



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

**Identificación de *Listeria monocytogenes*, en médula oblonga y carne
procesada ovina, con prueba rápida InSite Listeria® y técnicas de
identificación bacteriana**

TESIS

Que para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista

PRESENTA

Karla Verónica Hernández Ruíz

ASESORES:

Dr. en CARN. Humberto Gustavo Monroy Salazar
M. en C. Pomposo Fernández Rosas
Dr. en C. Roberto Montes de Oca Jiménez

REVISORES.

MVZ. Salvador Lagunas Bernabé
M. en DAES. Rene Ayala Ocampo



Toluca, México; Abril de 2018

TÍTULO

Identificación de *Listeria monocytogenes*, en médula oblonga y carne procesada ovina, con prueba rápida InSite Listeria® y técnicas de identificación bacteriana

El presente trabajo de tesis, se realizó con el auspicio de la Universidad Autónoma del Estado de México, Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, y el Cuerpo Académico de Epidemiología y Salud Pública Veterinaria.

En el proyecto de investigación 4038/2016A.

“Evaluación de calidad de la carne de ovino fresca y procesada, con empleo de biosensores y cultivo bacteriano”.

AGRADECIMIENTOS

La idea de materialidad como evidencia del otro abre camino al espectador para aproximarse y reconocer la conciencia de otro, de otros, reconocerse a sí mismo.

"Empecé a darme cuenta de lo valioso que son los criterios, las soluciones técnicas y la carga emocional del que colabora en mi trabajo. Yo quería que se viera su trabajo y ahora es un elemento fundamental en mi obra".

- Javier Marín, escultor.



“Reflejo VII”, 2015

A todos mis ascendientes, sin los cuales no estaría hoy, aquí; a mi familia, a mi madre, que soportó animales de estudio o rescatados en la casa, olores y cosas extrañas en el refrigerador, además de un sinfín de sacrificios.

A mis amigas Nataly y Cristina, con las que comparto apoyo incondicional, proyectos, logros, descubrimientos, sueños, aprendizaje y diversión.

A la familia Hernández López y a la Sra. Rufina Josefa Hernández Fernández, por su inmensa hospitalidad y cercanía.

A mis padrinos, por estar siempre pendiente de mí, por sus consejos, cariño y ayuda constante.

A mi tutorazo, Dr. José Mauro Victoria Mora, por su tiempo, consejos y el apoyo que siempre me ha brindado, por ser modelo a seguir, por su guía.

Al Dr Sotelo, por sembrar la visión de la salud pública en el ejercicio profesional.

A mi director de tesis, Dr. Humberto Gustavo Monroy Salazar y mis asesores, Dr. Montes de Oca y Dr. Pomposo, por darme cabida en este proyecto, por creer en mí, por su paciencia, enseñanzas, apoyo y por todo el aprendizaje final en mi formación de la licenciatura.

A mis revisores, Quim. Guadarrama, Dra. Ada Elia, MVZ. Salvador Lagunas y M. en DAES. René Ayala por su tiempo y sugerencias, por su paciencia, sinceridad y apertura.

A la familia Quiroz Mercado, por el gran apoyo que me han proporcionado; a Jorge, por los ánimos, correcciones, tips de tesista y todo lo demás.

A Hector que me ayudó con los microorganismos, a Carlos que me ayudó con mil cuestiones técnicas y preocupacionales.

A los docentes, a todos ellos, a los que me dieron clases y a los que no, por crear y mantener a la FMVZ como lo que es y ha sido, por brindarnos lo mejor de sí, su pasión,

vocación, tiempo, conocimiento, valores, consejos, y muchas veces su amistad. Al excepcional profesor, médico, persona, guía: Raul Reynoso Isrrade por ser modelo a seguir.

A la Dra. Angélica Espinoza, por su mano siempre dispuesta, por aquel pequeño empujón.

A Liz, Kary, Silvia, Elder, Suryday y el Sr. Julián, que siempre me regalaron de su maravilloso tiempo, alegría y amabilidad. Liz, gracias por tu nobleza, entusiasmo y apoyo incondicional. Al Dr Nava por su altruismo.

Al PhD. Raúl Fajardo Muñoz, por sus enseñanzas, consejos y observaciones certeras.

Al MVZ Miguel Ulises Pulido Gómez por su apoyo, y al equipo “chiens”, por la oportunidad de aprender y trabajar a su lado, por sus consejos; a Mariana por su entusiasmo y amistad.

A todos los que laboran en la FMVZ, porque todos ellos en algún momento me han ayudado y brindado una sonrisa.

A mis compañeros de generación y licenciatura, por su compañía y su competencia, que hace que todos seamos cada vez mejores.

A mi alma máter UAEMex, a mi querida FMVZ segundo hogar, al CIESA campo de aprendizaje.

A ti, que te diste el tiempo de leer mi trabajo.

A Henki, mi tonal.

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno de importancia en la transmisión alimentaria, sin embargo se busca un método de rápido diagnóstico, pues los métodos convencionales tardan alrededor de 5 días para confirmar o descartar su presencia; la prueba InSite Listeria® ofrece un pronto diagnóstico, por lo cual, entre los objetivos del presente trabajo están: comprobar la sensibilidad de la prueba rápida InSite Listeria®, a través de técnicas de aislamiento e identificación bacteriológicas, y determinar si el uso de la misma como técnica diagnóstica, es rápida, oportuna y eficiente.

La barbacoa normalmente se expende en puestos “callejeros”, lo cual, junto con las prácticas de manejo, favorecen la presencia de diversos microorganismos contaminantes como *Listeria monocytogenes*. Debido a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo general identificar la presencia de *Listeria monocytogenes*, en médula oblonga y barbacoa ovina por medio de la prueba rápida InSite Listeria® y pruebas bacteriológicas convencionales. Para ello se recolectaron 200 muestras en dos etapas; en la primera etapa se realizó el muestreo de 100 expendios de barbacoa de la ciudad de Toluca, donde se muestreó barbacoa, realizando encuestas para analizar los factores predisponentes a la contaminación del producto final con la ayuda de estudios de análisis de riesgo de las condiciones del personal de expendio, condiciones del equipo y local de expendio, y condiciones de la ropa de trabajo; en la segunda etapa, se obtuvieron 100 muestras del rastro municipal de Capulhuac, donde 87 muestras de médula oblonga obtenidas de la cabeza de ovinos fueron adecuadas para el estudio según los criterios de aceptación de muestras, y el diagnóstico con el hisopo InSite Listeria®; para esta etapa se realizaron tablas de contingencia para determinar la relación entre los resultados positivos de la prueba rápida, con las condiciones sexo, edad y peso de los ovinos muestreados. A partir de los resultados de ambas etapas se analizaron los factores de riesgo y la sensibilidad y especificidad de InSite Listeria®.

ÍNDICE

TÍTULO	I
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN.....	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE GRÁFICAS	X
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS	30
MATERIAL	31
MÉTODO.....	33
LÍMITE DE ESPACIO	42
LÍMITE DE TIEMPO	43
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	64
SUGERENCIAS	65
LITERATURA CITADA.....	66
ANEXOS.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tabla para evaluar pruebas diagnósticas simples.	41
Tabla 2. Condiciones del personal del expendio de barbacoa	49
Tabla 3. Análisis de riesgo de las condiciones del personal del expendio de barbacoa con hisopo positivo a las 24 horas	50
Tabla 4. Condiciones del equipo y local del expendio de barbacoa	51
Tabla 5. Análisis de riesgo de las condiciones del equipo y local del expendio de barbacoa con hisopo positivo a las 24 horas	52
Tabla 6. Uso de ropa de trabajo por el personal del expendio de barbacoa	53
Tabla 7. Análisis de riesgo de uso de ropa de trabajo por personal del expendio de barbacoa con hisopo positivo a las 24 horas	54
Tabla 8. Tabla de contingencia para edad de ovinos, hisopos positivos a las 24 horas	55
Tabla 9. Tabla de contingencia por sexo de ovinos, hisopos positivos a las 24 horas	56
Tabla 10. Tabla de contingencia para peso de ovinos, hisopos positivos a las 24 horas.....	57
Tabla 11. Análisis de riesgo por edad, sexo y peso de ovinos sacrificados en rastro municipal con hisopo positivo a las 24 horas	58
Tabla 14. Sensibilidad de InSite <i>Listeria</i> ® en médula oblonga:	59
Tabla 15. Resultado de prueba diagnóstica para InSite <i>Listeria</i> ®, en médula oblonga	59
Tabla 16. Sensibilidad de InSite <i>Listeria</i> ® en barbacoa	59
Tabla 17 Resultado de prueba diagnóstica para InSite <i>Listeria</i> ®, en barbacoa	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados presuntivamente positivos con prueba InSite Listeria®	45
Figura 2. Prueba de catalasa para muestras positivas por InSite Listeria®	45
Figura 3. Cultivo OXFORD para pruebas positivas a catalasa	46
Figura 4. Cultivo PALCAM para cepas positivas a OXFORD	46
Figura 5. Pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares (Dextrosa, Manitol, Ramnosa, Xilosa).....	46
Figura 6. Cultivo en medio SIM, para prueba de movilidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	47

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Condiciones del personal del expendio de barbacoa	49
Gráfica 2. Condiciones del equipo y local del expendio de barbacoa	51
Gráfica 3. Uso de ropa de trabajo por el personal del expendio de barbacoa.....	53
Gráfica 4. Resultados de médula oblonga, por edad en ovinos sacrificados en rastro	55
Gráfica 5. Resultados de médula oblonga, por sexo en ovinos sacrificados en rastro	56
Gráfica 6. Resultados de médula oblonga, por peso en ovinos sacrificados en rastro	57

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*), es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, con la capacidad de sobrevivir a temperaturas que van de 0 °C a 45 °C, pH de hasta 9.6 y altas concentraciones de sal <20%; características que le permiten crecer en suelo, cuerpos de agua y alimentos. Es una de las ocho especies del género *Listeria* (*innocua*, *ivanovii*, *welshimeri*, *seeligeri*, *marthii*, *rocourtiae* y *grayi*) y la única que se considera un patógeno de impacto para el hombre (Orsi, *et al.*, 2011).

L. monocytogenes es el agente causal de la enfermedad conocida como Listeriosis, la cual frecuentemente produce meningitis y septicemia en niños, adultos geriátricos y pacientes inmunocomprometidos, además de aborto y muerte fetal en mujeres embarazadas; tiene la capacidad de cruzar las membranas del intestino, placenta y cerebro. Su principal fuente de transmisión son alimentos contaminados (Posfay-Barbe & Wald, 2009; Zunabovic, *et al.*, 2011).

Una amplia variedad de especies animales pueden ser infectadas por *L. monocytogenes*, incluyendo mamíferos, aves, peces y crustáceos, la mayoría de los casos clínicos de Listeriosis ocurren en rumiantes; los cerdos rara vez desarrollan la enfermedad y las aves son generalmente portadoras. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero puede aparecer la enfermedad invasiva esporádicamente o como brote. Los rumiantes pueden jugar un papel como fuente de infección para los seres humanos, principalmente asociado al consumo de subproductos alimenticios contaminados (Roberts & Wiedmann, 2003).

La Listeriosis humana tiene las formas de presentación gastrointestinal e invasiva. La Listeriosis invasiva aparece entre 20 y 30 días después de la ingestión del patógeno; las formas clínicas incluyen septicemia, infección del sistema nervioso central (meningitis, meningoencefalitis), endocarditis e infecciones localizadas, entre 20 y 50% de los casos son mortales. La forma gastrointestinal se caracteriza por náuseas, pirexia, vómito y diarrea; se

presenta en individuos inmunocompetentes, los signos clínicos aparecen 20 horas post-ingestión (Doganay, 2003; Donnelly, 2001).

A principios de 1980, la bacteria se manifestó como un patógeno emergente causante de Enfermedad de Transmisión Alimentaria (ETA), desde entonces se han reportado brotes importantes en Europa y Estados Unidos (Schlech III, *et al.*, 1983).

La importancia de ésta enfermedad se debe a su impacto clínico, alta mortalidad, y el efecto económico por brotes asociados al consumo de alimentos. En 2007 se reportaron 1558 casos de Listeriosis en 27 países de Europa; el índice de mortalidad general fue 20%, elevándose en ancianos a 67%. En 2010, se reportaron en Estados Unidos 1662 casos de Listeriosis con 266 muertes, representando la tercera causa de muerte por ETA (Lahuerta, *et al.*, 2011; Cartwright, *et al.*, 2013; Castañeda-Ruelas, *et al.*, 2014).

En México la Dirección General de Epidemiología (DGE) no cuenta con información epidemiológica que permita evaluar el impacto de la Listeriosis en la población, en 2009 se reportaron 227,597 abortos sin especificación etiológica. En 2013, se registraron 40,147 casos de intoxicaciones alimentarias bacterianas y 966 casos de meningitis; sin diagnóstico etiológico, pudiendo estos casos relacionarse con Listeriosis (Fernández Cantón, *et al.*, 2012).

El propósito del presente trabajo fue identificar la presencia de *Listeria monocytogenes* en médula oblonga y barbacoa de ovino, destinada al consumo humano, utilizando la prueba rápida InSite Listeria® y técnicas de identificación bacteriana.

REVISIÓN DE LITERATURA

Listeria

El género *Listeria* contiene ocho especies (*monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii*, *welshimeri*, *seeligeri*, *marthii*, *rocourtiae* y *grayi*), de las cuales, solo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son de interés en la patología humana y animal. La especie más importante para el hombre y los animales es *Listeria monocytogenes* (Gellin, *et al.*, 1991).

La habilidad de *Listeria* spp., para colonizar y crecer en un amplio rango de ecosistemas se ha correlacionado con la presencia de 331 genes codificantes para distintas proteínas de transporte (Torres, *et al.*, 2005).

Listeria monocytogenes

El número de componentes reguladores del genoma de *Listeria monocytogenes* es similar a otras bacterias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bronchothrix* spp. El análisis de la secuencia de los genomas de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* revelan una relación filogenética con *Bacillus subtilis*, lo que sugiere un origen común para las tres especies (Torres, *et al.*, 2005).

Listeria monocytogenes pertenece a la familia *Corynebacteriaceae*, se describe como un bacilo corto, Gram positivo, intracelular facultativo, oportunista, no esporulado; se considera anaerobio facultativo, pues crece preferentemente en un medio con 10% de CO₂ y se inhibe en medios con 70% de CO₂ y 30% de N₂; mide de 1 a 2µm de largo por 0.5µm de ancho, posee flagelos peritricos, es móvil a temperaturas de entre 20°C y 25°C, es psicotrófico, pues tiene la capacidad de sobrevivir entre los 3°C y los 45°C, estable en medios con pH entre 5 y 9 con un óptimo de 5.8 a 7.0, tolera altas concentraciones de sal <20%; estas características le permiten crecer en suelo, cuerpos de agua y alimentos. Al

observarlo al microscopio a temperatura ambiente presenta un movimiento de deslizamiento semejante a un espiral muy particular, se asemeja morfológicamente a las corinebacterias o a los diplococos Gram positivos; en cultivos viejos se pueden apreciar estructuras filamentosas largas que miden de 6-20 µm de longitud, presentando tinción irregular (Bayles, *et al.*, 1996) (McClure, *et al.*, 1997).

