



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en
mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México

TESIS

Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista

P R E S E N T A

NAYELI ROMERO HERNÁNDEZ

ASESORES:

Dr. Martin Talavera Rojas

Dra. en C. Nydia Edith Reyes Rodríguez

REVISORES

M en C María de Lourdes Sánchez Guerrero

M. en C. Ada Elia Díaz González



El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Septiembre de 2017.

TITULO

Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México.

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
<i>acta</i>	Proteína inductora de ensamblaje actina
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
<i>aw</i>	Actividad de agua
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (Por sus siglas en inglés Centers for Disease Control and Prevention)
CDTX	Toxinas formadoras de poro dependientes de colesterol
DGE	Dirección General de Epidemiología
EB	Medio de enriquecimiento
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (Por sus siglas en inglés European Food Safety Authority)
<i>et al</i>	Colaboradores
ETAs	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations)
g	gramo
h	hora
H ₂ S	ácido sulfhídrico
<i>hly</i>	Listeriolisina O (LLO)
IL	Interleucina
InIA	internalina A
InIB	internalina B
Kg	kilogramo
l	litro

<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LIPI-1	Isla de patogenicidad 1 de <i>Listeria</i>
LLO	Listeriolisina O
LPC	Listo(s) para consumo
ml	mililitros
mm	milímetros
<i>mpl</i>	Precursor zinc metaloproteasa (Mpl)
OIE	ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL
OXA	Oxford agar base selectivo de <i>Listeria</i>
LMP	Palcam agar para <i>Listeria</i>
pH	Potencial Hidrógeno
<i>plcA</i>	Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI- PLC)
<i>plcB</i>	Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC- PLC)
<i>prfA</i>	Factor regulador positivo A (PrfA)
SIM	Medio de Sulfuro Indol para Movilidad
subesp	Subespecie
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
β	beta
μm	Micrómetro

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS:	iii
DEDICATORIAS	v
ABREVIATURAS	vii
INDICE DE CUADROS	xi
INDICE DE FIGURAS	xii
INDICE DE DIAGRAMAS	xii
SUMMARY	xiii
RESUMEN	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
a. Historia	4
b. Clasificación	5
c. Características morfológicas y bioquímicas	6
d. Patogenia	7
e. Ciclo intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	9
f. Factores de patogenicidad y virulencia	12
g. Cuadro clínico	13
h. Epidemiología	20
i. Impacto económico de <i>L. monocytogenes</i>	25
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVOS	28
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
VI. MATERIALES	29
a. Biológico	29
b. Muestreo	29
c. Equipo de protección en el laboratorio	29
d. Laboratorio	30
e. Cristalería	30

Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México.

f. Diversos	31
g. Equipo	31
VII. MÉTODOLÓGÍA	32
1. Determinación de tamaño de muestra	32
2. Recolección de la muestra.....	34
3. Aislamiento Bacteriológico	34
4. Identificación.....	35
5. Análisis Estadístico	38
VIII. LIMITE DE ESPACIO.....	39
IX. LÍMITE DE TIEMPO	40
X. RESULTADOS	41
XI. DISCUSION	47
XII. CONCLUSIONES	50
XIII. SUGERENCIAS	51
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	52

INDICE DE CUADROS

	Página
1. Valores óptimos de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> .	6
2. Diferenciación de especies de <i>Listeria</i> .	7
3. Descripción epidemiológica y clínica de la Listeriosis en humano.	17
4. Casos notificados de Listeriosis en el periodo 2008-2012, la tasa de notificación para casos en la Unión Europea de 2012.	21
5. Costo anual estimado de enfermedades alimentarias en EE. UU	25
6. Numero de muestras de acuerdo al Mercado del Estudio.	33
7. Frecuencia de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. aislada de carne de res y cerdo de los 6 mercados en la ciudad de Toluca, Estado de México	41
8. Frecuencia de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. de acuerdo al número de muestras obtenidas por mercado. Toluca, Estado de México	42
9. Frecuencia de los aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. según el tipo de carne del total de las muestras obtenidas de los seis mercados principales de Toluca, Estado de México	44
10. Distribución de los locales por muestreo de los seis mercados principales de Toluca, Estado de México	45

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. Esquema del ciclo intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2. Organización física y transcripcional de genes de virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i> .	12
3. Manifestación clínica típica de meningoencefalitis causada por <i>L. monocytogenes</i> .	19
4. Prueba de CAMP de la muestra L09 Central de abastos.	37
5. Mapa de límite de espacio del Estudio.	39

INDICE DE DIAGRAMAS

1. Proceso de aislamiento bacteriológico de <i>Listeria monocytogenes</i>	38
---	----

SUMMARY

Romero. HN; Talavera, RM; Reyes, RNE: Frequency of *Listeria monocytogenes* in steak of beef and pork markets the city of Toluca, State of Mexico.

The objective of the present study was to determine the frequency of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in beef and pork meat taken from the six main markets of the metropolitan area of Toluca city. The sample size was 31, three samples were done, obtaining a total of 93 samples. The bacteriological isolation was performed according to Mexican Official Standard NOM-143-SSA1-1995, Goods and Services. Microbiological test food. Determination of *Listeria monocytogenes*, the statistical analysis was performed using the chi-square test. Of the 93 samples, 33 (35.48%) were positive to the isolation of *Listeria* spp. Through Gram stain tests, catalase test, mobility in SIM medium. Differences were identified for the identification of *Listeria monocytogenes* through carbohydrate reduction, nitrate reduction, hemolysis and CAMP tests, resulting in 2 (2.15%) positive isolates. The results obtained showed no statistically significant difference. It was observed that only 2 of the 6 markets sampled were positive samples to *Listeria monocytogenes*, being the market 16 of September 1.08% and Central of Supply 1.08%, both isolates were of pork. While the Benito Juárez market, Morelos Market and Seminario Market was not found the presence of *Listeria monocytogenes* 0%. Without change the presence of *Listeria* spp. Was observed in the 6 markets sampled, in the Market 16 de septiembre, 9.68%, Benito Juarez Market 8.60%, Miguel Hidalgo Market 3.23%, Central de abastos 8.60%, Morelos Market 3.23% and the Seminario Market 2.15%. So the results show the presence of *Listeria* in meat supply centers in Toluca, State of Mexico, which represents a major public health problem.

Key Words: *Listeria monocytogenes*, Beef, Pork, Meat, Markets.

RESUMEN

Romero. HN; Talavera, RM; Reyes, RNE: Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en mercados la ciudad de Toluca, Estado de México.

El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. en carne de res y cerdo tomados de los seis principales mercados del área metropolitana de la ciudad de Toluca. El tamaño de muestra fue de 31, se realizaron tres muestreos obteniendo un total de 93 muestras. El aislamiento bacteriológico se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*, el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ji-cuadrada. De las 93 muestras analizadas, 33 (35.48%) resultaron positivas al aislamiento de *Listeria* spp. a través de las pruebas de Tinción de Gram, prueba Catalasa y movilidad en medio SIM. de estas se realizó la diferenciación para la identificación de *Listeria monocytogenes* a través de las pruebas de reducción de carbohidratos, reducción de nitratos, prueba de hemolisis y prueba CAMP, resultando 2 (2.15%) aislamientos positivos. Los resultados obtenidos no mostraron diferencia estadística significativa. Se observó que en 2 de los 6 mercados muestreados se obtuvieron muestras positivas a *Listeria monocytogenes*, siendo el mercado 16 de Septiembre 1.08% y la Central de Abastos 1.08%, ambos aislamientos fueron de carne de cerdo. Mientras que los mercados Benito Juárez, Mercado Morelos y el Mercado Seminario no se encontró la presencia de *Listeria monocytogenes* 0%. Sin embargo la presencia de *Listeria* spp. se observó en los 6 mercados muestreados, en el Mercado 16 de Septiembre 9.68%, Mercado Benito Juárez 8.60%, Mercado Miguel Hidalgo 3.23%, Central de abastos 8.60%, Mercado Morelos 3.23 y el Mercado Seminario 2.15%, por lo que los resultados encontrados demuestran la presencia de *Listeria* en centros de abastecimiento de cárnicos en Toluca, Estado de México lo que representa un importante problema de salud pública.

Palabras Claves: *Listeria monocytogenes*, Res, Cerdo, Mercados, Carne.

I. INTRODUCCIÓN

La listeriosis humana forma parte del grupo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), es causada por *Listeria monocytogenes* y el consumo de alimentos contaminados es su origen fundamental (FAO, 2004).

Una amplia variedad de especies animales puede infectarse con *Listeria monocytogenes*, entre las que se encuentran mamíferos, aves, peces y crustáceos, aunque la mayoría de casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes; los cerdos raras veces desarrollan la enfermedad y, generalmente, las aves son portadoras subclínicas del microorganismo (OIE, 2004).

Estudios epidemiológicos han determinado que esta bacteria entra en la cadena de los alimentos por medio de los animales utilizados para el consumo humano, los cuales, actúan como reservorios y fuentes de infección, la introducen al ambiente por medio de la leche o sus heces, sin embargo puede existir una contaminación cruzada por un inadecuado manejo en la manipulación de los alimentos lo que contribuye a la instauración de una infección por este patógeno en humanos (Rivera *et al.*, 2006).

L. monocytogenes puede ser aislada de un amplio grupo de alimentos, tales como: Queso, leche cruda y pasteurizada, carnes frescas de mamíferos, aves y productos cárnicos fermentados y pasteurizados, pescados y mariscos tanto frescos como ahumados, frutas, hortalizas y verduras. Pero a pesar de que son muchos los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, los casos están principalmente relacionados con alimentos listos para el consumo (LPC). Varios brotes han sido asociados con el consumo de estos tipos de alimentos (EFSA, 2007).

Esta enfermedad es relativamente rara, en comparación con otras, aunque la tasa de incidencia es de 4 a 8 casos por cada 1,000,000 de personas, la tasa de mortalidad está entre 20 y 30% en pacientes hospitalizados; es una mortalidad elevada en comparación con otras enfermedades transmitidas por alimentos. (FAO, 2000; Torres 2004).

Este microorganismo supone un problema grave para las empresas alimentarias debido a la dificultad que presenta su control en las plantas de alimentos procesados. Por todo ello, desde el punto de vista de la higiene y la salud alimentaria y pública, *L. monocytogenes* es un organismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) llevados a cabo en las industrias alimentarias, así como en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (Mengoni y Apraiz, 2003).

