células dendríticas, las proteínas listerianas (LLO) son procesadas y luego expuestas externamente en las membranas, en moléculas MHC clase I y II para activar respectivamente células T CD8 y CD4, las que son activadas para provocar que las células cooperadoras Th1 secreten factores (IFN- γ) para promover una respuesta por los linfocitos T citolíticos CD8 (Orndorff *et al.*, 2006).

Los MHC clase I restringidos a las células T citolíticas CD8 median la resolución de una infección primaria y son responsables del largo periodo de inmunidad antilisteriana secundaria (memoria) (Serbina and Pamer, 2004). Las CD8, sensibilizadas reconocen y se unen a péptidos de LLO presentados por moléculas de MHC clase I en la superficie de las células infectadas, estas CD8 destruyen las células secretoras de la proteína LLO junto con moléculas de MHC clase I mediante la producción de citocinas (IFN- γ y TNF), perforinas y granzimas (San Mateo *et al.*, 2002). El INF- γ inicia la actividad listericida de los macrófagos y modifica el fagosoma de manera que previene el escape de la bacteria del fagosoma hacia el citosol (McCaffrey *et al.*, 2004). Esta citólisis de células huésped infectadas que contienen *Listeria* hacen al patógeno intracelular, anteriormente protegido, susceptible a la destrucción por macrófagos activados. La cantidad máxima de CD8 citolíticas activadas presentes en el huésped, corresponden al día siete de la listeriosis. Diversos estudios han establecido también que durante la listeriosis difiere la composición de poblaciones de células T en el bazo y en la mucosa intestinal. Estos hallazgos y otros indican que distintos mecanismos inmunes son llevados a cabo en varios sitios anatómicos (Huleatt *et al.*, 2001). Los resultados de algunos estudios revelan que después del día 7 de la infección, los números de células efectoras CD8 citolíticas activadas específicamente, disminuyen para que la carga antigénica disminuya, estas dirigen la expresión de antígenos listerianos en las células dendríticas y previenen la futura activación de células T nativas para que no haya una sobre expansión de ellas mismas (Wong and Pamer, 2003). Posteriormente las células T CD8 de memoria inspeccionan tejidos para prevenir una posible reinfección listeriana, los números de células T CD8 de memoria son regulados por células T CD4 y CD25 para prevenir su sobre expansión, lo cual podría provocar una excesiva inflamación y destrucción del tejido (Orndorff *et al.*, 2006).

Los anticuerpos (IgG e IgA) para antígenos listerianos son producidos por el huésped y se creía que los anticuerpos no eran protectores, sin embargo ha sido reportado que anticuerpos anti-LLO específicos protegen al huésped de la infección listeriana (Edelson *et al.*, 1999). La LLO producida por la bacteria es neutralizada por los anticuerpos anti-LLO y la *Listeria* es retenida dentro del fagosoma. La inhabilidad para escapar del fagosoma podría hacer a la bacteria fagocitada susceptible a los mecanismos que utiliza el sistema inmune para su eliminación (Edelson and Unanue, 2001).

4.5.9 REGULACIÓN

El periodo de incubación para la listeriosis depende de la susceptibilidad del individuo y de la dosis ingerida, pero está reportado que puede ser de 24 horas a 91 días y no es bien conocido por que este rango es tan amplio; esta característica contribuye a la dificultad en la determinación de la fuente de infección. La dosis infecciosa depende de muchos factores, incluyendo el estado inmunológico del huésped, la virulencia del microorganismo y el alimento. La cantidad de bacterias en alimentos por los que se presentan casos son >100 CFU/g de alimento, sin embargo en algunos brotes, ha sido mucho menor (<0.3 CFU/g), por lo que se requieren más datos epidemiológicos para conocer la dosis infecciosa (Cliver and Riemann, 2002; Montville and Matthews, 2005).

Hay un debate internacional acerca de cómo debería ser regulada la *Listeria monocytogenes*, por ser muy común, las agencias regulatorias en muchos países coinciden que es imposible producir alimentos libres de esta bacteria, pero se han establecido niveles de tolerancia; los productos que han causado listeriosis en humanos han sido colocados en una categoría especial y regulados más estrictamente en contraste con alimentos que jamás han causado listeriosis. La mayoría de los países de la Unión Europea consideran que los alimentos deberían ser libres de este microorganismo o tener el menor nivel posible, de esta manera, los alimentos que promueven el crecimiento del microorganismo deberían estar libres de *Listeria* y los demás alimentos podrían contenerla en cantidades menores a 100 CFU/g. En contraste Reino Unido y Estados Unidos tienen cero tolerancia (en una muestra de 25 g), ambos países argumentan que la dosis infecciosa debería ser conocida antes de que pueda ser asignado un nivel aceptable; pero la dosis infecciosa no es conocida y podría variar para diferentes tipos de personas. El debate sobre cero tolerancia aun continua (Montville and Matthews, 2005).

4.6 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN

Los primeros métodos de aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* fueron desarrollados en laboratorios clínicos. Con el primer brote reconocido de listeriosis causada por alimentos en 1981, comenzó la necesidad de adaptar estos métodos para el aislamiento a partir de ellos. En la industria de alimentos es más común evaluar la presencia de *Listeria spp.* en muestras ambientales que con muestras de alimentos (ausencia en 25 g). Todos los métodos usan un enriquecimiento selectivo en caldo, seguido de aislamiento de colonias en placas de agar selectivo el cual permite la identificación de *Listeria spp.* (agar LPM, Oxford o PALCAM). Cuando el microorganismo pudiera estar estresado, como los provenientes de alimentos congelados o deshidratados, podría ser empleado un enriquecimiento inicial en un medio no selectivo. Para la identificación específica de cepas de *L. monocytogenes* se pueden emplear las placas de agar cromogénico (Rapid L. mono, ALOA agar Listeria Ottavani Agosti, y Cromagar). (Swaminathan *et al.*, 1995; Cliver and Riemann 2002; Allerberger, 2003).

La identificación de *Listeria* en aislados de alimentos, puede ser realizada empleando métodos rápidos y/o simplificados (Heredia 2004). Uno de ellos es el sistema BBL Crystal para la identificación de bacterias Gram-positivas. Es un método de identificación en miniatura, que utiliza substratos convencionales fluorogénicos y cromogénicos modificados, algunos de los procedimientos de análisis usados en este sistema son modificaciones de métodos clásicos, incluyendo pruebas de fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de varios substratos, para la detección de las enzimas que son utilizadas por los microorganismos (Becton Dickinson and Company 2005).

Sin embargo el PCR es la técnica a elegir para una identificación rápida en aislados clínicos y de alimentos. El aislamiento sigue siendo indispensable para estudios epidemiológicos. Ha sido propuesto como una alternativa para el serotipificado, el Múltiple PCR (Doumith *et al.*, 2004b). El método permite diferenciar las principales serovariedades, 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b de *L. monocytogenes*. Las técnicas basadas en la diferenciación fenotípica (fagotipado y bacteriocinotipado) o en caracterización molecular (métodos de tipificación por MEE y DNA) fueron desarrollados para caracterizar cepas de la misma

serovariedad. El fagotipado está basado en la evaluación de los aislados a su sensibilidad a un set de fagos, aislados de cepas de *Listeria* lisogénicas; MEE permite la determinación de un patrón de actividades por enzimas que son específicas para subtipos de *Listeria*; ambas técnicas han sido desarrolladas exitosamente en estudios epidemiológicos. Los métodos moleculares tales como caracterización de DNA cromosomal por análisis con endonucleasas de restricción, ribotipado RAPD (Random amplified polymorphism DNA) o PFGE (Pulse field gel electrophoresis) son también usadas para tipificar cepas de *Listeria*. PFGE es el método más discriminatorio para identificar *L. monocytogenes* y es recomendado junto con el serotipado para la vigilancia epidemiológica (Swaminathan *et al.*, Brosch *et al.*, 1996).

Las capacidades únicas de *L. monocytogenes* son la fuerza que dirige investigación académica futura: como un patógeno humano facultativo intracelular permite el análisis detallado de procesos celulares fundamentales tales como la reorganización de la actina del citoesqueleto y la respuesta inmune innata; además, fue aplicado recientemente como un sistema portador de vacuna en investigación de cáncer. Actualmente es uno de los organismos modelo más importantes de patógenos intracelulares, asimismo, el German PathoGenoMik network y el Instituto Pasteur cooperan en la secuenciación de los genomas de las otras especies de *Listeria* (<http://www.genomik.uni-wuerzburg.de/>), por lo cual podría ser uno de los primeros géneros bacterianos secuenciado completamente, mientras que la publicación de los genomas de *L. monocytogenes* y *L. innocua* han catalizado investigación en proteómica y transcriptómica (Dietrich *et al.*, 2006).

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar molecularmente cepas de *Listeria monocytogenes* en explotaciones caprinas con animales seropositivos a este microorganismo.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Obtener el antígeno (proteína p60) a partir de *Listeria monocytogenes*.
- 2) Detectar cabras seropositivas a *Listeria* mediante la prueba de ELISA.
- 3) Aislar *Listeria* a partir de la leche, alimento o materia fecal de cabra de granjas con animales seropositivos.
- 4) Identificar y tipificar las cepas de *Listeria monocytogenes* obtenidas, empleando PCR y enzimas de restricción.

6. HIPÓTESIS

Si en una explotación caprina se detectan cabras seropositivas a *Listeria* y se aísla *Listeria monocytogenes*, entonces es posible determinar la presencia de este patógeno en dicha explotación.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO A PARTIR DE *Listeria monocytogenes*.

7.1.1 CEPAS

La cepa de *Listeria monocytogenes* hiperproductora de la proteína p60, *Listeria monocytogenes* ATCC 244, *Listeria monocytogenes* ATCC 43249, y *Listeria ivanovii* CDC 1786 fueron proporcionadas por la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

7.1.2 OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO (PROTEÍNA P60)

Se inoculó una colonia de *L. monocytogenes* hiperproductora de la proteína p60 en caldo BHI que contenía Eritromicina 5 µg/ml y Cloramfenicol 10 µg/ml, se incubó 24 horas a 37°C, con este desarrollo se inocularon 30 ml de caldo BHI con antibióticos el cual se mantuvo durante 29 horas a temperatura ambiente, con este segundo crecimiento se inoculó 1 lt de caldo BHI con antibióticos y se incubó a 37°C durante 10 horas con agitación (95 rpm). El cultivo se centrifugó a 2725 Xg por 25 minutos, y al sobrenadante se le adicionó ácido tricloroacético hasta una concentración final de 7% y se almacenó a -20°C durante 1 hora y a 4°C durante 2 horas. Posteriormente se centrifugó a 5341 Xg por 30 minutos y la proteína precipitada se lavó con acetona una vez y se centrifugó a 5341 Xg durante 30 minutos. Finalmente, se resuspendió en 5 ml de amortiguador Laemmli (Tris HCl 0.5 M pH 6.8; SDS 10% y Glicerol), se le adicionó inhibidor de proteasas (PMSF: Formil metil sulfonil fluoruro [2 mM]) y se congeló a -20°C hasta su uso (Wenscher *et al.*, 1993; Wieckowska-Szakiel, 2002).

7.1.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO

La concentración de proteína fue medida por el método de Bradford (Bradford, 1976). La proteína que se empleó para la estandarización de la recta fue Albúmina sérica bovina. Se elaboró una solución con 10 ml de agua destilada y 0.001 g de albúmina, de ésta se tomaron

los volúmenes necesarios para obtener la absorbancia correspondiente a las concentraciones entre 20 y 100 µg de albúmina, las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a una $\lambda=595$ nm y se utilizó agua destilada como blanco (1 ml agua destilada y 5 ml de reactivo Bradford).

Se prepararon dos diluciones de las 5 muestras de proteína p60 (1:10 y 1:50) y se obtuvo la absorbancia de cada una, con estos datos se calculó su concentración por interpolación, estos resultados se multiplicaron por la dilución correspondiente para obtener la concentración real de cada lote de proteína p60.

7.1.4 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DEL ANTÍGENO

La pureza de la proteína p60 fue determinada por electroforesis empleando geles de poliacrilamida al 12% (en condiciones desnaturalizantes), los geles fueron teñidos con azul de Comassie durante 24 horas en agitación, posteriormente se eliminó el exceso de colorante en el gel empleando solución desteñidora, los geles fueron conservados en una solución de ácido acético al 10%. El peso molecular de la proteína p60 producida se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un marcador de peso molecular, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf (Laemmli, 1970).

7.1.5 DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTÍGENO

La especificidad del antígeno fue determinada por Inmunotransferencia, para ello, las muestras de proteína p60 (Dilución 1:10) fueron separadas por electroforesis y posteriormente transferidas (400 mA 1 hora) a la membrana de nitrocelulosa la cual fue bloqueada 1h a T° ambiente en una solución al 5% de leche descremada, se lavó 3 veces con amortiguador PBS-Tween 20 en agitación (15 min. c/u), se adicionó el antisuero de cabra anti p60 título 1:100 y fue incubado 1 noche a 4°C, se lavó 3 veces en agitación, se incubó 1 hora a T° ambiente en contacto con el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra elaborado en conejo, conjugado a peroxidasa, diluido 1:1280, se lavó 3 y 2 veces con amortiguador PBS-Tween 20 y PBS (respectivamente) en agitación 15 minutos cada uno.

Para el revelado, la membrana fue incubada 10 minutos a temperatura ambiente en 40 ml de una solución de ácido sulfúrico 50 mM pH 7.4, con 20 mg de 3,3-Diaminobenzidina y 1.2 ml de solución NiCo (20 mg CoCl₂ y 20 mg de NiCl₂ en 2 ml de agua), finalmente se adicionó 400 µl de una solución de peróxido de hidrógeno al 3.5%, la reacción fue detenida con agua a temperatura ambiente (Towbin y Gordon, 1984).

7.2 DETECCIÓN DE CABRAS SEROPOSITIVAS A *Listeria* MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA.

7.2.1 MUESTREO (SUEROS)

Se realizó en 25 explotaciones de cabras localizadas en los estados de Guanajuato, Querétaro y Estado de México.

El cálculo del tamaño de muestra se realizó mediante la fórmula:

$$P = p \pm 1.96 [p (1 - p) / n]^{1/2} = p \pm T$$

$$T = 1.96 [p (1 - p) / n]^{1/2}$$

$$n = 3.84 p (1 - p) / T^2$$

P = prevalencia poblacional desconocida

T = grado de precisión de la estimación

Nivel de confianza = 100 (1 - α) % = 95%

p = 0.50 (Valor asignado cuando se desconoce)

T = 0.05 (5%)

n = 384 animales (Milian, 1992)

Se seleccionaron al azar 30 animales por explotación de los que se obtuvieron muestras de suero las cuales fueron transportados a baja temperatura y mantenidas a -20°C hasta su uso.

7.2.2 OBTENCIÓN DEL SUERO CONTROL POSITIVO

Se obtuvo un suero control positivo para la estandarización de la prueba de ELISA, para ello se inmunizó una cabra de dos años de edad y 30 kg de peso aplicándole 1 ml de la proteína p60 (Lote No. 5 [2.215 mg/ml]) mediante inyección 4 veces en un periodo de un mes como se describe en la tabla 9.

Tabla 9. Obtención del suero control positivo

Día	Ag (p60) (ml)	Adyuvante de Freund (ml)	Vía
0	1	1 completo	subcutánea
5	1	1 incompleto	subcutánea
15	1	-	Intramuscular
30	1	-	Intramuscular

7.2.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA

Se evaluaron combinaciones de varias concentraciones de antígeno (proteína p60 1:1000 y 1:5000), antisuero (suero hiperinmune contra la proteína p60 obtenido de cabra 1:40, 1:80 y 1:100), anticuerpo secundario (anti-IgG de cabra elaborado en conejo conjugado a peroxidasa 1:800 y 1:1280), y sustrato (revelador 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml) mediante un cuadro de ajedrez para seleccionar las que obtuvieran la mayor diferencia de absorbancia entre los sueros control positivo y negativo en la prueba de ELISA de tipo indirecta como se indica a continuación.

7.2.4 DETECCIÓN DE CABRAS SEROPOSITIVAS A *Listeria*.

Se emplearon microplacas de poliestireno de 96 pozos, a las cuales se fijó antígeno (50 ng/pozo) diluido 1:1000 en buffer de carbonatos (pH 9.6) 1 noche a 4°C, se lavaron las placas tres veces con PBS Tween 20, posteriormente se bloquearon 1 hora a 37°C en una

solución al 5% de leche descremada, se lavaron 3 veces, se adicionó el anticuerpo (suero problema 1:100) y se incubaron 1 hora a 37°C, se lavaron 3 veces, se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG de cabra elaborado en conejo, conjugado a peroxidasa con dilución 1:1280 y se incubó a 37°C 30 minutos, se lavaron 3 veces y se revelaron con o-fenilendiamina (0.8 mg/ml y H₂O₂ al 30%), finalmente se agregaron 100 µl de ácido sulfúrico 3 M para detener la reacción, se empleó suero fetal 1:100 como control negativo y las muestras fueron probadas por duplicado; la lectura se realizó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 490 nm (Boerlin *et al.*, 2003).

7.3 AISLAMIENTO DE *Listeria* A PARTIR DE EXPLOTACIONES CON ANIMALES SEROPOSITIVOS

7.3.1 MUESTREO DE LECHE, ALIMENTO Y MATERIA FECAL

Las muestras de leche, alimento y materia fecal obtenidas de explotaciones con animales seropositivos fueron recolectadas en bolsas de plástico nuevas, transportadas a 4°C y mantenidas a -20°C hasta su uso.

7.3.2 AISLAMIENTO DE *Listeria*

Se adicionaron 25 g de muestra (leche, alimento o materia fecal) en 225 ml de caldo Demi Fraser con suplemento y se incubaron a 30°C. Después de 24 y 48 horas, se transfirió 0.1 ml en 9 ml de caldo Fraser con suplemento y fueron incubados bajo las mismas condiciones. En cada paso, se sembró 0.2 ml de caldo en placas con Agar Oxford modificado (MOX) y en Agar LPM por duplicado y fueron incubadas a 30°C 3-7 días (Scotter *et al.*, 2001; Gasanov *et al.*, 2005).

7.3.3 SELECCIÓN DE LAS CEPAS SOSPECHOSAS DE *Listeria* POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y POR EL MÉTODO BBL CRYSTAL.

Las colonias sospechosas fueron resembradas en placas de agar BHI, se tomaron muestras de las colonias obtenidas y se les realizó tinción Gram, así como pruebas de catalasa y oxidasa.

TINCIÓN GRAM

Se preparó un frotis para tinción de un cultivo de 18 a 24 horas, se añadió solución de cristal violeta y fue retirada después de 30 segundos mediante un lavado con agua; se agregó solución de lugol y fue decantada transcurridos 30 segundos, el frotis fue decolorado con alcohol-acetona durante 3 segundos posteriormente fue lavado con agua y se puso en contacto 30 segundos con el colorante de contraste (safranina), el cual fue retirado por lavado con agua, se permitió que secase la laminilla, finalmente se agregaron unas gotas de aceite al frotis y fue observado en el microscopio (Álvarez y Mendoza, 2005).

OXIDASA

El objetivo de la prueba es buscar la presencia de la enzima citocromo C oxidasa, se trata de un enzima que oxida el citocromo C de la cadena transportadora de e-. Este se detecta utilizando el N,N,N,N-p-fenilendiamina: el reactivo de oxidasa contiene este compuesto que es oxidado por el citocromo C oxidasa. En estado reducido es incolora, pero cuando se oxida vira a púrpura. Se colocó un papel filtro pequeño en una caja de petri, se añadió 3 gotas de N,N,N,N-p-fenilendiamina y se extendió con el asa de platino una colonia de la bacteria problema sobre el papel impregnado. Transcurridos 30 segundos, se observó si ocurrió algún cambio de color. Las bacterias que dan positivo a esta prueba tienen generalmente un ciclo respiratorio oxidativo. Se considera positiva esta prueba cuando toma un color púrpura la muestra (Brock *et al.*, 1993).

CATALASA

El objetivo es buscar la presencia de la enzima catalasa. El peróxido de hidrógeno se produce al utilizar la bacteria el azúcar por vía oxidativa. Al ser éste un compuesto muy oxidante, las bacterias la eliminan mediante la producción de la enzima catalasa ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$). Se agregaron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% a un portaobjetos, a continuación se tomó una muestra de la cepa del microorganismo a estudiar y se puso en contacto con el peróxido y se observó la reacción de ésta. La prueba se considera como positiva si se observan burbujas de oxígeno (Brock *et al.*, 1993).

MÉTODO BBL CRYSTAL

Las cepas sospechosas de *Listeria* fueron identificadas por el método rápido miniaturizado BBL Crystal, para la identificación de bacterias Gram positivas. Los paneles de este sistema contienen 29 sustratos bioquímicos y enzimáticos deshidratados. Para hidratarlos se empleó una suspensión de bacterias en el fluido de inóculo, después de un período de incubación de 24 horas a 37°C se examinaron los pocillos para determinar cambios de color o presencia de fluorescencia que resultan de las actividades metabólicas de los microorganismos. La serie de colores resultante de las 29 reacciones se convierte en un número de perfil de diez dígitos que se utiliza como la base de identificación. Las series de reacciones de los 29 sustratos para una variedad de microorganismos están almacenadas en la base de datos, la identificación se deriva de un análisis comparativo entre las series de reacciones del aislado y las de la base de datos.