Transmisión Alimentaria

Tras el aislamiento inicial y su descripción en 1926, *Listeria monocytogenes* ha demostrado tener una prevalencia mundial y estar asociada con enfermedad grave en una amplia variedad de animales, incluyendo el hombre (Low & Donachie, 1997).

Un estudio señaló al paté como una posible causa de Listeriosis en el Reino Unido e Irlanda. Entre 1967 y 1982 fueron reportados 100 casos anuales de Listeriosis en Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte. Se interrogó a los pacientes infectados, trece de 15 pacientes cuya enfermedad estaba causada por *L. monocytogenes* habían comido paté dentro de las tres semanas previas a la enfermedad. También se realizaron estudios sobre los patés que se encontraban a la venta en 1989 y 1990, en los que se confirmó la presencia de *L. monocytogenes*. Se advirtió que el paté de determinada fábrica era más propenso a estar contaminado y a niveles más altos que otras fábricas. De 107 muestras de paté de la fábrica, 48% estaban contaminadas. En consecuencia, en julio de 1989 se advirtió acerca del consumo de este alimento y el gobierno suspendió la venta de paté procedente de la fábrica que se identificó como origen del brote; lo que produjo un marcado descenso de la cantidad global de casos (McLauchlin, *et al.*, 1991).

En 1985 *L. monocytogenes* cobró importancia debido a brotes transmitidos por alimentos en la población humana, desde entonces se han reportado brotes en Europa y Estados Unidos, es la quinta causa de meningitis bacteriana en Estados Unidos, pero la segunda más importante en neonatos e individuos mayores de 60 años y continúa siendo una de las

causas mas importantes de Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA) (Schlech, *et al.*, 1983; Songer & Post, 2004).

En Europa en el período comprendido entre 1994 y el año 2000 se notificó una incidencia anual de Listeriosis humana de 0.2 y 0.8 casos/100.000. Esto se traduce en 1600 a 8400 casos por año, con 320 a 2500 muertes. Este amplio rango en las incidencias puede deberse a las diferencias en los sistemas de notificación o a los brotes, que pueden aumentar marcadamente el número de casos. Entre 1991 y 2001, los casos reportados relacionados a brotes ascendieron a 2065; en los cuales, las fuentes de contaminación fueron productos lácteos: desde leche cruda hasta manteca elaborada con leche pasteurizada, incluyendo varios tipos de quesos elaborados con leche sin pasteurizar (Rossi, *et al.*, 2008).

Se ha aislado *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, como cárnicos: salchichas, jamón, mortadela, entre otros; productos marinos salados y quesos. La presencia de *L. monocytogenes* en carne se ha asociado a la contaminación en el ambiente de procesamiento del alimento, como el contacto con superficies sucias, re-embalado, contaminación cruzada entre empleados participantes de diferentes procesos, re-contaminación con exudados de los mismos productos, entre otros (Silva Paz, *et al.*, 2007).

Aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de cárnicos

La amplia distribución de *Listeria* spp. en la naturaleza y las heces de los animales provoca que su presencia en carnes crudas sea casi inevitable. La prevalencia en carnes crudas puede variar del 0% a 68%. La carne porcina es la más contaminada, también es frecuente en la carne cruda de pollo (Acha & Szyfres, 2001).

Los principales reportes de aislamientos de *Listeria monocytogenes* en cárnicos crudos en los años comprendidos entre 1990 y 2016 a nivel internacional reportan prevalencias de identificación en carne cruda de cerdo (Nigeria 11.1%, Latvia 18%, Polonia 21.8%, Bosnia 27.5%, China 27.6%, Taiwán 58.8%), carne cruda de pollo (Marruecos 3.66%, Nigeria

5.0%, Bosnia 10%, China 12.3%, EUA 22%, Dinamarca 42%, Taiwán 50%, Finlandia 56%, Hungría 76%, Suecia 83%, Estonia 88%), carne cruda bovina (Etiopía 0.9%, República Checa 2.3%, Nigeria 6.5%, Taiwán 24%, Yemen 26%, Polonia 28.1%, %, China 15.4-34.8%, Bosnia 34.3%, España 36.84%, Jordán 51.4%) carne bovina congelada (Jordán 60%), **carne cruda ovina (Yemen 17.9%, Jordán 33.3%, China 33.3%), carne ovina congelada (Jordán 53.3%)**, carne cruda de pescado (Egipto 6%, Finlandia 4%, China 6.9-7.8%, Irán 7.72-14.28-21.3%, Italia 39.6%), camarón (Irán 1.69-2.5%, China 2%, India 2.9%, Brasil 3.4%, EUA 11-30.7%, Serbia 12.4 %). Wong y cols. en 1990 reportan que los aislamientos a partir de mariscos y carne bovina presentan mayor actividad hemolítica (Miles & Motes, 1991) (Yoshida, *et al.*, 1997) (Paziak-Domanèska, *et al.*, 1999) (Thimothe, *et al.*, 2002) (Navratilova, *et al.*, 2004) (Markkula, *et al.*, 2005) (Praakle-Amin, *et al.*, 2006) (Berzin, *et al.*, 2010) (Hodzic & Hukic, 2012) (Momtaz & Yadollahi, 2013) (Lakicevic, *et al.*, 2015) (Al-Nabulsi, *et al.*, 2015) (Khallaf, *et al.*, 2016) (Jamali, *et al.*, 2015)) (Wu, *et al.*, 2015) (Mohammed, *et al.*, 2016) (Park, *et al.*, 2016) (Abdollahzadeh, *et al.*, 2016) (Al-mashhadany, *et al.*, 2016) (Peter, *et al.*, 2016).

Por otro lado, las prevalencias de aislamiento a nivel internacional, procedentes de carnicos procesados se reportan las siguientes: cerdo ahumado (Latvia y Lituania 38%), carne salada bovina (España 24.32%), salami bovino (Jordán 6.2%), embutidos de origen bovino (Egipto 2.5%), embutidos de origen porcino (Bulgaria 6.75%), pescado procesado (Grecia 9.6%); (Bērzin, *et al.*, 2007) (Gebretsadik, *et al.*, 2011) (Nadai, *et al.*, 2012) (Awadallah & Suelam, 2014) (Soultos, *et al.*, 2014) (Daskalov, *et al.*, 2014) (Gómez, *et al.*, 2015) (Faeji, *et al.*, 2016).

En México hay escasos reportes de prevalencias de aislamientos a partir de cárnicos, siendo los únicos a partir de carne cruda de pollo (Tamaulipas 1.4 %), carne bovina cruda (Distrito Federal 10%, Monterrey 16-26.7%, Jalisco 20.5%, Tabasco 25%), carne cruda de cerdo (Toluca 1.08 %), y pescado crudo (Veracruz 4.5%) (Heredia, *et al.*, 2001) (Rodas-Suárez, *et al.*, 2006) (Cruz-Pulido, *et al.*, 2012) (Martínez-González, *et al.*, 2015) (Romero, 2017).

Por parte de los cárnicos procesados como milanesa de res (Distrito Federal 10%, Monterrey 26.6%, Villahermosa 30%), salchichas de pavo (Sinaloa 11.7%), salchichas porcinas (Baja california 16.5%), y jamón porcino (Baja california 9.7% (Alcazar, 2002) (Martínez, 2005) (Silva Paz, *et al.*, 2007) (Rubio, *et al.*, 2013) (Martínez-Gonzáles, *et al.*, 2015) (Guzmán-Hernández, *et al.*, 2016) (Castañeda-Ruelas, *et al.*, 2013).

Listeriosis

Listeria monocytogenes es el agente causal de la enfermedad conocida como Listeriosis, la cual frecuentemente produce meningitis y septicemia en niños, adultos geriátricos y pacientes inmunocomprometidos, además de aborto y muerte fetal en mujeres embarazadas; tiene la capacidad de cruzar las membranas del intestino, placenta y cerebro. Su principal fuente de transmisión son alimentos contaminados (Posfay-Barbe & Wald, 2009; Zunabovic, *et al.*, 2011).

La Listeriosis humana tiene las formas de presentación, gastrointestinal e invasiva. La *Listeriosis gastrointestinal* se caracteriza por náuseas, pirexia, vómito y diarrea; se presenta en individuos inmunocompetentes, 20 horas post-ingestión aparecen los signos clínicos. La forma *invasiva* aparece entre 20 y 30 días después de la ingestión del patógeno; las formas clínicas incluyen septicemia, infección del sistema nervioso central (meningitis, meningoencefalitis), endocarditis e infecciones localizadas, entre 20 y 50% de los casos son mortales. En pacientes inmunocomprometidos, generalmente se presenta la forma invasiva. Durante el embarazo la enfermedad se presenta con fiebre, mialgias, lumbalgia, malestar general y ocasionalmente diarrea, vómitos y dolor abdominal. La enfermedad tiene una fase de bacteriemia en la cual se puede diseminar vía transplacentaria y producir una infección fetal intrauterina, corioamnionitis, parto prematuro, muerte fetal in útero o sepsis neonatal precoz (Lorber, 1996; Doganay, 2003; Donnelly, 2001; Mylonakis, *et al.*, 2002).

La amplia distribución de *L. monocytogenes* en la naturaleza y su asociación con el ganado doméstico hace que su presencia ocasional en carne cruda sea casi inevitable (Johnson, *et al.*, 1990).

En los animales, las manifestaciones clínicas de la Listeriosis; especialmente en ovinos, caprinos y bovinos; generalmente ocurre en cinco presentaciones clínicas, de las cuales la encefalitis es la forma más común, seguido de abortos, mientras que la septicemia neonatal, mastitis y queratoconjuntivitis/uveítis, aparecen muy raramente. Estos síndromes rara vez se superponen dentro del mismo animal o del mismo rebaño. Normalmente sólo tiene lugar una forma clínica de Listeriosis en un grupo particular de animales, cerca del 5-10% de las ovejas expuestas durante un brote muestran signos clínicos; la mayoría presentan infecciones subclínicas y se convierten en portadoras asintomáticas (OIE, 2014; Torrence & Isaacson, 2003)

La forma *septicémica* es poco común y por lo general se produce en neonatos; se caracteriza por depresión, inapetencia, fiebre y muerte. La forma *encefálica* se denomina a veces “enfermedad en círculo” debido a la tendencia del animal a dar vueltas en una dirección, y es la manifestación más común de la enfermedad en los rumiantes; los síntomas comprenden depresión, anorexia, caída de la cabeza o torcimiento de la cabeza hacia un lado, parálisis facial unilateral y queratoconjuntivitis bilateral. El aborto se produce, por lo general, en el último tercio de gestación (después de 7 meses en bovinos y 12 semanas en ovinos). La mastitis en rumiantes puede ser provocada por *Listeria monocytogenes* (Wilesmith & Gitter, 1986) (OIE, 2014).

En rumiantes, la ruta de transmisión alimentaria de la infección por *L. monocytogenes* se estableció mucho antes que en humanos. Muchos estudios han indicado que el ensilado de baja calidad está comúnmente contaminado con la bacteria y es fuente de brotes de listeriosis; la excreción fecal de *Listeria monocytogenes* en el ganado se asocia con la contaminación del ensilaje. Las investigaciones de un vínculo epidemiológico entre la alimentación con silo y la listeriosis en los rumiantes, sin embargo, ha dado resultados

inconsistentes. Mientras que algunos estudios han aislado cepas coincidentes en cerebros de animales afectados y muestras de ensilaje, otros han arrojado cepas no relacionadas. En 2009, Mohammed *et al.*, detectaron una mayor prevalencia de la bacteria en las muestras recolectadas del entorno ganadero inmediato (pesebres, agua y camas) y en las heces de ganado que en el ensilaje, desafiando la opinión de que el ensilaje es la única fuente de infección. Según un estudio neuropatológico en Europa, estimaciones recientes de prevalencia de encefalitis listérica en bovinos, ovinos y caprinos, abarcan entre el 7,5% y el 29,4% (Oevermann, et al., 2010).

En contraste con los humanos, la presentación típica en el sistema nervioso central (SNC) en los rumiantes es la rombencefalitis, mientras que la meningitis o meningoencefalitis difusa es común en humanos. El período de incubación para la encefalitis es más largo en comparación con las otras afecciones (septicemia, aborto) y varía entre 1 y 7 semanas. Los signos clínicos de la encefalitis listérica varía dependiendo en la topografía de las lesiones del SNC, generalmente afectan unilateral o bilateralmente al tallo encefálico, hay déficits de nervios craneales (NC). Las manifestaciones incluyen problemas masticatorios, falla del cierre de la mandíbula, hipoalgesia de la cabeza (afectación de CN V), caída de las orejas, párpados superiores y labios (afectación de NC VII), déficits del reflejo palpebral y de amenaza (NCs V y VII), problemas de deglución (NCs IX y X), parálisis de la lengua (NC XII), andar en círculos, inclinación de la cabeza (sistema vestibular), nistagmos (NC VIII) y sialorrea. Otros signos más inespecíficos incluyen fiebre, embotamiento y anorexia. En la etapa terminal, los animales permanecen recostados y pueden mostrar convulsiones. Se han descrito casos raros con parálisis de las extremidades debido a la afección de la médula espinal (mielitis) sin implicación del cerebro. El curso de la infección en pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) es generalmente agudo y los animales mueren dentro de 1-3 días después de la aparición de los signos clínicos (Oevermann, et al., 2010).

Desarrollo y Patogenia

La Listeriosis se define clínicamente cuando el microorganismo es aislado de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) u otros sitios del organismo que normalmente son estériles (Low & Donachie, 1997).

Un número significativo de animales pueden ser portadores asintomáticos de *L. monocytogenes*, y de esta manera dispersar el organismo a través de materia fecal. *Listeria monocytogenes* es predominantemente transmitida por vía oral, la invasión generalmente ocurre en el tracto intestinal, con la subsecuente propagación hematógena, conduciendo a septicemia y posible infección transuterina. La patogénesis de la Listeriosis encefálica se inicia por la entrada de la bacteria a través de las membranas mucosas (posiblemente debida a lesiones previas) y su posterior migración centrípeta por los nervios craneales hacia el encéfalo, particularmente hacia el tallo (Torrence & Isaacson, 2003).

La entrada de *L. monocytogenes* y la colonización de los tejidos del hospedero se lleva a cabo en cuatro etapas:

1. Cruce de la barrera intestinal: Existe controversia con respecto al punto de entrada y el mecanismo de traslocación intestinal usado por *L. monocytogenes*. Racz y colaboradores, en 1972, infectaron cobayos intragástricamente con 10^{10} UFC de *L. monocytogenes*, el análisis histológico reveló, que todos los animales desarrollaron enteritis. En etapas iniciales, la bacteria pudo detectarse principalmente en las células epiteliales del área apical de las vellosidades, mientras en fases tardías, la bacteria se detectó en el interior de los macrófagos del estroma de las vellosidades, lo que sugirió que *L. monocytogenes* penetra el hospedero invadiendo el epitelio intestinal.