Si bien son pocos los estudios realizados en México para la detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Aunque reflejan una prevalencia similar a la identificada en otros países, en Colombia en el 2012 un estudio en carne de cerdo mostro una prevalencia de 3.7, mientras que la autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el 2013 hace mención que la prevalencia de carne fue 2.07 (Gamboa *et al.*, 2012; EFSA, 2013). Por lo que el objetivo de este trabajo es conocer la frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo destinados para el consumo humano, en mercados municipales del área metropolitana de la ciudad de Toluca, México.

En México existen muchas variantes en las condiciones sanitarias de la carne; estas condiciones son dependientes del desarrollo económico de la industria y como consecuencia un impacto en las medidas higiénicas de los rastros y de los puntos de venta, que favorece la presencia y desarrollo de patógenos, en donde la

carne y sus derivados actúan como vehículos potenciales para la transmisión de estos patógenos (Braña *et al.*,2012).

Cabe resaltar que en México existen Normas Oficiales como la NOM-091-SSA1-1994 y NOM-121-SSA1-1994 establecen cero tolerancia a la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos y leche pasteurizada, mientras que en otros alimentos no se aplica ninguna política. Aunque la NOM-143-SSA1-1995 contempla los procedimientos microbiológicos para la detección de *L. monocytogenes* en los alimentos, sin embargo no se han implementado, por parte del gobierno ni de la industria alimentaria, leyes o programas que regulen la inocuidad de los alimentos en relación con *L. monocytogenes* (Castañeda *et al.*, 2014).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

a. Historia

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram-positivo, intracelular facultativo, fue descrita por primera vez en 1926 por Murray y colaboradores mientras investigaban una infección epidémica entre conejos y cobayos de laboratorio y la denominaron *Bacterium monocytogenes* porque infectaba a los leucocitos sanguíneos (Carmona, 2010).

Pirie en 1930 aisló de hígado de gerbos una bacteria similar a la que denominó *Listerella hepatolytica* en nombre del famoso cirujano Joseph Lister el cual fue uno de los primeros científicos que relacionó la asepsia con un menor número de casos de infecciones; es importante citar que anteriormente el nombre de "*Listerella*" fue adoptado por un grupo de mohos productores de mucílago. A pesar de la considerable confusión en la nomenclatura del patógeno, se adoptó el nombre oficial de *Listeria monocytogenes* en 1940, de la Sexta Edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Martins *et al.*, 2010).

El primer caso de listeriosis en personas fue confirmado en 1929 por Nyfeldt; sin embargo, fue en la década de los 80s cuando se produjo un aumento importante en el número de casos de listeriosis asociados al consumo de alimentos contaminados (Amaro, 2002).

En un principio se desconocía que este patógeno podía ser transmitido por los alimentos. Esto cambió cuando en los Estados Unidos de Norteamérica ocurrieron los brotes de 1981 y 1985, los cuales fueron causados por la ingestión de alimento contaminado con *Listeria monocytogenes*. En 1985 el alimento implicado fue queso blando mexicano, hecho con leche sin pasteurizar. A nivel

mundial *L. monocytogenes* ha sido descrito como uno de los principales y más severos patógenos transmitidos por los alimentos (Wang *et al.*, 2013).

b. Clasificación

Clasificación taxonómica de *Listeria monocytogenes*:

Dominio: *Bacteria*

Filo: *Firmicutes*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Listeriaceae*

Género: *Listeria*.

Especie: *monocytogenes*

(Graves *et al.*, 2010)

En el género *Listeria* se han descrito taxonómicamente diez especies: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii* subesp. *ivanovii* y subesp. *londoniensis*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi* subesp. *grayi* y subesp. *murrayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subesp. *fleischmannii* y subsp. *coloradensis*. Las especies nuevas (*L. rocourtiae*, *L. marthii*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii* subesp. *fleischmannii* y subesp. *coloradensis*) se aíslan principalmente de muestras del entorno y son poco frecuentes (OIE, 2014).

Las especies patógenas para el ser humano son *Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes*, siendo esta última la que se aísla principalmente de casos humanos y la responsable de la mayor parte de las infecciones que afectan al hombre; aunque se han registrado algunos casos de infecciones producidas por *L. ivanovii* (Guillet *et al.*, 2010).

En cuanto a la serotipificación se ha discriminado trece serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7. No todas las cepas de *L. monocytogenes* parecen tener igual capacidad de causar enfermedad en humanos. Los serotipos responsables de la mayoría de las listeriosis humanas han sido: 1/2 a, 1/2b, 1/2c y 4b; sin embargo, caracterizaciones fenotípicas y genotípicas relacionadas sugieren que el serotipo 4b ha sido responsable de los más importantes brotes de listeriosis humanas transmitidas por alimentos (Muñoz *et al* 2012).

c. Características morfológicas y bioquímicas

Su motilidad es debida a un flagelo polar cuyo componente principal es la proteína flagelina; los antígenos flagelares se conocen como antígenos H y los codifica el gen *flaA* cuya expresión es dosis-dependiente respecto de los factores medioambientales, generalmente alimentos, que contienen represores de la expresión del gen *flaA* (Tresse *et al.*, 2009).

Listeria puede crecer a temperaturas entre 0 y 42°C (Cuadro 1), aunque son eliminadas por medio de la pasteurización. También puede ser cultivada de medios con un amplio rango de pH, preferiblemente a pH neutro, por lo que puede encontrarse contaminando una gran variedad de alimentos (Chasseignaux *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Valores óptimos de crecimiento de *L. monocytogenes*

Parámetro	Optimo
Temperatura	30-37°C
pH	7,0
Actividad de agua (aw)	0,97

Fuente: (FSAI, 2005)

Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México.

En cuanto a sus características bioquímicas (Cuadro 2), *Listeria monocytogenes* es un microorganismo con reacción positiva a la prueba de la catalasa y oxidasa negativo; las reacciones de Vogues- Proskauer y rojo metilo son positivas, no producen indol ni ácido sulfhídrico (H₂S). Además, produce ácido por la fermentación de varios azúcares: D-glucosa, D-arabitol, ramnosa, no reduce el nitrato y produce β-hemolisis en agar sangre, debido a la producción de listeriolisina O (exotoxina hemolítica y citolítica) (Jay, 2000).

Especie	Movilidad	Hemolisis β	Reducción de Ácidos a partir de			Prueba CAMP	
			Manitol	Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	-	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	+	-	-	V	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	+	-	-	V	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	(+)	-	-	+	(+)	-
<i>L. grayi</i>	+	-	+	V	-	-	-

V: variable; (+): reacción débil; +: >90% reacciones positivas; -: sin reacción.

(Jay, 2000; OIE, 2014)

d. Patogenia

L. monocytogenes es una bacteria que causa zoonosis, ya que infecta a una gran variedad de animales como al vacuno, ovino, aves, roedores, peces y crustáceos incluido el humano. Al ser un patógeno oportunista puede sobrevivir y multiplicarse fuera de los hospedadores animales, por lo que es un importante contaminante medioambiental, de relevancia a nivel de salud pública (OIE, 2014).

Se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria y una bacteria patógena emergente, ya que a partir de 1980 se empezó a aislar de alimentos a consecuencia de cambios en la producción, procesamiento y distribución de estos. Además, de los cambios de hábitos con la

alimentación de la población, ya que se comprobó un incremento en el consumo de alimentos LPC (Swaminathan, 2001).

El riesgo de que se presente una listeriosis se incrementa en personas consideradas de “alto riesgo”, entre las que se encuentran mujeres embarazadas, neonatos, personas inmunodeprimidas y personas mayores (>65 años) (Vázquez *et al.*, 2001).

L. monocytogenes puede invadir el ojo y la piel del hombre después de una exposición directa, se ha observado también en accidentes de laboratorio y en veterinarios (Vázquez *et al.*, 2001).

Si bien los alimentos son la principal ruta de adquisición y, por lo tanto, el tracto gastrointestinal es el primer sitio de entrada de *L. monocytogenes* al hospedero. Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hemato-encefálica y placentaria (Vera *et al.*, 2013).

Después de la ingesta de alimentos contaminados y antes de alcanzar el intestino, esta bacteria debe soportar el ambiente adverso del estómago, al menos 13 proteínas de estrés oxidativo y 14 proteínas de “shock tóxico”, son inducidas bajo condiciones de estrés (Vázquez *et al.*, 2001).

Al cruzar la barrera intestinal, la bacteria se absorbe desde el lumen intestinal siendo captadas por los enterocitos o células M próximas a las placas de Peyer en el intestino delgado dándose la multiplicación en las células fagocíticas, atravesando las células epiteliales y si el sistema inmune no es capaz de controlar eficientemente la infección, la bacteria seguirá multiplicándose y la infección puede

diseminarse al torrente sanguíneo y a los ganglios linfáticos (Vázquez *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2013).

Tras el ingreso al torrente sanguíneo, la mayoría de las bacterias alcanza el hígado y el bazo, donde puede replicarse en el interior de macrófagos o células epiteliales. Si la replicación de *L. monocytogenes* no es controlada por una efectiva respuesta inmune innata, la bacteria escapa y continúa replicándose. La sobrevivencia del hospedero depende del desarrollo de una efectiva respuesta inmune adaptativa; de otro modo, la bacteria puede ingresar nuevamente al torrente sanguíneo y alcanzar el cerebro o la placenta, causando infecciones sistémicas potencialmente letales (Vera *et al.*, 2013).

El período de incubación de la listeriosis es en promedio de 3 a 4 semanas, con extremos de 3 a 90 días. El riesgo está marcadamente elevado en las mujeres embarazadas y sus fetos, los ancianos y los individuos con cuadros de inmunodepresión (Rodríguez *et al.*, 2011).

El motivo por el que *L. monocytogenes* produce una grave infección, se debe a la capacidad que tiene de inducir su propia fagocitosis por células del huésped, seguido por la replicación en el interior de las mismas y su transferencia directa a otra célula. Como *L. monocytogenes* es un microorganismo intracelular, se disemina protegido de las defensas del huésped incluyendo anticuerpos y complemento (Cossart *et al.*, 2003).

e. Ciclo intracelular de *L. monocytogenes*

El proceso de infección comprende varias etapas: adhesión e invasión de la célula hospedera, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y proliferación

extracelular (Figura 1). En cada una de estas etapas están involucrados múltiples factores de virulencia.