7.4 IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Listeria* POR PCR Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

7.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Las cepas de *Listeria* fueron crecidas en caldo BHI por 24 horas a 37°C en agitación, separadas del medio por centrifugación a 4125 Xg durante 10 minutos y resuspendidas en 2.5 ml de amortiguador TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM), se adicionó y mezcló por

inversión 2 mg/ml de lisozima incubándolo 2 horas a 37°C; fueron agregados y mezclados 125 µl de SDS (preparado al 20%) y 50 µg/ml de proteinasa K manteniéndolo a 37°C 1 hora; después fue mezclado con 84 µl de NaCl 5 M y 60 µl de Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio CTAB (CTAB 10% w/v en NaCl 0.7 M) y mantenido a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente le fue añadido y mezclado un volumen de fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó a 4125 Xg por 10 minutos, el sobrenadante se puso en contacto con 5 µg/ml de RNAsa y se mantuvo una noche a temperatura ambiente (Burbano *et al.*, 2006).

Para separar el DNA se mezcló con un volumen de fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó 10 minutos a 4125 Xg, la fase acuosa superior fue transferida a tubos eppendorf, se mezcló por inversión con dos volúmenes de etanol y fue mantenido 2 horas a -20°C, finalmente se centrifugó a 9000 Xg por 10 minutos, se decantó el sobrenadante, se permitió que el tubo se seque por una noche a temperatura ambiente y el DNA fue resuspendido en amortiguador TE.

7.4.2 IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO (*Listeria spp.*)

Para amplificar el gen *iap* (1428 pb), fueron empleados los iniciadores UNILIS A 5`-GGCTACAGCTGGGATTGCGGT-3` y LIS1B 5`-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3`. El PCR se llevo a cabo en un volumen de reacción de 25 µl que contenían 10 mM TrisHCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.05 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 2.5 µM de cada primer, 1.5 U de Polimerasa termoestable y 2 µl de DNA. Se empleó un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos que incluyeron 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C y 2 minutos a 72°C y finalmente una extensión a 72°C durante 5 minutos. Los resultados de la prueba de PCR se compararon con los controles positivo y negativo; como control positivo fue empleada la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 244 y como control negativo, el DNA fue reemplazado por agua destilada estéril. Los productos de PCR (5 µl) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE 0.5x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) que contenía 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Para visualizar los productos se empleó un transiluminador de luz UV, los geles fueron fotografiados con cámara Polaroid DS-H7 y el tamaño de los productos de PCR se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un

marcador de tamaño conocido, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf (Bubert *et al.*, 1992a).

7.4.3 IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

Se emplearon los iniciadores MAR1 5'-GGCTTTATCCATAAAATA-3' y MAR2 5'-TTGCAAGAACCTTGATTA-3'. Sintetizados sobre la base de la secuencia del gen *iap* localizado en las posiciones 635-653 y 1069-1085 pb que producen un fragmento de 450 pb específico de *L. monocytogenes* (Manzano *et al.*, 1997). El PCR fue desarrollado en un volumen de 25 µl que contenían 10 mM TrisHCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.160 mM de cada desoxinucleotido trifosfato, 2.5 µM de cada iniciador, 1.5 U de Polimerasa termoestable y 2 µl de DNA. El DNA fue desnaturalizado inicialmente a 94°C por 5 minutos seguido por 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a la misma temperatura; 30 segundos para el alineamiento a 46°C, 90 segundos de extensión a 72°C y una extensión final de 9 minutos a 72°C. Los resultados de la prueba de PCR se compararon con los controles positivo y negativo, como control positivo fueron empleadas las cepas de *L. monocytogenes* ATCC 244 y *L. monocytogenes* ATCC 43249, como control negativo, el DNA fue reemplazado por agua destilada estéril. Los productos de PCR (10 µl) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% preparados con amortiguador TAE 0.5x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM), que contenía 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, para visualizar los productos se empleó un transiluminador de luz UV, los geles fueron fotografiados con cámara Polaroid DS-H7 y el tamaño de los productos de PCR se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un marcador de tamaño conocido, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf (Manzano *et al.*, 1998).

7.4.4 TIPIFICACIÓN PARCIAL DE *Listeria monocytogenes* POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se utilizó la enzima de restricción *Hind* III (GIBCO BRL), que corta en la secuencia: 5'-A↓AGCTT-3' y 3'-TTCGA↑A-5'. 10 µl de producto de PCR fueron digeridos con una unidad de la enzima [enzima (2 µl), Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), MgCl₂ 10 mM y 50 NaCl mM], a una temperatura de 37°C durante 1 hora. Fue incluido como control DNA no tratado, para

determinar el tamaño de los fragmentos cortados y los que no fueron cortados. Los fragmentos (10 μ l) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% preparados con amortiguador TAE 0.5x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM), que contenía 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, para visualizar los productos se empleó un transiluminador de luz UV, los geles fueron fotografiados con cámara Polaroid DS-H7 y el tamaño de los productos de la digestión se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un marcador de tamaño conocido, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf (Manzano *et al.*, 1998).

7.4.5 PCR ANIDADADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

Se emplearon como molde los productos del PCR obtenidos para la identificación del género (iniciadores UNILIS A y LIS1B los cuales amplificaron el gen *iap* de 1428 pb), con estos se realizó el segundo PCR empleando los iniciadores para la identificación de la especie (*L. monocytogenes*) MAR 1 y MAR 2 en un volumen de reacción de 25 μ l los cuales contenían 10 mM TrisHCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.120 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 2.5 μ M de cada iniciador, 1.5 U de Polimerasa termoestable y 3 μ l del producto de PCR de *Listeria spp.* La reacción de PCR se efectuó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para estos iniciadores. Los resultados de la prueba de PCR (10 μ l) se compararon con los controles positivo y negativo, como control positivo fueron empleadas las cepas de *L. monocytogenes* ATCC 244 y *L. monocytogenes* ATCC 43249, como control negativo, el DNA fue reemplazado por agua destilada estéril. Los productos de PCR (5 μ l) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE 0.5x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM), que contenía 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, para visualizar los productos se empleó un transiluminador de luz UV, los geles fueron fotografiados con cámara Polaroid DS-H7 y el tamaño de los productos de PCR se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un marcador de tamaño conocido, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf.

7.4.6 IDENTIFICACIÓN DE *Listeria ivanovii*

Fueron utilizados los iniciadores IVA1 5`-CTACTCAAGCGCAAGCGGCAC-3` y LIS1B 5`-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3`, que producen un fragmento de 1100pb a partir del gen *iap*, de *L. ivanovii*. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µl conteniendo 10 mM TrisHCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.120 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 2.5 µM de cada iniciador, 1.5 U de Polimerasa termoestable y 2 µl de DNA. Las condiciones del PCR fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a la misma temperatura; 30 segundos para el alineamiento a 56°C, 2 minutos de extensión a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los resultados de la prueba de PCR se compararon con los controles positivo y negativo, como control positivo fue empleada la cepa de *L. ivanovii* ATCC, como control negativo, el DNA fue reemplazado por agua destilada estéril. Los productos de PCR (5 µl) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% preparados con amortiguador TAE 0.5x (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM), que contenía 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, para visualizar los productos se empleó un transiluminador de luz UV, los geles fueron fotografiados con cámara Polaroid DS-H7 y el tamaño de los productos de PCR se obtuvo comparando su posición en el gel con la de un marcador de tamaño conocido, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf (Bubert *et al.*, 1999).

8. RESULTADOS

8.1 OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO A PARTIR DE *Listeria monocytogenes*.

8.1.1 CONCENTRACIÓN DEL ANTÍGENO

Utilizando albúmina sérica bovina se realizó la curva patrón para determinación de proteína p60. En la tabla 10 se muestran las lecturas de absorbancia obtenidas para la estandarización de la recta, la correlación entre la [] de proteína y DO fue de 0.988.

$$Y = 1.745 \times 10^{-3} X + 0.3057 \quad r = 0.988$$

$$Y = \text{DO} \quad \text{y} \quad X = [\] \text{ proteína}$$

Tabla 10. Estandarización de la curva empleada en el método de "Bradford".

No. Tubo	Sol. Albúmina ml	Agua destilada ml	Reactivo Bradford ml	X μg	Y DO
1	0.2	0.8	5	20	.335
2	0.4	0.6	5	40	.389
3	0.6	0.4	5	60	.404
4	0.8	0.2	5	80	.440
5	1.0	0	5	100	.489

Se produjeron 5 lotes de la proteína p60, se tomaron muestras de 0.1 ml con las que fueron realizadas dos diluciones de las 5 muestras de proteína p60 (1:10 y 1:50) y se obtuvo la densidad óptica de cada una; con la dilución 1:10 la lectura obtenida de la muestra del lote no. 5 salió fuera del rango de la curva estandarizada por su alta concentración por lo cual se realizó la dilución 1:50. Con estos datos se calculó su concentración por interpolación empleando la curva estandarizada. Los resultados se multiplicaron por la dilución correspondiente para obtener la concentración real de cada lote de proteína p60 (tabla 11). La concentración promedio de proteína p60 fue de 1.15 mg/ml y se obtuvieron ~5 ml de cada lote.

Tabla 11. Determinación de la concentración de la proteína p60 por el método de “Bradford”.

No. Lote	Muestra 1:10 (DO)	Muestra 1:50 (DO)	Interpolación	Concentración [µg/ml]
1	.384	.113	44.87	448.7
2	.485	.303	102.75	1027.5
3	.460	.223	88.54	885.4
4	.508	.293	115.93	1159.3
5	-	.383	44.29	2214.9

8.1.2 PUREZA DEL ANTÍGENO

El gel de poliacrilamida en el cual se separaron por electroforesis, las muestras de las proteínas obtenidas a partir de *Listeria monocytogenes* hiperproductora de la proteína p60, se muestra en la figura 1, en la cual se observan dos bandas, una de 62 kDa y otra de 43 kDa.

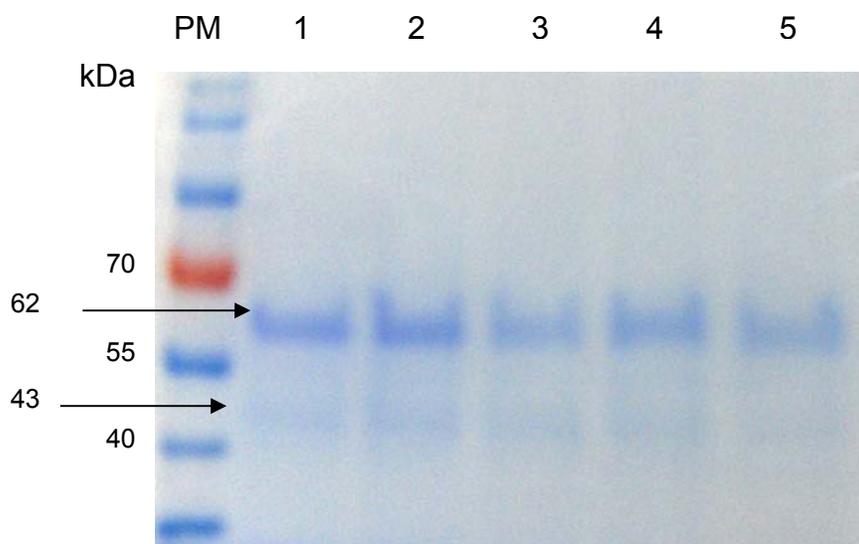


Figura 1. Gel de poliacrilamida al 12%, PM marcador de peso molecular, carriles 1-5 proteína p60 lotes 1 al 5.

8.1.3 ESPECIFICIDAD DEL ANTÍGENO

En la figura 2 se presenta el resultado de la inmunotransferencia realizada con la proteína obtenida de *Listeria monocytogenes* hiperproductora de p60 y el suero hiperinmune producido en cabra, en la membrana se observa que dicho suero reconoció tanto la proteína de 62 kDa como la de 43 kDa.

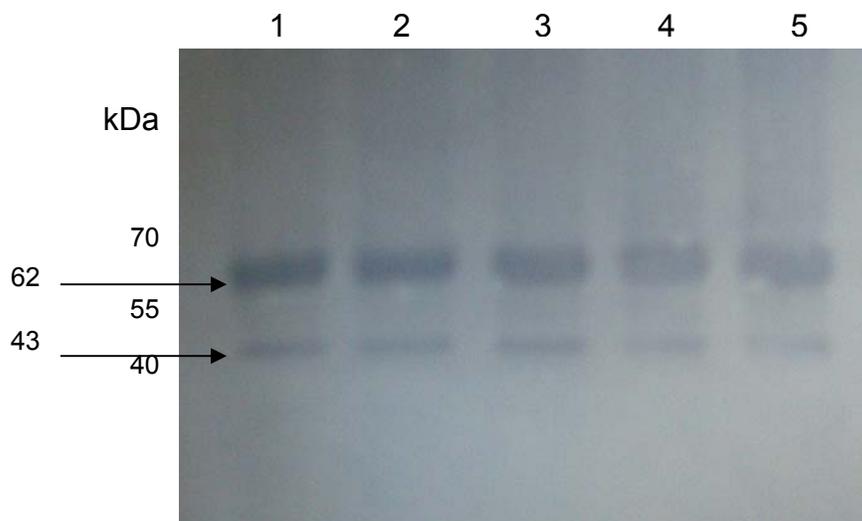


Figura 2. Inmunotransferencia de las muestras de proteína p60, son observadas bandas de reconocimiento de 62 y 43 kDa, carriles 1-5 muestras de proteína lotes 1 al 5.

8.2 CABRAS SEROPOSITIVAS A *Listeria*

8.2.1 MUESTREO (SUEROS)

La cantidad mínima de animales derivada del cálculo del tamaño de muestra fue de 384, sin embargo, debido a la disponibilidad de cabras y de reactivos para el análisis de los sueros, fueron obtenidas un total de 758 muestras de suero de cabra de diversas explotaciones localizadas en los estados de Querétaro, Guanajuato y Edo. De México y 246 muestras de un banco de sueros de la FES- Cuautitlán, por lo que se contó con un total de 1004 sueros para analizar mediante la prueba de ELISA (Tabla12).

Tabla 12. Muestras de suero de cabras

REGIONES MUESTREADA	No. DE SUEROS	BANCO DE SUEROS	No. DE SUEROS
Edo. De México	95	Hidalgo	51
Querétaro	183	Celaya	61
Guanajuato 1	200	Cortazar	134
Guanajuato 2 y 3	280		
Total	758	Total	246

8.2.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA

Se evaluaron varias concentraciones de Ag, antisuero, anticuerpo secundario y sustrato (revelador) para seleccionar las que se emplearon en la prueba de ELISA. En base a los resultados, la dilución de Ag seleccionada fue de 1:1000 con la cual se adicionó una cantidad cercana a 50 ng/ pozo (100 µl); empleando la concentración de sustrato (revelador) de 0.8 mg/ml, combinada con una dilución del suero de 1:100 y una dilución del anticuerpo secundario de 1:1280 se obtuvieron los mayores valores de absorbancia (3.7), lo cual es deseable para obtener un rango de DO más amplio en el cual poder diferenciar los sueros positivos de los negativos.

8.2.3 DETECCIÓN DE CABRAS SEROPOSITIVAS A *Listeria*.

En la tabla 13 se muestra las lecturas promedio de la densidad óptica del suero control positivo empleado en las pruebas de ELISA, su promedio y desviación estándar fueron empleados para determinar el punto de corte, el cual fue de 3.6869 ± 0.1522 (tomando en cuenta 1 desviación).

Tabla 13. Lecturas promedio de la Densidad Óptica del control positivo

ELISA	Control (+) DO
1	3.6070
2	3.7855
3	3.9270
4	3.6275
5	3.4450
6	3.6115
7	3.7180
8	3.5905
9	3.8700
X	3.6869
S (σ)	0.1522

En la tabla 14 y en las figuras 3, 4 y 5 se observa que en general, las mayores frecuencias se registraron en valores de densidad óptica altos. Las figuras 3 y 4 muestran por separado, las cuatro gráficas de la frecuencia obtenida de la densidad óptica para cada región (Edo. de México, Querétaro, Guanajuato 1 y Guanajuato 2-3) y en la figura 5 se muestra en forma global, la frecuencia de la densidad óptica obtenida de todas las regiones muestreadas. De los 1004 sueros analizados por la prueba de ELISA, se obtuvo un porcentaje promedio de muestras positivas a *Listeria* de 23.22 y 73.17 % para las regiones muestreadas y del banco de sueros respectivamente (Tabla 15). En el Estado de México, la frecuencia mostró dos tendencias ambas con densidades ópticas menores al punto de corte. Sin embargo, las frecuencias de densidad óptica obtenidas en las muestras de Querétaro, Guanajuato 1 y Guanajuato 2-3 mostraron una clara tendencia hacia el área correspondiente al del punto de corte.

Tabla 14. Frecuencia de las lecturas de la Densidad Óptica obtenidas con la prueba de ELISA en sueros de cabra.

Región	Estado de México	Querétaro	Guanajuato 1	Guanajuato 2-3	Total
DO	Frecuencia				
0-0.40	0	8	0	1	9
0.41-0.80	0	0	0	2	2
0.81-1.20	0	0	0	9	9
1.21-1.60	2	1	0	10	13
1.61-2.0	20	3	0	19	42
2.01-2.40	26	15	1	23	65
2.41-2.80	8	35	21	62	126
2.81-3.20	19	33	44	61	157
3.21-3.60	20	63	61	68	212
3.60-4.0	0	25	73	25	123
Total	95	183	200	280	758

Tabla 15. Resultados de la prueba de ELISA en sueros de cabra muestreados y del banco de sueros.

Regiones Muestreadas	Sueros Analizados	Sueros (+) X - 1σ	% Sueros (+)
Guanajuato 2 y 3	280	36	12.86
Guanajuato 1	200	99	49.50
Querétaro	183	41	22.40
Edo. México	95	0	0
Total	758	176	23.22
Banco de Sueros	Sueros Analizados	Sueros (+) X - 1σ	% Sueros (+)
Celaya	61	28	45.90
Cortazar	134	115	85.82
Hidalgo	51	37	77.55
Total	246	180	73.17

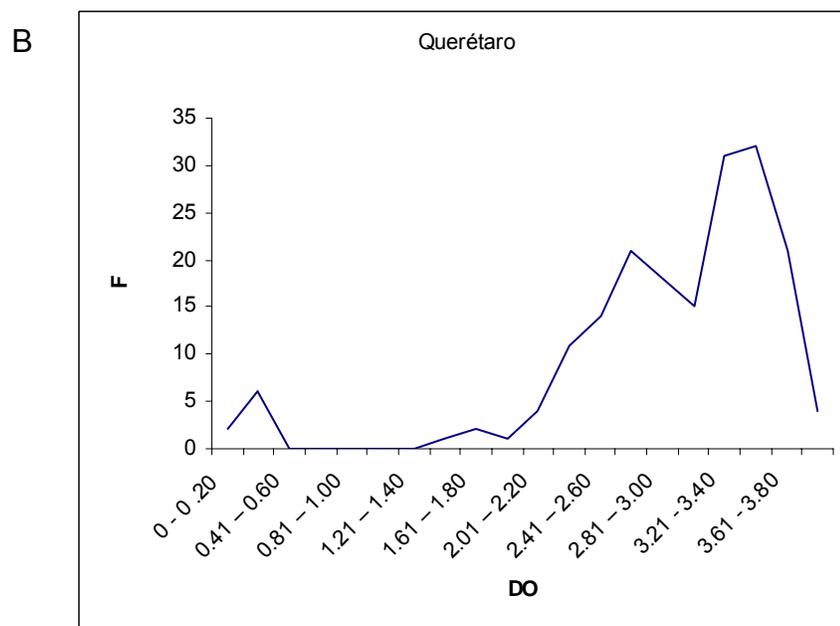
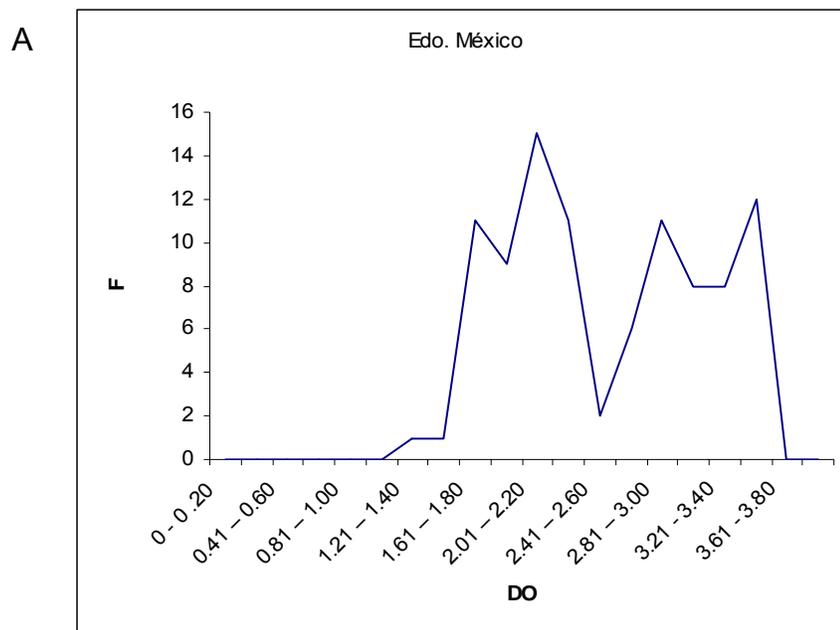


Figura 3. Frecuencia de la Densidad Óptica obtenida en la Prueba de ELISA. A) Muestras de suero de hatos localizados en el Estado de México. B) Muestras de suero de hatos localizados en Querétaro.