En otros estudios usando ratones inoculados con 10^8 a 10^9 UFC, no se observó invasión del epitelio de las vellosidades intestinales, en cambio se evidenció colonización de las placas de Peyer, sugiriendo que *L. monocytogenes* usa las células M del epitelio como una entrada

portal, al igual que se ha reportado para otros patógenos bacterianos (Marco, *et al.*, 1997; Siebers & Finlay, 1996).

Un estudio murino de infección intestinal mostró que *L. monocytogenes* es traslocada a órganos internos en pocos minutos, demostrando que el cruce de la barrera intestinal ocurre en ausencia de replicación intraepitelial. El sitio preferencial para la replicación bacteriana fueron las placas de Peyer (Pron, *et al.*, 1998).

2. Multiplicación en el hígado: *L. monocytogenes* cruza la barrera intestinal vía linfática e intestinal hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, bazo e hígado (Pron, *et al.*, 1998).

Más del 90% de bacterias se acumulan en el hígado, en experimentos de depleción del sistema inmune “*in vivo*”, los macrófagos residentes destruyen la mayoría de bacterias ingeridas, reduciendo el tamaño de la población bacteriana durante las primeras 6 horas de infección, aunque no todas las células bacterianas son destruidas por los macrófagos tisulares, y su número se incrementa después de 2 a 5 días en órganos de ratón (Ebe, *et al.*, 1999; De Chastellier & Berche, 1994).

El sitio principal de multiplicación bacteriana en el hígado es el hepatocito. Mackaness, en 1962, fue el primero en demostrar que *L. monocytogenes* era capaz de sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos. Existen dos vías posibles para el acceso de *L. monocytogenes* al parénquima hepático después de la traslocación intestinal del microorganismo y el transporte portal o arterial: vía células de Kupffer, por la diseminación célula-célula o por invasión directa de hepatocitos después de cruzar la barrera endotelial que rodea los sinusoides hepáticos (Drams, *et al.*, 1995).

El paso de hepatocito a hepatocito conduce a la formación de un foco infeccioso en el que *L. monocytogenes* se disemina a través del parénquima sin entrar en contacto con el sistema inmune humoral. Los neutrófilos juegan un papel importante en el control de la fase aguda de la infección y en la destrucción “*in vivo*” de *Listeria* en hepatocitos infectados (Edelson, *et al.*, 1999; Conlan & North, 1991; Rogers & Unanue, 1993).

3. Colonización de útero grávido y feto: el aborto y la muerte del neonato debido a *Listeria* spp., se ha reproducido experimentalmente por inoculación intravenosa, oral y respiratoria de *Listeria* en animales gestantes susceptibles, como ovinos, bovinos, conejos, cobayos, ratones y ratas, de esta manera se demostró que *L. monocytogenes* accede al feto por penetración hematógena de la barrera placentaria (Abram & Dorić, 1997).

4. Invasión encefálica: la infección del sistema nervioso central se presenta en forma de meningitis, asociada frecuentemente con la presencia de focos infecciosos en el parénquima cerebral, especialmente en el tallo cerebral (Lorber, 1996).

Aunque se presenta infiltración mononuclear y linfocítica de las meninges, ocurre como una extensión del proceso cerebral, y las lesiones macroscópicas pueden restringirse a las áreas basales, cerebro blando y cerebelo. En humanos, al igual que en rumiantes se desarrolla encefalitis. Se ha demostrado en rumiantes que el tropismo de *L. monocytogenes* en la infección del sistema nervioso central se restringe a la médula oblonga y cordón espinal (Lorber, 1996; Vázquez-Boland, *et al.*, 2001).

L. monocytogenes invade el cerebro por migración centrípeta a lo largo de los nervios craneales. La parálisis unilateral del nervio craneal es característica de romboencefalitis en rumiantes, conduciendo al desarrollo de la enfermedad que se caracteriza por tortícolis involuntaria y andar en círculos como resultado de las lesiones del tallo cerebral (Wesley, 1999).

Las lesiones histopatológicas cerebrales en la meningoencefalitis listeriana son típicas y muy similares en humanos y animales, y consisten en nódulos perivasculares de infiltrados inflamatorios, compuestos de células mononucleares, neutrófilos dispersos y linfocitos; microabscesos parenquimales y focos de necrosis. Las bacterias están generalmente ausentes en las áreas perivasculares de inflamación y son abundantes en el parénquima cerebral alrededor de las áreas necróticas (Jungi, *et al.*, 1997).

En los macrófagos, la mayoría de las bacterias son destruidas en fagosomas después de la internalización y sólo algunas rompen la membrana fagosomal y escapan al citoplasma donde polimerizan actina y se extienden hacia otras células; aunque el macrófago es la principal célula implicada en la multiplicación in vivo de *L. monocytogenes*, una serie de otros tipos de células tales como fibroblastos y células epiteliales han sido infectadas con éxito in vitro (Cossart, et al., 1989) (Galliot, et al., 2000).

La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas) (Torrence & Isaacson, 2003).

L. monocytogenes se desplaza a través de sus flagelos en ambientes extracelulares; estudios muestran que la expresión genética de la movilidad basada en flagelos es regulada por la temperatura. *L. monocytogenes* son altamente flageladas y móviles a bajas temperaturas, (<30°C), y son típicamente no móviles a temperaturas de >37°C. Las flagelinas bacterianas sirven como moléculas de reconocimiento para la activación de respuestas inmunes innatas a la infección, la transcripción de **flaA** (codifica flagelina), se detiene a temperatura fisiológica (37 ° C); se ha propuesto que la durante la infección in vivo puede servir como un mecanismo adaptativo para evitar el reconocimiento y movilización de la respuesta inmune innata del huésped (Gründling, et al., 2004).

La biología celular de la infección por *L. monocytogenes* puede dividirse en cuatro etapas: entrada de la bacteria en el huésped o internalización (gen **inU**), lisis de la vacuola fagosomal mediada por **Hly** (citolisina formadora de poros); multiplicación en el citosol, y nucleación de filamentos de actina mediado por **actA** (segundo gen de lecitinasa); y dispersión célula-célula mediado por **plcB** (secreción de fosfolipasa C que hidroliza fosfatidilcolina (lecitina), implicado en la lisis de la vacuola de doble membrana que se forma durante la propagación célula-célula) (Portnoy, et al., 1992).

Cada paso requiere expresión de factores de virulencia específicos. Los principales genes de virulencia se encuentran en un grupo de genes codificante de un fosfatidilinositol específico fosfolipasa C (**PlcA**), una hemolisina llamada Listeriolisina O (**LLO**), una metaloproteasa (**Mpl**), una actinreclación (**ActA**), una lecitinasa (**PlcB**), y una proteína activadora transcripcional pleiotrópica **PrfA** que regula y coordina la expresión de genes de virulencia. En diferentes locus se codifican dos proteínas implicadas en la invasión, **InlA** e **InlB** (Dramsi, et al., 2004).

Al igual que otros patógenos intracelulares, *L. monocytogenes* es expuesta a las condiciones hostiles inducidas por el sistema respuesta, incluyendo inanición, pH bajo, tensión enzimática y temperatura elevada. Las bacterias se adaptan rápidamente a cambios ambientales repentinos sintetizando proteínas que actúan como chaperones y proteasas. Los chaperones ayudan al plegado, y ensamblaje de proteínas (replegado), mientras que las proteasas procesan aquellas que no pueden ser replegadas (Galliot, et al., 2000).

La adherencia de *L. monocytogenes* a la superficie de la célula huésped, es un evento crítico durante la infección; implica una serie de proteínas de superficie, incluyendo **ActA** (proteína requerida para la motilidad basada en actina, puede promover la unión a través de los proteoglicanos de la célula huésped), **Ami** (autolisina presente en la superficie con actividad amidasa), **P104** e internalina **InlA** (promueve la adherencia y entrada en las líneas celulares que expresan su receptor proteína de adhesión E-cadherina) (Dramsi, et al., 2004).

Posterior a la fagocitosis de la bacteria ocurre la disolución de la membrana fagosomal, presumiblemente mediada por Listeriolisina O (**LLO**), la cual es un factor hemolítico perteneciente a una familia de citolisinas producidas por varias especies gram-positivas, incluyendo *Streptococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*. Estas citolisinas comparten una serie de propiedades: peso molecular similar, reactividad inmunológica cruzada, inactivación por colesterol. Entre estas citolisinas, la listeriolisina O es la única producida por una bacteria intracelular activa en pH ácido; ha sido reconocida como un factor importante de virulencia de *Listeria monocytogenes*, pues la inactivación de listeriolisina en cepas patógenas

conduce a la pérdida de actividad hemolítica, avirulencia en el animal modelo, y falta de crecimiento en células de cultivo de tejidos (Cossart, et al., 1989) (Leimeister-Wächter, et al., 1990).

Una vez que *L. monocytogenes* se encuentra libre en el citosol, se extiende de célula a célula interactuando con microfilamentos de las células hospedadoras y moviéndose hacia la membrana periférica, donde induce la formación de proyecciones citoplasmáticas tipo filopodia que son ingeridas por células adyacentes (Mounier, et al., 1990) (Dabiri, et al., 1990).

Dentro de la primera hora post infección, alrededor del 40% de las bacterias se encuentran rodeadas por filamentos de F-actina citoplásmica de la célula huésped; a los 90 minutos, el número aumenta a 80%, y a los 240 min todas las bacterias se encuentran rodeadas con F-actina. A las 3 horas, comienzan a formarse proyecciones largas que se extienden desde sólo un extremo de la bacteria "cola de cometa", en la que aparecen los filamentos de F-actina aleatoriamente orientados, pudiendo ser tan largos como 30µm (Dabiri, et al., 1990).

La bacteria se dirige a la superficie de la célula con su cola orientada hacia el centro de la misma y se incorpora en una extensión celular; esta extensión contacta macrófagos vecinos que fagocitan la extensión del primer macrófago; así, dentro del citoplasma del segundo macrófago *L. monocytogenes* aparece rodeada por una membrana de actina que a su vez es rodeada por la membrana fagosomal del nuevo anfitrión. Ambas membranas se solubilizan y el ciclo se repite. Una vez dentro de la célula huésped, *L. monocytogenes* y su progenie pueden propagarse de una célula a otra y evitar el sistema inmune humoral del organismo (Tilney & Portnoy, 1989) (Mounier, et al., 1990).

Los factores de patogenicidad secundarios de *Listeria monocytogenes* son los siguientes:

PleA (anteriormente también llamado ORFU y pic) Adyacente a *hly* es un gen que codifica una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI - PLC) (Portnoy, et al., 1992).

Plc Los mutantes de inserción de *L. monocytogenes* están claramente reducidos en virulencia, pero el efecto polar de estas mutaciones sobre el gen regulador de *prfA* hace una asignación definitiva de un papel para PI-PLC (Portnoy, et al., 1992).

Operon de lecitinasa. Detrás de *hly* se encuentra un operón que codifica la lecitinasa de *L. monocytogenes*. Este operón comprende los genes *mpl*, *actA*, y *plcB* y tres marcos de lectura abiertos de función desconocida, ORFX, -Y, Y -Z (Portnoy, et al., 1992).

Mpl (anteriormente también llamado ORFD y prt4). Codifica una proteína que contiene una homología significativa de aminoácidos con una familia de metaloproteasas (Portnoy, et al., 1992).

inlAB operon. En *L. innocua* confiere a esta especie no invasiva la capacidad de invadir células epiteliales. La secuencia de *inLA* predice una proteína interna de 80 kDa (Portnoy, et al., 1992).

Iap. Mutantes espontáneos de *L. monocytogenes* muestran una expresión reducida de *p60* y forman cadenas largas que poseen septos dobles entre las células individuales (Portnoy, et al., 1992).

PrfA. Codifica una proteína que activa la transcripción del gen de la listeriolisina O (LisA), es además un activador de al menos cuatro genes determinantes de virulencia en *L. Monocytogenes*. El producto génico codificado por *prfA* activa directamente la transcripción de *hly*. Se demostró que un mutante no hemolítico espontáneo de *L. monocytogenes* tenía una delección en una región de *plcA*; expresando niveles apenas detectables de *hly* mRNA, lo que sugiere que *prfA* fue un factor regulador positivo para *hly* (Portnoy, et al., 1992).

gen FbpA: Necesario para la colonización intestinal y hepática eficiente en ratones inoculados por vía oral e intravenosa (Drams, et al., 2004).

La **fibronectina** es una glicoproteína dimérica (440 kDa) que está presente en forma soluble en plasma y fluidos extracelulares, y en una forma fibrilar de mayor peso molecular sobre las superficies celulares. Aunque la fibronectina tiene papeles críticos en células

eucariotas, como adhesión, migración y diferenciación, es también un sustrato común para la unión de bacterias (Dramsi, et al., 2004).

FbpA es una proteína de unión a fibronectina presente en la superficie de *Listeria* que puede mediar la adherencia a las células; también modula los niveles de proteína de dos factores de virulencia, LLO y InlB. Estos resultados apuntan a las múltiples contribuciones de FbpA a la virulencia de *L. monocytogenes* (Dramsi, et al., 2004).

ClpP es una proteína perteneciente a una familia de proteasas, necesaria para una variedad de funciones, incluyendo crecimiento a alta temperatura, motilidad, síntesis de enzimas degradativas, competencia y esporulación. Los homólogos de las ATPasas de Clp y ClpP se han identificado en una amplia gama de procariotas, además de mitocondrias y cloroplastos de células eucariotas. La ausencia de ClpP ha demostrado reducir fuertemente la actividad hemolítica de LLO, especialmente bajo condiciones de estrés; también la expresión de ActA podría verse afectada, debido a que la polimerización de actina parece reducida pues muestra muy pocos cometas de actina (Galliot, et al., 2000).

Diagnóstico

El diagnóstico clínico de Listeriosis es difícil, debido a la variedad de enfermedades que causan signos clínicos similares, por lo cual, puede únicamente efectuarse por el aislamiento del agente causal si la muestra se obtiene de lugares usualmente estériles, como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico o material de biopsia (en fetos septicémicos a partir de cualquier órgano). En animales con encefalitis (ovinos, bovinos, caprinos), se debe recurrir al empleo de la médula oblonga. El diagnóstico definitivo se puede determinar por cultivo bacteriano, histopatología y en ocasiones serología; sin embargo, en muchos casos no se logra en un animal vivo, sino que requiere exámenes post-mortem, patológicos e histopatológicos, y cultivo microbiano (Torrence & Isaacson, 2003; McClain & Lee, 1987).

Los hallazgos post mortem e histopatológicos dependen de la presentación clínica. En la forma encefálica son raras las lesiones patológicas globales del cerebro, el fluido cerebroespinal puede estar turbio y los vasos meníngeos congestionados; en ocasiones, la médula muestra áreas de reblandecimiento. Sin embargo, la enfermedad muestra una histopatología característica que consiste en focos de células inflamatorias con manguito perivascular adyacente, predominando linfocitos e histiocitos, células plasmáticas y ocasionalmente neutrófilos. Los microabscesos en el tronco cerebral son frecuentemente unilaterales y pueden mostrar licuefacción del neurópilo. En la forma septicémica, pueden detectarse focos múltiples de necrosis en el hígado y, con menor frecuencia, en el bazo. Los fetos abortados de los rumiantes muestran muy pocas lesiones globales (OIE, 2014).