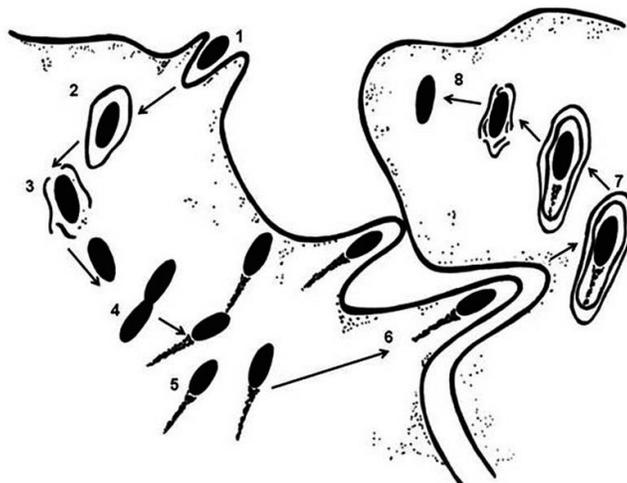


Figura 1. Esquema del ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes*. **1.** Entrada en la célula hospedera; **2.** Sobrevivencia dentro de la vacuola fagocítica; **3.** Disrupción de las membranas del fagosoma y escape al citosol; **4.** Replicación en el citosol; **5.** Movimiento a través de la polimerización de actina; **6.** Propagación célula-célula; **7.** Sobrevivencia en fagosomas secundarios; **8.** Escape del fagosoma secundario y reinicio del ciclo (Tomado de Vera *et al.*, 2013).

L. monocytogenes posee factores de virulencia que favorecen su fagocitosis, seguida de la replicación intracelular y su posterior transferencia a células vecinas para esta bacteria. El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula y subsecuente penetración de la bacteria dentro de las células del hospedero. El proceso es mediado por la proteína internalina (InIA) y InIB (otro miembro de la familia de internalinas, caracterizada por la presencia de unidades repetitivas de leucina) y otros factores de internalización, en respuesta, las bacterias quedan dentro del fagosoma en las células del huésped como enterocitos, hepatocitos,

células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos (Bonazzi *et al.*, 2009; McCaffrey, 2004).

Para que *L. monocytogenes* atraviese la barrera intestinal, es crucial la participación de InIA; en cambio, estudios más recientes han determinado que tanto InIA y InIB son fundamentales para la invasión placentaria. Pocos estudios han abordado los mecanismos empleados en el cruce de la barrera hemato-encefálica, la cual conduce a meningoencefalitis. La única proteína posiblemente involucrada, lo cual ha sido sugerido por los estudios *in vitro*, es InIB. Aunque se ha propuesto que E-cadherina también podría estar participando, considerando su expresión en las células que constituyen el epitelio de la barrera hemato-encefálica (Stavru *et al.*, 2011; Lecuit, 2005).

Después de la internalización, *L. monocytogenes* escapa del fagosoma por la secreción de LLO, la cual lisa la membrana fagolisosomal y le permite a la bacteria escapar al citoplasma donde puede polimerizar actina. En pocas horas *L. monocytogenes* se cubre de filamentos de actina, lo cual facilita su desplazamiento dentro del macrófago y posteriormente provoca la desmanación a macrófagos contiguos (Seiler *et al.*, 2004; Dramsi y Cosart, 2002).

Una vez que las bacterias se multiplicaron en el citosol de la célula huésped, se desplazan utilizando la nucleación de filamentos de una proteína, actina (ActA). Esto produce un movimiento dirigido de las bacterias hacia la membrana celular de la célula huésped y promueve estructuras semejantes a pseudopodos que se extienden dentro de las células vecinas. Este mecanismo hace que se infecte la célula y la bacteria quede dentro de una vacuola de doble membrana (Cossart *et al.*, 2003).

Una vez que la bacteria ha escapado de la vacuola, se replica en el citoplasma gracias a la proteína de superficie p60, la cual cataliza la división celular de *L. monocytogenes* (Park *et al.*, 2000).

Las ATPasas ClpC y ClpE son proteínas de estrés que ayudan en el fraccionamiento de la membrana vacuolar y en la sobrevivencia intracelular de *Listeria*. La ClpC modula la expresión de otra proteína bacteriana denominada actA y de las internalinas a nivel transcripcional (Gaillot *et al.*, 2000).

f. Factores de patogenicidad y virulencia

Los genes de virulencia de *L. monocytogenes* se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad. Seis de los factores de virulencia responsables de la infección intracelular de *L. monocytogenes* son *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*, los cuales están organizados en una isla cromosomal de 9Kb conocida como grupo de genes de virulencia dependiente de PrfA la cual es conocida como isla 1 de patogenicidad de Listeria (LIPI-1) (Figura 2).

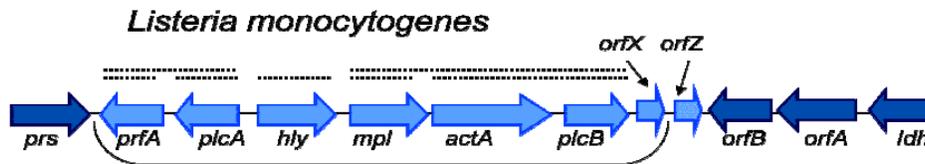


Figura 2. Organización física y transcripcional de genes de virulencia de *Listeria monocytogenes* (Tomado de Vázquez *et al.*, 2001).

El gen *prfA* es el activador transcripcional de los principales genes de virulencia de *L. monocytogenes*, la expresión del regulador de virulencia vía PrfA depende de diversas señales ambientales como: temperatura (37°C), condiciones

de estrés, contacto con células del hospedador y del ambiente citoplasmico del hospedero (Renzoni *et al.*, 1999).

El principal factor de virulencia de *L. monocytogenes* es la listeriolisina O (LLO), la cual es una hemolisina codificada en el gen *hly*. La LLO pertenece a la familia de las toxinas formadoras de poro dependientes de colesterol (CDTX) y se ha demostrado que es requerida para sobrevivir y proliferar dentro de macrófagos y células fagocíticas. La función principal de la LLO es perforar la membrana del fagosoma por medio de anillos formados de LLO que se insertan en la membrana permitiendo que se generen poros, los cuales permiten la liberación de la bacteria al citoplasma (Dramsi y Cosart, 2002).

La listeriolisina O es una exotoxina hemolítica y citolítica que actúa como un factor crítico de virulencia de *L. monocytogenes*. *Listeria* se disemina célula a célula sin ponerse en contacto con el medio extracelular, lo que explica la necesidad de una inmunidad mediada por células (Torres *et al.*, 2004).

g. Cuadro clínico

En el hombre se reconocen dos tipos de Listeriosis: invasiva y no invasiva, la primera produce la mayor tasa de hospitalización y de mortalidad (60%-80%), la segunda produce gastroenteritis con baja tasa de hospitalización y mortalidad (Tabla 3) (Vázquez *et al.*, 2001; FAO, 2004).

Los síntomas de esta enfermedad de transmisión alimentaria son variables, desde un cuadro leve, que simula una gripe con fiebre, dolores musculares y sintomatología gastrointestinal, hasta una sepsis grave, sobre todo en edades extremas de la vida (recién nacidos y ancianos) y pacientes inmunodeprimidos, causa aborto en mujeres embarazadas, neumonía y granulomas diseminados en

recién nacidos, meningitis y meningoencefalitis, e incluso septicemia causando la muerte del individuo (Ooi y Lorber, 2005).

Los casos de listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril por listerias) se han observado en algunos brotes en los que la mayoría de los casos presentaron síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. Estos brotes se han producido generalmente tras la ingestión de dosis altas de *L. monocytogenes* por personas previamente sanas (FAO, 2004).

No obstante, se desconoce la incidencia real, el inóculo necesario para causar enfermedad varía notablemente dependiendo de la cepa y de la situación del huésped, aunque las personas inmunocompetentes suelen ser menor. Aproximadamente 24 horas (rango entre 6 y 240 horas) después de la ingesta del alimento contaminado, los pacientes se convierten en portadores asintomáticos o sufren deposiciones acuosas, náuseas, vómitos, cefalea, artromialgias y fiebre, síntomas que suelen limitarse en dos días, salvo que padezcan algún tipo de inmunodepresión (Sánchez y Palencia, 2010).

La listeriosis invasiva se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles, como el útero grávido, el sistema nervioso central o la sangre, o combinaciones de éstos (FAO, 2004).

En las gestantes que experimentan un inmunocompromiso relativo fisiológico y en las que generalmente no se detectan otros factores de riesgo conocidos para sufrir listeriosis, la forma más frecuente de presentación es la fiebre sin foco aparente y con pocos síntomas, la mayoría experimentan entre 2 y 6 semanas después de la infección una bacteriemia que suele cursar con un síndrome

pseudogripal leve, con fiebre, escalofríos, artromialgias, lumbalgia, tos, cefalea, mareo o síntomas gastrointestinales (cualquier combinación o uno sólo de estos síntomas y signos), suele resolverse espontáneamente salvo que ocasione amnionitis, la meningitis es muy rara (Sánchez y Palencia, 2010).

La gravedad de la listeriosis materna radica sobre todo en el tercer trimestre y más aún si el embarazo es múltiple suele provocar aborto, muerte fetal intraútero, mayor tasa de cesáreas, prematuridad, sepsis y muerte neonatal. Algunas ocasiones, la forma clínica más frecuente en inmunodeprimidos es la bacteriemia sin foco identificable, que cursa con fiebre, deterioro rápido y a menudo fulminante (Suárez *et al.*, 2007).

Los pacientes pueden tener meningitis, meningoencefalitis, la afectación cerebral es caprichosa, supra o infra-tentorial, difusa o localizada formando abscesos. La infección del sistema nervioso central, en general, es menos frecuente en las gestantes. La meningoencefalitis afecta a neonatos (periodo perinatal precoz), adultos mayores de 60 años e inmunodeprimidos, aunque un 30% de los pacientes no tienen factores subyacentes identificables. El aspecto clínico oscila entre un cuadro sutil con fiebre y cambios cognitivos, hasta el curso fulminante y coma. El diagnóstico puede verse retardado, ya que más del 40% de los pacientes no tienen signos meníngeos en la presentación que suele ser más atípica e insidiosa que en otras meningitis bacterianas (Cuadro 3) (Sánchez y Palencia, 2010).

En los animales, las manifestaciones clínicas de la listeriosis incluyen encefalitis, septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas. La forma septicémica es relativamente poco común y por lo general, pero no de manera invariable, se produce en el recién nacido. Se caracteriza por depresión, inapetencia, fiebre y muerte. La forma rombencefálica se denomina “enfermedad de los círculos” por una tendencia de los animales a desplazarse en círculos en un

único sentido, que es el signo más frecuente de la enfermedad en los rumiantes. Además, está entre las causas más habituales de enfermedad neurológica en los rumiantes. Los signos clínicos son depresión, anorexia, presión y giro de la cabeza hacia un lado, y parálisis unilateral de pares craneales, esto último se debe a la afectación de los pares craneales y de sus núcleos en el tronco encefálico (OIE, 2014) (Figura 3 A y B).