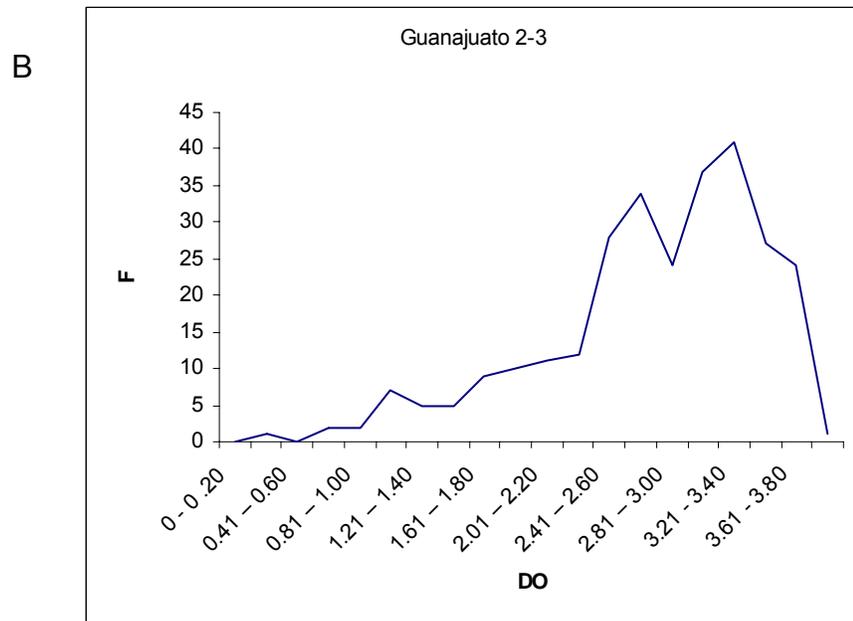
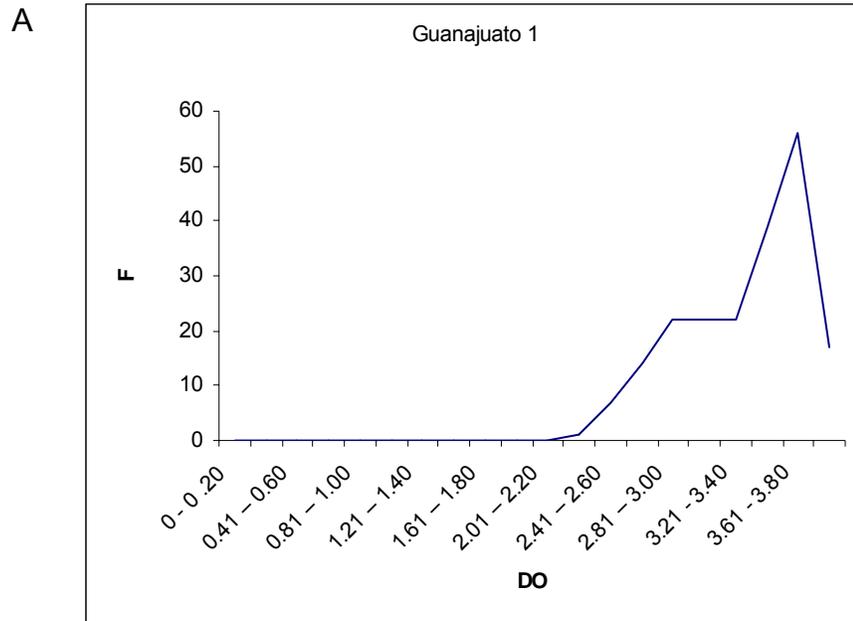


Figura 4. Frecuencia de la Densidad Óptica obtenida en la Prueba de ELISA. A) Muestras de suero de hatos localizados en Guanajuato 1. B) Muestras de suero de hatos localizados en Guanajuato 2-3.

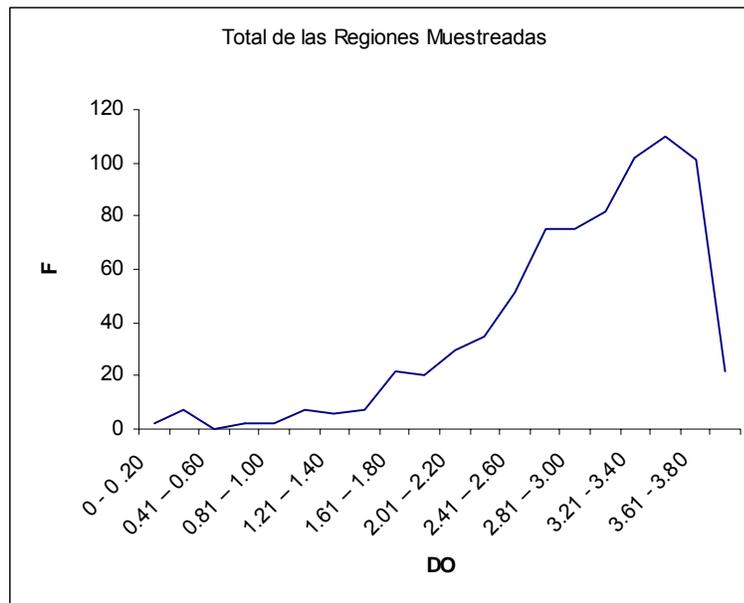


Figura 5. Frecuencia de la Densidad Óptica obtenida en la Prueba de ELISA. Suero de cabras pertenecientes a explotaciones localizadas en las Regiones Muestreadas.

8.3 AISLAMIENTO DE *Listeria* A PARTIR DE GRANJAS CON ANIMALES SEROPOSITIVOS

8.3.1 MUESTREO DE LECHE, ALIMENTO Y MATERIA FECAL

Como se describe en la Tabla 16, fueron obtenidas un total de 360 muestras de leche, materia fecal y alimento, de las explotaciones con animales seropositivos a *Listeria* detectados mediante la prueba de ELISA; en la Figura 6 se muestran algunas imágenes del muestreo.

Tabla 16. Muestras de Leche, alimento y materia fecal de cabra

Región	Leche	Alimento	Materia Fecal	Total
Edo. México	54	17	76	147 40.8%
Querétaro	4	4	29	37 10.3%
Guanajuato 1	8	5	21	34 9.4%
Guanajuato 2	38	2	38	78 21.7%
Guanajuato 3	38	3	23	64 17.8%
Total	142 39.45%	31 8.61%	187 51.94%	360



Figura 6. Muestreo de Leche, Alimento y Materia fecal de cabras.

8.3.2 AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS SOSPECHOSAS DE *Listeria*

De las muestras de leche, alimento y materia fecal obtenidas de las explotaciones con animales seropositivos, fueron aisladas un total de 30 cepas sospechosas de *Listeria* (Tabla 17), 17 de materia fecal, 9 de alimento y 4 de leche de cabra. Respecto al medio del cual fueron recuperadas, 16 se obtuvieron del caldo Demi Fraser y 14 del caldo Fraser. Finalmente, en relación al tiempo de incubación, la mayor parte de las muestras fueron recuperadas después de 24 horas a excepción de las muestras de leche las cuales requirieron un tiempo de 48 horas (Tabla 17). Dichas cepas son el resultado de una primera selección realizada mediante la aplicación de las pruebas de Tinción Gram, catalasa y oxidasa, el género de *Listeria* son Gram positivas, catalasa positivas y oxidasa negativas.

Después de la incubación de los paneles del Sistema BBL Crystal, con la serie de colores resultante de las 29 reacciones, según los valores asignados por el fabricante a cada prueba en el caso de ser positiva o negativa, se obtuvo un número de perfil de diez dígitos que se utilizó para la identificación, introduciéndolo en una base de datos (Figura 7). Los resultados de la identificación de las 30 cepas sospechosas de *Listeria* se muestran en la tabla 18.

Cinco muestras no pudieron ser identificadas por este método dando ID identificación inaceptable y un valor de confianza menor a 0.9. Respecto a las demás cepas, 19 fueron identificadas como *L. ivanovii* y 6 como *L. monocytogenes*, ambas patógenas, sin embargo se debe tomar en cuenta que este método solo puede identificar 4 especies del género: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi*. En la Figura 8 se muestran imágenes de la identificación de *Listeria monocytogenes* con este método.

Tabla 17. Origen de las cepas aisladas

CEPA no.	MUESTRA	ORIGEN	MEDIO DEMI FRASER/ FRASER	TIEMPO INCUBACIÓN horas
1	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
2	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
3	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
4	Materia Fecal	Querétaro	Fraser	24
5	Materia Fecal	Querétaro	Fraser	24
6	Materia Fecal	Querétaro	Fraser	24
7	Materia Fecal	Querétaro	Fraser	24
8	Materia Fecal	Querétaro	Fraser	24
9	Materia Fecal	Querétaro	Fraser	24
10	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
11	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
12	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
13	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
14	Materia Fecal	Querétaro	Demi Fraser	24
15	Alfalfa	Edo. México	Demi Fraser	24
16	Alfalfa	Edo. México	Demi Fraser	24
17	Alfalfa	Edo. México	Demi Fraser	24
18	Alfalfa	Edo. México	Fraser	24
19	Alfalfa	Edo. México	Fraser	24
20	Ensilado	Edo. México	Demi Fraser	24
21	Ensilado	Edo. México	Demi Fraser	24
22	Ensilado	Edo. México	Fraser	24
23	Ensilado	Guanajuato 1	Fraser	24
24	Materia Fecal	Guanajuato 1	Demi Fraser	24
25	Materia Fecal	Guanajuato 2	Fraser	24
26	Materia Fecal	Guanajuato 2	Fraser	24
27	Leche	Guanajuato 3	Demi Fraser	48
28	Leche	Guanajuato 3	Demi Fraser	48
29	Leche	Guanajuato 3	Fraser	48
30	Leche	Guanajuato 3	Fraser	48

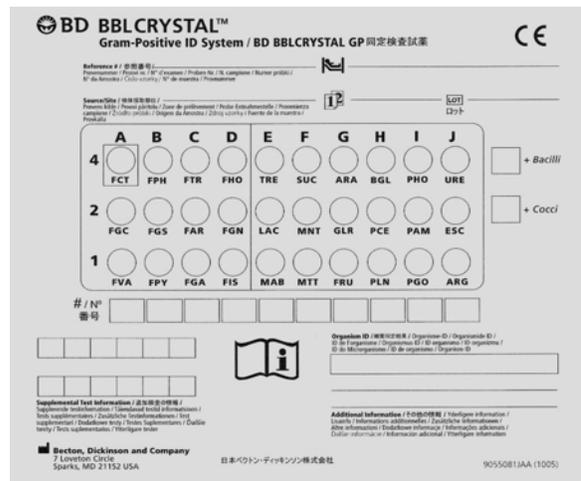
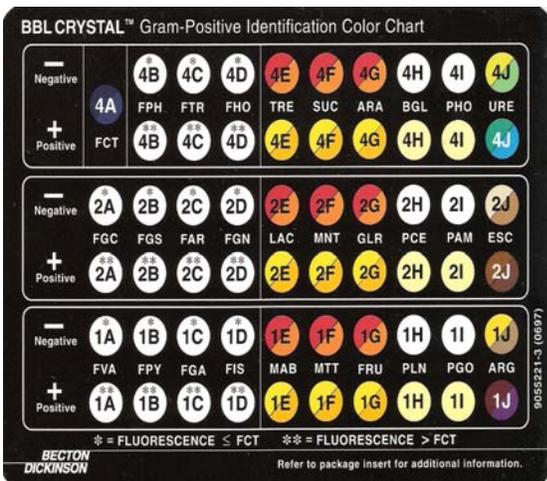
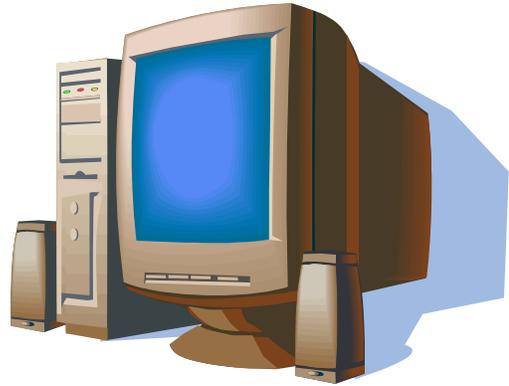


Figura 7. Sistema de Identificación BBL Crystal GP ID.

Tabla 18. Identificación de cepas sospechosas de *Listeria* aisladas de leche, alimento y materia fecal de cabra, por el método BBL Crystal.

Número de Perfil	Género / especie	Valor de confianza	No. Cepa
2650511662	<i>L. ivanovii</i> spp. <i>ivanovii</i> .	0.9415	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17
2650713662	<i>L. monocytogenes</i>	0.9660	8,14
2654511662	<i>L. ivanovii</i>	0.9821	11,12,18,19, 27
2674511662	<i>L. ivanovii</i>	0.9810	28, 29, 30
2674513662	<i>L. ivanovii</i>	0.9810	9
2674713662	<i>L. monocytogenes</i>	0.9997	8, 26
2654713662	<i>L. monocytogenes</i>	0.9997	13, 25
2654513662	<i>L. monocytogenes/ L. ivanovii</i>	0.5681/0.4319	10
2474401662	ID inaceptable <i>L. monocytogenes</i> <i>C.aquaticum, B.megaterium</i>	0.9069	20
2464401662	ID inaceptable <i>C. aquaticum</i> <i>B. megaterium, S. anginosus</i>	0.6881	21
2454401643	ID inaceptable <i>B. subtilis</i> <i>B. pumilus, B. brevis</i>	0.6849	24
2444401662	ID inaceptable <i>L. monocytogenes</i> <i>C. aquaticum, B. subtilis</i>	0.9991	22
2444401642	ID inaceptable <i>S. anginosus</i> <i>L. monocytogenes B. subtilis</i>	0.4521	23

A



B



Figura 8. Identificación de *Listeria spp.* mediante el Sistema de Identificación BBL Crystal.

8.4 IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE CEPAS DE *Listeria* POR PCR Y ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

8.4.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Se obtuvo el DNA de las cepas control y de 25 cepas aisladas de leche, alimento y materia fecal de cabra e identificadas como *Listeria spp.* mediante el sistema de identificación BBL Crystal. En la figura 9 se muestran las imágenes del DNA cromosómico corrido en geles de agarosa, los tamaños de los DNA en general fueron superiores a 23,000 pb, aunque algunos de ellos mostraron cierta diferencia de tamaño.

8.4.2 IDENTIFICACIÓN DE GÉNERO (*Listeria spp.*)

Se realizó la estandarización del PCR para la identificación género específica de *Listeria*, para lo cual se emplearon los iniciadores Unilis A y Lis1B y como controles positivos las cepas *L. monocytogenes* ATCC 244 y *L. monocytogenes* ATCC 43249; se confirmó que las 25 cepas evaluadas pertenecen al género *Listeria*, en las figuras 10 y 11 se muestran los productos de la amplificación de las cepas aisladas (bandas de 1450 pb) y los controles positivo y negativo. Además se confirmó la especificidad de los iniciadores para lo cual se sometió al mismo PCR cepas de otros géneros como *Brucella*, *Escherichia*, *Staphylococcus* entre otras y en ninguna se obtuvo producto amplificado (figura 12).

De las cepas confirmadas por PCR, 14 fueron aisladas de una explotación localizada en Querétaro (cepas no. 1 a la 14), 5 de un hato en el Estado de México (cepas no. 15 a la 19), 3 pertenecientes a un hato localizado en la región de Guanajuato 2 (cepas no. 25 y 26) y 2 cepas aisladas de un hato de la región Guanajuato 3 (cepas no. 27, 28, 29 y 30) (tablas 16 y 17).

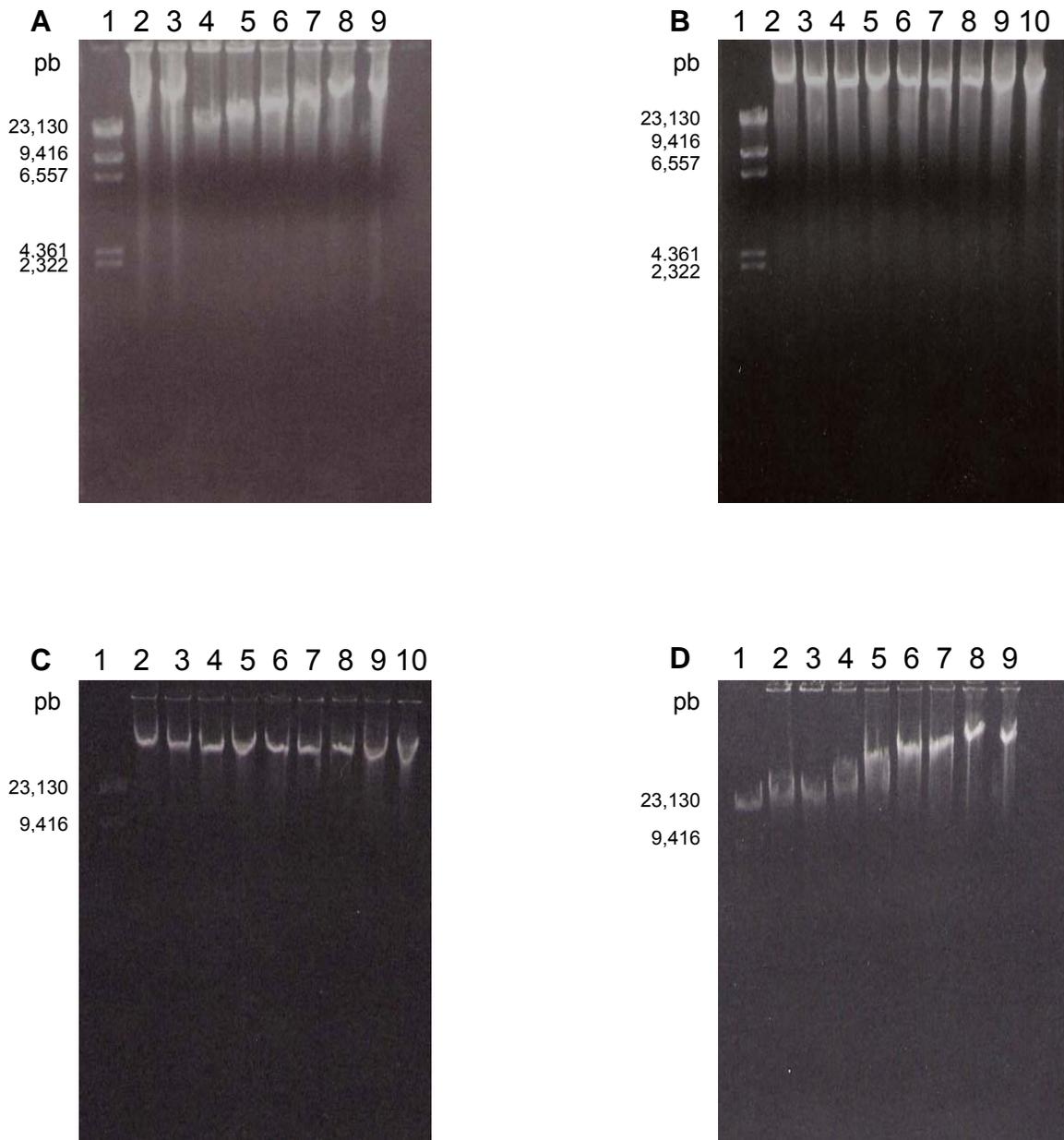


Figura 9. Geles de agarosa al 0.7%, muestras de DNA cromosómico de las cepas control y las cepas de *Listeria* aisladas de leche, alimento y materia fecal de cabras. A: Carril 1 Marcador de tamaño (DNA de λ *Hind* III), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-*L. monocytogenes* ATCC 43249, 4-cepa 1, 5-cepa 2, 6-cepa 3, 7- cepa 4, 8-cepa 5, 9-cepa 6. B: Carril 1 Marcador de tamaño (DNA de λ *Hind* III), 2-cepa 7, 3-cepa 8, 4-cepa 9, 5-cepa 10, 6-cepa 11, 7-cepa 12, 8-cepa 13, 9-cepa 14, 10-cepa 15. C: Carril 1 Marcador de tamaño (DNA de λ *Hind* III), 2-cepa 16, 3-cepa 17, 4-cepa 18, 5-cepa 19, 6-cepa 25, 7 y 8-cepa 26, 9 y 10-cepa 27. D: Carril 1 Marcador de tamaño (DNA de λ *Hind* III), 2 y 3-cepa 28, 4 y 5-cepa 29, 6 y 7-cepa 30, 8 y 9-cepa *L. ivanovii* CDC 1786.