El diagnóstico, puede llevarse a cabo a través de métodos basados en detección de anticuerpos, los anticuerpos juegan roles esenciales en la defensa del hospedero contra patógenos intracelulares como *L. monocytogenes*. Estos incluyen la prevención de la entrada a las células del hospedero a través de la unión a moléculas de superficie clave y neutralización de toxinas y opsonización, destacando la activación de complemento. La selectividad molecular que muestran los anticuerpos en estos roles naturales también forman las bases para su uso como agentes diagnósticos (Ryser & Marth, 2007).

Como métodos adicionales para la identificación del patógeno en alimentos se encuentran la citometría de flujo, biosensores, sistemas microanalíticos basados en chips, métodos espectroscópicos, entre otros (Ryser & Marth, 2007).

Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

La identificación tradicional involucra métodos de cultivo basados en el enriquecimiento selectivo seguida de la caracterización basada en la morfología de las colonias, fermentación de azúcares y propiedades hemolíticas. Estos métodos son el estándar de oro;

pero son tardados y pueden no ser adecuados para las pruebas de los alimentos con la vida útil corta (Gasánov, *et al.*, 2005).

Métodos tradicionales de aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*

Los métodos tradicionales, o basados en cultivo, para la detección de *Listeria* se limitan por sus demandas de tiempo y trabajo; generalmente se requiere pre enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, siembra en medio selectivo y diferenciación bioquímica, tomando alrededor de 5 a 7 días (Ryser & Marth, 2007).

La identificación presuntiva de *L. monocytogenes* se puede basar en las siguientes observaciones y resultado de pruebas (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008):

- Bacilos Gram positivos, cortos, con presentación en cadenas o solos.
- Observación de movilidad acrobática en una base húmeda, y/o crecimiento con conformación de paraguas en un medio líquido o semisólido.
- Catalasa positivo.
- Positivo a hidrólisis de esculina.
- Crecimiento a 4°C.
- Zona estrecha de hemólisis en agar sangre de cordero al 5%.

Las muestras contaminadas, como los alimentos, se cultivan en un medio de enriquecimiento y luego en uno selectivo; la norma oficial mexicana NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*; recomienda el uso de los siguientes medios de cultivo (McClain & Lee, 1987; Secretaría de Salud, *et al.*, 1995):

- Agar sangre (desfibrinada de cordero al 5%): *Listeria monocytogenes* forma colonias lisas y pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro después de 48 horas de incubación; además de una zona de hemólisis estrecha y suave.
- Agar Oxford: medio selectivo y enriquecido; después de 24 horas de incubación a 35°C, las colonias de *Listeria monocytogenes* aparecen negras con un halo negro, resultado de la hidrólisis de esculina y la formación de compuestos de ferro-fenólicos en el medio.
- Agar Polimixin-acriflavina-cloruro de litio-ceftazidina esculina-manitol (PALCAM): las colonias de *Listeria monocytogenes* aparecen verde-grisáceas, con centros hundidos y un halo de color negro (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2008).

La norma oficial mexicana NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*; recomienda el uso de las siguientes pruebas bioquímicas:

- Movilidad en fresco: en gota suspendida o entre porta y cubreobjetos, se utiliza una solución salina al 0.85%. La suspensión debe ser densa y emulsificarse completamente; se observa con objetivo de inmersión en un microscopio de contraste de fase o microscopio de campo oscuro. Las células de *Listeria* spp. son bacilos cortos con movilidad rotatoria “como si brincaran”.
- Catalasa: la formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva; las especies de *Listeria* son catalasa positiva.
- Tinción de Gram: Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos Gram positivos; sin embargo en cultivos viejos pueden presentarse como formas cocoides. En extensiones delgadas se observan de color pálido y pueden confundirse con *Bacteroides* spp.
- Hemólisis: al observar la reacción hemolítica en las placas, *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una zona ligeramente clara alrededor de la colonia. Confirmar las

reacciones dudosas con la prueba de CAMP (Cristine Atkins Munch Peterson) (Dongyou, 2008).

- Reducción de nitratos: inocular los tubos conteniendo caldo nitrato, incubar a 35°C por 5 días. Para la lectura se debe agregar 0,2 mL del reactivo A y 0,2 mL del reactivo B, un color rojo indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar zinc en polvo para comprobación de la prueba.
- Movilidad en agar: inocular el medio Movilidad Indol Sulfuro (SIM) o el medio Thayer-Martín Modificado (MTM), incubar por 7 días a temperatura ambiente (20-25°C), observar diariamente. cuando *L. monocytogenes* crece en tubos con agar semisólido, exhibe un crecimiento característico de paraguas cerca de la superficie del medio (Dongyou, 2008).
- Utilización de carbohidratos (dextrosa, ramnosa, xilosa y manitol): inocular tubos de rojo de fenol para fermentación de carbohidratos al 0,5%: dextrosa, ramnosa, manitol y xilosa. Incubar 7 días a 35°C. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. Todas las especies de listeria dan positivas las pruebas para dextrosa.
- Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP): se emplean las siguientes cepas de colección de *Staphylococcus aureus* (ATCC 49444, NTCC 7428) y *Rhodococcus equi* (ATCC 6339, NTCC 1621). En una placa de agar sangre de carnero sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y, paralelamente una de *R. equi*, separadas aproximadamente 5mm, entre éstas estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*. Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C observar el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica más intensa.
 - La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus*, y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*; las especies restantes no son hemolíticas en esta prueba.

Métodos rápidos para la detección de *Listeria*

Tomando como referencia el tiempo requerido por los métodos de cultivo, se han desarrollado pruebas más rápidas basada en anticuerpos (ELISA) o técnicas moleculares (PCR o de hibridación de ADN). Estas pruebas poseen la misma sensibilidad, son rápidas, pues arrojan resultados hasta en 48h (Gasarov, *et al.*, 2005).

Un método ideal incluye reducción de costos, trabajo, y almacenamiento. La habilidad de detectar rápidamente listeria en alimentos y el ambiente de procesamiento de alimentos puede permitir más tiempo libre en el monitoreo de puntos críticos de control, contribuyendo a controlar *L. monocytogenes* en estos ambientes y, finalmente la incidencia de la enfermedad (Ryser & Marth, 2007).

Kits y sistemas de pruebas comerciales

Los beneficios de los kits y sistemas de pruebas comerciales incluyen disponibilidad, estandarización, validación independiente, simplicidad, efectividad de costo, apoyo técnico (Ryser & Marth, 2007).

InSite *Listeria*®

InSite *Listeria*® es una prueba rápida de la marca Higienda para la detección de especies de *Listeria* en entornos del procesamiento de alimentos, contiene un medio líquido formulado con potenciadores de crecimiento, antibióticos y compuestos cromogénicos específicos para el crecimiento de especies de *Listeria*. Estos compuestos incluyen cloruro de sodio, cloruro de litio, citrato amónico férrico, cicloheximida para fuente microbiana, esculina, y mezcla de antibióticos no especificada.

Su sensibilidad es de 1-10 UFC/mL de *Listeria* spp, aun con la presencia de altas cantidades de organismos competitivos.

Si el color del medio cambia de amarillo-ámbar a marrón-negro en un plazo de 24-48 horas de incubación a 37°C ±1, la muestra se considera presunto positivo.

Algunos *Enterococcus* spp. son capaces de dar resultados falsos positivos; dado que todas la especies de *Listeria* spp. son catalasa positivas y las de *Enterococcus* spp. catalasa negativas, la prueba de catalasa simple puede distinguir *Listeria* spp. de *Enterococcus* spp.

Estatus epidemiológico

La importancia de ésta enfermedad se debe a su impacto clínico, alta mortalidad, y el efecto económico por brotes asociados al consumo de alimentos. En 2007 se reportaron 1558 casos de Listeriosis en 27 países de Europa; el índice de mortalidad general fue 20%, elevándose en ancianos a 67%. En 2010, se reportaron en Estados Unidos 1662 casos de Listeriosis con mortalidad del 16%, representando la tercera causa de muerte por ETA (Lahuerta, *et al.*, 2011; Cartwright, *et al.*, 2013; Castañeda-Ruelas, *et al.*, 2014).

En México la Dirección General de Epidemiología (DGE) no cuenta con información que permita evaluar el impacto de la Listeriosis en la población, en 2009 se reportaron 227,597 abortos sin especificación etiológica. En 2013, se registraron 40,147 casos de intoxicaciones alimentarias bacterianas y 966 casos de meningitis; sin diagnóstico etiológico, pudiendo relacionarse con Listeriosis (Fernández Cantón, *et al.*, 2012).

En el área veterinaria, *L. monocytogenes* continúa siendo un patógeno común, pues la listeriosis se ha descrito en más de 40 especies animales, causa infecciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) en bovinos, ovinos, caprinos, equinos, aves y caninos, al igual que abortos en bovinos, ovinos y caprinos. La mayoría de los casos clínicos ocurren en rumiantes, siendo subclínicas la mayoría de las infecciones, pero se puede presentar la enfermedad invasiva de forma esporádica o como un brote. Los rumiantes pueden jugar un papel como fuente de infección para los seres humanos, principalmente por el consumo de

productos provenientes animales contaminados (Roberts & Wiedmann, 2003; Songer & Post, 2004).

Durante el período 2005-2007, se realizó un estudio clínico patológico de Listeriosis en ovinos que se remitieron al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), ubicado en el estado de México. En este estudio se obtuvo una prevalencia del 2.1% (Plata Nieto & Mañon Barbabosa, 2011).

Ovinocultura en México

La ovinocultura mexicana está orientada hacia la producción de carne, pues la producción de lana únicamente se emplea en algunos estados con fines artesanales; sin embargo, la ovinocultura nacional satisface la demanda de carne; el censo ovino nacional se ha mantenido estático las últimas tres décadas; según cifras aportadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, el inventario actual se acerca a las siete millones de cabezas (SAGARPA, 2003).

La producción nacional aporta el 38% del consumo total, por lo tanto, esta actividad depende en gran medida de la importación de carne ovina congelada de Australia en 55%, Nueva Zelanda en 34%, EUA en 9% y Chile en 2%; y ovinos en pie para abasto de EUA en 92%, Australia en 6%, Canadá en 2% (Cuéllar, 2003).

La distribución geográfica del ganado ovino abarca a la mayoría de los estados, siendo los de mayores inventarios en 2002, el estado de México (998,000), Hidalgo (762,000), San Luis Potosí (667,000), Oaxaca (515,000), y Puebla (400,000) con menor producción se encuentran Veracruz (352,000) y Chiapas (225,000) (Arteaga, 2003).

Existe una marcada dispersión de la población ovina en el territorio nacional, sin embargo, los centros de consumo se restringen a grandes ciudades como la Ciudad de México y su zona conurbana, por lo cual, el ganado debe ser trasladado desde varios estados para llegar

a su destino de sacrificio o consumo. Para abastecer de ganado a los engordadores del centro se acude al norte del país (San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, etc.) (Sagarnaga, et al., 2000).

La comercialización del ganado ovino se da en muchos casos a través de la compra de animales por pieza; para la elaboración de la barbacoa, se emplean canales de diversa calidad (corderos, sementales viejos, ovejas delgadas y viejas, etc.); sin embargo, al emplear canales de corderos se mejoran las ganancias debido al incremento del rendimiento en canal y homogeneidad en la barbacoa elaborada (Cuéllar, 2003).

El consumo *per cápita* de carne ovina para 1983 era de 305g por habitante, incrementándose para 1993 a 837g posiblemente como consecuencia de una mayor oferta de barbacoa debido al incremento en la importación de canales y animales en pie, además de una mejor productividad del rebaño nacional. Actualmente el consumo rebasa los 1,000g por habitante al año (Sagarnaga, et al., 2000).

El consumo de la carne ovina en México es en 95% a través de *barbacoa*, considerado como un platillo de lujo resultado de la cocción de la canal ovina cubierta en pencas de maguey en horno subterráneo o en bote de metal. La barbacoa se consume durante los fines de semana en el centro de México (Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala), siendo también uno de los componentes del menú ofrecido en eventos sociales. Existen opciones emergentes para el consumo de carne ovina, como mixiotes, cordero al pastor o a la griega, birria de borrego, cordero lechal, borrego al ataúd y cortes en restaurantes. En el norte del país es común la utilización de corderos para venderlos como *cabrito* (Cuéllar, 2003).

Barbacoa ovina

El comercio local de la barbacoa comenzó en la década de 1940; los principales actores fueron los arrieros, quienes compraban borregos en poblados y haciendas del pie de monte

del Alto Lerma, destinándolos a la producción de barbacoa; la ruta principal de comercio era el camino hacia el Distrito Federal, Calimaya y el sur de Toluca. En 1942 se registró el sacrificio mensual de 112 cabezas de ganado ovino; las áreas de crianza y alimentación eran las ciénagas; la matanza era al aire libre, en casas particulares y bajo tejados. En 1947 ya se reconocía al municipio como productor de barbacoa (Pillado, et al., 2017).

El comercio de barbacoa se intensificó durante la década de 1950, siendo el principal punto de venta el mercado de Santiago Tianguistenco, lugar donde confluían todos los comerciantes de la región y que era el enlace con el comercio proveniente del sur –rumbo a Acapulco-, del occidente hacia Michoacán, del norte desde el Bajío y de la ciudad de México. En 1960 ya existían mercados consolidados en el Distrito Federal y Morelos (Pillado, et al., 2017).

Para 1970 Capulhuac fue considerado uno de los principales procesadores de carne de cordero con un sacrificio de más de 400,000 cabezas anuales de ganado ovino y caprino, la mayoría sacrificadas en traspatio ya que solo existía un rastro municipal; los ingresos económicos de los barbacoeros despuntaron el desarrollo económico de la región. A finales de los 1980 el ochenta por ciento de la población se dedicaba al comercio de la barbacoa (Marcial Jiménez & Pérez Vargas, 2006).

En 1990 se incrementó el precio del ganado, provocando problemas de financiamiento y carestía del comercio de ganado nacional; facilitando la entrada al mercado mexicano de carne importada la cual llegó a cubrir el 43% del consumo nacional de ganado ovino. La rápida aceptación de la carne importada se debió a su bajo costo y, en gran medida, a su mayor aceptación en la industria restaurantera por características como corte homogéneo, disponibilidad de grandes volúmenes, empaque y presentación, certificación del proceso de matanza y a su disponibilidad para el almacenamiento (Gómez, 2010).

Todo lo anterior ocasionó el declive de la economía de los ganaderos nacionales, y una de las acciones tomadas para revertir esta tendencia en la región fue la creación del Centro de Introducción y Producción de Ganado de Capulhuac, Estado de México, S.P.R de R.L. de

C.V., al cual están adscritos 31 socios, 350 productores proveedores en 7 estados y 700 clientes barbacoeros, quienes movilizan anualmente alrededor de 322,400 cabezas de ovinos y caprinos provenientes de Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí, Chihuahua, Michoacán, Durango y Aguascalientes (Juárez, 2011).