El aborto se produce, por lo general, en la última etapa (después de 7 meses en vacas y 12 semanas en ovejas). Normalmente sólo tiene lugar una forma clínica de listeriosis en un grupo particular de animales. También se ha descrito la oftalmatitis ovina. Asimismo, se asocia la mastitis de rumiantes con la infección por *L. monocytogenes*. (Jacquet *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2004).

Cuadro 3. Descripción epidemiológica y clínica de la Listeriosis en humano

Tipo de Listeriosis		Modo de transmisión	Severidad	Periodo de incubación
Listeriosis invasiva	Infección neonatal temprana	Infección de neonatos durante el parto o por contaminación cruzada con neonatos en salas de recién nacidos	Puede ser extremadamente severa, resultando en meningitis y muerte (mortalidad de hasta 35%)	1-2 días (incubación y temprana) habitual en la infección congénita previa al nacimiento 5 – 12 días en el caso de contaminación con otros neonatos
	Infección neonatal tardía	10-15% de los casos neonatales transferencia en el canal vaginal	Involucra periodos febriles, meningitis en algunos casos diarrea y neumonía (mortalidad de 13-43% en pacientes tratados y 100 % de mortalidad en pacientes no tratados)	1-8 semanas postparto.
	Durante el embarazo (prenatal)	Adquirida por el consumo de alimentos contaminados	Enfermedad leve, asintomática para la madre (afección respiratoria leve o moderada). Serias implicaciones para el feto incluyendo: aborto espontáneo, muerte del feto, mortinato y meningitis. Es más común en el tercer trimestre.	De uno a varios días incluso semanas

			La mujer puede portar el microorganismo en el tracto genital por algún tiempo, ocasionando complicaciones en embarazos posteriores.	
	Adultos >65 años inmunosuprimidos	Consumo de alimentos contaminados	Puede evolucionar a enfermedades del sistema nervioso central incluida meningitis. Tasa de mortalidad puede llegar a 80%	De 1 día a 3 meses con un promedio de 20-30 días.
Listeriosis no invasiva		Consumo de alimentos contaminados con concentración elevadas de <i>L. monocytogenes</i> (10^7 UFC/a).	Vómito, diarrea, fiebre, náuseas, dolor de cabeza y fatiga puede evolucionar a bacteriemia, suele ser auto-limitante. No genera complicaciones. La información sobre los mecanismos que utiliza <i>Listeria</i> para desarrollar la enfermedad no se ha logrado establecer	<24 horas después del consumo.

(McLauchlin *et al.*, 2004)



Figura 3. A) Manifestación clínica típica de meningoencefalitis causada por *L. monocytogenes* en oveja. En una primera etapa se observa torticollis involuntaria y marcha en círculos, B) En una fase posterior a la imagen anterior, observamos postración, incoordinación y pedaleo. El pronóstico en estos casos es fatal (Tomado de Vázquez *et al.*, 2001).

Cuando se produce listeriosis en cerdos, la manifestación primaria es septicemia, son menos frecuentes los casos de encefalitis y raros los abortos. Aunque las aves son portadoras subclínicas habituales, se han descrito casos esporádicos de listeriosis, siendo más frecuente la septicemia y mucho menos común la aparición de meningoencefalitis. La listeriosis aviar puede ser el resultado de una infección secundaria en condiciones de enfermedad vírica y salmonelosis (Wesley, 2007).

Los hallazgos *post mortem* y la histopatología en la listeriosis animal, dependen de la presentación clínica. En la forma encefálica, el fluido cerebroespinal puede estar turbio y los vasos meníngeos congestionados. Son raras las lesiones patológicas globales del cerebro. En ocasiones, la médula espinal muestra áreas de reblandecimiento. Sin embargo, la enfermedad muestra lesiones histopatológicas características que consiste en focos de células inflamatorias con manguito perivascular adyacente, predominando linfocitos e histiocitos, células plasmáticas y ocasionalmente neutrófilos. Los micro-abscesos en el tronco cerebral son

frecuentemente unilaterales y pueden mostrar licuefacción del neurópilo. La mayoría de las veces están implicadas la médula espinal y la protuberancia anular. En la forma septicémica, pueden detectarse focos múltiples de necrosis en el hígado y, con menor frecuencia, en el bazo (OIE, 2008).

Las evidencias indican que la listeriosis animal es sobre todo una enfermedad de transmisión alimentaria, siendo el medio ambiente la fuente principal de contaminación de los alimentos. El ensilado es la fuente más frecuente de listeriosis transmitida por alimentos (OIE, 2014).

h. Epidemiología

En 2012, se reportaron 1,642 casos humanos confirmados de Listeriosis (Cuadro 4), un aumento del 10,5% en comparación con el 2011. La tasa de notificación en la Unión Europea (UE) fue de 0,41 casos por 100,000 habitantes, con las tasas más altas de notificación observadas en Finlandia, España y Dinamarca (1,13, 0,93 y 0,90 casos por cada 100.000 habitantes, respectivamente). La tasa de notificación más baja se registró en Rumanía (0,05 casos por cada 100,000 habitantes) (EFSA, 2014).

Analizando otros datos publicados por la (EFSA, 2012) se puede ver que los productos cárnicos fueron los que más casos positivos de *L. monocytogenes* obtuvieron, en mayor medida los elaborados con carne de cerdo y bovino (32%), seguido de pescado y productos del mar (29%), alimentos LPC (19%), carne de ave (13%), productos lácteos (12%), vegetales (10%), teniendo porcentajes muchos menores los quesos (1%). Dada la gran diversidad de alimentos implicados, y el carácter de *L. monocytogenes* de colonizar cualquier lugar, en las últimas décadas se han ido produciendo diferentes brotes, en el mundo (EFSA, 2014).

Cuadro 4: Casos notificados de Listeriosis humana en el período 2008-2012, y la tasa de notificación para casos confirmados en la Unión Europea de 2012

Pais	2012				2011	2010	2009	2008
	Tipo ¹ de informe	Casos	Casos confirmados	Casos confirmados / 100,000	Casos confirmados			
Austria	C	36	36	0.43	26	34	46	31
Bélgica	C	83	83	0.75	70	40	58	64
Bulgaria	A	10	10	0.14	4	4	5	5
Chipre	C	1	1	0.12	2	1	0	0
República Checa	C	32	32	0.30	35	26	32	37
Dinamarca	C	50	50	0.90	49	62	97	51
Estonia	C	3	3	0.22	3	5	3	8
Finlandia	C	62	62	1.13	43	71	34	40
Francia	C	348	348	0.53	282	312	328	276
Alemania	C	427	427	0.50	330	337	395	306
Grecia	C	11	11	0.10	10	10	4	1
Hungría	C	13	13	0.13	11	20	16	19
Irlanda	C	11	11	0.24	7	10	10	13
Italia ²	C	36	36	-	100	137	109	118

Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México

Letonia	C	6	6	0.29	7	7	4	5
Lituania	C	8	8	0.27	6	5	5	7
Luxemburgo	C	2	2	0.38	2	0	3	1
Malta	C	1	1	0.24	2	1	0	0
Países Bajos	C	73	73	0.44	87	72	44	45
Polonia	C	54	54	0.14	62	59	32	33
Portugal ³	-	-	-	-	-	-	-	-
Rumania	C	11	11	0.05	1	6	6	0
Eslovaquia	C	11	11	0.20	31	5	10	8
Eslovenia	C	7	7	0.34	5	11	6	3
España ⁴	C	107	107	0.93	91	129	121	88
Suecia	C	72	72	0.76	56	63	73	60
Reino Unido	C	183	183	0.30	164	176	235	206
Total de la Unión Europea		1,658	1,642	0.41	1,486	1,643	1,675	1,425
Islandia	C	4	4	1.25	2	1	0	0
Liechtenstein		-	-	-	-	-	0	0
Noruega	C	30	30	0.60	21	22	31	34
Suiza ⁵	C	39	39	0.50	47	67	41	43

1. A: Los datos agregados presentados; C: Los datos referidos a base de casos; - : ningún informe.
2. Los datos provisionales para 2012 como varias regiones aún no han informado de sus casos. Por lo tanto, la tasa de notificación no puede ser estimada.
3. No existe un sistema de vigilancia
4. Vigilancia centinela; las tasas de notificación calculados sobre la cobertura estimada del 25 %.
5. Suiza proporcionó los datos directamente a la EFSA

(Tomado de EFSA, 2014)

Entre los últimos brotes de listeriosis ocurridos destacan por su importancia el que tuvo lugar en Canadá en 2008. El brote se originó en las líneas 8 y 9 de producción de deli-meats de la fábrica de Maple Leaf Foods, se cree que alrededor de 220 productos presentaron contaminación de *L. monocytogenes* dando lugar a 57 casos de listeriosis y 23 decesos (CIDRAP, 2008).

El mayor brote de listeriosis en la historia de EE.UU. se produjo en el 2011 afectando a 28 estados provocando 147 personas enfermas, 33 muertes y 1 aborto involuntario; el brote se asoció con el consumo de melón contaminado proveniente de una sola granja (CDC, 2011).

La CDC (2011) estima que anualmente en los Estados Unidos aproximadamente 1,600 personas enferman y 260 muertes son debido a la listeriosis.

En México, los estudios epidemiológicos sobre la incidencia y presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son escasos. Europa y Estados Unidos cuentan con dependencias como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), respectivamente. Éstas tienen como funciones vigilar la inocuidad alimentaria y realizar la supervisión activa de las ETA, incluida la listeriosis, con el propósito de contribuir a la reducción de las tasas de morbilidad y mortalidad por este padecimiento.

En contraste, y debido principalmente a la falta de instituciones responsables de la vigilancia de ETA asociadas con *L. monocytogenes*, en México no se cuenta con estimaciones precisas de la prevalencia de esta bacteria, ni del costo económico que representa. Sin embargo existe la Dirección General de Epidemiología (DGE), pero no cuenta con información epidemiológica precisa que

permita evaluar el impacto de la listeriosis en la población. (Castañeda *et al.*, 2014). y es considerada dentro del grupo 3 como enfermedad endémica en el Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos (SAGARPA, 1994).

i. Impacto económico de *L. monocytogenes*

El costo económico que suponen las enfermedades alimentarias es muy elevado, recientemente se han realizado cálculos para estimar los costos económicos de las enfermedades alimentarias en EE.UU. Los costos incluidos en esta estimación incluyen: impacto a la salud pública, costos médicos, pérdida de productividad, valoración de mortalidad prematura. En el estudio realizado por Hoffmann se aportan también estimaciones desagregadas de los cinco patógenos que ocasionan aproximadamente un 90% de los costos económicos (Cuadro 5) (Hoffmann, 2012).