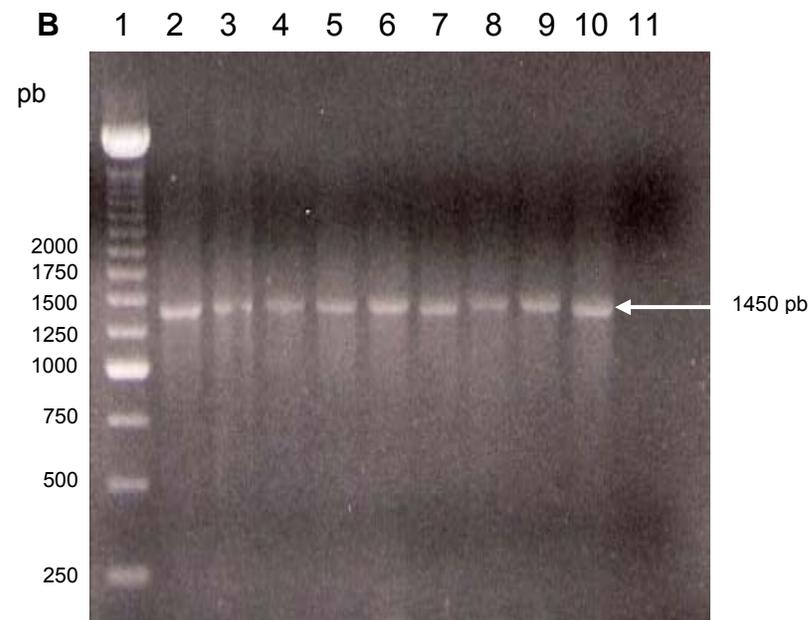
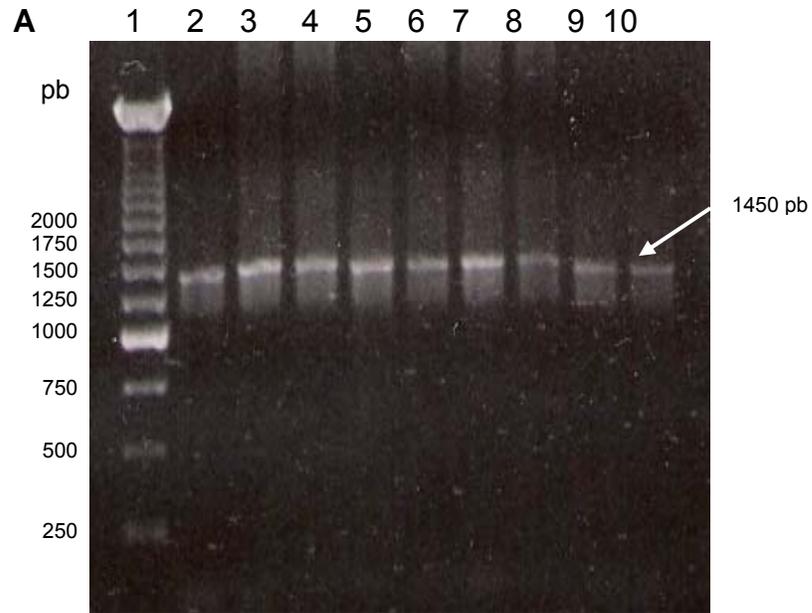


Figura 10. Productos de PCR realizado para la Identificación de Género (*Listeria spp.*). A: carril 1- Marcador de tamaño (250 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-cepa 1, 4-cepa 2, 5-cepa 3, 6-cepa 4, 7-cepa 5, 8-cepa 6, 9-cepa 7, 10-*L. monocytogenes* ATCC 43249. B: carril 1 Marcador de tamaño (250 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-cepa 8, 4-cepa 9, 5-cepa 10, 6-cepa 11, 7-cepa 12, 8-cepa 13, 9-cepa 14, 10-*L. monocytogenes* ATCC 43249, 11-control negativo.

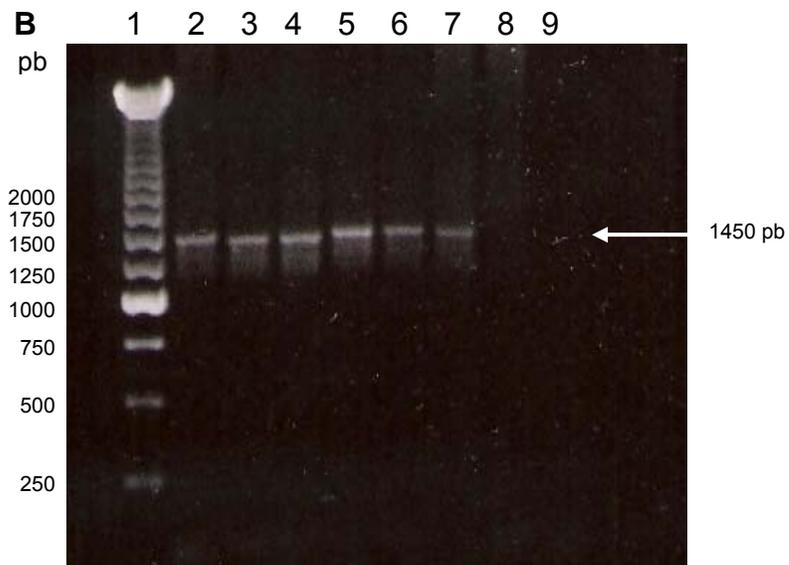
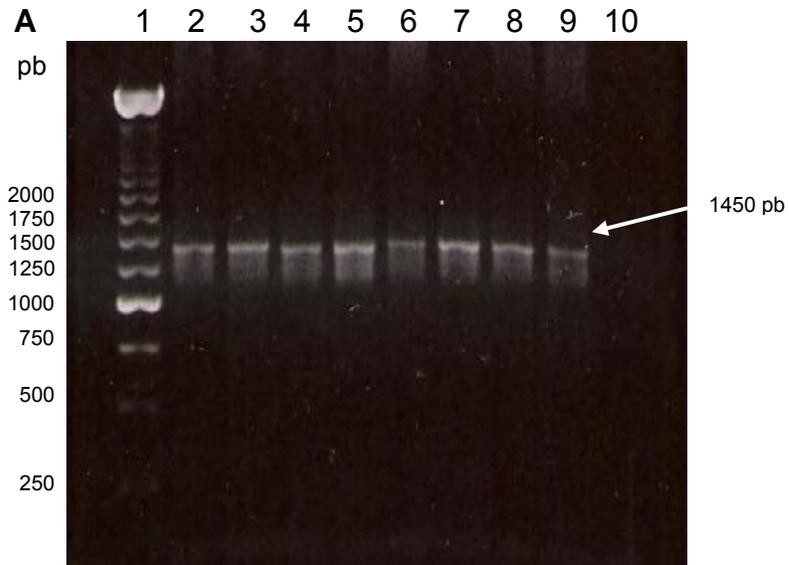


Figura 11. Productos de PCR realizado para la Identificación de Género (*Listeria spp.*). A: carril 1- Marcador de tamaño (250 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-cepa 15, 4-cepa 16, 5-cepa 17, 6-cepa 18, 7-cepa 19, 8-cepa 25, 9-cepa 26, 10-control negativo. B: Carril 1 Marcador de tamaño (250 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-cepa 27, 4-cepa 28, 5-cepa 29, 6 y 7-cepa 30, 9-control negativo.

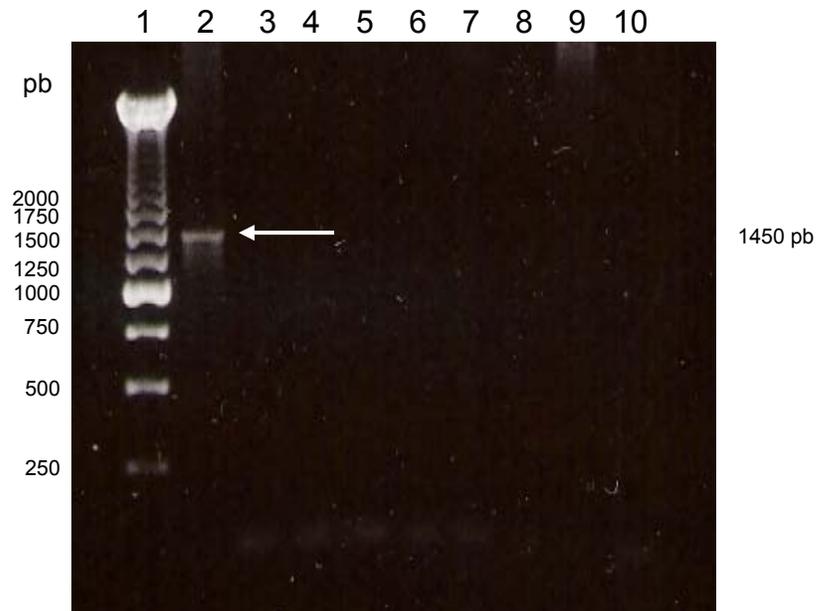


Figura 12. Productos de PCR en el que se demostró que los iniciadores son específicos para *Listeria spp.* Carril 1 Marcador de tamaño (250 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-*Histophyllus somni*, 4-*Actinobacillus pleuropneumoniae*, 5-*Pasteurella multocida*, 6-*Staphylococcus aureus*, 7-*Brucella ovis*, 8-*Escherichia coli*, 9-*Actinobacillus seminis*, 10-control negativo.

8.4.3 IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

Se confirmó por PCR que 7 de las 25 cepas aisladas pertenecen a la especie patógena *Listeria monocytogenes*, para ello fueron empleados los iniciadores MAR 1 y MAR 2. En la figura 13 se muestran los productos amplificados de las cepas de campo (bandas de 450 pb) y sus respectivos controles. Tres de estas cepas fueron aisladas de la explotación localizada en el Estado de México (cepas no. 15, 16 y 17), 1 de la región de Querétaro (cepa no. 8), 2 de un hato perteneciente a la región de Guanajuato 2 (cepas no. 25 y 26) y una de la región de Guanajuato 3 (cepa no. 28).

8.4.4 TIPIFICACIÓN PARCIAL DE *Listeria monocytogenes* POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los productos del PCR obtenidos de la identificación especie específica fueron digeridos con la enzima de restricción *Hind* III, los fragmentos generados permiten una distinción entre dos grupos de serovariedades de *Listeria monocytogenes*: en el grupo 1 (serovariedades 1/2a y 1/2c) producen dos fragmentos, uno de 365 y otro de 88 pb. En el grupo 2 (serovariedades 1/2b, 3b, y 4b), no corta los fragmentos previamente amplificados (Manzano *et al.*, 1998). Para determinar la actividad de la enzima de restricción empleada, se sometieron primero productos del PCR género específico a una digestión con la enzima, para ello se utilizaron las dos cepas control de *Listeria* obteniéndose dos fragmentos uno de 1100 pb y otro de 330 pb, en la Figura 14 se muestran las imágenes de la electroforesis en geles de agarosa (1%). Una vez que se confirmó la actividad de la enzima, se sometió al mismo proceso a los productos de PCR especie específico, en este caso, fueron cortados los fragmentos de las cepas control (450 pb) de las cuales se obtuvieron bandas de 365 pb (figura 15 y 16), a diferencia de estas, las cepas aisladas no registraron ningún corte (Figura no 16B), en la figura no. 16A se muestran sus controles negativos (amplificado sin digerir).

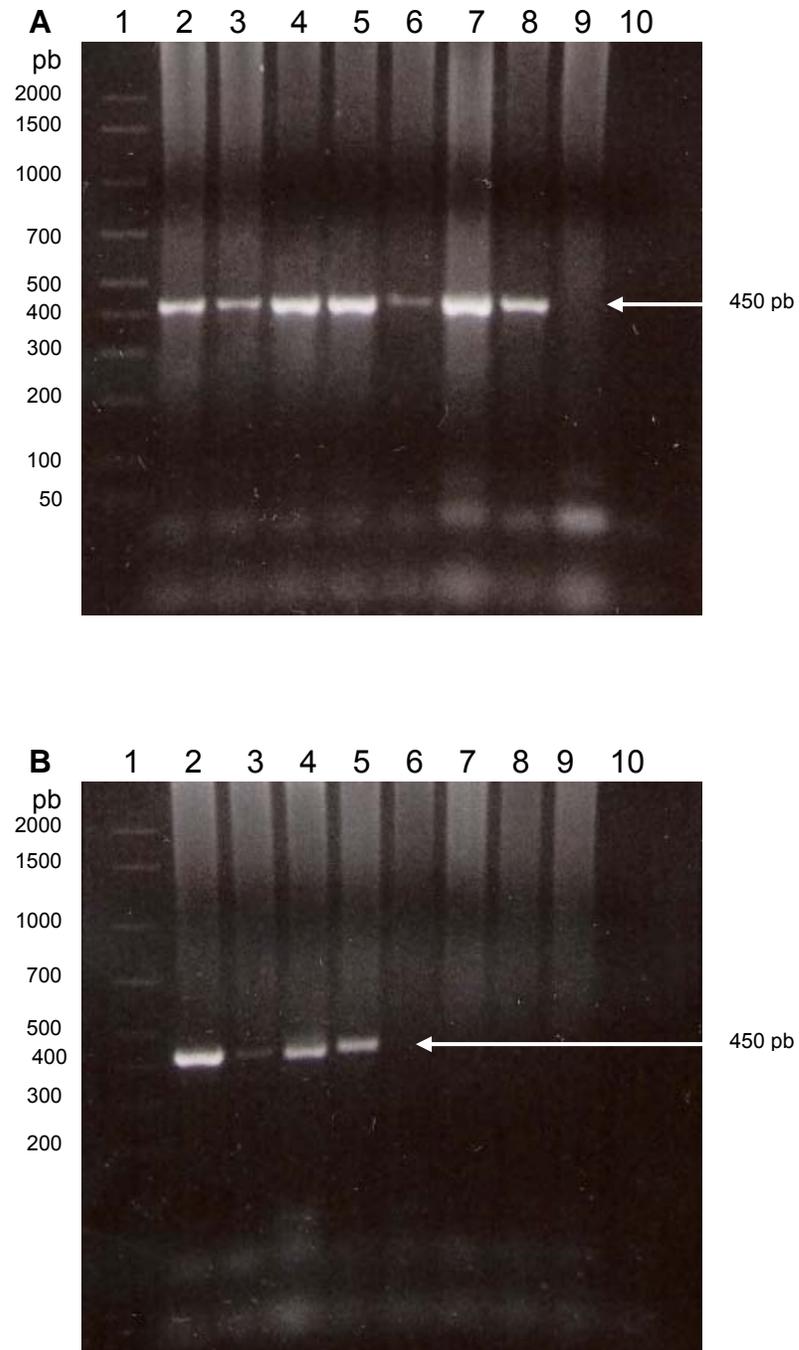


Figura 13. Productos de amplificación de PCR obtenidos empleando los iniciadores especie específicos para la identificación de *Listeria monocytogenes*. A: carril 1-Marcador de tamaño (2000 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-cepa 15, 4-cepa 16, 5-cepa 17, 6-cepa 28, 7-cepa 25, 8-cepa 26, 10-control negativo. B: carril 1 Marcador de tamaño (2000 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3- *L. monocytogenes* ATCC 43249, 4 y 5-cepa 8, 6-cepa 10, 7-cepa 13, 8-cepa 14, 9-cepa 27, 10-control negativo.

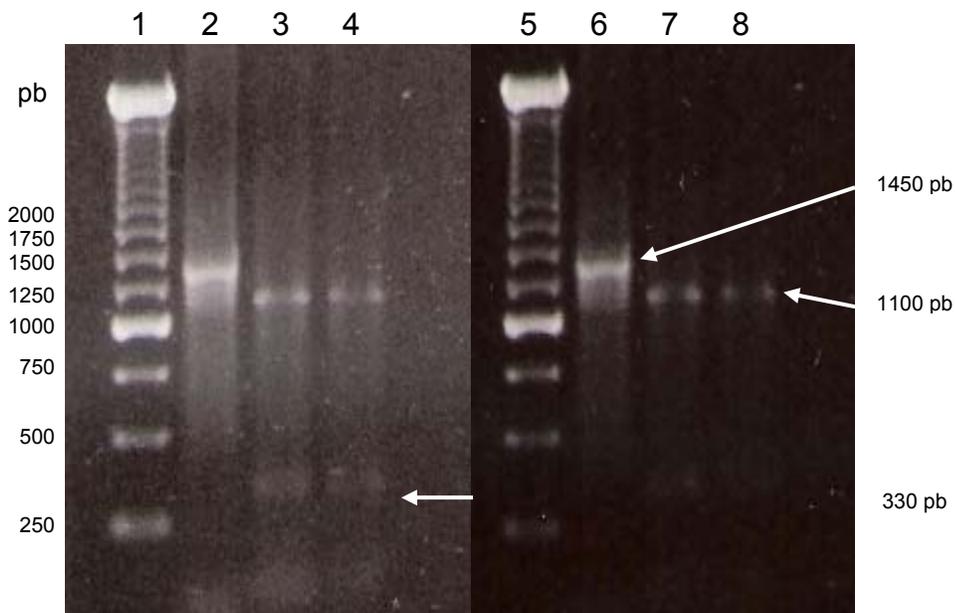


Figura 14. Productos de PCR de las cepas control generados con los iniciadores UNILIS A Y LIS1B y tratados con la enzima de restricción *Hind* III. Carril 1 y 5-Marcador de tamaño (250 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244 sin tratar, 3 y 4-*L. monocytogenes* ATCC 244 tratada, 6-*L. monocytogenes* ATCC 43249 sin tratar, 7 y 8-*L. monocytogenes* ATCC 43249 tratada.

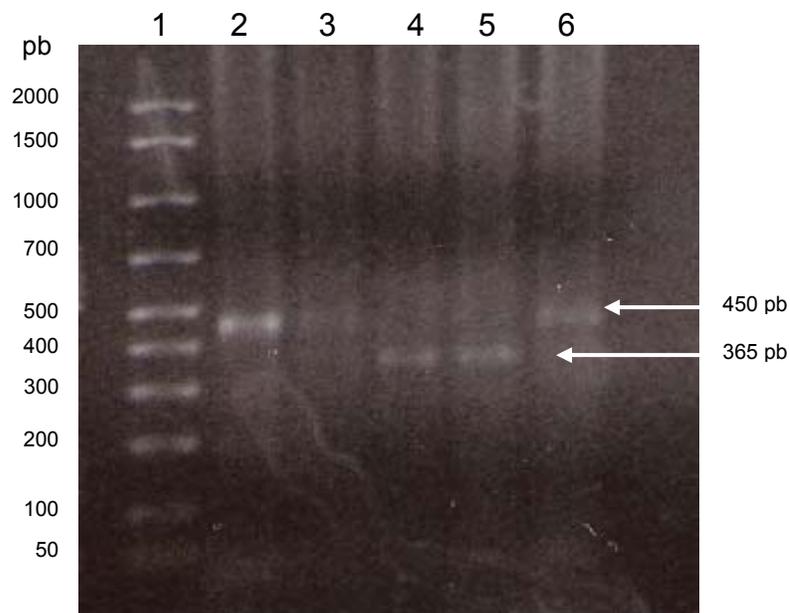


Figura 15. Productos de PCR de las cepas control generados con los iniciadores MAR 1 y MAR 2 y tratados con la enzima de restricción *Hind* III para la tipificación parcial de *L. monocytogenes*. Carril 1-Marcador de tamaño (2000 pb), 4 y 5- *L. monocytogenes* ATCC 244 y *L. monocytogenes* ATCC 43249 tratadas, 2-3 y 6-controles negativos respectivos.

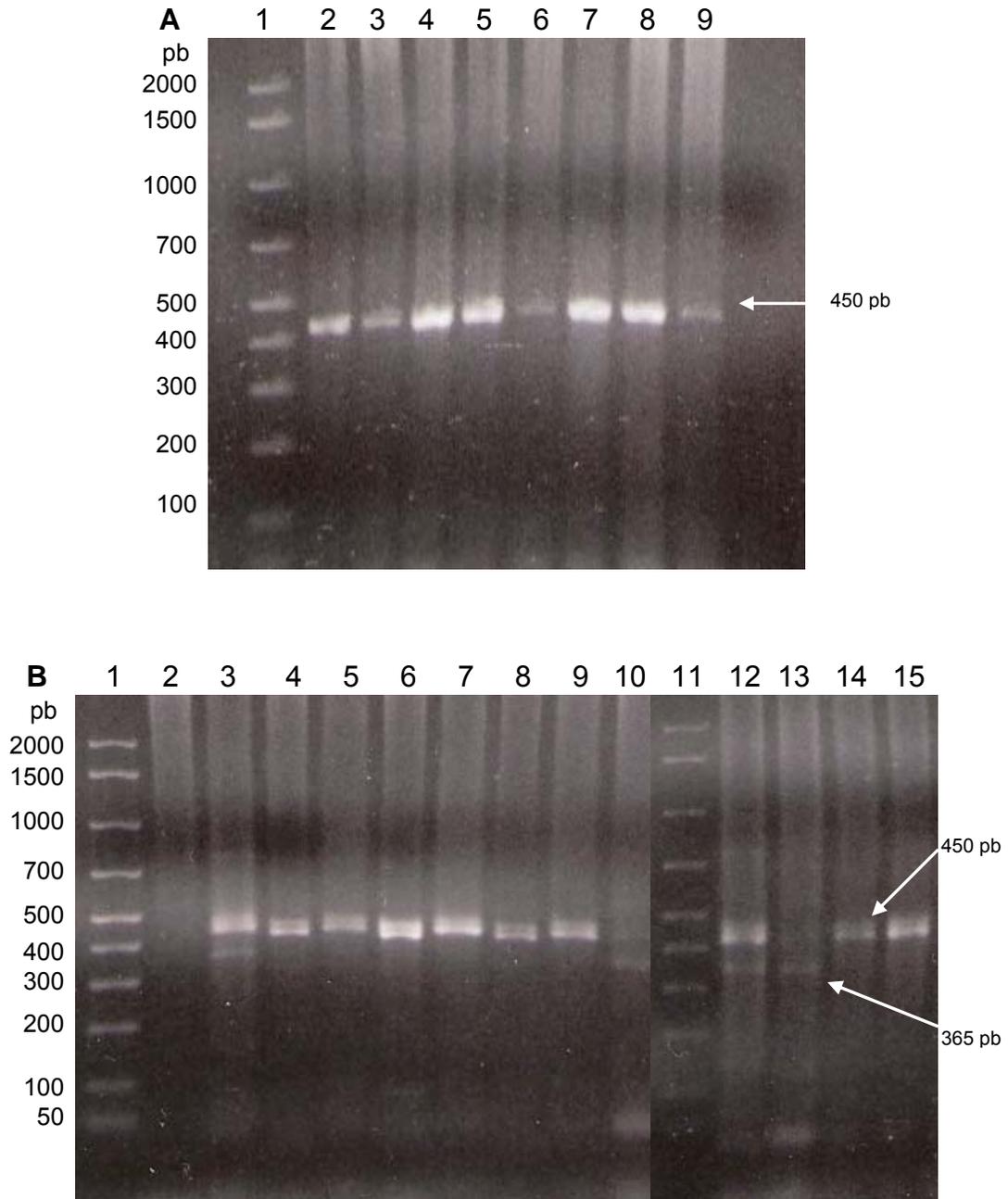


Figura 16. Productos de PCR de las cepas aisladas, generados con los iniciadores MAR1 y MAR2 y tratados con la enzima de restricción *Hind* III para la tipificación parcial de *L. monocytogenes*. A. Fragmentos amplificados no tratados: Carril 1 Marcador de tamaño (2000 pb), carril 2 *L. monocytogenes* ATCC 244, carril 3 al 9 cepas de *L. monocytogenes* aisladas. B. Productos digeridos con la enzima *Hind* III: carril 1 y 11 Marcador de tamaño (2000 pb), 3 y 12- *L. monocytogenes* ATCC 244, 10 y 13-*L. monocytogenes* ATCC 43249, 4-cepa 15, 5-cepa 16, 6-cepa 17, 7-cepa 28, 8-cepa 25, 9-cepa 26, 14 y 15-cepa 8.