JUSTIFICACIÓN

No hay estudios previos sobre aislamiento de *Listeria monocytogenes* en México a partir de carne ovina cruda o procesada; de igual manera, en el estado de México no se han realizado estudios que muestren la prevalencia de aislamiento en ningún producto cárnico ovino.

No hay literatura en el país, que compruebe la presencia de *L. monocytogenes* en superficies de contacto en mataderos, rastros, plantas de procesamiento de carne ovina, ni lugares de expendio de cárnicos ovinos, por lo cual este estudio pretende dar un punto de partida para la comprobación de fuentes de contaminación de carne ovina.

El presente estudio responde a la necesidad de conocer la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en médula oblonga ovina fresca y barbacoa en el Estado de México, para la posterior propuesta y aplicación de acciones para la prevención primaria de esta enfermedad, en caso de aislar al patógeno.

Debido a la alta variabilidad en la prevalencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* que reporta la literatura internacional en cárnicos procesados; tomando como promedio nacional 17.41% en cárnicos procesados, y considerando que la barbacoa ovina se encuentra inocua hasta el momento en que se extrae de la olla y es manejada por el despachador de tacos, se espera una identificación del agente correspondiente al 40% del promedio nacional; a saber 7%.

Los únicos datos sobre prevalencia de listeriosis en ovinos del Estado de México arrojan el 2.1%, debido a que se desconoce el origen y estado de salud de los ovinos muestreados se espera una identificación del agente en un 7% del total de muestras analizadas.

HIPÓTESIS

La identificación de aislamientos de *Listeria monocytogenes* en médula oblonga ovina fresca y barbacoa se estima en un 7%.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Identificar la presencia de *Listeria monocytogenes*, en médula oblonga y barbacoa ovina, con el uso de la prueba rápida InSite Listeria®, cultivo bacteriano y pruebas bioquímicas básicas.

Objetivos Específicos

- Identificar la presencia de *Listeria monocytogenes* en médula oblonga y barbacoa ovina.
- Analizar los factores de riesgo de la contaminación de *L. monocytogenes* en barbacoa ovina y medula oblonga.
- Analizar la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida InSite Listeria® para *Listeria* spp y *Listeria monocytogenes*.

MATERIAL

Cristalería

- a) Matraces Erlenmeyer de 500 mL
- b) Tubos de ensaye con rosca 5 mL
- c) Portaobjetos 15 x 100mm

Reactivos

- a) Hisopos InSite Listeria®
- b) Agar base sangre BIOXON®
- c) Agar Oxford BIOXON®
- d) Agar PALCAM BIOXON®
- e) Medio SIM BIOXON®
- f) Cepa de referencia *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
- g) Peróxido de hidrógeno 3%
- h) Caldo rojo de fenol SIGMA®
- i) Dextrosa SIGMA®
- j) Manitol BD DIFCO®
- k) Ramnosa MERCK®
- l) Xilosa DIFCO®
- m) Glicerol

Equipo de protección personal

- a) Guantes de nitrilo y látex
- b) Cubrebocas
- c) Bata

Material de laboratorio

- a) Cucharillas de distintos tamaños para extracción de médula oblonga
- b) Asa microbiológica
- c) Estuche de disección
- d) Gradilla
- e) Equipo diverso
- f) Cajas de Petri

Material plástico

- a) Termo
- b) Refrigerantes de gel
- c) Bolsas de plástico
- d) Bolsas de polipapel

Material misceláneo

- a) Suero salino fisiológico
- b) Jeringas de 10mL
- c) Cámara fotográfica
- d) Marcador permanente
- e) Lámpara

Equipo

- a) Autoclave
- b) Estufa bacteriológica
- c) Refrigerador
- d) Ultracongelador

MÉTODO

Se usaron procedimientos estándar para obtención y transporte de muestras a laboratorio, recolección de datos de campo y de muestras.

Tamaño de muestra

Para determinar el tamaño de muestra se usó el método de proporciones, con una proporción estimada del 7%.

Para determinar el tamaño de muestra se utilizó la siguiente ecuación.

$$n = \frac{(z^2)(p * q)}{E^2}$$

En donde se considera un índice de Confiabilidad del 95%:

$$z = 1.96$$

$$p = 0.07$$

$$q = 0.93$$

$$E = 0.05$$

n = Tamaño de muestra esperado

$$n = \frac{(1.96^2)(0.07 * 0.93)}{0.05^2}$$

$$n = \frac{(3.8416)(0.0651)}{0.0025}$$

$$n = \frac{0.25008816}{0.0025}$$

$$n = 100.03$$

El tamaño de muestra determinado de acuerdo al estadístico de prueba, nos proporcionó un resultado de 100 muestras a analizar; considerando 100 muestras para médula oblonga y 100 muestras para barbacoa.

Tipo de muestreo

El tipo de muestreo usado fue el de muestreo aleatorio simple, sin remplazo.

Procedimiento para la toma de muestra cabeza ovina con el uso de cucharilla especial para extraer médula oblonga

1. Se tomó la cabeza ovina decapitada con la mano izquierda sobre una superficie lisa.
2. Con la mano derecha se insertó la cucharilla de manera contundente a través de la zona ventral del agujero magno.
3. Se retiró la cucharilla.
4. Se retira la cucharilla arrastrando con ella 2cm de médula oblonga.
5. Se inserta la muestra en una bolsa zipp lock previamente rotulada.
6. La bolsa zipp lock con la muestra se guarda en el termo a 4°C para su transportación al laboratorio.

Procedimiento para la toma de muestra a partir de médula oblonga con hisopo, incubación y lectura de InSite *Listeria*®

1. Se esterilizó el área de trabajo con alcohol 70%, y posteriormente se encendió un mechero Fisher que se estuvo encendido durante todo el procedimiento.
2. Se sacó la muestra del termo de unicel y posteriormente de la bolsa zipp lock.
3. Se extendió la muestra sobre una gasa estéril.
4. Se hidrato el tejido con suero salino fisiológico.
5. Se retiró con pinzas de disección las meninges que se encuentren adheridas al tejido nervioso.
6. Se realizó un corte con escalpelo a través de la línea media del tejido.
7. Se colocó el hisopo sobre la muestra, rotándolo sobre la misma, tocando únicamente el tejido descubierto por el corte previamente realizado.
8. Se colocó el hisopo en el tubo de incubación.
9. Se activó el dispositivo InSite *Listeria*®, rompiendo el dispensador de la parte superior del mismo.
10. Se presionó de forma intermitente y suavemente el dispositivo durante 3 segundos.
11. Se incubó el dispositivo InSite *Listeria*®, durante 24 y 48 horas a 36°C.
12. Se esterilizan las pinzas de disección y el escalpelo en el mechero Fisher.
13. Se registró el resultado en la hoja de registro y seguimiento de muestras (anexo 1); siendo positivo (2) si el color del medio vira de un color amarillo paja, al color café o negro; siendo negativo (1) si el color del medio se mantiene de color amarillo paja.
14. Se repitió el procedimiento a partir de los pasos 2 al 13 con cada muestra y con la cepa de referencia *Listeria monocytogenes* ATCC® 19115 utilizada como control positivo.
15. Eliminar los hisopos negativos a las 48 horas.

Procedimiento para la toma de muestra a partir de barbacoa

1. En el punto de expendio de barbacoa a muestrear, fue elegido al azar, con observación detallada del procedimiento de despacho de producto y a los

expendedores con el fin de llenar el formato “Análisis de puntos críticos de higiene en abastecimientos de expendio de barbacoa” (Anexo 3).

2. Se pide un taco de maciza sin aditivos para llevar.
3. Se mantiene en refrigeración, hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio.

Procedimiento para la toma de muestra a partir de barbacoa con hisopo, incubación y lectura de InSite *Listeria*®

1. Se esterilizó el área de trabajo con alcohol 70%, y posteriormente se enciende un mechero Fisher que se estuvo encendido durante todo el procedimiento.
2. Se sacó la muestra del termo de unicel.
3. Se coloca el hisopo sobre la muestra, rotándolo sobre la misma.
4. Se colocó el hisopo dentro del tubo de incubación.
5. Se activó el dispositivo InSite *Listeria*®, rompiendo el dispensador de la parte superior del mismo
6. Se presionó de forma intermitente y suave el dispositivo durante 3 segundos.
7. Se incubó durante 24 y 48 horas a 36°C.
8. Se registró el resultado en la hoja de registro y seguimiento de muestras (anexo 1); siendo positivo (2) si el color del medio vira de un color amarillo paja, al color café o negro; siendo negativo (1) si el color del medio se mantiene de color amarillo paja.
9. Se repitieron los procedimientos a partir de los pasos 2 al 8 con cada muestra y con la cepa de referencia *Listeria monocytogenes* ATCC® 19115 utilizada como control positivo.
10. Eliminar los hisopos negativos a las 48 horas.

Procedimiento para la realización de la prueba catalasa en hisopos presuntos positivos

1. Se tomó una gota de la muestra presuntamente positiva del tubo del hisopo InSite *Listeria*®.

2. Se coloca en un portaobjetos sobre fondo blanco (hoja de papel) y se agrega una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.
3. Anotar el resultado en la hoja de registro y seguimiento de muestras (anexo 1); siendo después de 3 minutos positivo (2) al observar formación de burbujas y negativo (1) al no presentar cambio alguno.
4. Eliminar los hisopos que siendo positivos a las 48 horas por viraje del medio, tengan un resultado a la prueba de catalasa negativo.

Procedimiento para siembra de presuntos positivos en agar Oxford

1. Se agregó una gota del tubo del hisopo InSite Listeria® sobre el medio de cultivo, y se realizó con asa microbiológica estría cerrada sobre el mismo, arrastrando la muestra y ocupando la mitad de la caja de petri para cada muestra.
2. Se rotulo en el fondo de la caja Petri con el número de muestra.
3. Se incubó a 36°C durante 24 y 48 horas.
4. Se registro el resultado en la hoja de registro y seguimiento de muestras (anexo 1); tomando como positivo (2) el crecimiento de las colonias que presenten halo negro, y negativo (1) las siembras en las cuales no se presenta crecimiento de colonias sospechosas. En el caso de las muestras que se desecharon previo a este paso, se registran como no realizado (0).

Procedimiento para siembra de presuntos positivos en agar PALCAM

1. Se tomó la colonia presuntamente positiva a partir del medio Oxford con el asa microbiológica.
2. Se realizó estría cerrada arrastrando la colonia y ocupando la octava parte de la caja Petri para cada muestra.
3. Rotular en el fondo de la caja Petri con el número de muestra.
4. Se incubó a 36°C 24 y 48 horas.

5. Se tomó como presuntas positivas las colonias que presenten halo negro y negativas las que mantengan el medio de color rojo o viren el medio a color amarillo; anotar el resultado en la hoja de registro y seguimiento de muestras (anexo 1), indicando en la columna correspondiente al color del medio con el número 2; En el caso de las muestras que se desecharon previo a este paso, se registran como no realizado (0).

Procedimiento para la realización de pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos (dextrosa, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa)

1. Se agregó una asada de la colonia sospechosa al tubo de ensaye, previamente rotulado, de caldo rojo de fenol, con el carbohidrato correspondiente a una concentración del 0.5%.
2. Se incubó por 7 días a temperatura ambiente 20-25°C
3. Se anotó diariamente el resultado en la hoja de seguimiento de carbohidratos (anexo 2); tomando como positivo (2) el viraje del medio a color amarillo y negativo ausencia de vire, color rojo o anaranjado (1).
4. Se registró el resultado final en la hoja de registro y seguimiento de muestras (anexo 1), En el caso de las muestras que se desecharon previo a este paso, se registran como no realizado (0).

Procedimiento para la realización de prueba de movilidad en medio SIM

1. Se inoculó el medio SIM por picadura.
2. Se incubó por 7 días a temperatura ambiente (20-25°C)
3. Se anotó diariamente el resultado en la hoja de seguimiento de carbohidratos (anexo 2); tomando como positivo (2) el enturbiamiento característico del medio en forma de paraguas abierto, y negativo la ausencia de enturbiamiento característico del medio SIM (1).
4. Se registró el resultado final en la hoja de registro y seguimiento de muestras (anexo 1), En el caso de las muestras que se desecharon previo a este paso, se registran como no realizado (0).

Criterios de rechazo para muestras de médula oblonga ovina

1. En caso de que el material para toma y procesamiento de muestras sea insuficiente.
2. En caso que la muestra se observe contaminada macroscópicamente con cualquier agente ajeno al tejido propio (ej. tierra, tejido de otro origen, pelo, gel refrigerante, etc).
3. En caso que la muestra haya sido mal empacada en la bolsa plástica contenedora y se encuentre fuera de la misma.
4. En caso que la muestra no sea identificada adecuadamente.

Criterios de aceptación para expendios de barbacoa

1. Expendios identificados por la venta de barbacoa ovina.
2. Expendios que se encuentren en Toluca y su área conurbada.
3. Expendios que se encuentren semanalmente en el mismo lugar.

Criterios de rechazo para muestras de barbacoa ovina

1. En caso de que el material para toma y procesamiento de muestras sea insuficiente.
2. En caso que la muestra se observe contaminada macroscópicamente con cualquier agente ajeno (ej. tierra, tejido de otro origen, pelo, gel refrigerante, otros).
3. En caso que la muestra haya sido mal empacada en la bolsa plástica contenedora y se encuentre fuera de la misma.
4. En caso que la muestra no sea identificada adecuadamente.
5. En caso de que la muestra posea algún componente añadido (ej. Salsa, cilantro, cebolla, otros).

Análisis estadístico

Para el análisis de riesgo en barbacoa se tomaron en cuenta los criterios encuestados a través del Anexo 3 “Análisis de puntos críticos de higiene en abastecimientos de expendio de barbacoa” y se analizaron con el programa Epi-Dat. Para el análisis de riesgo en medula

oblonga se tomaron en cuenta el sexo, peso y edad de los ovinos muestreados y se analizaron con el programa Epi-Dat (OPS & OMS, 2002)

Para determinar la Sensibilidad y Especificidad de Insite Listeria ®, se utilizará la siguiente tabla de 2x2:

Tabla 1 Tabla para evaluar pruebas diagnósticas simples.

		Diagnostico bacteriológico		
		Positivo	Negativo	
InSite Listeria®	Positivo	a	b	a + b
	Negativo	c	d	c + d
		a + c	b + d	a + b + c + d

La sensibilidad de una prueba es la probabilidad de un resultado positivo de la misma sea realmente positivo, en otras palabras, predice la positividad de la misma; las pruebas con sensibilidad elevada son útiles para realizar cribado. Se determinará con la siguiente fórmula (Sociedad Española de Reumatología, 2014):

$$Se = a / (a + c)$$

La especificidad de una prueba es la probabilidad de un resultado negativo de la misma sea realmente negativo, en otras palabras, predice la negatividad de la misma; las pruebas con elevada especificidad son apropiadas para confirmar o excluir el agente probado. Se determinará con la siguiente fórmula (Sociedad Española de Reumatología, 2014):

$$Es = d / (b + d)$$

LÍMITE DE ESPACIO

El muestreo de médula oblonga ovina fresca se realizará en el rastro municipal de Capulhuac, con la dirección: Ignacio Allende, Barrio San Miguelito, CP 52730 Capulhuac de Mirafuentes, Estado de México, México (Latitud Norte: 19° 11' 11'' y Longitud Oeste 99° 28' 08'').