Microorganismos	Coste estimado
<i>Salmonella enterica nontyphoidal</i>	3.300 millones \$
<i>Campylobacter spp.</i>	1.700 millones \$
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.600 millones \$
<i>Toxoplasma gondii</i>	3.000 millones \$
Norovirus	2.000 millones \$

Cuadro 5: Costo anual estimado de enfermedades alimentarias en EE.UU., causadas por los cinco patógenos alimentarios más relevantes. (Tomado de Hoffmann, 2012)

En México no se cuenta con estimaciones precisas del costo económico que representa esta enfermedad. (Castañeda *et al.*, 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

L. monocytogenes se considera uno de los agentes más importantes de enfermedades de transmisión alimentaria. Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos como un asunto de máximo interés de Salud Pública comprenden los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos.

Además del impacto económico de la listeriosis en animales, existe una conexión entre los animales y su papel como fuente de infección para el hombre, bien sea como resultado del contacto directo con animales infectados, especialmente durante el parto de vacas u ovejas, o bien después del consumo de productos de origen animal contaminados.

Esta bacteria tiene importancia por su potencial patógeno tanto para los animales de abasto como para el hombre que es el consumidor primario, por lo que en este estudio se pretende conocer la frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo destinados al consumo humano expedidos en los mercados públicos de la ciudad de Toluca, México.

IV. HIPÓTESIS

Existe una frecuencia de *Listeria monocytogenes* igual o menor a 2.07% en carne de cerdo y res provenientes de los mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la frecuencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* en carne de cerdo y res destinados para el consumo humano, en mercados Municipales del área metropolitana de la ciudad de Toluca, México.

Objetivos específicos

- Conocer la frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de cerdo destinados para el consumo humano, en mercados Municipales del área metropolitana de la ciudad de Toluca, México.
- Conocer la frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res destinados para el consumo humano, en mercados Municipales del área metropolitana de la ciudad de Toluca, México.
- Determinar la frecuencia de *Listeria monocytogenes* por local y mercado en la ciudad de Toluca, México.
- Elaboración de cepario de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* Para referencia de futuros trabajos en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UAEMex.

VI. MATERIALES

a. Biológico

Para el presente estudio se requirieron de 93 muestras de carne de cerdo y res, provenientes de los 6 Mercados municipales (Miguel Hidalgo, Benito Juárez, Morelos, 16 de Septiembre, Central de abastos y Mercado del Seminario) correspondientes a el área metropolitana de la Ciudad de Toluca, Estado de México.

b. Muestreo

- Bolsas de polietileno
- Termo refrigerante
- Termómetro
- Libreta de registro
- Marcadores
- Lápiz
- Guantes de látex

c. Equipo de protección en el laboratorio

- Bata de laboratorio
- guantes de látex,
- Cubre bocas
- Guantes de protección contra el calor y/o fuego

d. Laboratorio

Medios de Cultivo

- Medios de Cultivo
- Caldo de enriquecimiento para listeria
- Agar Oxford OXA
- Agar Palcam PLM
- Base de agar sangre
- Medio de SIM

Reactivos

- Alcohol-acetona
- Cristal violeta
- Solución de Yodo
- Solución de Safranina
- Caldo nitratos
- Caldo rojo de fenol para fermentación de carbohidratos al 0,5 %: maltosa, ramnosa, y xilosa
- Caldo nitrato
- Zinc
- Solución al 3% de peróxido de hidrógeno
- Agua destilada
- Alcohol

e. Cristalería

- Cajas de Petri
- Tubos de 16 x 125 mm
- Tubos de 13 x 100 mm u otros con tapón de rosca
- Matraces con tapa de rosca de 500 ml

- Pipetas volumétricas de 25, 10 y 1,0 ml
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Tubos plástico Falcon 50ml y 15 ml

f. Diversos

- Gradilla de alambre para 60 tubos
- Portaobjetos 26 x 76 mm
- Cubreobjetos
- Papel Aluminio
- Protección personal
- Mechero
- Aceite de inmersión
- Asas bacteriológicas

g. Equipo

- Estufa Bacteriológica
- Autoclave
- Microscopio
- Balanza analítica

VII. METODOLOGÍA

1. Determinación de tamaño de muestra

Para calcular el tamaño de la muestra se utilizó el programa Epi info™ versión 7, en el programa se introdujeron los parámetros:

- Tamaño de la población: 6 mercados en la ciudad de Toluca, en total de carnicerías de estos mercados fueron 75.
- Frecuencia esperada: se tomó en cuenta el estudio realizado por la (EFSA, 2013) donde se observó una prevalencia de 2.07 para *Listeria monocytogenes* en carne.
- Límite de confianza: 5%
- Nivel de confianza: 95%
- Tamaño de muestra: 31

Sustituyendo: con la formula se obtuvieron el mismo resultado.

Formula:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2}$$

Dónde:

- $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$ (Nivel de confianza de 95%)
- $p =$ proporción esperada (en este caso 2.07% = 0.0207)
- $q = 1 - p$ (en este caso $1 - 0.0207 = 0.979$)
- $d^2 = (0.05)^2$

$$n = \frac{1.96^2 (0.0207) (0.979)}{(0.05)^2} = 31.0$$

(Wayne, 2006)

Una vez que se determinó el tamaño total de la muestra se ponderaron en los 6 mercados de forma proporcional al número de locales. Obteniéndose las muestras como se indica en la (Cuadro 6).

Se seleccionó la muestra través de una tabla de número aleatorios, se realizaron 3 repeticiones del muestreo para tener un total de 93 muestras. (Dawson *et al.*, 2005).

Cuadro 6. Número de muestras de acuerdo al mercado

Mercado	Número de locales	% muestras	Numero de muestras
16 de septiembre	28	37.33	11
Benito Juárez	16	21.33	7
Miguel Hidalgo	5	6.6	2
José Ma. Morelos	4	5.3	2
Central de Abastos	20	26.66	8
Mercado del Seminario	2	2.6	1
Total	75	100	31

2. Recolección de la muestra

Las muestras se recolectaron de los locales seleccionados a través de la tabla de numero aleatorios (Dawson *et al.*, 2005), de los seis mercados principales de Toluca, Estado de México. Para la determinación del tipo de carne según la especie res o cerdo, la asignación fue realizada al azar. El tipo de corte de carne para este estudio fue bistec. Intervalo de tiempo para la recolección de muestras se abarco 2 meses para la obtención total de los 3 muestreos.

En proceso de recolección de las muestras, estas se depositaron en bolsas de plástico previamente identificadas (Nombre del mercado, número o nombre del local, tipo de carne y numero de muestreo).

Para la conservación de las muestras se utilizó un termo refrigerante, manteniéndolas a una temperatura de 4° C para ser transportadas inmediatamente al Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) en el Área de inocuidad alimentaria; de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

3. Aislamiento Bacteriológico

La técnica que se utilizó para la determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* se basó en la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

El análisis de 25g de la muestra analítica (carne de res o cerdo) fue una proporción de 1:10 muestra/caldo.

Se pesó asépticamente la muestra y se adiciono al medio de enriquecimiento (EB) Caldo Selectivo para *Listeria*, se homogenizo, enroscando suave la tapa, dejándose incubar por 48 ± 2 h a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Después de las 48 hrs de incubación en el medio de enriquecimiento, se sembraron en el medio Palcam LMP bajo condiciones asépticas, se incubaron las placas a 36°C por 24 horas, sino se observó crecimiento se dejaron 24 horas más.

Se examinaron las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Listeria* spp., se empleó luz blanca en un ángulo de 45° (iluminación de Henry). Agar PLM: colonias de grises a verdes rodeadas de halos de color marrón oscuro a negro en el medio. Agar Oxford: colonias pequeñas blanquecinas, con halo oscuro sobre fondo claro.

Una vez que se identificaron las colonias se seleccionaron cinco o más colonias típicas del medio LMP para resembrarlas en el medio Oxford y se incubó durante 24 horas. Después de 48 horas, esta colonia típicamente se observó un diámetro de 2 a 3 mm, permaneciendo negras con un halo negro, pero desarrollan un centro hundido.

Este paso fue importante debido a que las colonias aparentemente aisladas en los medios OXA y LMP pueden estar contaminadas con flora competitiva parcialmente inhibida, invisible a simple vista. Debido a que puede estar presente más de una especie de *Listeria* en la muestra, se identificaron como mínimo cinco colonias.

4. Identificación

Se utilizaron cepas de referencia, *Listeria monocytogenes* como control positivo y *E. coli* como control negativo para cada una de las pruebas.

Se realizó la tinción de Gram de cultivos de 24 y 48 h. Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos Gram positivo; sin embargo, en cultivos viejos pueden presentarse como formas cocoides.

Para la Prueba de catalasa. Se emulsificó un cultivo puro, con una gota de solución de peróxido al 3% colocada sobre un portaobjetos. La formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva, las especies de *Listeria* son catalasa positiva.

Para la prueba de movilidad en agar se inoculó en el medio SIM, se incubó por 7 días a temperatura ambiente (20-25 °C), y se realizaron las observaciones diariamente. Las especies de *Listeria* son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas.

La prueba de utilización de carbohidratos se realizó al inocular tubos de caldo rojo de fenol para fermentación de carbohidratos al 0,5 %: ramnosa, y xilosa. Se incubaron durante 7 días a 35 °C. Una coloración amarilla indica una prueba positiva.

En la prueba de hemólisis se dibujó una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa de agar sangre de carnero al 5% y se inocularon por picadura un cuadro por cada cultivo, se incubará por 48 h a 35°C y se observó la reacción hemolítica en las placas.

Prueba reducción de nitratos se inocularon los tubos conteniendo caldo nitrato e incubados a 35°C por 5 días, para la lectura de esta prueba, se agregó 7 gotas de reactivo A y posteriormente 7 gotas reactivo B (reactivos para la determinación de nitritos), un color rojo indica una prueba positiva (presencia de

nitritos). A los tubos que no se observó reacción se adiciono zinc en polvo, el desarrollo de un color naranja confirma una prueba negativa (presencia de nitritos).

Para la prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) se emplearon cepas *S.aureus* y *R. equi*, en una placa de agar sangre de cordero se sembró una estría de la cepa de *S.aureus* y paralelamente una de *R.equi*, separadas lo suficiente para que entre estas se pudieran estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse. Después de 24 y 48 horas de incubación a 35°C, se observó el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria monocytogenes* que se manifiesto como una zona hemolítica más intensa (Figura 4).