8.4.5 PCR ANIDADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

Los productos del PCR género específico de las 7 cepas de *Listeria* confirmadas especie *L. monocytogenes* (gen *iap* de 1450 pb, Figura 17A), fueron sometidos a un segundo PCR en el que se emplearon los iniciadores MAR 1 y MAR 2, específicos para *L. monocytogenes*, esto con la finalidad de aportar mayor especificidad a la prueba. En la figura 17B se muestra los productos de dicha prueba (fragmentos de 450 pb) en gel de agarosa al 2%; de las dos cepas control y de las cepas aisladas se obtuvo amplificación

8.4.6 IDENTIFICACIÓN DE *Listeria ivanovii*

Las 18 cepas aisladas que no fueron confirmadas *L. monocytogenes*, se sometieron a un PCR en el que se emplearon iniciadores específicos para *Listeria ivanovii*, obteniéndose amplificación (banda 1100 pb) con las cepas control (*L. Ivanovii* CDC 1786), sin embargo, con ninguna de las cepas de campo se obtuvo la banda esperada y con algunas de ellas hubo amplificación pero la banda no fue del tamaño esperado (Figura 18).

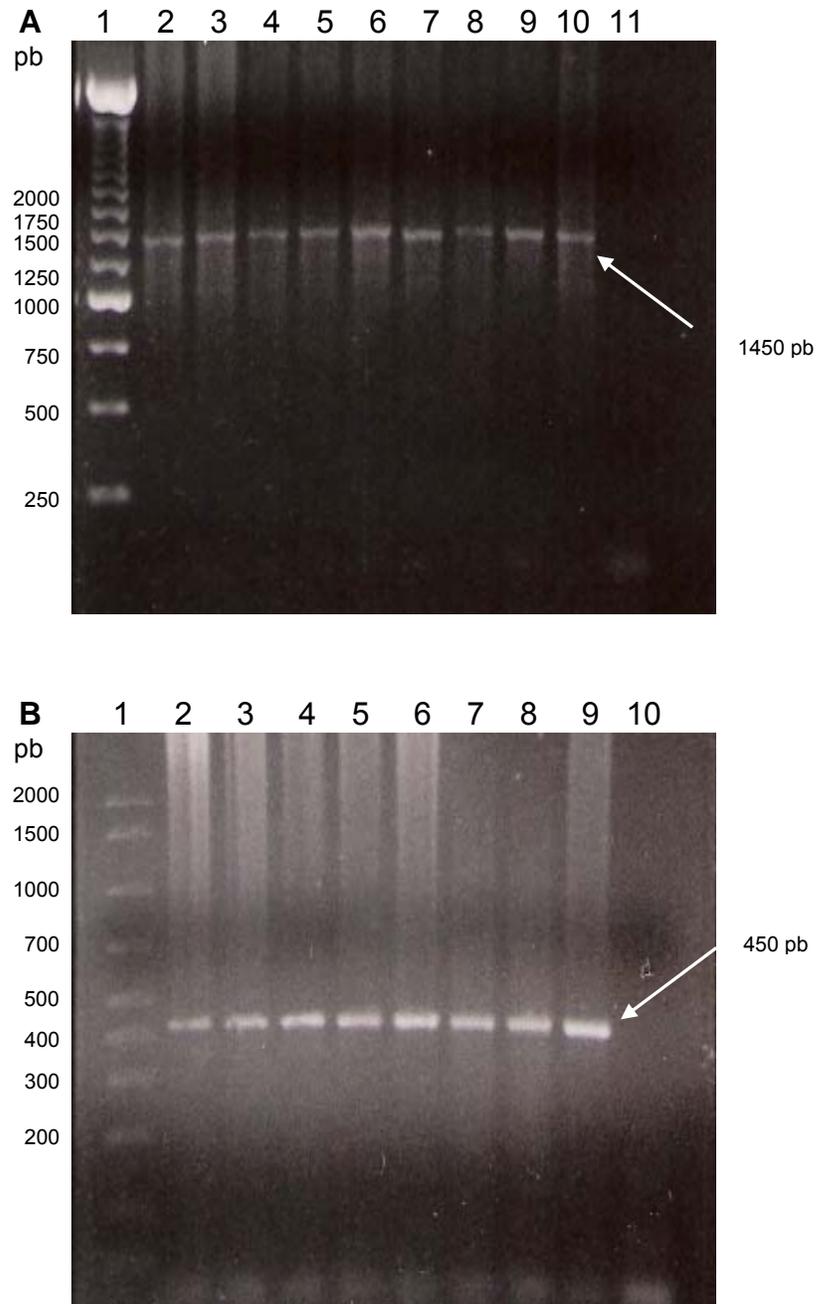


Figura 17. Productos del PCR anidado. A: amplificados del PCR género específico, Carril 1 Marcador de tamaño (250 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3- *L. monocytogenes* ATCC 43249, 4-cepa 15, 5-cepa 16, 6-cepa 17, 7-cepa 28, 8-cepa 25, 9-cepa 26, 10-cepa 8, 11-control negativo. B: Amplificados del PCR especie específico en el cual se empleó como plantilla el producto amplificado del PCR género específico, Carril 1 Marcador de tamaño (2000 pb), 2-*L. monocytogenes* ATCC 244, 3-cepa 15, 4-cepa 16, 5-cepa 17, 6-cepa 28, 7-cepa 25, 8-cepa 26, 9-cepa 8, 10 –control negativo.

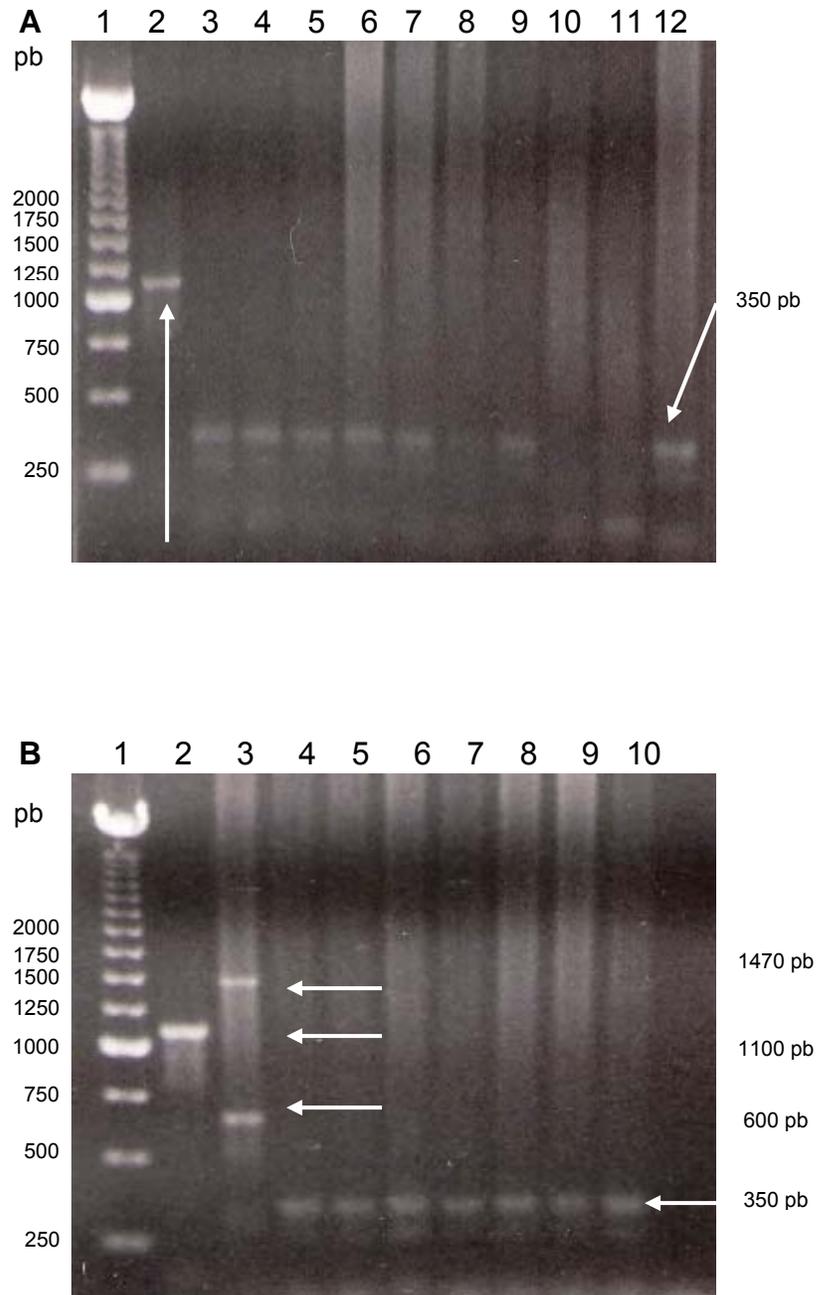


Figura 18. Amplificados de PCR para la identificación de *Listeria ivanovii*. A: Carril 1- Marcador de tamaño (250 pb), 2-cepa control (*L. Ivanovii* CDC 1786), 3-cepa 1, 4-cepa 2, 5-cepa 3, 6-cepa 4, 7-cepa 5, 8-cepa 6, 9-cepa 7, 10-cepa 9, 11-cepa 10, 12-cepa 11. B: Carril 1 Marcador de tamaño (250 pb), 2-control positivo (*L. Ivanovii* CDC 1786), 3-cepa 12, 4-cepa 13, 5-cepa 14, 6-cepa 18, 7-cepa 19, 8-cepa 27, 9-cepa 29, 10-cepa 30.

9. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de este trabajo fue obtener el antígeno (proteína p60) que sirvió para detectar las cabras seropositivas a *Listeria spp.* mediante la prueba de ELISA. Al separar por electroforesis la proteína p60 obtenida de los cinco lotes, se observó en el gel la proteína esperada de 62 kDa y fragmentos poco visibles de aproximadamente 43 kDa. De acuerdo a estudios realizados por Wenscher *et al.*, (1993), estos son detectados en los geles de electroforesis después de un almacenamiento prolongado a -20°C. Además se ha visto que si la proteína es purificada pierde su actividad enzimática y tiende a formar agregados (170 KDa), por lo cual, en este trabajo no fue purificada. En la transferencia realizada se comprobó la especificidad del antígeno (proteína p60) obtenido, únicamente las dos proteínas observadas en el gel de electroforesis fueron reconocidas por el suero control positivo producido en cabra.

Utilizando el antisuero producido en cabra contra la proteína p60 completa como control positivo se puede realizar la detección de *Listeria spp.*, pero no es apropiado para la detección específica de *Listeria monocytogenes*. En diversos trabajos, el análisis Western Blot ha demostrado la reacción cruzada con las proteínas p60 de las demás especies de *Listeria* (Bubert *et al.*, 1994). Lo anterior podría explicar la alta proporción de sueros con Densidad Óptica cercana o igual al punto de corte (3 - 4 DO), que se obtuvieron en la prueba de ELISA en la cual se empleó la proteína p60 completa como antígeno. El 55 % de los animales muestreados presentaron valores de Densidad Óptica altos (3 - 4 DO) y de manera específica, la región que presentó mayor porcentaje de valores altos de DO fue Guanajuato 1 con 78% de las muestras con valores de absorbancia cercanos o iguales al punto de corte (3.6869 ± 0.1522), seguida por Querétaro con 56.2%, Guanajuato 2-3 con 46.43% y finalmente Estado de México con 29.47% de las muestras con valores menores al punto de corte. De igual manera, las regiones con los valores de absorbancia más altos fueron Guanajuato 1 (3.993), sucedida por Querétaro y Guanajuato 2-3 (3.910, 3.913).

Debido a la ubicuidad de este patógeno, se espera que muchos animales presenten anticuerpos contra este microorganismo, por lo que es muy difícil obtener una población negativa a esta bacteria que pudiera ser empleada como control negativo bajo condiciones

de campo. Por ello fue empleado el control positivo para determinar el punto de corte en la prueba de ELISA.

Los resultados del presente trabajo coincidieron con reportes previos en la India, en los que muestran una seropositividad a *Listeria monocytogenes* en cabras de 19.16% (Elezebeth *et al.*, 2007), Banu Rekha, (1997) reporta 21.7% y una seropositividad más alta (41.13%) es reportada en cabras aparentemente sanas (Barbuddhe *et al.*, 2000). Las muestras del banco de sueros que fueron analizadas en este estudio, también mostraron un porcentaje de positividad elevado y superior al de las explotaciones muestreadas (73.17%).

Si bien los resultados que fueron obtenidos en este trabajo en la prueba de ELISA indican que una gran cantidad de los animales muestreados ha tenido contacto con alguna especie de *Listeria*, podrían no indicar el estado inmune del huésped por varias razones. La prueba no es específica para alguna o ambas especies patógenas para los rumiantes como son *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, asimismo, se ha visto que los animales con septicemia desarrollan títulos de anticuerpos altos, mientras que los animales con encefalitis tienen títulos bajos (Miettinen *et al.*, 1990). En cabras infectadas experimentalmente, se ha reportado un incremento en anticuerpos anti-LLO el cual ha sido correlacionado con una rápida eliminación de *L. monocytogenes* del tracto gastrointestinal lo cual predice un curso favorable de la infección clínica (Miettinen *et al.*, 1991). En estudios seroepidemiológicos en vacas lecheras, se ha visto que la prueba de ELISA sirve para la confirmación de mastitis y abortos relacionados con *Listeria*, pero parece no ser indicada para su uso en el diagnóstico de encefalitis relacionada con *Listeria*. (Boerlin *et al.*, 2003).

En varios estudios se ha visto que el plasma humano contiene anticuerpos contra la proteína p60 de *Listeria monocytogenes*, los cuales incrementan la eficiencia en el atrapado de la bacteria por las células dendríticas (Kolb-Maurer *et al.*, 2001). Por lo anterior, se piensa que dicha proteína tal vez juegue un papel importante en la adhesión de *L. monocytogenes* por las células dendríticas humanas vía opsonización de la bacteria. Este proceso podría tener un impacto importante en la prevención de la infección por este patógeno en humanos y animales. En algunos casos, los anticuerpos específicos de p60 que se han encontrado en el plasma de humanos posiblemente sean derivados de *L. innocua* u otras especies Listerianas ambientales no patógenas a las cuales los humanos son expuestos

permanentemente y no necesariamente de la exposición la especie patógena. Este cruce de reacción de los anticuerpos anti-p60 podría sin embargo opsonizar *L. monocytogenes* e incrementar la adhesión de este patógeno por las células dendríticas humanas, proporcionando una barrera contra la diseminación del microorganismo en el sistema vía torrente sanguíneo, y así disminuir la frecuencia de las infecciones causadas por este patógeno intracelular. Se ha reportado que los anticuerpos presentes en suero de humanos inhiben la invasión de *L. monocytogenes* a las células endoteliales del cerebro y a las células epiteliales Caco 2 (Hertzig *et al.*, 2003). En base a varios experimentos se ha encontrado que el efecto inhibitorio es debido a anticuerpos anti-*Listeria* presentes en el suero humano y que el contacto con *L. innocua*, posiblemente contribuya al mantenimiento de células T CD4 y CD8 de memoria específicas para *L. monocytogenes* a través de la proteína p60 (Geginat *et al.*, 1999). Los anticuerpos presentes en el suero humano reconocen proteínas de *Listeria* derivadas de la célula lisada así como de las proteínas del sobrenadante de esta bacteria y lo mismo podría suceder con el suero de los animales.

El problema de la presencia de *L. monocytogenes* en las granjas no solo representa un riesgo de diseminación hacia la plantas procesadoras de alimentos, también existe el peligro para las personas que trabajan en granjas y en los rastros. Es sabido que estos trabajadores están frecuentemente expuestos a los microorganismos patógenos que portan los animales y el medio ambiente. En estudios se han encontrado anticuerpos anti-LLO en 15.5% de los trabajadores asociados con rastro y 32.7% de los trabajadores de granja (Barbuddhe *et al.*, 1999) y aunque un mayor porcentaje de las personas que trabajan en las granjas son seropositivas, las personas asociadas con el rastro muestran títulos de anticuerpos más altos.

Otro de los objetivos de este trabajo fue el aislar cepas de *Listeria monocytogenes* de muestras de leche, alimento y materia fecal de cabra, estas fueron obtenidas de 5 explotaciones caprinas con animales seropositivos a *Listeria spp.* Este género consta de seis especies de las cuales solo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenas. Generalmente los microorganismos del mismo género no son afectados igualmente por los inhibidores usados en los medios de enriquecimiento selectivo. En procedimientos donde todas las especies de un género son consideradas patogénicas, esto no es un problema ya que solo podría ser obtenida información falsa epidemiológicamente. Sin embargo, en la

detección de *L. monocytogenes*, otras especies del género crecen más rápido, como es el caso de *L. innocua*, lo cual podría enmascarar la presencia de este patógeno y ser subestimada su incidencia. Por lo anterior, la selección de los medios de aislamiento es muy importante cuando se realiza un estudio de este microorganismo.

Dos de los métodos de referencia más ampliamente usados para la detección de *Listeria* en todos los alimentos son el método bacteriológico y analítico de la FDA (BAM) y el método (ISO) 11290 (Gasnov *et al.*, 2005), ambos métodos requieren enriquecimiento de 25 g de muestra de alimento en un caldo selectivo diseñado para disminuir el crecimiento de la flora competitiva antes de sembrarlo en agar selectivo y la identificación de las colonias sospechosas. Aunque los agentes selectivos son necesarios para inhibir los organismos competitivos durante el enriquecimiento, ha habido muchos reportes de sus efectos dañinos en células de *Listeria* lesionadas o estresadas. En el método (ISO) 11290 el cual fue empleado en este trabajo, el enriquecimiento primario contiene solo la mitad de la concentración de agentes selectivos, lo cual aunado a la capacidad amortiguadora de ambos medios de enriquecimiento favorecieron la reparación y el crecimiento de las células bacterianas, reflejándose en el número de aislamientos obtenidos.

En el aislamiento de *Listeria*, es recomendado el uso de diferentes medios de cultivo, por lo menos 2 (Leclercq, 2004), porque se ha visto que aumenta el porcentaje de aislamiento. Por esta razón, fueron empleados los agares LPM y Oxford modificado, este último contiene menos inhibidores que el agar Oxford (no contiene acriflavina, cefotetan, cicloeximida y fosfomicina,); ha sido reportado que la acriflavina afecta el crecimiento de *Listeria monocytogenes* más que el de otras especies como *L. innocua* (Beumer and Hazeleger, 2003). En general, los medios que fueron empleados, contienen menor cantidad de inhibidores comparados con otros medios disponibles en el mercado; lo anterior posiblemente contribuyó al aislamiento. Ambos agares han sido incorporados en los principales métodos de aislamiento de *Listeria* como son el USDA-FSIS para el aislamiento en carne y aves, y el FDA para alimentos lácteos y vegetales. El tiempo de incubación de las muestras en los medios selectivos también es importante, en este caso, las muestras de leche requirieron más tiempo de incubación para el aislamiento, por el contrario, las muestras de ensilado y sobre todo las de materia fecal requirieron la mitad de tiempo de incubación en cualquiera de los medios, para el aislamiento, ya que los demás microorganismos presentes

crecían mucho más rápido y las colonias eran más grandes que las formadas por *Listeria*, y con tiempos de incubación largos (48 horas), la flora contaminante no permitía el aislamiento de *Listeria*. Una opción que a veces es utilizada para evitar que los demás microorganismos impidan o dificulten el aislamiento de esta bacteria (Kalorey *et al.*, 2006), es reducir la cantidad de muestra analizada de 25 a 5 g, sobre todo cuando se tratan muestras de materia fecal. En algunos casos, se logró distinguir las colonias de *Listeria* después del almacenamiento a 4°C de las placas de agar (en las que se realizó el aislamiento); a esta temperatura se detiene o en algunos casos se disminuye el crecimiento de los demás microorganismos, sin embargo *Listeria* continúa su crecimiento, aunque no sea su temperatura óptima de crecimiento.