El muestreo de barbacoa se llevará a cabo en diversos puntos de expendio de barbacoa en la ciudad de Toluca, Estado de México, México.

Los análisis de laboratorio se realizarán en el Centro de Investigación y Estudios Avanzado en Salud Animal (CIESA), con dirección: kilómetro 15.5 Carretera Panamericana Toluca-Atacomulco, Estado de México, México. (Latitud Norte: 19° 23' 57'' y Longitud Oeste 99° 42' 47'').

LÍMITE DE TIEMPO

Cronograma de actividades 2015-2018

	Abril 2015	Mayo 2015	Junio 2015	Julio 2015	2015-2018	Febrero 2018
Registro del protocolo	X					
Muestreo		X	X	X		
Incubación		X	X	X		
Siembra		X	X	X		
Pruebas bioquímicas		X	X	X		
Análisis de datos					X	X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Conclusión de tesis						X

RESULTADOS

El estudio realizado se llevó en dos etapas, en una etapa se realizó el muestreo de 100 expendios de barbacoa de la ciudad de Toluca, donde la muestra fue carne procesada ovina (barbacoa), la muestra antes descrita, se procesó de acuerdo a la metodología descrita, obteniendo de 100 muestras viables de acuerdo a los criterios establecidos para la aceptación o rechazo de muestras; estas mismas fueron analizadas con el hisopo InSite Listeria®; resultando a las 24 horas de incubación un total de 66 muestras presuntivas, de las cuales tres muestras fueron positivas a *Listeria monocytogenes* con medios de cultivo selectivos y pruebas y bioquímicas, a partir de estos resultados se analizaron los factores de riesgo y la sensibilidad y especificidad de las pruebas.

En otra etapa las muestras se obtuvieron del rastro municipal de Capulhuac, donde 87 muestras de médula oblonga obtenidas de la cabeza de ovinos fueron adecuadas para el estudio de acuerdo a los criterios establecidos para la aceptación o rechazo de muestras; el diagnóstico con el hisopo de InSite Listeria®, a las 24 horas de incubación fue de 7 muestras presuntivas, de las cuales solo una muestra fue positiva a *Listeria monocytogenes* con medios de cultivo selectivos y pruebas y bioquímicas. A partir de estos resultados se analizaron los factores de riesgo, y la sensibilidad y especificidad de la prueba InSite Listeria®.

El diagnóstico inicial de contaminación por *Listeria* spp, se realizó con el hisopo InSite Listeria®, donde de las muestras obtenidas en los muestreos respectivos, se evaluaron a las 24 horas de incubación, dando los resultados presuntivos (Figura 1) a la prueba que serían posteriormente sometidos a cultivos selectivos y pruebas bioquímicas.



Figura 1. Resultados presuntivamente positivos con prueba InSite *Listeria*®

A las muestras presuntivamente positivas con hisopo InSite *Listeria*®; en este estudio: 6 a partir de médula, y 68 a partir de barbacoa se les realizó la prueba de catalasa (Figura 2), de acuerdo a la metodología propuesta, para diferenciar *Enterococcus* sp. de *Listeria* sp.

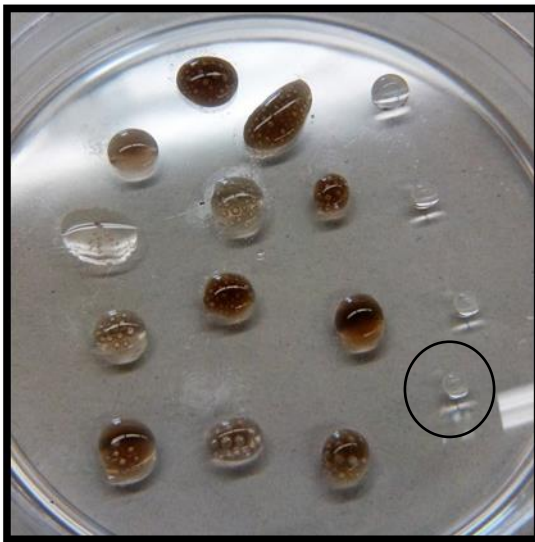


Figura 2. Prueba de catalasa para muestras positivas por InSite *Listeria*®

En la Figura 2 se aprecian muestras positivas a la prueba catalasa; la muestra encerrada en el círculo se observa con resultado negativo. Una vez seleccionadas las muestras positivas al hisopo InSite *Listeria*® y prueba de catalasa, se les cultivó sobre el medio selectivo, OXFORD (Figura 3).

En el caso de medula, ninguno de los 6 resultados presuntivos en el hisopo InSite *Listeria*® fue positivo a la prueba de catalasa; en el caso de barbacoa, 2 de las 68 muestras fueron negativas a la prueba de catalasa, resultando por lo tanto positivas a *Enterococcus* sp.



Figura 3. Cultivo OXFORD para pruebas positivas a catalasa

Una vez seleccionadas las cepas positivas a hidrólisis de esculina en el medio selectivo OXFORD se resembraron en el medio selectivo PALCAM (Figura 4). En este caso 6 de las 6 presuntivas a partir de médula y 27 de 66 a partir de barbacoa.

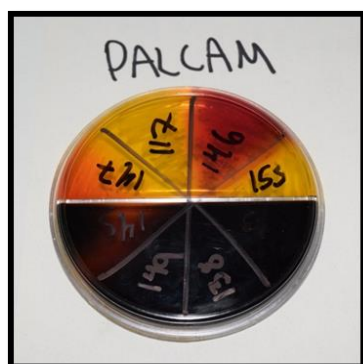


Figura 4. Cultivo PALCAM para cepas positivas a OXFORD

Una vez seleccionadas las cepas positivas a la hidrólisis de esculina en el medio selectivo PALCAM, se realizaron las pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares (Figura 5). En el caso de médula 6 de 6 y en el caso de barbacoa 11 de 27.

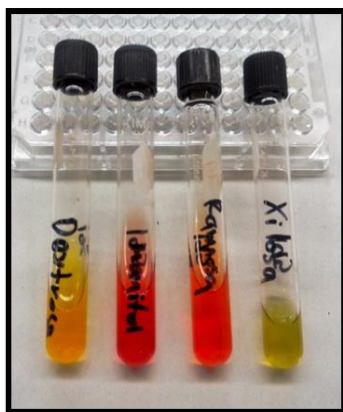


Figura 5. Pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares (Dextrosa, Manitol, Ramnosa, Xilosa)

En la Figura 5, se observan de izquierda a derecha: prueba dextrosa positiva, manitol negativo, ramnosa negativo, xilosa positivo; en este caso una cepa de *Listeria ivaovii* o *L. seeligeri*. Una vez seleccionadas las cepas presuntivas a *L. monocytogenes* de acuerdo a las pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares, se sembraron en medio SIM, para evaluar movilidad y formación de paraguas característico (Figura 6). En el caso de médula 1 de 6, y en el caso de barbacoa 6 de 27.



Figura 6. Cultivo en medio SIM, para prueba de movilidad de *Listeria monocytogenes*

En la figura 6, se muestran los tubos de ensaye de izquierda a derecha: crecimiento con movilidad negativa, y en los cuatro posteriores se muestra el crecimiento característico en forma de sombrilla de *L. monocytogenes*. En el caso de médula 1 de 1, y en el caso de barbacoa 4 de 6.

Posterior al descarte de aislamientos, de acuerdo a las pruebas bioquímicas disponibles realizadas, pudieron identificarse las siguientes especies bacterianas aisladas a partir de médula y barbacoa ovina.

Especie	Médula	Barbacoa
<i>Enterococcus</i> sp	0	2
<i>L. monocytogenes</i>	1	4
<i>L. grayi</i>	0	3
<i>Listeria</i> sp	4	4

En barbacoa se hallaron 2 cepas de *Enterococcus* sp., debido a que fueron descartadas, no se identificó si alguna de ellas pertenece a la especie *Enterococcus faecalis*; por otro lado, hay 11 cepas de *Listeria* spp.; de las cuales únicamente se pudieron identificar siete: cuatro pertenecientes a *L. monocytogenes* y tres pertenecientes a *L. grayi*; lo anterior debido a que no se realizó la prueba de CAMP, pues no se disponía de las cepas de *Rhodococcus equi* y *Staphylococcus aureus* para diferenciar las demás especies, a saber: *L. ivanovii* (hemolisis

positiva en el cruce con *Rhodococcus equi*), *L. seeligeri* (hemólisis positiva en el cruce con *Staphylococcus aureus*), *L. welsimeri* (hemólisis negativa en el cruce con *Rhodococcus equi* y con *Staphylococcus aureus*). Por lo tanto las 4 cepas restantes de *Listeria* spp, se encuentran sin identificación de especie.

En medula oblongada no se hallaron cepas de *Enterococcus* sp, sin embargo se aislaron 5 cepas de *Listeria* spp.; de las cuales únicamente se pudo identificar una, perteneciente a *L. monocytogenes*.

Resultados del análisis de barbacoa

De los datos recolectados en las 100 encuestas realizadas en los puestos de expendio de barbacoa, se realizaron tablas de contingencia para determinar la relación entre los resultados positivos de la prueba rápida a las 24 horas, y cada una de las condiciones relacionadas al establecimiento, procesamiento y manejo de la barbacoa en los puntos de expendio.

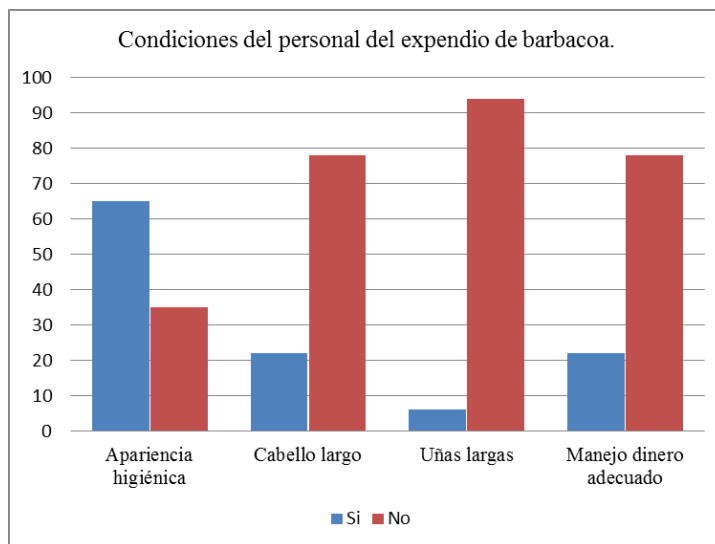
Condiciones del personal del expendio de barbacoa

Lo que se manifiesta dentro del presente estudio, que la apariencia higiénica, el cabello corto, uñas largas y manejo adecuado de dinero, son las características principales que se incluyen para el personal del expendio de barbacoa, se observa que el 65% del personal mantiene una apariencia higiénica adecuada, el 22% del personal tiene cabello largo, 6% tiene uñas largas, y el manejo de dinero se realiza de forma adecuada en un 22%.

Tabla 2. Condiciones del personal del expendio de barbacoa

	Apariencia higiénica	Cabello largo	Uñas largas	Manejo dinero adecuado
Si	65	22	6	22
No	35	78	94	78
	100	100	100	100

Gráfica 1. Condiciones del personal del expendio de barbacoa



Al realizar el estudio de análisis de riesgo de las condiciones del personal de expendio se obtienen los siguientes datos:

Tabla 3. Análisis de riesgo de las condiciones del personal del expendio de barbacoa con hisopo positivo a las 24 horas

	Razón de prevalencias de la enfermedad	Razón de prevalencias de la exposición	OR	Ji Cuadrada
Apariencia Higiénica	0.730 IC: 0.561 - 0.951	0.725 IC: 0.544 - 0.948	0.351 IC: 0.544 - 0.948	4.703 p < 0.05
Cabello largo	0.787 IC: 0.523 - 1.186	0.618 IC: 0.297 - 1.282	0.533 IC: 0.202 - 1.402	1.649 p > 0.05
Uñas largas	1.010 IC: 0.563 - 1.812	1.030 IC: 0.198 - 5.344	1.032 IC: 0.179 - 5.941	0.001 p > 0.05
Manejo de dinero adecuado	1.042 IC: 0.751 - 1.477	1.103 IC: 0.497 - 2.447	1.134 IC: 0.412 - 3.118	0.059 p > 0.05

IC: 95%
IC de OR: Woolf al 95%
Softwrae: EPI DAT, v = 3.1

La apariencia higiénica, nos manifiesta en la razón de prevalencia de la enfermedad de 0.730 y la razón de prevalencias de la exposición con 0.725, indicando que este factor tiene un efecto protector en la venta de producto, con una Ji cuadrada de 4.703 ($p < 0.05$) de acuerdo a OPS y OMS, 2002.

Para los factores de cabello largo, los parámetros nos indican que no influyen en los resultados del muestreo, en el factor de uñas largas se manifiesta un riesgo mínimo, para el manejo de dinero, se manifiesta un riesgo mínimo y estos factores tienen un impacto mínimo en la venta del producto.

Condiciones del equipo y local de expendio

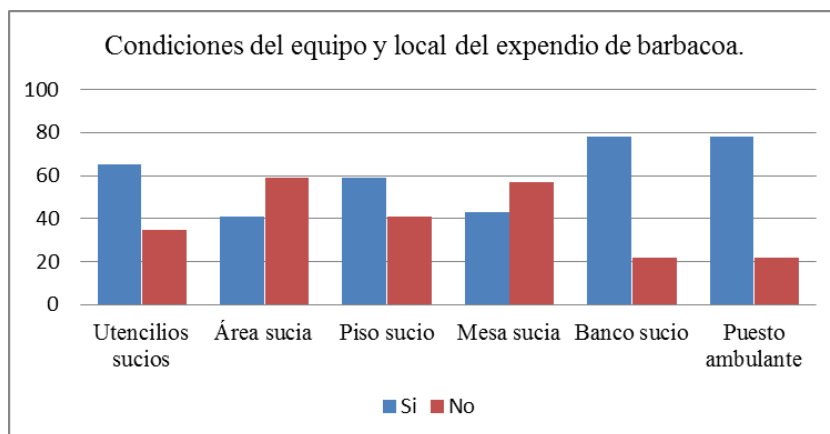
Las condiciones del equipo y local de expendio en términos de porcentaje se presentan de la siguiente manera: en 35% se observa equipo limpio, 59% mantiene un área de manejo de alimentos limpia, 41% mantiene el piso limpio, 57% mantiene la mesa de despacho limpia,

22% mantiene el banco de madera limpio, con un 78% de puestos ambulantes y un 22% de puestos fijos.