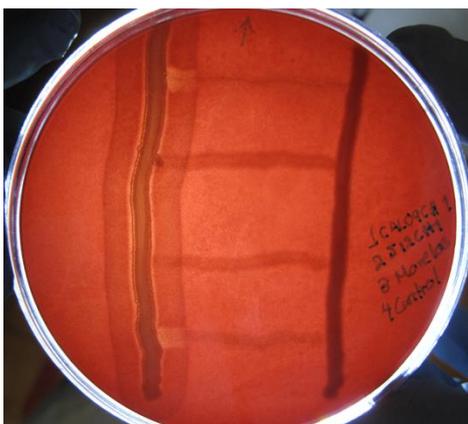
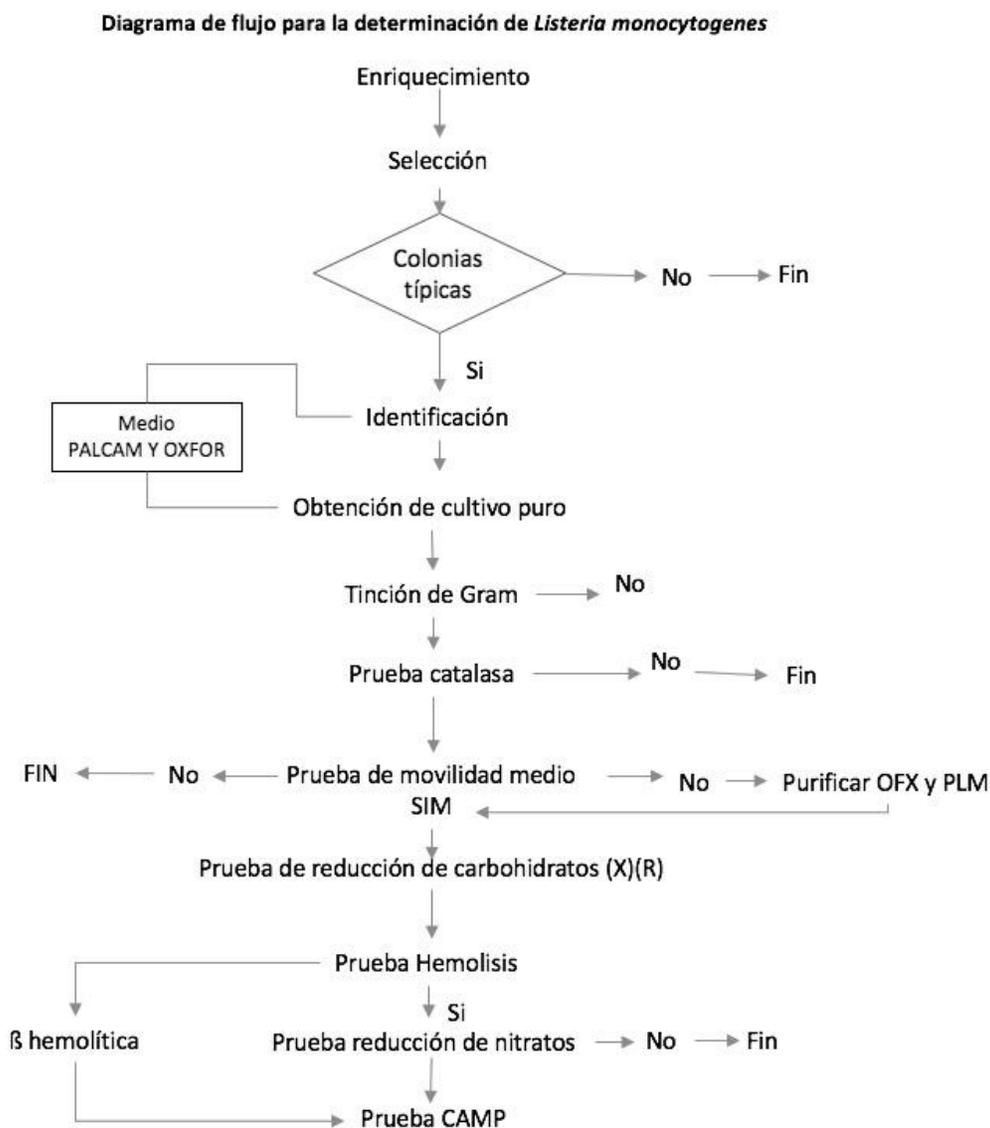


Figura 4: Prueba de CAMP de la muestra L09 Central de abastos.

La disposición de las estrías de los cultivos en la placa para la prueba de CAMP la hemolisis de *L. monocytogenes* se incrementa cerca de la *S. aureus*, y la hemolisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes no son hemolíticas en esta prueba.

Diagrama 1. Aislamiento bacteriológico de *Listeria monocytogenes*.



5. Análisis Estadístico

Los resultados fueron evaluados por medio de la prueba ji-cuadrada.

VIII. LÍMITE DE ESPACIO

Las muestras para este estudio se tomaron las carnicerías de los mercados: 16 de septiembre, José Ma. Morelos, Miguel Hidalgo, Central de Abastos Toluca, Benito Juárez y mercado del Seminario ubicados dentro de la zona metropolitana de la ciudad de Toluca, Estado de México y fueron procesadas en el Área de inocuidad alimentaria del Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México; ubicado en el Km. 15.5 de la carretera panamericana en el tramo Toluca - Atlacomulco.

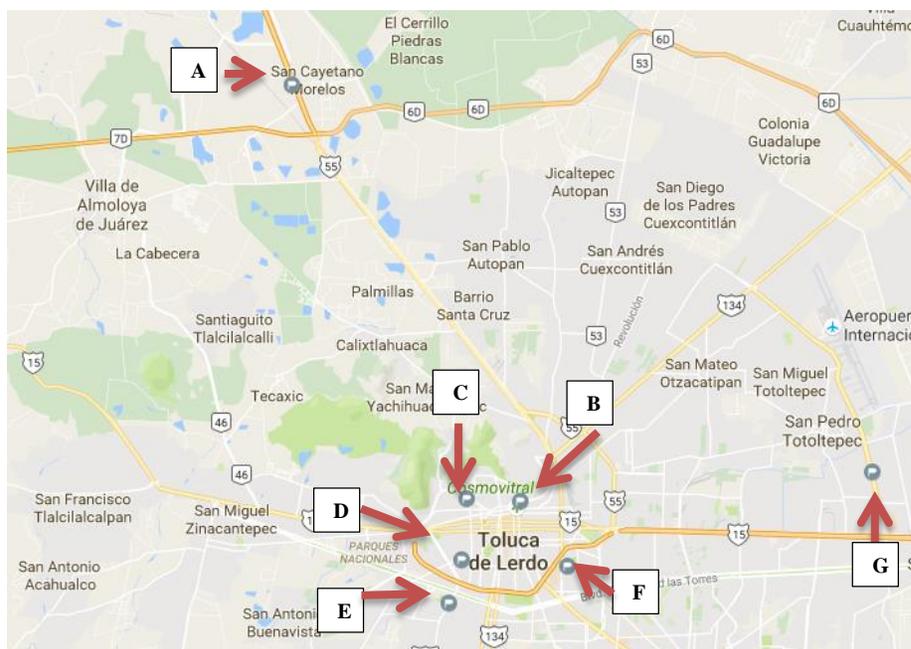


Figura 5: Mapa de límite de espacio, Toluca, Estado de México. Sitios del estudio con coordenadas A) CIESA (19.399158,-99.712965), B) Mercado 16 Septiembre (19.295206,-99.652449), C) Mercado Miguel Hidalgo (19.295887,-99.66756), D) Mercado Morelos (19.269671,-99.671264), E) Mercado Seminario (19.2696710,-99.671264), F) Mercado Benito Juárez (19.279180,-99.640103), G) Central Abastos Toluca (19.302451,-99.559808).

IX. LÍMITE DE TIEMPO

El tiempo requerido para el desarrollo del presente trabajo fue de 8 meses comprendido del 30 de septiembre del 2016 al 30 de mayo 2017.

Primer bimestre: Se recabo información de las principales revistas científicas en las bibliotecas de las universidades (UNAM, UAM, IPN) y de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM,

Segundo bimestre: Se realizó el muestreo y aislamiento bacteriológico.

Tercer bimestre: Se realizaron las pruebas bioquímicas para la identificación de cepas positivas a *Listeria monocytogenes*.

Cuarto bimestre: Realización de pruebas estadísticas para el análisis de los resultados y redacción de la tesis.

X. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de acuerdo a las características morfológicas y bioquímicas, se observó que, de un total de 93 muestras de carne de res y cerdo, se obtuvieron 2 (2.15%) muestras positivas para *Listeria monocytogenes*, 33 (35.48%) muestras positivas para *Listeria spp.* y 58 (62.37%) de las muestras resultaron ser negativas en el presente estudio. (Cuadro 7)

Cuadro 7. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* aislada de carne de res y cerdo de los 6 mercados en la ciudad de Toluca, Estado de México.

Total de muestras de carne	Número de muestras positivas a <i>Listeria monocytogenes</i>		Numero de muestras positivas a <i>Listeria spp.</i>		Número de muestras negativas.	
	Número	%	Número	%	Número	%
93	2	2.15	33	35.48	58	62.37

Del total de muestras obtenidas por mercado en la ciudad de Toluca, Estado de México. La frecuencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* se observó solo en 2 mercados que fueron: Mercado 16 de Septiembre 3.03% y la central de abastos 4.2%. El porcentaje de aislamiento de *Listeria spp.* para cada uno de los mercados fue: Mercado 16 de Septiembre 27.27%, Mercado Benito Juárez 38.10%, Mercado Miguel Hidalgo 50.00%, Mercado Morelos 50.00%, Central de Abastos 33.33%, Mercado seminario 66.67% (Cuadro 8), no mostrando significancia estadística ($P>0.05$).

Cuadro 8. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.* de acuerdo al número de muestras obtenidas por mercado. Toluca, Estado de México.

Mercado	Número de muestras obtenidas	Muestras positivas a <i>Listeria monocytogenes</i>		Muestras positivas a <i>Listeria spp.</i>		Muestras negativas a <i>Listeria spp.</i>	
		Número	%	Número	%	Número	%
16 de septiembre	33	1	3.03	9	27.27	23	69.70
Benito Juárez	21	0	0	8	38.10	13	61.90
Miguel Hidalgo	6	0	0	3	50.00	3	50.00
Morelos	6	0	0	3	50.00	3	50.00
Central de abastos	24	1	4.2	8	33.33	15	62.50
Mercado Seminario	3	0	0	2	66.67	1	33.33

(P>0.05).

Nota

■ Muestra positiva de *Listeria monocytogenes* en los Mercados 16 de Septiembre y Central de abasto.