Mientras que la Listeriosis animal ha sido reportada para un amplio rango de especies, la mayoría de las infecciones en animales han sido reportadas en rumiantes de granja (Seeliger, 1961; Weis and Seeliger, 1975; Yoshida *et al.*, 2000). *Listeria monocytogenes* ya ha sido aislada de los animales y el ambiente de granjas de caprinos, la información acerca de la incidencia de esta bacteria en leche de cabra es escasa, pero existen algunos reportes en los que 0.8% a 6% de las muestras de leche de cabras analizadas han sido positivas al aislamiento (Greenwood *et al.*, 1991; Gaya *et al.*, 1996; Barbuddhe *et al.*, 2000). En la presente investigación, 4 de las 25 cepas de *Listeria* aisladas fueron obtenidas de leche proveniente de la misma explotación, en la cual no fueron lavadas las ubres de los animales antes del ordeño, con lo que se confirmó la necesidad de las buenas prácticas de ordeño para evitar la contaminación de la leche en este paso de su obtención. Ha sido reportado que un mala higiene de la granja o la sala de ordeño son factores de riesgo importantes para la contaminación de leche cruda con *L. monocytogenes* (Sanaa *et al.*, 1993), Los tratamientos pre-ordeño reducen la carga de patógenos ambientales en las ubres, el procedimiento de sanitización reduce la contaminación microbiana antes de la adhesión a las unidades de ordeño y disminuye la incidencia de infecciones en la ubre causadas por diversos patógenos principalmente ambientales. Se ha visto que las granjas con sistema de ordeño mecanizado tienen menor carga de *Listeria* y que hay una asociación significativa entre la desinfección de la ubre y la examinación de la apariencia normal de la leche antes del ordeño contra la ocurrencia de *L. monocytogenes* (Latiffah Asan *et al.*, 2001), por lo que, la mejora en la higiene en el ambiente animal podría representar un factor importante en el control de la contaminación de la leche con este patógeno durante el ordeño. Una vez contaminada, la

leche representa un vehículo para la introducción de esta bacteria a la planta donde se elaboran productos lácteos y una posible fuente de listeriosis en humanos si la consumen sin pasteurizar. Los conocimientos de la relación entre el manejo del rebaño lechero, las prácticas de ordeño, y la ocurrencia de *L. monocytogenes* en granjas lecheras sirven para el desarrollo de estrategias dirigidas a la eliminación de este microorganismo a nivel preprocesado de alimentos lácteos.

La leche y los productos lácteos han sido involucrados en diversos brotes de listeriosis. La información de la presencia de *Listeria monocytogenes* en México es escasa y la frecuencia de listeriosis es desconocida, sin embargo en los estudios que se han realizado, se ha aislado *Listeria monocytogenes*. Vázquez *et al.*, (2001), han aislado *Listeria spp.* en 23% de las muestras de leche obtenidas de tanques de diferentes granjas lecheras del sudeste de la ciudad de México durante un año, de las cuales, 13% son identificadas como *L. monocytogenes*. También ha sido recuperada de muestras de queso vendidas al detalle (Díaz-Cinco *et al.*, 2006).

Estudios a nivel de granja han confirmado que la alimentación representa un factor de riesgo significativo para una serología y aislamiento positivos a *Listeria*, el ensilado inapropiadamente fermentado (pH >5) ha sido identificado como la fuente principal de infecciones con este microorganismo en rumiantes (Boerlin *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2007). En algunos estudios se han aislado cepas de *L. monocytogenes* representadas por el mismo ribotipo de muestras clínicas y de ensilado; asimismo, cepas con ribotipos diferentes han sido aisladas de muestras de ensilado, indicando la diversidad de la población de cepas de este patógeno en los ambientes de la granja, de las cuales algunas podrían causar enfermedades (Wiedmann *et al.*, 1996). En el presente estudio, no fue aislada *Listeria* de ninguna muestra de ensilado, pero cinco cepas de *Listeria* fueron aisladas de alimento alfalfa, las cuales pertenecen a la misma explotación en el Estado de México, indicando que no solo el ensilado es un factor de riesgo para la listeriosis en cabras, cualquier alimento suministrado representa un factor de riesgo y por lo mismo debe ser cuidado para evitar la listeriosis en cabras. En México frecuentemente las tierras donde se cultivan los forrajes son regadas con aguas negras sin tratar, estas contienen diversos patógenos entre ellos *Listeria monocytogenes*, representando un riesgo de contaminación para los animales que los consumen. También ha sido aislada del agua de lagunas en el estado de Veracruz (8.3%) y

en la laguna de Zapotlán del estado de Jalisco, de las muestras obtenidas de tres canales con aguas residuales que provienen de dos municipios aledaños al lugar, se ha encontrado *Listeria spp.* y *L. monocytogenes*, en 70% y 66.6% de las muestras estudiadas respectivamente (Sepúlveda *et al.*, 2002; Rodas-Suárez *et al.*, 2006). Lo anterior indica que este género bacteriano está ampliamente distribuido en distintas regiones del país. El papel del alimento de los animales en la producción de alimentos seguros para los humanos ha sido reconocido y el Codex alimentarius actualmente está considerando la necesidad de desarrollar guías en el manejo de riesgos respecto a este tema, para proveer bases científicas, con este motivo, la FAO y WHO, han programado una reunión con expertos en este tema, para revisar los conocimientos actuales en alimentación de animales y su impacto en la seguridad de los alimentos en Octubre del presente año (WHO, 2007).

En cuanto a la materia fecal, fueron aisladas 16 cepas, 14 de ellas provenientes de una explotación de Querétaro y 2 de un hato en el estado de Guanajuato. En ninguna las granjas se aisló *Listeria* de por lo menos dos tipos de muestra (leche y alimento, leche y materia fecal, o alimento y materia fecal). En el caso del ganado el índice de portadores asintomático reportados de *Listeria spp.* está en el rango de 3.1- 45.8% (Kalorey *et al.*, 2006). La excreción de *L. monocytogenes* en la materia fecal ha sido reportada en diversos trabajos. Ho *et al.*, (2007), han aislado este patógeno en 31% de las muestras de materia fecal con 20 ribotipos detectados, varias de las cepas aisladas de materia fecal, también han sido aisladas de ensilado. La prevalencia e incidencia de la excreción de dicha bacteria en heces es muy variable con respecto al tiempo; esta puede ocurrir como parte de un brote o como un evento esporádico aislado, por lo que se han sugerido periodos continuos largos de excreción o periodos intermitentes como parte de brotes pequeños separados. Los subtipos de *L. monocytogenes* asociados con infecciones en humanos son comúnmente aislados de las heces y el ensilado de los animales de granja, y parecen estar presentes también en el ambiente de la granja (Wiedman *et al.*, 1996; Rivera Betancourt *et al.*, 2004).

La duración de la excreción, si está infectado el animal o si es solo su paso a través de este, aún no está bien entendido y es difícil definir si su presencia en las heces representa un simple paso a través de la adquisición por vía oral o es una infección real; para diferenciar la infección del paso a través del animal, generalmente se realiza mediante estudios serológicos en paralelo con estudios microbiológicos de excreción en materia fecal (Kalorey

et al., 2006; Ivanek *et al.*, 2007). Cuando el ensilado está contaminado con *L. monocytogenes*, generalmente la distribución de la bacteria es irregular, por ello los animales alimentados con ensilado pueden ingerir una dosis única o dosis repetidas en un periodo de tiempo determinado. Al respecto, ha sido sugerido que las dosis bajas durante un tiempo prolongado incrementan la probabilidad de la infección listeriana (Maijala *et al.*, 2001; Roberts and Wiedmann, 2003) por que ayudan a perpetuar el ciclo infectivo del microorganismo, pero no inducen la infección, ya que sólo con dosis altas (10^{10} ufc/ml), los animales desarrollan seroconversión detectable (Zundel *et al.*, 2006).

Aunque el tema de estudio fue determinar la presencia de *L. monocytogenes* en leche de cabra, se muestreó el alimento que consumen y su materia fecal porque como se ha mencionado, este microorganismo es frecuentemente excretado en las heces de los humanos y de los animales, y por las características ya mencionadas de dicha bacteria, su excreción en la materia fecal es un mecanismo importante de diseminación, por ello, el entendimiento de la dinámica de dicho microorganismo excretado en las heces es importante para poder controlar y prevenir la diseminación de la listeriosis y por los resultados que fueron obtenidos en el presente trabajo podemos observar que la presencia de dicho patógeno en la leche de cabra, podría deberse en mayor medida a la contaminación que a la excreción en la leche. Asimismo, los animales que excretan la bacteria en las heces posiblemente contaminen la piel de otros animales en la granja y durante el transporte, los intestinos y la piel contaminada podrían producir contaminación cruzada en los equipos y carcasas en el rastro, permitiendo la contaminación de carne. La carne y la leche contaminada, pueden servir como una fuente del patógeno en plantas procesadoras u otros ambientes asociados con los alimentos por ejemplo la venta al menudeo. También puede ser transmitida a frutas y vegetales por diseminación con estiércol contaminado en el campo agrícola (Fenlon *et al.*, 1996), la seguridad de los alimentos no sólo implica los productos que se adquieren y consumen, sino también los subproductos que se generan, que pueden re-entrar en diversos productos de consumo por ejemplo en el abonado de campos de cultivo. El empleo de abono orgánico sin tratamiento alguno puede dar lugar a una transmisión de microorganismos patógenos desde las heces de animales portadores, no enfermos, hacia los consumidores de alimentos biológicos, de forma especial en la agricultura ecológica. De esta manera, se podría entonces introducir este microorganismo en plantas procesadoras de frutas y vegetales o causar infección en humanos si estos alimentos

son consumidos sin desinfectar o sin procesar (Schlech *et al.*, 2005). Además representa un riesgo para la contaminación de ambientes agrícolas y alimento para animales por ejemplo a través de la fertilización de los campos usados para el cultivo de plantas empleadas en la preparación del ensilado, y así contribuir al mantenimiento del ciclo infectivo en los rumiantes de granja. Para poder controlar la contaminación por *L. monocytogenes* en el ambiente agrícola y en el alimento de los animales, así como la contaminación de alimentos a nivel prerrecolección de alimentos, es crucial entender la epidemiología de la excreción de *L. monocytogenes* en las heces y en la leche ya que las granjas de rumiantes han sido sugeridas como un reservorio importante de *L. monocytogenes* (Arimi *et al.*, 1997; Nightingale *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2007).

La mayoría de los casos de listeriosis humana suceden en individuos inmunocomprometidos, pero en el caso de los animales solo ha sido reportado que situaciones de estrés tales como mal tiempo, transporte o enfermedades concurrentes posiblemente predispone a los animales a la infección por *Listeria* (Fenlon *et al.*, 1996; Wesley, 1999).

La seropositividad obtenida en el presente trabajo y los aislamientos del patógeno no coincidieron del todo. Aunque en el hato del Estado de México ninguno de los animales muestreados fue seropositivo, por las lecturas de DO obtenidas se puede decir que las cabras han tenido contacto con *Listeria*, ya que muestran valores de absorbancia menores pero cercanos al valor del punto de corte. Esto fue confirmado con el aislamiento de la bacteria de la muestra de alfalfa perteneciente a ese hato, no obstante, se recomendaría un análisis periódico para confirmar su negatividad o posible incremento en la contaminación de los animales. En el caso de Querétaro y Guanajuato 2-3, los resultados de la seropositividad coincidieron con los aislamientos. Sin embargo en el caso de la zona de Guanajuato 1, a pesar de la alta seropositividad y de que en esa explotación se obtuvieron las lecturas de DO más altas, no se logró el aislamiento del microorganismo. En estudios con *Listeria* frecuentemente se presenta esta diferencia entre los resultados de seropositividad y aislamiento. Esto tal vez se deba a exposiciones previas del animal al microorganismo, a la movilidad de los animales, o a diferentes momentos de la infección, pero aún no se ha demostrado por qué sucede. Barbuddhe *et al.*, (2000) han encontrado que 50% de las cabras

en las que se obtiene aislamiento son seronegativas, en contraste, 37.14% de las que no se obtiene el aislamiento, son seropositivas.

La proteína p60 ha sido descrita como el principal producto extracelular excretado por esta bacteria (Bourry and Poutrel, 1996). Mientras que el gen *hly* (LLO) es relativamente bien conservado en todas las cepas de *L. monocytogenes*, el gen *iap* (p60) no lo es, aunque este contiene porciones conservadas en ambos extremos de la secuencia, su región central es altamente variable y contiene polimorfismo incluso entre cepas de la misma serovariedad (Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004). Empleando el gen *iap* se puede realizar la identificación de todas las especies del género *Listeria*, además sirve para estudios epidemiológicos por las regiones donde presenta polimorfismo. Debido a esto, se han realizado diversos trabajos empleando dicha proteína o el gen que la codifica para la detección, identificación y/o tipificación de especies de *Listeria* mediante PCR (Bubert *et al.*, 1997b) o PCR tiempo real (Hein *et al.*, 2001; Rodríguez-Lázaro 2004), ya sea para su identificación directa en alimentos (Cocolin *et al.*, 2002), o caracterización genética (Cabrita *et al.*, 2004). Asimismo, la proteína se ha empleado como antígeno en pruebas inmunológicas (Gentshev *et al.*, 1992; Bubert *et al.*, 1994; Wieckowska-Szakiel *et al.*, 2002). En el presente trabajo, fue empleada dicha proteína para la prueba de ELISA, y el gen y parte de este para la identificación y tipificación parcial de las cepas de *Listeria* aisladas de leche, alimento y materia fecal de cabras.

Se ha visto que la proteína p60 muestra secuencia similar con una autolisina de *Streptococcus faecalis* y con una proteína de superficie de *Enterococcus faecium*. Esta secuencia es restringida a la parte C-terminal de ambas proteínas y dicha región es altamente conservada en todas las proteínas p60 de *Listeria spp.* (Wenscher *et al.*, 1993). Los iniciadores Lis1A y Lis1B, amplifican el gen *iap*, de todas las especies de *Listeria* y también dan amplificadas con *Enterococcus faecalis* y *Bacillus cereus*, sin embargo los tamaños de los amplificadas con estos últimos, son más pequeños y no tienen una homología apreciable (mediante secuenciación de dicha región), con el gen *iap* o la proteína p60 de *L. monocytogenes* o de otras especies de *Listeria* a nivel de secuencia de nucleótidos o de secuencia de aminoácidos (Bubert *et al.*, 1992a). Para evitar el cruce con dichas especies, fueron empleados los iniciadores Unilis A y Lis1B, pues ha sido reportado que dichos iniciadores dan productos de PCR de todas las especies de *Listeria*, pero no cruzan con *B. cereus*, *M. flavus* o *E. faecalis* (Bubert *et al.*, 1992a; Bubert *et al.*, 1999). De las 25

cepas que fueron identificadas como *Listeria spp.* por el método BBL Crystal fue confirmada su identificación mediante PCR, empleando estos iniciadores y los fragmentos del gen amplificado fueron los esperados de 1450 pb, estudios previos muestran que estos fragmentos pueden variar de 1450 a 1600 pb de una especie a otra, si fueran analizados los amplificados obtenidos en el estudio, empleando geles con mayor porcentaje de agarosa y con marcadores con una escala menor, posiblemente detectaríamos estas variaciones en el caso de que las hubiese. Asimismo, nuestros resultados mostraron que la prueba de PCR es específica para *Listeria spp.* ya que no cruzaron con ninguna de las bacterias evaluadas (*Histophyllus somni*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli* y *Actinobacillus seminis*), las cuales son encontradas frecuentemente en los rumiantes y su ambiente.

A diferencia de las regiones conservadas en los extremos del gen *iap*, la parte interna es especie específica. Estudios previos han mostrado como puede ser identificada *L. monocytogenes* usando los iniciadores MAR1 Y MAR2 y como plantilla un fragmento en la parte central de dicho gen, asimismo, presentan especificidad alta para este patógeno, por lo que no son detectadas las demás especies del género (Manzano *et al.*, 1997). En el presente estudio, de las 25 cepas aisladas pertenecientes al género *Listeria*, 7 fueron identificadas como *Listeria monocytogenes* empleando estos iniciadores, una de ellas fue aislada de leche (Guanajuato 3), tres de materia fecal (Guanajuato-2 y Querétaro), y 3 de alfalfa (Edo. de México). Una de las características de *Listeria monocytogenes* es que generalmente se encuentra con una o más especies del género, por los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que esto no siempre se cumple. Aunque en Querétaro fueron aisladas la mayor cantidad de cepas de *Listeria*, solo una de ellas fue identificada como *L. monocytogenes*; en el Estado de México y en Guanajuato-3, 1 y 3 de las cepas aisladas respectivamente son *L. monocytogenes*; pero en el caso de Guanajuato-2, las dos únicas cepas aisladas pertenecen a la especie patógena.

La infección causada por *L. ivanovii* es la de mayor importancia en veterinaria en ganado bovino, ovino y caprino, porque esta especie es la que con mayor frecuencia causa listeriosis en los rumiantes (Low and Donachie, 1997). Debido a esto, las cepas que no fueron identificadas como *L. monocytogenes* fueron sometidas a un segundo análisis por

PCR para la identificación de esta segunda especie patógena *Listeria ivanovii*, no obstante, se encontró que ninguna de las cepas aisladas pertenece a dicha especie patógena.

Como ya se mencionó, todas las cepas identificadas como *Listeria spp.* por el método Crystal, fueron confirmadas mediante PCR. Sin embargo, únicamente tres de las seis cepas identificadas como *L. monocytogenes* por el método Crystal, fueron confirmadas por PCR; asimismo, de las 19 cepas identificadas como *L. ivanovii* por el método Crystal, ninguna fue confirmada por PCR, además, 4 de ellas fueron identificadas como *L. monocytogenes* mediante PCR. Al respecto los fabricantes admiten que pueden existir variaciones en las cepas de la misma especie; si el perfil de la prueba da un resultado “sin identificación” y se ha confirmado la pureza del cultivo, entonces es probable que el aislado para la prueba produzca reacciones atípicas, o que dichas reacciones se deban a un error en el procedimiento, la especie de la prueba no forma parte de los grupos taxonómicos previstos o el sistema no es capaz de identificar el aislado con el nivel de confianza requerido. Además una de las limitantes de la prueba es que no identifica todas las especies del género, solo puede identificar *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. murrayi*, lo cual podría contribuir a dichos errores de identificación. Asimismo, este sistema utiliza micromedios modificados, por lo tanto los resultados esperados de pruebas individuales pueden ser distintos de los datos previamente establecidos en reacciones de pruebas convencionales, la precisión de este sistema se basa en la interpretación estadística de pruebas específicamente diseñadas y una base de datos exclusiva. Por lo anterior, los fabricantes sugieren tomar en cuenta el origen de la cepa, su tolerancia a la presencia de oxígeno, morfología celular, características de las colonias en varios medios al igual que los productos metabólicos determinados mediante cromatografía de gases, para la identificación final del aislado. Sin embargo en este trabajo, la confirmación se realizó mediante PCR.

Aunque un amplio número de serovariedades de *Listeria monocytogenes* pueden ser aislados de alimentos, algunas (1/2a 1/2b y 4b), son encontradas con mayor frecuencia en los casos clínico. La distinción entre las serovariedades de esta especie es necesaria para el mejor entendimiento de la patogenicidad de la especie y la epidemiología de la listeriosis. En el presente trabajo, los productos del PCR para la identificación de *L. monocytogenes* fueron tratados con la enzima de restricción *Hind* III, para la tipificación parcial de las cepas, obteniéndose que las siete cepas de *L. monocytogenes* pertenecen a las serovariedades

1/2b, 3b o 4b. Ha sido reportado que en Norteamérica y en Europa la serovariedad que predomina en la leche cruda es la 1/2a (Ryser and Marth 1999), sin embargo en un estudio realizado en México con aislados de leche de vaca, se ha encontrado que 45.6% de los aislados pertenecen a la serovariedad 4b y 54.4% a la serovariedad 1/2 (Vázquez *et al.*, 2001). Mediante el análisis de genes de virulencia, ribotipado y caracterización de virulencia comparativa, se ha subdividido a *L. monocytogenes* en tres linajes, el Linaje 1 consiste en cepas (tipos de antígeno flagelar b y d) que causan enfermedades en humanos con mayor frecuencia que los aislados clasificados en el Linaje 2 (tipo antihigiénico a o c) y el linaje 3 (serovariedades raramente detectadas, 4a y 4c) (Cabrita *et al.*, 2004).

A pesar de la abundancia de *L. monocytogenes* en el ambiente, la incidencia de listeriosis humana es muy baja. La dosis mínima requerida para causar infección clínica en humanos no ha sido bien determinada pero la cantidad de esta bacteria detectada en alimentos responsables de casos epidémicos o esporádicos de listeriosis generalmente sugiere que es alta (10^6), esto podría ser el resultado de la respuesta inmune eficiente de las personas sanas, aunque también podría indicar la diferencia de dichas cepas en cuanto a su patogenicidad. De todas las serovariedades conocidas de *L. monocytogenes*, solo tres (1/2a, 1/2b y 4b) causan más del 90% de infecciones humanas y de animales. Además, a pesar de que las cepas de grupo antigénico 1/2 predominan en aislados de alimentos, las cepas de la serovariedad 4b son las que predominan en los casos de listeriosis en humanos, pero recientemente, cepas de la serovariedad 1/2 se están incrementando entre los aislados humanos. Diversos reportes han descrito cepas de *L. monocytogenes* con patogenicidad escasa o nula, pero poco es conocido acerca de que determina la baja o nula virulencia. Los actuales esquemas de vigilancia asumen que todos los aislados de *L. monocytogenes* son igualmente patogénicos, pero los resultados de diversos estudios, sugiere que la virulencia varía de una cepa a otra. Actualmente existen algunas explicaciones para la baja virulencia de ciertas cepas, algunas de ellas no producen cierta proteína (hemolisina, fosfolipasa) o tienen mutaciones en algún gen (*Inl*, *PrfA*, *plcA* o *plcB*) (Roche *et al.*, 2005). La presencia de 270 y 149 genes específicos de cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua* respectivamente sugiere que la virulencia en *Listeria* es el resultado de múltiples eventos de adquisición y delección de genes. Además, ninguna función ha podido ser predicha para 35.3% de los genes de *L. monocytogenes* y 37% de genes de *L. innocua* (Glaser *et al.*, 2001). Asimismo, ha sido reportado que los tipos responsables de algunos brotes de listeriosis en humanos

han sido similares a pesar de provenir de países diferentes y de alimentos diferentes como vehículo (McLauchlin, 1997), y se ha sugerido que la distribución de los tipos podría reflejar la adaptación de estas bacterias a diversos nichos ecológicos. En el presente estudio no fue determinada la patogenicidad de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas, por las serovariedades que presentan (1/2b 3b o 4b), podrían ser patógenas, sin embargo, es importante conocer con exactitud si muestran algún grado de patogenicidad. En los informes de estudios realizados en México no mencionan dicha evaluación. Únicamente, Vázquez *et al.*, (2001), ha reportado que de las cepas aisladas de leche de vaca, los serotipos 4b no han sido patógenos para ratón, en contraste, las cepas del serotipo 1/2 si (DL₅₀ fue de 10⁶-10⁷ cfu/ml).