Tabla 4. Condiciones del equipo y local del expendio de barbacoa

	Utensilios sucios	Área sucia	Piso sucio	Mesa sucia	Banco sucio	Puesto ambulante
Si	65	41	59	43	78	78
No	35	59	41	57	22	22
	100	100	100	100	100	100

Gráfica 2. Condiciones del equipo y local del expendio de barbacoa



Al realizar el estudio de análisis de riesgo de las condiciones del equipo y local del expendio de barbacoa se obtienen los siguientes datos:

Tabla 5. Análisis de riesgo de las condiciones del equipo y local del expendio de barbacoa con hisopo positivo a las 24 horas

	Razón de prevalencias de la enfermedad	Razón de prevalencias de la exposición	OR	Ji Cuadrada
Utensilios sucios	1.435 IC: 1.008 - 2.0431.671	1.454 IC: 1.007 - 2.099	2.666 IC: 1.124 - 6.322	5.094 p < 0.05
Área sucia	1.060 IC: 0.799 - 1.405	1.109 IC: 0.665 - 1.850	1.900 IC: 0.510 - 1.850	1.190 p > 0.05
Piso sucio	1.003 IC: 0.753 - 1.336	1.004 IC: 0.711 - 1.419	1.011 IC: 0.711 - 2.344	0.000 p > 0.05
Mesa sucia	1.247 IC: 0.946 - 1.644	1.498 IC: 0.868 - 2.587	1.967 IC: 0.828 - 4.676	2.382 p > 0.05
Banco madera sucio	1.149 IC: 0.786 - 1.680	1.092 IC: 0.863 - 1.380	1.467 IC: 0.554 - 3.886	0.600 p > 0.05
Puesto ambulante	0.812 IC: 0.612 - 1.079	0.870 IC: 0.713 - 1.062	0.496 IC: 0.165 - 1.489	1.597 p > 0.05

IC: 95%
IC de OR: Woolf al 95%
Software: EPI DAT, v = 3.1

El factor de utensilios sucios es el de mayor riesgo, con una Ji cuadrada de 5.094, siendo la mayor fuente de contaminación de la barbacoa que se expende en la vía pública.

El factor de área sucia y piso sucio, implican las condiciones del lugar donde se ubica el expendio, su riesgo es moderado y su Ji cuadrada no es significativa. Por otro lado, el uso de mesa sucia y banco de madera sucio son factores de riesgo moderado, pero su Ji cuadrada no es significativa; así mismo, el factor de ser puesto ambulante es un factor de riesgo mínimo.

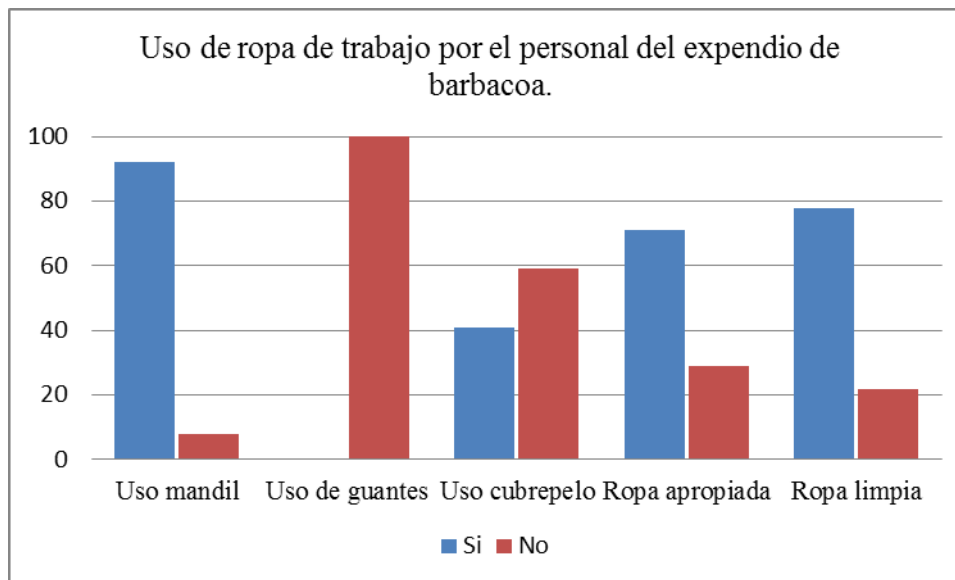
Condiciones de uso de ropa de trabajo

Las condiciones de la ropa de trabajo en términos de porcentaje se presentan de la siguiente manera: 92% de los expendedores utilizan mandil, 0% utiliza guantes, 41% utiliza cubrepelo, 71% utiliza ropa apropiada, y 78% usa ropa limpia.

Tabla 6. Uso de ropa de trabajo por el personal del expendio de barbacoa

	Uso mandil	Uso de guantes	Uso cubrepelo	Ropa apropiada	Ropa limpia
Si	92	0	41	71	78
No	8	100	59	29	22
	100	100	100	100	100

Gráfica 3. Uso de ropa de trabajo por el personal del expendio de barbacoa



Al realizar el estudio de análisis de riesgo del uso de ropa de trabajo por el personal del expendio de barbacoa se obtienen los siguientes datos:

Tabla 7. Análisis de riesgo de uso de ropa de trabajo por personal del expendio de barbacoa con hisopo positivo a las 24 horas

	Razón de prevalencias de la enfermedad	Razón de prevalencias de la exposición	OR	Ji Cuadrada
Uso de mandil	0.869 IC: 0.567 - 1.322	0.965 IC: 0.862 - 1.082	0.625 IC: 0.119 - 3.276	0.313 $p > 0.05$
Uso de guantes	Ningún local encuestado usa guantes.			
Uso de cubrepelo	0.877 IC: 0.651 - 1.181	0.804 IC: 0.502 - 1.290	0.685 IC: 0.296 - 1.584	0.781 $p > 0.05$
Ropa adecuada	0.816 IC: 0.620 - 1.074	0.839 IC: 0.659 - 1.068	0.518 IC: 0.195 - 1.376	1.770 $p > 0.05$
Ropa limpia	0.958 IC: 0.690 - 1.331	0.973 IC: 0.784 - 1.206	0.881 IC: 0.320 - 2.423	0.598 $p > 0.05$

IC: 95%
IC de OR: Woolf al 95%
Software: EPI DAT, v = 3.1

De los factores evaluados en relación al riesgo que representa el uso de ropa adecuada, el análisis nos muestra un riesgo mínimo y de bajo impacto en el expendio de barbacoa.

Ningún local tiene el uso de guantes de ningún tipo.

Resultados del análisis de médula oblonga

A partir de los datos recolectados de las 87 muestras tomadas en el rastro municipal de Capulhuac, 7 resultaron positivas con el hisopo InSite Listeria® a las 24 horas, se realizaron tablas de contingencia para determinar la relación entre los resultados positivos de la prueba rápida, las condiciones sexo, edad y peso de los ovinos muestreados. Se analizaron los parámetros de edad, sexo y peso de los animales muestreados.

Edad

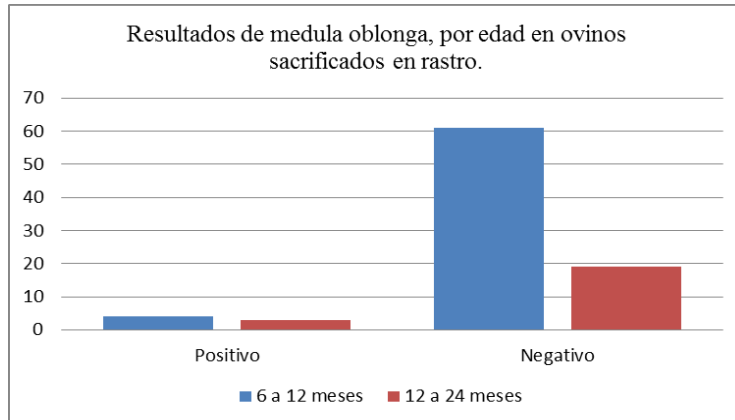
La edad de los ovinos muestreados en términos de porcentaje se presentan de la siguiente manera: 75% era menor a 12 meses y 25% mayor a 12 meses.

Después de 24 horas de incubación del hisopo InSite *Listeria*® los ovinos menores a 12 meses presentaron 4 positivos y los mayores a 12 meses presentaron un 3 positivos.

Tabla 8. Tabla de contingencia para edad de ovinos, hisopos positivos a las 24 horas

Edad	Positivo	Negativo	Total
6 a 12 meses	4	61	65
12 a 24 meses	3	19	22
	7	80	87

Gráfica 4. Resultados de médula oblonga, por edad en ovinos sacrificados en rastro



Sexo

El sexo de los ovinos muestreados en términos de porcentaje se presenta de la siguiente manera: 73% hembras y 26% machos.

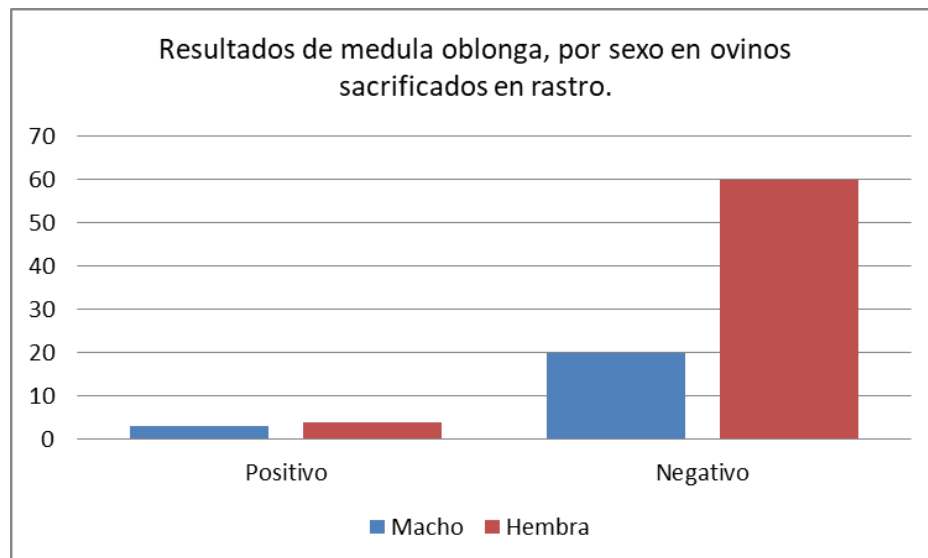
Después de 24 horas de incubación del hisopo InSite *Listeria*®, se tienen 7 resultados positivos de los cuales los ovinos hembra presentan 4 resultados positivos y los machos 3 resultados positivos.

Tabla 9. Tabla de contingencia por sexo de ovinos, hisopos positivos a las 24 horas

Tabla de contingencia (Sexo / Hisopo 24 H):

Sexo	Hisopo 24 horas		Total
	Positivo	Negativo	
Macho	3	20	23
Hembra	4	60	64
	7	80	87

Gráfica 5. Resultados de médula oblonga, por sexo en ovinos sacrificados en rastro



Peso

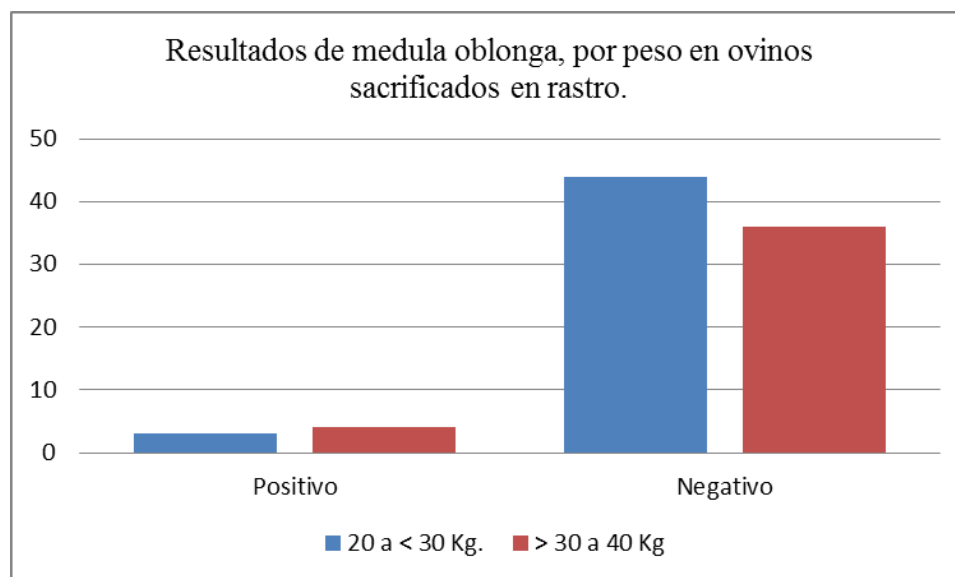
El peso de los ovinos muestreados se clasifica de la siguiente manera: 54% se encuentra en el rango de 20 y 30 Kg y el 46% entre 30 y 40 Kg.

Después de 24 horas de incubación del hisopo InSite *Listeria*® los ovinos entre 20 y 30 Kg presentaron 3 resultados positivos; los ovinos entre 35 y 40 Kg presentaron 4 resultados positivos.

Tabla 10. Tabla de contingencia para peso de ovinos, hisopos positivos a las 24 horas

Peso	Positivo	Negativo	Total
20 a < 30 Kg.	3	44	47
> 30 a 40 Kg	4	36	40
	7	80	87

Gráfica 6. Resultados de médula oblonga, por peso en ovinos sacrificados en rastro



Al realizar el estudio de análisis de riesgo por edad, sexo y peso de ovinos sacrificados en rastro municipal, de donde se obtienen la médula oblonga para el estudio, obtienen los siguientes datos:

Tabla 11. Análisis de riesgo por edad, sexo y peso de ovinos sacrificados en rastro municipal con hisopo positivo a las 24 horas

Tabla de análisis de contingencia de factores de riesgo de edad, sexo y peso, con hisopo positivo a 24 horas.

	Razón de prevalencias de la enfermedad	Razón de prevalencias de la exposición	OR	Ji Cuadrada
Edad	0.451 IC: 0.109 - 1.860	0.749 IC: 1.063 - 1.439	0.415 IC: 0.085 - 2.022	1.243 p > 0.05
Sexo	2.080 IC: 0.504 - 8.626	1.714 IC: 0.672 - 4.370	2.250 IC: 0.463 - 10.925	1.055 p > 0.05
Peso	0.638 IC: 0.151 - 2.684	0.779 IC: 0.323 - 1.874	0.613 IC: 0.128 - 2.921	0.382 p > 0.05

IC: 95%
IC de OR: Woolf al 95%
Software: EPI DAT, v = 3.1

De los factores de riesgo analizados por sexo, se observa que ninguno de los tres influye en los resultados finales del estudio.

De los siete aislamientos positivos, 3 fueron machos de peso menor a 30 Kg y menores a 12 meses; 4 aislamientos fueron de hembras, las cuatro con peso mayor a 30 Kg.; 3 con edad mayor a 12 meses y 1 menor a 12 meses. Un aislamiento positivo presuntivo a *Listeria monocytogenes*, al final del proceso técnico del muestreo en médula oblonga, pertenece a una hembra mayor de 12 meses de edad, con un peso mayor a 30 Kg.