De las 93 muestras obtenidas de los seis principales mercados, solo en dos mercados se aisló *Listeria monocytogenes* en carne de cerdo, el porcentaje que mostraron fueron: Mercado 16 de septiembre 1.08% y central de abastos 1.08%; en los seis mercados se encontró la presencia de *Listeria spp.* en ambos tipos de carne, el porcentaje de la presencia de *Listeria spp.* en carne de res para cada mercado fue: Mercado 16 de Septiembre 4.30%, Mercado Benito Juárez 3.23%, Mercado Miguel Hidalgo 2.15%, Mercado Morelos 2.15%, Central de abastos 4.30% y Mercado Seminario 1.08%. Mientras que el porcentaje de la presencia de *Listeria spp.* en carne de cerdo fue: Mercado 16 de Septiembre 5.38%, Mercado Benito Juárez 5.38%, Mercado Miguel Hidalgo 1.08%, Mercado Morelos 1.08%, Central de

abastos 4.30% y Mercado Seminario 1.08%. (Cuadro 9), no mostrando significancia estadística ($P > 0.05$).

Representando un total de 17.20% en carne de res y 18.28% en carne de cerdo muestras positivas respecto al número de muestras obtenidas en total del estudio.

Cuadro 9. Frecuencia de los aislamientos de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. según el tipo de carne del total de las muestras obtenidas de los seis mercados principales de Toluca, Estado de México.

Mercado	Número de locales muestreados	Número de muestras obtenidas	Muestras positivas <i>Listeria monocytogenes</i>				Muestras positivas de <i>Listeria</i> spp.				Muestras negativas a <i>Listeria</i> spp			
			Res		Cerdo		Res		Cerdo		Res		Cerdo	
			Número	%	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
16 de septiembre	11	33	0	0	1	1.08	4	4.30	5	5.38	12	12.90	11	11.83
Benito Juárez	7	21	0	0	0	0	3	3.23	5	5.38	8	8.60	5	5.38
Miguel Hidalgo	2	6	0	0	0	0	2	2.15	1	1.08	1	1.08	2	2.15
Morelos	2	6	0	0	0	0	2	2.15	1	1.08	2	2.15	1	1.08
Central de abastos	8	24	0	0	1	1.08	4	4.30	4	4.30	5	5.38	10	10.75
Mercado Seminario	1	3	0	0	0	0	1	1.08	1	1.08	0	0.00	1	1.08
Total	31	93	0	0	2	2.15	16	17.20	17	18.28	29	31.18	29	31.18

(P>0.05).

Respecto a la distribución de locales por muestreo se observó que los 2 aislamientos de *Listeria monocytogenes* fue en el Muestreo 1, local L9 del mercado Central de abastos y en el Muestreo 2 del local L22 del mercado 16 de septiembre, cabe resaltar que ambos resultados fueron a partir de muestras de carne de cerdo. *Listeria spp* en los tres muestreos presento el aislamiento en la carne de res y cerdo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Distribución de los locales por muestreo de los seis mercados principales de Toluca, Estado de México.

Mercado	Muestreo 1						Locales por mercado
	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Listeria spp.</i>		Negativas		
	Res	Cerdo	Res	Cerdo	Res	Cerdo	
1	-	-	L4	L15, L16, L22	L3, L1, L18, L28	L1, L9, L24	11
2	-	-	L10, L16	L12	L1, L6	L4, L14	7
3	-	-	L1	-	L4	-	2
4	-	-	L4	-	L1	-	2
5	-	L9	L7	L13	L2, L15	L11, L12, L20	8
6	-	-	-	-	-	L1	1
Sub Total							31
Muestreo 2							
1	-	L22	L13	L4, L15	L1, L3, L9, L16, L18, L24	L28	11
2	-	-	L10	L6, L12	L4, L14, L16	L1	7
3	-	-	-	L1	-	L4	2
4	-	-	L4	-	-	L1	2
5	-	-	L3	L2, L9, L11	L20	L7, L12, L15	8
6	-	-	-	L1	-	-	1
Sub Total							31
Muestreo 3							
1	-	-	L4, L28	-	L3, L22	L1, L3, L9, L15, L16, L18, L24	11
2	-	-	-	L1, L12	L6, L10, L1	L4, L16	7
3	-	-	L1	-	-	L4	2
4	-	-	-	L1	L4	-	2
5	-	-	L9, L12	-	L2, L13	L7, L11, L15, L20	8

Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en carne de res y cerdo en mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México

6	-	-	L1	-	-	-	1
Sub Total							31
Total							93

Nota:

1. Mercado 16 de Septiembre
2. Mercado Benito Juárez
3. Mercado Miguel Hidalgo
4. Mercado morelos
5. Central de abastos
6. Mercado Seminario
- L. Local

XI. DISCUSIÓN

La frecuencia de *Listeria monocytogenes* obtenida (2.15%) en este trabajo se encuentra por arriba de lo reportado en la Unión Europea 2.07% en carne (EFSA, 2014), así como de los estudios realizados en México 1.66% en productos con carne molida y España 2.9% en carne (Sánchez *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2001); si embargo este resultado es menor a lo reportado en otros trabajos similares; como en el caso de Italia donde se analizaron canales de cerdo con 3% (Annunziata *et al.*, 2012), Estados Unidos 3.5%, Italia 9.5%, Japón 12.2%, y Marruecos 16.4% en muestras de carne molida de res (Comi *et al.*, 1992; Inoue *et al.*, 2000; Kriem *et al.*, 1998), Colombia 3.7% de canal de cerdo (Gamboa *et al.*, 2012). Venezuela 5% en muestras de cortes de carne de cerdo (Rivera *et al.*, 2006), España 5.9% de productos cárnicos (Marco y Yangüela, 2010). (Cuadro 7)

Con respecto a la frecuencia obtenida de *Listeria* spp. (35.48%) encontrada en el presente trabajo (Cuadro 7) se encuentra por debajo de lo reportado en la investigación de Soriano que reporta un aislamiento del 56.6% de aislamiento de *Listeria* spp. (Soriano *et al.*, 2001). Si bien, (Cuadro 8), se observó que *Listeria* spp. se aislo en todos los mercados del estudio, el porcentaje de numero de muestras obtenidas por mercado, mostraron valores considerablemente altos tomando en cuenta el tamaño de muestra de este trabajo, estos probablemente reflejan la falta de medidas higiénicas, sanitarias y manejo de la carne en los locales de cada mercado.

(Cuadro 9) El aislamiento de *Listeria* spp. en carne de res fue de 17.20%, este resultado está por debajo en comparación a la investigación realizada en México en carne de res cruda que fue de 20%, (Heredia *et al.*, 2001); en cuanto a la carne de cerdo se obtuvo 18.28% siendo menor que en la investigación de (Pinner *et al.*, 1992) donde reportaron 19.5% en carne de cerdo. Se mostró también que el aislamiento

de *Listeria* spp. en carne de cerdo fue mayor que la carne de res, y así mismo los aislamientos de *Listeria monocytogenes* se obtuvieron solo de carne de cerdo; en comparación con otros trabajos en este estudio se esperaba encontrar mayor aislamiento en carne de res como se observó en (Heredia *et al.*, 2001) por la suposición de que como la mayoría de los casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes y en los cerdos rara vez se desarrolla la enfermedad, pudiera verse reflejado una mayor positividad de aislamientos de *Listeria monocytogenes* en carne de res. Sin embargo, para la salud pública es más relevante la contaminación a partir del medio ambiente en el que se procesan los alimentos (OIE, 2014).

En el estudio realizado en la Unión Europea donde se analizaron 33,000 unidades de carne de cerdo, del cual se detectó 3.2% de muestras a *Listeria* spp. el periodo del estudio fue de 2011-2012 (EFSA, 2014). En otro estudio realizado en Hungría (EFSA, 2014) en una planta de procesadora se obtuvieron 122 muestras de jamón crudo, registraron un resultado de 3.7% positivas a *Listeria monocytogenes*, realizando ese estudio en el 2011 y registrando esa aportación el mismo año. En España se encontró 2.9% *L. monocytogenes* (Soriano *et al.*, 2001) realizó el estudio en el periodo de Septiembre de 1999 a Marzo de 2000, el número de muestras fue de 103 de alimentos crudos y LPC.

Sin embargo, se debe de considerar que el tipo de muestreo que se realizó en el presente trabajo fue con una duración de 2 meses, realizando el muestreo por mercado, lo cual se considera un tipo de muestreo corto en comparación con las investigaciones anteriores señaladas.

Esto es importante señalarlo, ya que como se puede observar, la duración del muestreo y el tamaño de la muestra van en relación directa con el porcentaje de positividad.

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, carne, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de los mataderos, sin embargo, la especie patógena para el ser humano es *Listeria monocytogenes*.

En este trabajo el porcentaje de la presencia de *Listeria monocytogenes* para los dos mercados en la que se aislaron fue de: 1.08 % en la Central de abastos del local L9, muestreo 1 y Mercado 16 de Septiembre 1.08% local L22 muestreo 2. (Cuadro 9 y 10). Estos resultados deben de ser tomados en cuenta desde el punto de vista epidemiológico ya que la presencia de *Listeria monocytogenes* representa un riesgo potencial como fuente de infección al humano. (Cuadro 10) Para el muestreo de los locales se realizó una distribución ponderada, representativa y homogénea de los locales por mercado de la ciudad de Toluca, Estado de México.

XII. CONCLUSIONES

El aislamiento de *Listeria monocytogenes* se obtuvo 2 aislamientos positivos.

La frecuencia de aislamiento de *Listeria* spp. a partir de muestras de carne de res y cerdo en los mercados de la ciudad de Toluca, Estado de México fue de 37.53%

Listeria spp. se observó en todos los mercados muestreados.

La frecuencia de aislamiento de *Listeria* spp. a partir de muestras de carne de res fue de 17.20%, mientras que en la carne de cerdo la frecuencia fue de 18.28%.

Se obtuvieron dos aislamientos de *Listeria monocytogenes* en los mercados Mercado 16 de Septiembre local (L22) y la Central de abastos local (L9) ambas en carne de cerdo.

De los resultados obtenidos en este trabajo se elaboró un cepario de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. para referencia de futuros trabajos en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UAEMex.

XIII. SUGERENCIAS

Se recomienda la realización de estudios de vigilancia epidemiológica que permitan conocer el comportamiento y la frecuencia de *Listeria monocytogenes*.

Además, se sugiere realizar la identificación los serotipos existentes para determinar los posibles focos de infección.