Desde un punto de vista agrícola, el problema de listeriosis está realmente relacionado con la seguridad alimentaria y salud pública más que con las pérdidas por enfermedades en animales de importancia agrícola. La ubicuidad y naturaleza saprofita de *Listeria* hace imposible que pueda ser eliminada del ambiente agrícola, sin embargo las medidas de control basadas en el reconocimiento del inicio de la enfermedad, mejoras en el monitoreo a nivel prerrecolección, y mejor entendimiento de los factores de la bacteria y del huésped que influyen la patogénesis de la enfermedad podrían combinarse para disminuir los efectos a menudo severos de la listeriosis. En la presente investigación solo fue realizado un muestreo de sueros, leche, alimento y materia fecal de cabra porque el objetivo primordial fue determinar la presencia de *L. monocytogenes* en leche de cabra y de alguna manera en las explotaciones de cabras, sin embargo, en base a los resultados obtenidos sería conveniente realizar estudios más amplios y específicos para poder determinar claramente la situación de este patógeno en los hatos caprinos en México.

La calidad higiénica de la leche es de gran importancia en la industria láctea, y la detección rápida de animales infectados es necesaria. La incidencia de mastitis causada por *L. monocytogenes* es baja pero tiende a ser subclínica y persistente, durante la lactación, la recuperación del microorganismo es rara (Bourry *et al.*, 1995); además los animales con mastitis causada por esta bacteria deberían ser retirados del rebaño porque en la mayoría de los casos, los tratamientos con antibióticos son inefectivos debido a las características de este patógeno, asimismo, los animales que logran recuperarse, podrían permanecer como

portadores asintomáticos. Por estas razones, la detección de animales infectados es necesaria para limitar el riesgo de contaminación de los productos elaborados con leche.

Actualmente se ha propuesto el empleo de *L. monocytogenes* como bioindicador sanitario en empresas de alimentos, así como en el monitoreo ambiental de su propio entorno (Sepúlveda *et al.*, 2002). El bioindicador representa una especie determinada de un organismo utilizada para monitorear los efectos de su exposición ante ciertos estímulos externos representados por sustancias genotóxicas. Las características fisiológicas de resistencia que tiene esta bacteria patógena lo facultan para su empleo como un elemento eficaz en el monitoreo del buen funcionamiento de las instalaciones donde son procesados alimentos, en las plantas de tratamiento de aguas negras o incluso para probar la eficacia de métodos físicos y químicos usados para destruir otros organismos patógenos.

El impacto de *L. monocytogenes* en la salud pública ha sido reconocido solo en las dos últimas décadas. Las agencias regulatorias coinciden en que la seguridad microbiológica de los alimentos debería ser considerada también a nivel pre-procesado. Su importancia como patógeno de origen alimentario es compleja, la gravedad y el porcentaje de muertes exigen medidas preventivas apropiadas, pero las características del microorganismo son tales que sería difícil esperar que todos los alimentos o las granjas estén exentos de esta bacteria. Asimismo, la magnitud exacta de las enfermedades zoonóticas se desconoce. En México no existe información disponible de la ocurrencia de listeriosis en humanos o en el ganado, por lo cual se requiere investigar la situación de esta infección. Asimismo, existe insuficiente información sobre las ETAs y su impacto en el ámbito económico, además del escaso conocimiento sobre inocuidad por parte de los consumidores.

En el proyecto Europeo Prague, expertos de distintas disciplinas se unen para fortalecer el control tanto desde el punto de vista sanitario como veterinario y para aportar cifras reales sobre el impacto de las enfermedades zoonóticas, el principal objetivo es mejorar la vigilancia de las infecciones transmitidas por los alimentos en la Unión Europea, en la mayoría de los casos este control se enfoca directamente en el reservorio animal y el proyecto, forma parte de la iniciativa Med-Vet-Net (Red europea que está trabajando para controlar y prevenir las zoonosis y enfermedades provenientes de alimentos). (<http://www.medvetnet.org/cms/templates/doc.php?id=26>). Asimismo, mejorar la salud animal

para obtener alimentos más seguros ha sido una de sus prioridades, los estudios en este campo han demostrado que las condiciones en las que se produce un alimento están directamente relacionadas con su calidad y seguridad, por este motivo, los proyectos europeos se inclinan a mejorar las prácticas de alimentación, asegurar niveles apropiados de comodidad y reducir el número de enfermedades y lesiones en los animales. Una de las medidas es un plan sobre protección y bienestar animal que planea establecer normas, introducir indicadores de bienestar y crear una etiqueta comunitaria para promover los productos obtenidos bajo las máximas exigencias de producción a partir de ciertos estándares relacionados con la sanidad animal.

Las cabras tienen potenciales económicos reales en el futuro y su papel e impacto como desarrollo sustentable han sido subestimados. El tamaño pequeño de la industria de las cabras podría ser una oportunidad, a pesar del creciente desarrollo de la investigación en cabras, permanece muy baja en muchos países; se sabe que el mundo confrontará la gran escasez de agua, por lo cual habrá una demanda de la producción intensiva de animales que utilicen una cantidad de agua pequeña y las cabras podrían ser una alternativa parcial si pudiera ser mejorada su eficiencia mediante la investigación. Asimismo, es urgente el desarrollo de estándares de calidad de leche de cabra por científicos y miembros de la industria de leche de cabra, ya que si las agencias regulatorias imponen sus reglas, estas podría afectar dicha industria. En México, los caprinocultores iniciaron ya, junto con la Secretaría de Salud, la redacción de una Norma Oficial Mexicana para la leche de cabra (Rudiño, 2007), que definirá las características de este alimento, también se elaboran normas no oficiales para el queso de cabra y la cajeta. Además, hay posibilidades de exportación de productos con valor agregado como cajeta y quesos a Centro y Sudamérica, así como ampliar envíos a Estados Unidos. Se prevé que México eleve su hato caprino, pues la actividad, que se desarrolla en 23 estados de la República, puede crecer, dado que sus inversiones iniciales son pequeñas, además de las características ya mencionadas de las cabras. La región de la Laguna en el estado de Coahuila, destaca a nivel nacional por las fuertes inversiones en tecnología de punta que realizan en sus salas de ordeño y toda la infraestructura que gira alrededor del sector, esta región es el principal escaparate nacional para dar a conocer lo mejor en maquinarias y equipo dentro de la caprinocultura, los resultados dentro del sector en la región se han reflejado en una mayor productividad y calidad del producto, aunque existen zonas en el país con mayor tradición dentro de este

sector, la Comarca Lagunera ocupa los primeros lugares en productividad en leche, así como en venta de cabrito en Monterrey. La caprinocultura atraviesa por un momento muy importante a nivel nacional, una prioridad es impulsar mejoras productivas, para lo cual este año se cuenta por primera vez con un presupuesto federal, en la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación, de 75 millones de pesos.

10. CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvo un porcentaje de seropositividad a *Listeria spp.* de 23.33% y fueron aisladas 7 cepas de *Listeria monocytogenes* y 18 cepas pertenecientes a las especies no patógenas. Por lo anterior, se comprobó la presencia de *Listeria monocytogenes* en hatos caprinos localizados en los estados de Guanajuato, Querétaro y Estado de México.

A pesar de que la técnica de ELISA sirve para detectar los animales que han tenido contacto con alguna especie del género *Listeria*, es necesario evaluar si la bacteria esta siendo excretada por el animal en la leche o en la materia fecal mediante el aislamiento, para determinar si se trata de una infección o únicamente el paso a través del animal.

El método de aislamiento empleado fue el apropiado, para cualquiera de las muestras analizadas. Asimismo, el método de identificación BBL Crystal es eficiente para la identificación del género *Listeria*, sin embargo muestra limitantes para la identificación de las distintas especies del género.

La amplificación del gen *iap* es útil para la identificación molecular del género *Listeria* y todas las especies pertenecientes a dicho género, incluyendo las especies patógenas *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii*. Otra de las ventajas de utilizar la amplificación de este gen es que, debido a sus características, puede servir también para estudios epidemiológicos.

Si bien, las cepas aisladas pertenecen a las serovariedades 1/2b, 3b o 4b y se ha reportado que las serovariedades 1/2b y 4b han sido asociadas con un porcentaje de brotes de listeriosis en humanos alto, es necesario determinar la patogenicidad de dichas cepas y en el caso de que sean patógenas, se podrían prevenir brotes de listeriosis evitando su transferencia a las plantas procesadoras de alimentos, ya sean lácteos o cárnicos.

En base a los resultados encontrados en este trabajo, es importante realizar más investigación relacionada con la presencia de *Listeria monocytogenes* en hatos caprinos en México. Se recomienda hacer estudios con muestreos periódicos y el empleo de antígenos específicos de las especies patógenas para poder determinar el efecto real de su presencia en la salud de los animales así como el riesgo potencial de su transmisión a las plantas procesadoras de alimentos o al humano por consumo directo.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abou-Eleinin, A. M., Ryser, E. T., and Donnelly, C. W., (1998). Unpublished data. In: Ryser, E. T., and Marth, E. H. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. (1999). Marcel Dekker Inc. USA.

ADGA, (2004). American Dairy Goat Association. <http://www.adga.org>

Allerberg F., (2003). *Listeria*: Growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35:183-189.

Álvarez, M. C. I. y Mendoza, E. S. E., (2005). Tinción Gram. Manual básico de Bacteriología. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2ª Edición. México, 2005, 128-131.

Amaya, M. G., Álvarez, M. C. I., Doniz, M. E., Morales, R., y Martínez, H. A., (2003). Calidad microbiológica de diferentes tipos de quesos de cabra. Presentado en el Congreso Nacional de Tecnólogos en Alimentos realizado en Pachuca Hidalgo.

Angelidis, A. S., Smith, G. M., (2003). Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 69(12):7492–7498.

Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labeda, D. P., and Wilkinson, B. J., (1997). Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 63(10):3887-3894.

Arimi, S. M., Ryser, E. T., Pritchard, T. J., Donnelly, C. W., (1997). Diversity of *Listeria* ribotypes recovered from dairy cattle, silage, and dairy processing environments. J. Food Prot. 60:811–816.

Aureli P. G., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, I., and Salmaso, S., (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N. Engl. J. Med. 342:1236-1241.

Badovinac, V. P., Messingham, K. A., Hamilton, S. E., and Harty, J. T., (2003). Regulation of CD8+ T cells undergoing primary and secondary responses to infection in the same host. J. Immunol. 170:4933-4942.

Banu Rekha, (1997). Virulence factor based diagnosis of *Listeria monocytogenes* infection in goats. M.V.Sc. Thesis. Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar, India.

Barbuddhe, S. B., Malik, S. V. S., and Kumar, P., (1999). High seropositivity against listeriolysin O in humans. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 93(5):537- 539.

Barbuddhe, S. B., Malik, S. V. S., Bhilegaonkar, K. N., Kumar, P., and Gupta, L. K., (2000). Isolation of *Listeria monocytogenes* and anti-listeriolysin O detection in sheep and goats. Small Ruminant Research. 38:151-155.

Bayles, D. O., Annous, B. A., and Wilkinson, B. J., (1996). Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 62(3);1116–1119.

Bayles, D. O., and Wilkinson, B. J., (2000). Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 30(1):23–27.

Beales, N., (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. Comp. Rev. Food Sci. Food Safety. 3(1):1–20.

Becker, L. A., Cetin, M. S., Hutkins, R. W., and Benson, A. K., (1998). Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. J. Bacteriol. 180(17):4547–4554.

- Becker, L. A., Evans, S. N., Hutkins, R. W., and Benson, A. K., (2000). Role of sigmaB in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J. Bacteriol.* 182(24):7083–7087.
- Beumer, R. B., and Hazeleger, W. C., (2003). *Listeria monocytogenes*: Diagnostic Problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiol.* 35:191-197.
- Boerlin, P., Boerlin-Petzold, F., and Jemmi, T., (2003). Use of Listeriolysin O and Internalin A in a seroepidemiological study of Listeriosis in Swiss Dairy Cows. *J. Clin. Microbiol.* 41(3):1055-1061.
- Bourry, A., Poutrel, B., and Rocourt, J., (1995). Bovine Mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: characteristics of natural and experimental infections. *J. Medical Microbiology.* 43:125.
- Bourry, A., and Poutrel, B., (1996). Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*: kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. *J. Dairy Sci.* 79:2189-2195.
- Bower, H. G., and Hinrichs, D. J., (1996). Cytotoxic-T-lymphocyte responses to epitopes of listeriolysin O and p60 following infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 64 :2515-2522.
- Bradford, M. A., (1976). A rapid and sensible method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 71:248-254.
- Brock, T. D., y Madigan, M. T., (1993). *Microbiología*, 6^a Ed., Prentice Hall Hispanoamericana. México, D. F.
- Brosch, R., Brett M., Catimel, B., Luchansky, B., Ojeniyi, B., and Rocourt, J., (1996). Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulse-field gel electrophoresis (PFGE). *Int. J. Food Microbiol.* 32:343-355.
- Bubert, A., Stephan, K., and Werner, G., (1992a). The Homologous and Heterologous Regions within the *iap* Gene Allow Genus- and Species-Specific Identification of *Listeria spp.* by Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8):2625-2632.
- Bubbert, A., Kohler, S., and Goebel, W., (1992b). Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* 174:8166-8171.
- Bubbert, A., Schubert, P., Kohler, S., Frank, R., and Goebel, W., (1994). Synthetic peptides derived from the *Listeria monocytogenes* p60 protein as antigens for the generation of polyclonal antibodies specific for secreted cell-free *L. monocytogenes* p60 proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(9):3120-3127.
- Bubert, A., Kestler, H., Gotz, M., Bockmann, R., and Goebel, W., (1997a). The *Listeria monocytogenes iap* gene as an indicator gene for the study of PrfA-dependent regulation. *Molec. Gen. Genet.* 256:54-62.
- Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schönberg, A., Goebel, W., and Schubert, P., (1997b). Isolation of Catalase-Negative *Listeria monocytogenes* Strains from Listeriosis Patients and Their Rapid Identification by Anti-p60 Antibodies and/or PCR. *J. Clinical Microbiol.* 35(1):179–183.
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W., and Wagner, M., (1999). Detection and Differentiation of *Listeria spp.* by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10):4688–4692.
- Burbano, E., Sierra, S., Torres, K., Mercado, M., Carrascal, A., and Poutou, R., (2006). Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *MVZ Córdoba.* 11(1):715-724.
- CDC, (2004). Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services. Centros para el control y la prevención de Enfermedades. Departamento de Salud y Servicios Humanos. <http://www.cdc.gov/cidod/dbmd/diseaseinfo/default.htm> <http://www.cdc.gov/foodnet/reports.htm>
- Cabrita, P., Correia, S., Ferreira-Diasand, S., and Brito, L., (2004). Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* Food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. *Systematic and Appl. Microbiol.* 27:454-461.

- Charpentier, E., Gerbaud, G., Jacquet, C., Rocourt, J., and Courvalin, P., (1995). Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J. Infect. Dis.* 172 :277-281.
- Charpentier, E., and Courvalin, P., (1999). Antibiotic resistance in *Listeria spp.* *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2103-2108.
- Chavarrias M., (2006). Zoonosis y seguridad alimentaria. Boletín semanal 24 mayo 2007. <http://www.wconsumaseguridad.com>
- Cliver, D., and Riemann, H. P., (2002). *Foodborne Diseases 2nd Edition* Academic Press, San Diego California USA.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., and Comi, G., (2002). Direct Identification in Food Samples of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12):6273–6282.
- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., and Lecuir, M., (2003). Invasión of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: Functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell. Biol.* 13:23-31.
- Cossart, P. and Sansonetti, P. J., (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242–248.
- Cotter, P. D., Emerson, N., Gahan, C. G., and Hill, C., (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 181(21):6840–6843.
- Cotter, P. D., Gahan, C. G., and Hill, C., (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Mol. Microbiol.* 40 (2), 465–475.
- Cotter, P. D., and Hill, C., (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3):429–453.
- Cowart, R. E., and Foster, B. G., (1985). Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: Minimum requirements and mechanism of acquisition. *J. Infect. Dis.* 151:721-730.
- Czuprynski, C. J., Faith, N. G., and Steinberg, H., (2003). A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. *Infect. Immun.* 71:682-689.
- Dalton, C. B., Austin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Graves, L. M., Swaminathan, B., Proctor, M. E., and Griffin, P. M., (1997). Listeriosis from chocolate milk: linking of and outbreak of febrile gastroenteritis and “sporadic” invasive disease. *N. Engl. J. Med.* 336:100-105.
- Diaz, C. M., Luchansky, J., Moren, E. R., García, G. A., Acedo, F. E., Gonzalez, H., and Call, J., (2006). Characterization of *Listeria monocytogenes* from a Survey of Fresh Retail Cheese and Associated Farms in Sonora, México. In: United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. 29/05/2007. <http://www.ars.usda.gov/research/publications/Publications.htm?se4no115=193748>
- Dieterich, G., Kärst, U., Fischer, E., Wehland J., and Jänsch, L., (2006). LEGER: knowledge database and visualization tool for comparative genomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species *Nucleic Acids Research.* 34:D402–D406.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., and Martin P., (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(8):3819-3822.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. y Montville, T. J., (2001). *Microbiología de los alimentos.* Acribia, Zaragoza España.
- Debeuf, J.P., Morand-Fehr, P., and Rubino, R., (2004). Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research* 51:165-173.

Dubeuf, J., and Le Jaouen, J., (2006). The sheep and goat dairy sectors in the European UNION: Present situation and stakes for the future. CIRVAL (Centre International de Ressources et de Valorisation de L'information des Filières Laitières Petits Ruminants). <http://www.cirval.univ-corse.fr>

Dijkstra R. G., (1971). Investigations on the survival times of *Listeria* bacteria in suspensions of brain tissue, silage and faeces and in milk. Zbl. Bacteriol. I. Abt. Orig. 216:92-95. In: Ryser, E. T., and Marth, E. H. *Listeria*, Listeriosis and Food safety. (1999). Marcel Dekker Inc. USA.

Duche, O., Tremoulet, F., Glaser, P., and Labadie, J., (2002a). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 68(4):1491–1498.

Duche, O., Tremoulet, F., Namane, A., Labadie, J., (2002). A proteomic analysis of the salt stress response of *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 215(2), 183–188.

Dunn, P. L., and North, R. J., (1991). Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. Infect. Immun. 59:2892–2900.

ERS, (2001). Economic Research Service. Economics of Foodborne Disease: *Listeria monocytogenes*. <http://www.ers.usda.gov/Emphases/SafeFood/features.htm#start>
<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/mead.htm>

Edelson, B. T., Cossart, P., and Unanue, E. R., (1999). Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. J. Immunol. 163:4087–4090.

Edelson, B. T., and Unanue, E. R., (2001). Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. Immunity 14:503–512.

Elezebeth, G., Malik, S. V. S., Chaudhari, S. P., and Barbudde, S. B., (2007). The occurrence of *Listeria* species and antibodies against listeriolysin-O in naturally infected goats. Small Ruminant Research. 67:173–178.

Engeland, I. V., Waldeland, H., Ropstad, E., Kindahl, H., and Andersen, O., (1997). Effect of experimental infection with *Listeria monocytogenes* on the development of pregnancy and on concentrations of progesterone, oestrone sulphate and 15-ketodihydro-PFG2 α in the goat. Anim. Reprod. Sci. 45:331-327.

Escárcega, H., Peñaloza, R., Montes, O., Peña, R., Godoy, H., Negrin, M., Rodríguez, R., y Anaya, P., (1999). Listeriosis materno-fetal: reporte de tres casos. Rev.mex.pueric.ped; 6(35):290-6.

FAOSTAT (2004). FAO, Official statistics. The Statistics Division, Economic and Social Departmente. GLiPHA Global Livestock Production and Health Atlas, Animal Production and Health Division. <http://www.fao.org/ag/aga/glipha/imdex.jsp>

Fenlon, D. R., Wilson, J., and Donachie, W. (1996). The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. J. Appl. Bacteriol. 81:641-650.

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

FoodNet. Foodborne Diseases Active Surveillance Network. Emerging Infections Program Report of Foodborne Pathogens. <http://www.cdc.gov/foodnet/reports.htm>

Gandhi, M., and Chikindas, L. M., (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Review. International Journal of Food Microbiology. 113:1–15.

Gardan, R., Duche, O., Leroy-Setrin, S., and Labadie, J., (2003). Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. Appl. Environ. Microbiol. 69 (1), 154–161.

- Gasanov, U., Hughes, D., and Hansbro, P., (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiology Reviews. Article in press.
- Gaya, P., Saralegui, C., Medina, M., and Núñez, M., (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* In raw caprine milk. J. Dairy Sci. 79:1936-1941.
- Geginat, G., Lalic, M., Kretschmar, M., Goebel, W., Hof, H., Palm, D., and Bubert, A., (1998). Th1 cells specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo. J. Immunol. 160:6046-6055.
- Geginat, G., Nichterlein, T., Kretschmar, M., Schenk, S., Hof, H., Lalic-Multhaler, M., Goebel, W., and Bubert, A., (1999). Enhancement of the *Listeria monocytogenes* p60-specific CD4 and CD8 T cell memory by non-pathogenic *Listeria innocua*. J. Immunol. 162:4781-4789.
- Gellin, B. G., Broome, C. V., Bibb, W. F., Weaver, R. E., Gaventa, S., Mascola, L., and the listeriosis Study Group., (1991). The epidemiology of listeriosis in the United States-1986. Am. J. Epidemiol. 133:392-401.
- Gentschev, I., Sokolovic, Z., Kohler, S., Krohne, G. F., Hof, H., Wagner, J., and Goebel, W., (1992). Identification of p60 Antibodies in Human Sera and Presentation of This Listerial Antigen on the Surface of Attenuated Salmonellae by the H1yB-H1yD Secretion System. Infection and Immunity. 60(12):5091-5098.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapat, G., Madueño, E., Maitournam, A., Mata J. V., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J.-C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Scluteter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P., (2001). Comparative Genomics of *Listeria* species. Science. 294:849-852.
- Gray, M. L., (1960). Silage Feeding and listeriosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 136:205-208.
- Greenwood, M. H., Roberts, D., and Burden, P., (1991). The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: A national survey in England and Wales. Int. J. Food Microbiol. 12:197-206.
- Groisman, E. A., (2001). Principles of bacterial pathogenesis. Academic Press, San Diego Cal. USA.
- Gutekunst, K. A., Holoway, B. P., and Carlone, G. M., (1992). DNA sequence heterogeneity in the gene encoding a 60-kilodalton extracellular protein of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. Can. J. Microbiol. 38:865-870.
- Haenlein, G. F. W., (2004). Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research 51:155–163.
- Haenlein, G. F. W., (2007). About the evolution of goat and sheep milk production. Small Ruminant Research. 68:3-7.
- Harty, J. T., and Pamer, E. G., (1995). CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes* infection. J. Immunol. 9:4642-4650.
- Havell, E. A., (1993). *Listeria monocytogenes*-induced interferon-gamma primes the host for production of tumor necrosis factor and interferon-alpha/beta. J. Infect. Dis. 167:1364–1371.
- Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E., and Wagner, M., (2001). Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. Res.Microbiology. 152:37-46.
- Heredia N. L., (2004). Métodos Rápidos Modernos. Revista Salud Pública y Nutrición. No. 5-2004. http://www.respyn.uanl.mx/especiales/ee-5-2004/ponencias_juany09.htm.RESPYN

Hernández, V., (2007). La apertura en 2008 traerá un efecto diferente en las ramas productivas del sector agropecuario. El Siglo de Torreón, Torreón Coahuila, México. 22/02/2007. <http://www.capraispana.com/noticias.htm>

Hertzog, T., Weber, M., Greiffenberg, L., Schulte, H. B., Goebel, W., Sik Kim, K., and Uhn, M., (2003). Antibodies present in normal human serum inhibit invasion of human brain microvascular endothelial cells by *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*. 71(1):95-100.

Hess, J., Gentschev, I., Szalay, G., Ladel, C., Bubert, A., Goebel, W., and Kaufmann, S. H., (1995). *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect.Immun.* 63:2047-2053.

Hines, J. S., and Atmar, R. L., (1995). Infections Associated with the Consumption of the Goat Cheese. *J. Travel Med.* 2:178-181.

Ho, A. J., Ivanek, R., Gröhn Y. T., Nightingale, K. K., and Wiedmann, M., (2007). *Listeria monocytogenes* fecal shedding in dairy cattle shows high levels of day-to-day variation and includes outbreaks and sporadic cases of shedding of specific *L. monocytogenes* subtypes. *Preventive Veterinary Medicine*. Article in press. doi:10.1016/j.prevetmed.2007.03.005

Hof, H., Nichterlein, T., and Kretschmar, M., (1997). Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:345-357.

Huillet, E., Larpin, S., Pardon, P., and Berche, P., (1999). Identification of a new locus in *Listeria monocytogenes* involved in cellobiose-dependent repression of hly expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 174:265.

Huleatt, J. W., Pilip, I., Kerksiek, K., and Pamer, E. G., (2001). Intestinal and splenic T cell responses to enteric *Listeria monocytogenes* infection: distinct repertoires of responding CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* 166:4065–4073.

Ivaneka, R., Gröhna, Y. T., Jui-Jung Hob, A., and 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 *Journal of Theoretical Biology*. 245:44–58.

Ivanov, I., (1962). Untersuchungen über die Listeriose der schafe in Bulgarien. *Monatshefte für Vet. Med.* 17:729-36. In: Ryser, E. T., and Marth, E. H. (1999). *Listeria*, Listeriosis and Food safety. Marcel Dekker Inc. USA.

Jay, J. M., (1994). *Microbiología moderna de los Alimentos*. Acribia, Zaragoza España.

Jensen, A., Frederiksen, W., and Gerner-Smidt, P., (1994). Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. *Scan J. Infect. Dis.* 26:171-178.

Jurado, R. L., Farley, M. M., Pereira, E., Harve, R. C., Schuchat, A., Wenger, J. D., and Stephens, D. S., (1993). Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.* 17:224-227.

Kalorey, D. R., Kurkure, N. V., Warke, S. R., Rawool, D. B., Malik, S. V. S., and Barbuddhe, S. B., (2006). Isolation of pathogenic *Listeria monocytogenes* in faeces of wild animals in captivity. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 29:295–300.

Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., and Wiedmann, M., (2003). *Listeria monocytogenes* sigmaB regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* 185(19):5722–5734.

Kohler, S., Bubert, A., Vogel, M., and Goebel, W., (1991). Expression of the *iap* gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* is controlled on the postranscriptional level. *J. Bacteriol.* 173:4668-4674.

Kolb-Maurer, A., Pilgrim, S., Kampgen, E., McLellan, D., Brocker, B., Goebel, W., and Gentschev, I., (2001). Antibodies against listerial protein p60 act as an opsonin for phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by human dendritic cells. *Infect. Immun.* 69:3100-3109.

- Kuhn, M., and Goebel, W., (1989). Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect. Immun.* 57:55-61.
- Kuhn, M., and Goebel, W., (2004). *Listeria monocytogenes*: inside a cell inside a cell. *Biologist.* 51(1):49-53.
- Labbé, R. G., and García, S., (2001). *Guide to Foodborne Pathogens.* Wiley-Inter Science 2001, New York, USA.
- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 227:680-685.
- Lara-Tejero, M., and Pamer, E. G., (2004). T cell responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:45-50.
- Latiffa, H., Mohammed, O. H., and McDonough, P. L., (2001). Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Vet. Med.* 51(1-2):63-73.
- Lebbie, S. H. B., (2004). Goats under household conditions. *Small Ruminant Research* 51:131–136.
- Leclercq, A., (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *Journal of Microbiological Methods.* 57:251– 258.
- Lenz, L. L., Mohammadi, S., Geissler, A., and Portnoy, D. A., (2003). SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:12432-12437.
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonkura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks A., and Broome, C. V., (1988). Epidemic Listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* 319:823-828.
- Liu, S., Graham, J. E., Bigelow, L., Morse, P. D., Wilkinson, B. J., (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1697–1705.
- Loken, T., and Gronstol, H., (1982). Clinical investigations in a goat herd with outbreaks of listeriosis. *Acta Vet. Scand.* 23: 380-391.
- Lorber, B., (1997). Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 24:1-11.
- Louria, D. B., Hensle, T., Armstrong, D., Collins, H. S., Blevinis, A., Krugman, D., and Buse, M., (1967). Listeriosis complicating malignant disease: A new association. *Ann. Intern. Med.* 67:260-281.
- Low, J. C., and Donachie, W., (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet. J.* 153:9-29.
- Majjala, R., Lyytikäinen, O., Autio, T., Aalto, T., Haavisto, L., Honkanen-Buzalski, T., (2001). Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. *Int. J. Food. Microbiol.* 70:97–109.
- Manzano, M., Coccolin, L., Ferroni, P., Cantón, C., and Comi, G., (1997). A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. *J. Sci. Food Agric.* 74:25-30.
- Manzano, M., Coccolin, L., Cantón, C., and Comi, G., (1998). A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. *Inter. J. Food Microbiol.* 42:207-212.
- McCaffrey, R. L., Fawcett, P., O’Riordan, M., Lee, K.D., Havell, E. A., Brown, P. O., and Portnoy, D. A., (2004). A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:11386–11391.

- McClure, P. J., Kelly, T. M., and Roberts, T. A., (1991). The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 14:77-91.
- McLauchlin, J., (1997). Animal and Human Listeriosis: a Shared Problem?. *The Veterinarian Journal.* 153:3-5.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V., (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5(5):607–625.
- Milian, F., (1992). Manual para determinar tamaño de muestra para estudios de campo en medicina veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.
- Miettinen, A., Husu, J., and Tuomi, J., (1990). Serum antibody response to *Listeria monocytogenes*, listerial excretion and clinical characteristics in experimentally infected goats. *J. Clin. Microbiol.* 28:340-343.
- Miettinen, A., Husu, J., and Tuomi, J., (1991). Antibodies to Listeriolysin O reflect the acquired resistance of *Listeria monocytogenes* in experimentally infected goats. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:181-186.
- Montville, J. T., and Matthews, K. R., (2005). *Food Microbiology an Introduction*. ASM Press, Washington DC, USA, *Listeria monocytogenes*, 159-173.
- Morales, L. J., Alanis de la O, R., Vázquez-Sandoval, M. E., and Rosas-Barbosa, B. T., (1995). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, México. *J. Food Prot.* 58:1139-1141.
- Morand-Fehr, P., and Lebbie, S. H. B., (2004). Proposals for improving the research efficiency in goats. *Small Ruminant Research.* 51:145–153.
- Murray, E. G., Weeb, R. E., and Swann, M. B. R., (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *Journal of Pathology and Bacteriology.* 29:407-439.
- Nightingale, K. K., Schukken, Y. H., Nightingale, C. R., Fortes, E. D., Ho, A. J., Her, Z., Grohn, Y. T., McDonough, P. L., and Wiedmann, M., (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4458–4467.
- O'Driscoll, B., Gahan, C. G., and Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5):1693–1698.
- Olsen, S. J., MacKinnon, L. C., Goulding, J. S., Bean, N. H., and Slutsker, L., (2000). Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks—United States, 1993–1997. *MMWR CDC Surveill Summ*, 49(1):1–62.
- Orndorff, P. E., Hamrick, T. S., Smoak, I. W., Havell, E. A., (2006). Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Review. Vet. Microbiol.* 114:1-15.
- Park, S. F., and Kroll, R. G., (1993). Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant –derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Molec. Microbiol.* 8:653-661.
- Phan-Thanh, L., and Mahouin, F., (1999). A proteomic approach to study the acid response in *Listeria monocytogenes*. *Electrophoresis* 20(11):2214–2224.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., and Alige, S., (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 55(1–3):121–126.
- Pilgrim, S., Kolb-Maurer, A., Gentschev, I., Goebel, W., and Kuhn, M., (2003). Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin based motility. *Infect. Immun.* 71:3473-3484.

Pirie, J. H., (1927). A new disease of veld rodents "Triger river disease." South African Institute of Medical Research Publications. 3:163-86. In: Low, J. C., and Donachie, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. Vet. J. 153:9-29.

Potel, J., (1952). Zur granulomatosis infantiseptica. Zbl. Bakteriologie. Origin. 158:329-331. In: Ryser, E. T., and Marth, E. H. (1999). *Listeria*, Listeriosis and Food safety. Marcel Dekker Inc. USA.

Revista Cabras México, (2004). COMECAPRI, La organización Nacional de los Caprinocultores. <http://www.cabras.com.mx/Revista/CabrasVwr.asp?e=1&n=4&s=5&a=1>

Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S. D., Arthur, T. M., Westmoreland, K. E., Bellinger, G., Rossman, M., Reagan, J. O., Koohmaraie, M., (2004). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. J. Food Prot. 67:295–302.

Ripio, M. T., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Brehm, K., Berche, P., and Vazquez-Boland, J. A., (1996). Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. Res. Microbiol. 147:371-384.

Rocourt, J., and Cossart, P., (1997). *Listeria monocytogenes* In: B. Doyle and Montville (Eds.) Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers. ASM Press Washington, DC. pp. 337-352.

Roberts, A. J., and Wiedmann, M., (2003). Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. Cell. Mol. Life Sci. 60:904–918.

Roche, S. M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Témoign, S., Grépinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P., and Velge, P., (2005). Investigation of Specific Substitutions in Virulence Genes Characterizing Phenotypic Groups of Low-Virulence Field Strains of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 71(10): 6039–6048.

Rodas-Suárez, O. R., Flores-Pedroche, J. F., Betancourt-Rule, J. M., Quiñones-Ramírez, E. I., and Vazquez-Salinas, C., (2006). Occurrence and Antibiotic Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Oysters, Fish, and Estuarine Water. Appl. Environ. Microbiol. 72(11):7410–7412.

Rodríguez, J. J. J., (2007). *L. monocytogenes*, el patógeno alimentario del futuro inmediato. Boletín 13 Abril 2007. <http://www.consumaseguridad.com>

Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scortti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J. A., and Pla, M., (2004). Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* Targets and AmpliFluor Technology. Appl. Env. Microbiol. 70(3):1366–1377.

Rudiño, L. E., (2007). Preparan norma oficial para la leche de cabra. El siglo de Torreón, Marzo 15 2007. Alimentariaonline.com. y EL FINANCIERO. <http://www.inforural.com.mx/welcome.php> y <http://www.alimentariaonline.com>

Ruhland, G. J., Hellwing, M., Wanner, G., and Fiedler, F., (1993). Cell-surface location of *Listeria* specific protein p60-detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. J. Gen. Microbiol. 139:609-616.

Ryser, E. T., and Marth, E. H., (1999). *Listeria*, Listeriosis and Food safety. Marcel Dekker Inc. USA.

Sanaa, M., Poutrel, B., Menard, J. L., and Serieys, F., (1993). Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. J. Dairy Sci. 76:2891–2898.

Sagarpa-Ergomix, (2006). México - Exportaciones de ovinos y caprinos de alta genética a Ecuador Publicado el 07/03/2006. Fuente: SAGARPA. <http://www.ergomix.com>

Saltijeral, J. A., Álvarez, V. B., y García, B., (1999). Presencia de *Listeria* en Quesos Mexicanos. J. Food Saf. 19(4):241-247.

- Sánchez, M. D., (1999). Especies Menores para Pequeños Productores: Cabras Lecheras. Dirección de Producción y Sanidad Animal FAO, Roma. <http://www.virtualcentre.org/es/enl/keynote11.htm>
- San Mateo, L. R., Chua, M. M., Weiss, S. R., and Shen, H., (2002). Perforin-mediated CTL cytotoxicity counteracts direct cell-cell spread of *Listeria monocytogenes*. J. Immunol. 169:5202–5208.
- Schlech, W. F., (1984). New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. Clin. Invest. Med. 7:321-324.
- Schlech, W. F., Haldane, I. H., Mailman, T. L., Warhuus, M., Crouse, N., and Haldane, D. J., (2005). Does sporadic *Listeria* gastroenteritis exist? A 2-year population-based survey in Nova Scotia, Canada. Clin. Infect. Dis. 41:778–784.
- Schimid, M. W., Eva, Y. W. N., Lampidis, R., Emmerth, M., Walcher, M., Kreft, J., Goebel, W., and Wagner, M., (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. Systematic, Applied Microbiol., 28:1-18.
- Schuchat A., Deaver, K. A., Wenger, J. D., Plikaytis, B. D., Mascola, L., Pinner, R. W., Reingold, A. L., and Broome, C. V., (1992). Role of foods in sporadic Listeriosis. 1 Case-control study of dietary risk factors. J. A. M. A. 267:2041-2045.
- Scotter, S. L., Langton S., Lombard, B., Schulten, S., Nagelkerke, N., In't Veld, P. H., Rollier, P., and Lahellec, C., (2001). Validation of ISO method 11290 part 1, Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. I. J. Food Microbiol. 64 (3):295-306.
- Seeliger, H. P. R., (1961). Listeriosis, 2nd ed. Karger, Basel.
- Seeliger, H., and Jones, D., (1986). Genus *Listeria* In: M. Sneath, Sarpe and Holt (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Baltimore. MD. pp.1235-1245.
- Sepúlveda, M. A., Martínez, G. N. E., Ramírez, G. A. C., Raygoza, A. M. y Trujillo, C. F., (2002). *Listeria monocytogenes* como bioindicador sanitario para el control ambiental de las aguas incorporadas a los embalses. Rev. Cub. Hig. Y Epid. 3.
- Serbina, N., and Pamer, E. G., (2004). Quantitative studies of CD8+ T cell responses during microbial infection. Curr. Opin. Immunol. 15:436–442.
- Shabala, L., Budde, B., Ross, T., Siegumfeldt, H., and McMeekin, T., (2002). Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. Int. J. Food Microbiol. 75(1–2):89–97.
- Shigidi, M. T. A., (1979). Isolation of *Listeria monocytogenes* from animals in the Sudan. Br. Vet. J. 135:297-298.
- SIAP-SAGARPA. Elaborados por el Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las delegaciones de la SAGARPA. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- Resumen Nacional, Producción, Precio, Valor, Animales Sacrificados y Peso (2000 – 2006).
Cabras, Producción por Estado:
Producción, Precio, Valor, Animales Sacrificados y Peso de carne en Canal (2005).
Producción, Precio, Valor, Leche de Caprino (2005).
- Solís, M. M., (2007). Curso de Actualización para veterinarios del ISEM. Revista Comunidad. Universidad Nacional Autónoma de México. 20(2):21.
- Sørensen, J. T., Edwards, S., Noordhuizen, J., and Gunnarsson, S., (2006). Animal production systems in the industrialized world. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 25(2):493-503.
- Stam, A. M., Dismukes, W. E., Simmons, B. P., Cobbs, C. G., Elliott, A., Budrich, P., and Harmon, J., (1982). Listeriosis in renal transplant recipients: Report of an outbreak and review of 102 cases. Rev. Infect. Dis. 4:665-682.

- Swaminathan, B., Rocourt, J., and Bille, J., (1995). *Listeria* In: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C., and Tenover, F. C., and Tenover, R. H. (Eds.) Manual of Clinical Microbiology. ASM Press Washington, DC. pp. 341-348.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S., (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443–451.
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J., Mailliet, I., Akira, S., Ryffel, B., and Erard, F., (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 72:2131–2139.
- Towbin, H., and Gordon, J., (1984). Immunoblotting and Dot immunoblotting. Current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* 72:313.
- Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., and Stock, I., (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 6:525-535.
- van Schaik, W., Gahan, C.G., and Hill, C., (1999). Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the antibiotics nisin and lactacin 3147. *J. Food Prot.* 62 (5), 536–539.
- Vázquez, C., Rodas, O., and Quiñones, E. I., (2001). Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of México City. *Food Microbiol.* 18(2):177-181.
- Vázquez-Boland, J. E., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J., (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiol. Reviews.* 14(3):584-640.
- Vázquez, A. J., y Cabral, M. A., (2001). La inocuidad Alimentaria, realidad o reto mundial. FAO, Food Nutrition and Agriculture. Issue 28. www.fao.org/docrep/003/y0600M/y0600m00.htm
- Way, S. S., Thompson, L. J., Lopes, E., Hajjar, A.M., Kollmann, T. R., Freitag, N. E., and Wilson, C. B., (2004). Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell. Microbiol.* 6:235-242.
- Weis, J., and Seeliger, H. P. R., (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 30: 29–32.
- Welshimer H. S., (1968). Isolation of *L. monocytogenes* from vegetation. *J. Bacteriol.* 95:300-303.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., Sleator, R. D., Wouters, J. A., Hill, C., and Abee, T., (2004). Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5):2912–2918.
- Wuenscher, M. D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U., and Goebel, W., (1993). The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J. Bacter.* 175(11):3491-3501.
- Wesley, I. V., (1999). Listeriosis in animals. In: Ryser, E.T., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, pp. 39–73.
- WHO, (2007). World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Animal Feed Impact on Food Safety, 8-12 October 2007, Rome, Italy. <http://www.who.int/foodsafety/fsmanagement/meetings/animalfeed/en/index.html>
- Wieckowska-Szakiel, M., Bubert, A., Rozalski, M., Krajewska, U., Rudnicka, W., and Rozalska, B., (2002). Colony-blot assay with anti-p60 antibodies as a method for quick identification of *Listeria* in food. *Int. J. of Food Microbiol.* 72:63-71.

- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E., McDowell, C. I., McDonough, P. L., Batt, C. A., (1996). Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. *J. Clin. Microbiol.* 34(5):1086–1090.
- Wing, E. W., and Gregory, S.H., (2002). *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *J. Infect. Dis.* 185:18-24.
- Wong, P., and Pamer, E. G., (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 21:29-70.
- Yoshida, T., Sugimoto, T., Sato, M., Hirai, K. (2000). Incidence of *Listeria monocytogenes* in wild animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 673–675.
- Yousif, Y. A., Joshi, B. P., and Ali, H. A., (1984). Ovine and caprine listeric encephalitis in Iraq. *Trop. Anim. Health Prod.* 16:27-28.
- Zundel, E., Pele, S., Phan-Thanh, L., and Pardon, P., (2006). Repeated daily doses do not increase *Listeria monocytogenes* infection in ewes as shown by faecal excretion and serological monitoring. *Small Ruminant Research*. Technical note. Article in press.