La implementación del sistema de análisis de riesgo y control de puntos críticos se debe implementar de manera obligatoria en la industria alimentaria; no obstante a nivel de puntos de venta como los mercados el sistema es voluntario, por lo que para hacerle frente al riesgo de la contaminación por *Listeria monocytogenes* en los alimentos se sugiere realizar programas de vigilancia, mejorar las medidas sanitarias, aplicación de buenas prácticas de higiene, y buenas prácticas de manufactura además de implementar planes periódicos de monitoreo de *L. monocytogenes* mediante organismos gubernamentales competentes, universidades y centros de investigación, y así mismo determinar la magnitud, frecuencia y distribución de este microorganismo.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. Amaro L, M. A. (2002). Listeriosis de origen alimentario. Curso de Sanidad Animal y Salud Pública: Zoonosis. Murcia
2. Annunziata, V., Rizzi, V., Acciari, V., Iannetti, L., Giovannini, A., Serraino, A., Calderone, D., Rossi, D., Morelli, D., Marino, L., Migliorati, G., y Caporale, V. 2012. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25, 150-158.
3. Bonazzi M, Lecuit M, Cossart P. (2009): *Listeria monocytogenes* internalin and E- cadherin from structure to pathogenesis. *Cell Microbiol*; 11: 693-702.
4. Braña D, Vélez A, Espinosa JA, Moctezuma G, Pérez MM, Jolalpa JL, Martínez G, Esparza AL. (2012) Calidad en puntos de Venta de Carne. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y mejoramiento animal. Macroproyecto "indicadores de la calidad en la cadena de producción de carne fresca en México". Ajuchitlán, Colon, Querétaro. Folleto Técnico No.22 ISBNBN: 978-607-425-954-4.
5. Carmona, M. D. (2010). Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.
6. Castañeda RG, Eslava CC, Castro CN, León FJ, Chaidez QC. (2014). Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*, 56(6), 654-659. URL: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342014000600016&lng=es&tlng=es. (Consultado en septiembre 2016).
7. CDC (2011). Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe--United States, August-September 2011. <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>, (consultado en octubre del 2016)

8. Chasseignaux E, Gerault P, Toquin M, Salvat g, Colin P, Ermel G. (2002): Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *Microbiol Lett.* 210: 271-275.
9. CIDRAP (2008) Center for Infectious Disease Research and Policy. University of Minnesota, Minneapolis 2008. URL: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/> (consultado en septiembre 2016).
10. Clark R.G., Gill J.M. & Swanney S. (2004). *Listeria monocytogenes* gastroenteritis in sheep. *NZ Vet. J.*, 52,46–47.
11. Comi G., Frigerio R, Cantoni C (1992). *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. *Letters in Applied Microbiology* 15: 168-171
12. Cossart P, Pizarro J, Lecuit M. (2003): Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 13: 23–31.
13. Dawson, B., Trapp, R. and Arias Rebatet, G. (2005). *Bioestadística médica*. 4th ed. México: El Manual Moderno, p.329.
14. Dramsi S, Cossart P. (2002) Listeriolysin O: a Genuine Cytolysin Optimized for an Intracellular Parasite. *J Cell Biol* 156: 946-946.
15. EFSA (2014): The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf>, (14 de September del 2016).
16. EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal* 2013;11(6):3241, 75 pp.
17. EFSA. 2007. Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods and the

- related risk for human illness. EFSA (Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). The EFSA Journal, 599, 1-42.
18. FAO (2000) Informe de la Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos Asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos. Consulta de Expertos AD HOC sobre la Evaluación de Riesgos Asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos; Roma, 27-30.
 19. FAO (2004): Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: caracterización de peligros (relación entre la dosis y la respuesta), Roma. <http://www.fao.org/docrep/009/y5393s/y5393s0a.htm>. (consultado en septiembre de 2016).
 20. FSAI. (2005) Food Safety Authority of Ireland. The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food. Abbey Court Lower Abbey Street Dublin 2005 pp 94.
 21. Gaillot O, Pellegrini E, Bregenholt S, Nair S, Berche P. (2000). The ClpP Serine Protease is Essential for the Intracellular Parasitism and Virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 35: 1286-1294.
 22. Gamboa A, Buitrago M, Pérez K, Mercado R, Marcela, Poutou P, Carrascal C. (2012). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork-meat and other processed products from the Colombian swine industry. *Revista MVZ Córdoba*, 17(1),2827-2833. URL: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01220268201200100004. (consultado en agosto 2016).
 23. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, Den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Sauders BD. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:1280–1288.1288
 24. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka MK, Scotti M, Disson O, Berche P, Vazquez-Boland J,

- Lortholary O, y Lecuit M. (2010): Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 136-138.
25. Heredia N, García S, Rojas G, Salazar L. (2001) Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *J Food Prot*; 64:1249-1251.
26. Hoffmann, S., Batz, M. B., Morris Jr., J. G. (2012): Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*, Volume 75, Number 7, pp. 1292-1302.
27. Inoue S, Nakama A, Arai Y, Kokubo Y, Maruyama T, Saito A, Yoshida T, Terao M, Yamamoto S, Kumagai S. (2000). Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *International Journal of Food Microbiology* 59: 73-77
28. Jacquet C., Gouin E., Jeannel D., Cossart P. & Rocourt J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 616–622.
29. Jay J.M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*. Cuarta Edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza.p. 457-480.
30. Kriem M, Marrakchi A, Hamama A. (1998). Prevalence of *Listeria* spp. on a variety of meat products in Morocco. *MAN Microbiologie, Aliments, Nutrition* 16: 179-187.
31. Lecuit M. (2005): Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect*; 11: 430-6.
32. Marco RN, Yangüela MJ (2010). *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC. Resistencia a los antibióticos. Departamento de Producción Animal y Ciencias de los Alimentos, Universidad Zaragoza. España.
33. Martins IS, Faria FC da Conceição, Miguel MAL, et al., (2010): “A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults,” *The American Journal of Infection Control*, vol. 38, no. 9, pp. 31–36.

34. McCaffrey R. 2004. A specific expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11386-11391.
35. McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. (2004): *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol.*92(1):15-33.
36. Mengoni GB, Apraiz PM. Monitoring of a HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) plan for *Listeria monocytogenes* control. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35: 224-7.
37. Muñoz, A. Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, (2012). Colombia, 2000-2009. *Biomédica*, [S.l.], v. 32, n. 3, p. 408-17, apr. 2012. ISSN 0120-4157. URL: <<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/709/1554> (consultado en agosto 2016).
38. NOM-091-SSA1-1994. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias 1994.
39. NOM-121-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias 1994. URL:<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>. (Consultado en octubre de 2016)
40. NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. URL: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/143ssa15.html>. (Consultado en octubre de 2016).
41. OIE. (2004) Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. URL: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.14_Listeria_monocytogenes.pdf, (consultado en septiembre 2016).
42. OIE. (2008) Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008. URL: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.07.%20Listeria%20monocytogenes.pdf, (consultado en noviembre 2016)

43. OIE. (2014): Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2015. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.07_Listeria_monocytogenes.pdf, (consultado en septiembre de 2016).
44. Ooi, S.T. y Lorber, B. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases* 40, 1327-1333.
45. Park JH, Lee YS, Lim YK, Kwon SH, Lee CU, Yoon BS. (2000) Specific Binding of Recombinant *Listeria monocytogenes* p60 Protein to Caco2 Cells. *FEMS Microbiol Lett* 186(1): 35-40.
46. Pinner, R.W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P.S., Deaver, K.A., Weaver, R.E. y Plikaytis, B.D. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. *Journal of the American Medical Association*, 267: 2046–2050.
47. Renzoni A, Cossart P, Dramsi S (1999). PrfA, the Transcriptional Activator of Virulence Genes, is Upregulated During Interaction of *Listeria monocytogenes* with Mammalian Cells and in Eukaryotic Cell Extracts. *Mol Microbiol* 34: 552-561.
48. Rivera F, Wesley I, Hurd S, Simoes D, Sosa A, Rivera S. 2006. Microbiological and molecular detection of *Listeria spp* and *Listeria monocytogenes* in a cull sows process plant in USA. *Rev Cient FCV-LUZ* 16: 297-307.
49. Rodríguez S, Salud S, Marfil N, Jodral V. (2011). *Listeria monocytogenes*. En patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino: Fundamentos de seguridad alimentaria (39-54). Córdoba: Ediciones Díaz de Santos.
50. SAGARPA (1994) Diario Oficial de la Federación el Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos,
51. Sánchez BA, Palencia HE. (2010): Infecciones por *Listeria*. http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Listerias_Medicine2010.pdf, (consultado en septiembre de 2016).

52. Sánchez FJ, Mata V, Espinoza A, Villareal L. Incidencia de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL* 2006;9:51-56.
53. Seiler P, Ulrico S, Kaufmann HES. (2004) Role of Innate Immunity in Bacterial Infection. *The Innate Immune Response to Infection*. 433-441.
54. Soriano, J. M. Molto J.C. and Mañes, J. (2001) *Listeria* Species in Raw and Ready-to-Eat Foods from Restaurants. *J. Food Prot.* 64: 551-553.
55. Stavru F, Archambaud C, Cossart P. (2011): Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunological Revs*; 240: 160-84.
56. Suárez MM, Bautista RM, Almela M, Soriano A, Marco F, Bosch J. (2007): Bacteriemia por *Listeria monocytogenes*: análisis de 110 casos. *Med Clin (Barc)*; 129:218-21.
57. Swaminathan B. (2001). *Listeria monocytogenes*. *En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Second Edition*, Doyle M.P., Beuchat L.R. & Montville T.J., eds. ASM Press, Washington, DC, EE.UU., 383–409.
58. Torres K J, Sierra S C, Poutou R.A, Vera H, Carrascal AK, Mercado, M. (2004). Incidencia y Diagnóstico de *Listeria monocytogenes* Microorganismo Zoonótico Emergente en la Industria de Alimentos. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 7(1): 25- 57
59. Tresse, O., Lebret, V., Garmyn, D. & Dussurget, O. (2009): The impact of growth history and flagellation on the adhesion of various *Listeria monocytogenes* strains to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology*. 55: 189-196.
URL:<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/091ssa14.html>.
(Consultado en octubre de 2016).
60. Vázquez JA, Kuhn M, Berche P. (2001): *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14(3):584-640. doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.

61. Vera A, González G, Dominguez M, Bello H. (2013): Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v30n4/art10.pdf>, (consultado en agosto del 2016).
62. Wang HL, Ghanem KG, Wang P, Yang S, Li TS. (2013): Listeriosis at a tertiary care hospital in Beijing, China: high prevalence of nonclustered healthcare-associated cases among adult patients. *Clinical Infectious Diseases*. vol. 56, No 5, pp. 666–676.
63. Wayne WD. 2006. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa. México.
64. Wesley IV. (2007): Listeriosis in animals. *In: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, Ryser E.T. & Marth E.H., eds. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, 55–84.