Pruebas Diagnósticas

Prueba diagnóstica simple para médula oblonga y para barbacoa.

Tabla 12. Sensibilidad de InSite *Listeria*® en médula oblonga:

		Diagnostico bacteriológico		
		Positivo	Negativo	
InSite <i>Listeria</i> ®	Positivo	1	6	7
	Negativo	0	80	80
		1	86	87

Tabla 13. Resultado de prueba diagnóstica para InSite *Listeria*®, en médula oblonga

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	100	50	100
Especificidad (%)	93.02	87.06	98.99
Índice de validez (%)	93.1	87.2	99
Valor predictivo + (%)	14.29	0	47.35
Valor predictivo - (%)	100	99.38	100
Prevalencia (%)	1.15	0	3.96

Tabla 14. Sensibilidad de InSite *Listeria*® en barbacoa

		Diagnostico bacteriológico		
		Positivo	Negativo	
InSite <i>Listeria</i> ®	Positivo	4	62	66
	Negativo	0	34	34
		4	96	100

Tabla 15 Resultado de prueba diagnóstica para InSite Listeria®, en barbacoa

	Valor	IC a (95%)	
Sensibilidad (%)	100	87.5	100
Especificidad (%)	35.42	25.33	45.5
Índice de validez (%)	38	27.99	48.01
Valor predictivo + (%)	6.06	0	12.57
Valor predictivo - (%)	100	98.53	100
Prevalencia (%)	4	0	8.34

DISCUSIÓN

En barbacoa se hallaron 2 cepas de *Enterococcus* sp., debido a que fueron descartadas, no se identificó si alguna de ellas pertenece a la especie *Enterococcus faecalis*; por otro lado, hay 11 cepas de *Listeria* spp.; de las cuales únicamente se pudieron identificar siete: cuatro pertenecientes a *L. monocytogenes* y tres pertenecientes a *L. grayi*; lo anterior debido a que no se realizó la prueba de CAMP, pues no se disponía de las cepas de *Rhodococcus equi* y *Staphylococcus aureus* para diferenciar las demás especies, a saber: *L. ivanovii* (hemolisis positiva en el cruce con *Rhodococcus equi*), *L. seeligeri* (hemolisis positiva en el cruce con *Staphylococcus aureus*), *L. welsimeri* (hemolisis negativa en el cruce con *Rhodococcus equi* y con *Staphylococcus aureus*). Por lo tanto las 4 cepas restantes de *Listeria* spp, se encuentran sin identificación de especie.

En medula oblongada no se hallaron cepas de *Enterococcus* sp, sin embargo se aislaron 5 cepas de *Listeria* spp.; de las cuales únicamente se pudo identificar una, perteneciente a *L. monocytogenes*.

El porcentaje de prevalencia de aislamiento que obtuvimos de *Listeria monocytogenes* en medula oblonga fue del 1.15%; los estudios previos de aislamiento de *L. monocytogenes* en carne cruda ovina muestran las prevalencias en según Al-Nabulsi, et al., en 2015 en Yemen del 17.9%, según Al-mashhadany, et al., en 2016 en Jordán del 33.3%, y según Wu, et al., en 2015 en China 33.3%; además en carne ovina congelada Al-mashhadany, et al., obtuvieron en 2016 en Jordán el 53.3%. Estos porcentajes de prevalencia distan mucho del que nosotros encontramos, pues, el más cercano de ellos fue 17.9% en Yemen, teniendo una diferencia del 16.75%, en referencia a nuestro resultado; todos los porcentajes de prevalencia de aislamiento del microorganismo son de bajo riesgo para la salud pública, a excepción de la carne congelada en Jordán, que presenta un riesgo moderado para la misma. A nivel nacional no hay literatura que reporte aislamientos a partir de rastros de procesamiento ovinos, ni carne ovina cruda.

Listeria monocytogenes se aísla a partir de médula oblonga y romboencéfalo cuando el animal está cursando por encefalitis listérica, por lo cual puede explicarse la baja prevalencia de aislamiento a partir de médula oblonga obtenida en este estudio.

Por otra parte, los resultados que se obtuvieron del análisis de la barbacoa son que el porcentaje de positividad es muy bajo, y, por lo tanto el porcentaje de prevalencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* obtenido es del 4% considerándose bajo; el porcentaje de prevalencia de aislamiento que se obtuvo en este estudio muestra ser el menor en cárnicos procesados a nivel nacional, a comparación del obtenido por Martínez, en 2005 sobre milanesa de res en Distrito Federal 10%, Monterrey 26.6%, y Villahermosa 30%, y el obtenido por Silva Paz, et al., en 2007 sobre salchichas porcinas en Baja California 16.5%, y jamón porcino en Baja California 9.7%.

La barbacoa puede contaminarse a partir del medio ambiente, personal de manejo y utensilios con los cuales entra en contacto, pues la ocurrencia de *L. monocytogenes* en rastros, mataderos y plantas de procesamiento de cárnicos se ha asociado a la colonización ambiental debida a la habilidad del microorganismo de adaptación y supervivencia por largos períodos en cuartos y equipos limpios. El análisis de riesgo de las condiciones del personal del expendio, uso de ropa, el equipo del expendio, y características del local; muestra que los utensilios sucios es el factor de mayor riesgo (χ^2 cuadrada de 5.094), siendo la mayor fuente de contaminación de la barbacoa. En España, Gómez y cols. en 2015, detectaron *L. monocytogenes* en 22.72% de las muestras obtenidas a partir de superficies de contacto en fábricas procesadoras de cárnicos, en Latvia, Berzin y cols. en 2010, aislaron *L. monocytogenes* a partir de los dientes de una máquina de corte de carne cruda y el personal de esa área específica en una empresa de procesado de cerdo ahumado, identificando esta máquina de corte como la causa principal de contaminación; en un matadero bovino en Italia, Peccio y cols. en el 2003 aislaron la bacteria en el 27.7% de los cuchillos “limpios” utilizados en el proceso de faenado.

La prevalencia relativamente baja de *L. monocytogenes* en barbacoa puede derivar del tiempo breve que permanece en contacto con superficies y utensilios posiblemente contaminadas. Se requieren buenas prácticas de manufactura, limpieza apropiada, programas de higiene y sanitización efectivos, para la prevención de la contaminación por *L. monocytogenes* de los alimentos listos para el consumo.

La barbacoa se consume típicamente los fines de semana, por lo cual difícilmente permanece en refrigeración, la dosis infectante es de >100 Unidades Formadoras de Colonias, en este trabajo no se midieron los niveles de contaminación de la carne, sin embargo, considerando que la carne se contamina entre el momento en que se extrae de la olla y es consumida, hay escasas probabilidades de que se originen brotes a partir del consumo de barbacoa en los puntos de venta analizados en este estudio.

El uso de biosensores en la industria alimenticia es de uso cotidiano, sin embargo también sería de gran eficacia su implementación en unidades de sacrificio y en puntos de venta de productos alimenticios en la vía pública. La verificación sanitaria se realiza de forma macroscópica sin determinar la contaminación bacteriana del producto alimenticio, por lo cual, el uso de biosensores puede ser una alternativa, pero se requieren mayores estudios y modificaciones a los protocolos de verificación de los productos alimenticios destinados al consumo humano. En el caso de InSite *Listeria*®, resulta de gran utilidad para conocer alimentos contaminados por *Listeria* sp y *Enterococcus* sp; estos géneros contienen cada uno una especie patógena, sin embargo al ser poco específico, y debido a la necesidad de realizar más pruebas, se recomienda para el uso en alimentos que permanecen en refrigeración varios días, o para la verificación de superficies de contacto durante el procesado o almacenamiento de alimentos.

CONCLUSIONES

La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en barbacoa y en medula oblonga fue menor a 0.07, por lo cual se concluye que la hipótesis planteada en este trabajo es inválida.

El porcentaje de prevalencia de aislamiento de *Listeria monocytogenes* en medula oblonga fue de 3.44% y en barbacoa de 4%; por lo tanto, se concluye que el microorganismo se pudo aislar en medula oblonga y barbacoa ovina.

La sensibilidad de la prueba rápida InSite Listeria ® para *Listeria* spp fue de 100% tanto en el análisis de barbacoa, como en el análisis de médula oblongada, y la especificidad de 93% en médula oblonga e índice de validez de 93%; mientras que en barbacoa 35.4% en especificidad y 38% de índice de validez. Estos valores reflejan que la prueba es altamente sensible a las especies del género *Listeria*, pero poco específica para *Listeria monocytogenes*, en el caso de medula oblonga y barbacoa, presenta un valor predictivo negativo del 100%, por lo cual no hay oportunidad para falsos negativos.

También se concluye según los resultados obtenidos que, aunque *Listeria monocytogenes* es un patógeno importante en salud animal, para la salud pública presenta un riesgo muy bajo a partir del consumo de médula oblonga cruda o barbacoa ovina.

De todos los factores de riesgo analizados del expendio de barbacoa, únicamente los utensilios tienen poca significancia estadística siendo un riesgo mínimo en la contaminación del producto.

Este estudio muestra el vacío actual en bibliografía referente al estado que guarda México en cuanto a la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos diversos tanto crudos, como procesados, asimismo acerca de la presencia de cepas persistentes en utensilios y maquinaria de procesamiento de alimentos.

SUGERENCIAS

1. Durante la preparación de la barbacoa, seguir los pasos: 1) limpiar, 2) separar: manejo de la barbacoa preparada en áreas que estén separadas de los productos crudos; 3) cocinar, 4) guardar: la barbacoa lista para comer que se prepare, conserve o almacene cerca de productos crudos puede contaminarse debido a la atomización o goteo, 5) refrigerar.
2. Establecer procedimientos de desinfección que describan cómo deben limpiarse y desinfectarse los utensilios y el equipo antes de usarse.
3. Limpiar y desinfectar los utensilios y equipo usados para manejar, preparar y guardar la barbacoa lista para el consumo constantemente (por ejemplo, cada 4 horas).
4. Desarmar el equipo de procesamiento de barbacoa cocida cuando se limpia y desinfecta para asegurar la limpieza de las áreas de difícil acceso donde se puede esconder la bacteria.
5. Tallar las superficies durante la limpieza para evitar que se desarrollen películas biológicas.
6. Rotar los desinfectantes para proveer un control bacteriano más eficaz.
7. Establecer un procedimiento para desinfectar los artículos de limpieza (por ejemplo, paños y cepillos para restregar).
8. Usar fregaderos separados para lavarse las manos y limpiar los productos o el equipo.
9. Mantener instalaciones adecuadas con jabón y agua potable, dar instrucciones a los empleados sobre cómo lavarse las manos.
10. Mantener higiene en los utensilios (cuchillos, banco, y equipo).
11. Guardar la barbacoa en el congelador dentro de las dos horas posteriores a su preparación o compra, en recipientes poco profundos con tapa, y consumirla dentro de 72 a 96 horas.

LITERATURA CITADA

Abdollahzadeh, y otros, 2016. Prevalence and molecular characterization of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from fish, shrimp, and cooked ready-to-eat (RTE) aquatic products in Iran. *LWT - Food Science and Technology*, Volumen 73, pp. 205-211.

Abram, M. & Dorić, M., 1997. Primary *Listeria monocytogenes* infection in gestating mice. *Folia microbiologica*, 42(1), pp. 65-71.

Abram, M. & Dorić, M., 1997. Primary *Listeria monocytogenes* infection in gestating mice. *Folia microbiologica*, 42(1), pp. 65-71.

Acha, P. & Szyfres, B., 2001. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre*. Washington, DC, EUA: Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Alcazar, C., 2002. Detección de *Salmonella* sp y *Listeria monocytogenes* como agentes contaminantes en queso fresco tipo panela y semimadurado tipo chihuahua por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mexico, DF: Tesis de Maestría UNAM.

Al-mashhadany, y otros, 2016. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Red Meat in Dhamar Governorate/Yemen. *International Journal of Medical and Health Research*, 2(12), pp. 73-78.

Al-Nabulsi, y otros, 2015. Occurrence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and processed meat products in Amman, Jordan. *Journal of Food*, 13(3), pp. 346-352.

AL-Shamary & Mounam, 2011. Incidence of *Listeria* in table-eggs in Baghdad Markets. *International Journal for Sciences and Technolog*, 6(2), pp. 93-98.

Amagliani, y otros, 2016. Presence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* in Raw Ovine Milk Destined for Cheese Production and Evaluation of the

Equivalence Between the Analytical Methods Applied. *Foodborne pathogens and disease*, 20(20).

Awadallah, M. A. I. & Suelam, I. A., 2014. Characterization of virulent *Listeria monocytogenes* isolates recovered from ready-to-eat meat products and consumers in Cairo, Egypt. *Veterinary World*, pp. 788-93.

Bayles, D., Annous, B. & Wilkinson, . B., 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures.. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), pp. 1116-1119.

Berzin, Hellström, Silins & Korkeala, 2010. Contamination Patterns of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Pork Processing. *Journal of Food Protection*, 73(11), p. 2103–2109.

Bērzin, Hörman, Lundén & Korkeala, 2007. Factors associated with *Listeria monocytogenes* contamination of cold-smoked pork products produced in Latvia and Lithuania. *International Journal of Food Microbiology*, p. 173–179.

Cartwright, E. y otros, 2013. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998–2008. *Emergent Infectious Diseases*, 19(1), pp. 1-9.

Castañeda-Ruelas, G. y otros, 2014. Listeriosis in Mexico: Clinical and epidemiological importance. *salud pública de méxico*, 56(6), pp. 654-659.

Conlan, J. W. & North, R. J., 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium.. *The Journal of experimental medicine*, 174(3), pp. 741-744.

Cruz-Pulido, y otros, 2012. *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* in frozen poultry: Detection by NOM-143-SSA1-19 95 and PCR from retan stores from Matamoros and Reynosa, Tamaulipas, Mexico. *CienciaUAT*, 6(3), pp. 41-47 .

Dalzini, y otros, 2016. Survey of prevalence and seasonal variability of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk from Northern Italy. *Food Control* , Volumen 60 , pp. 466-470.

Daskalov, Fejzullah & Daskalova, 2014. Frequency of contamination with *Listeria monocytogenes* of raw dried cured vacuum packed sausageS. *Mac Veterinary Review*, 37(1), pp. 49-53.

De Chastellier, C. & Berche, P., 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infection and immunity*, 62(2), pp. 543-553.

Desmaures, N., Bazin, F. & Guéguen, M., 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* , p. 53–58.

Doganay, M., 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), pp. 173-175.

Dongyou, L., 2008. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Florida: Taylor and Francis.

Donnelly, C., 2001. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutrition Reviews*, 59(6), pp. 183-194.

Dramsi, S. y otros, 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular microbiology*, 16(2), pp. 251-261.

Ebe, Y. y otros, 1999. The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein- 2 in primary listeriosis in mice. *Pathology international*, 49(6), pp. 519-532.

- Edelson, B. T., Cossart, P. & Unanue, E. R., 1999. Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *The journal of immunology*, 163(8), pp. 4087-4090.
- Engelkirk, P. G. & Duben-Engelkirk, J. L., 2008. *Laboratory diagnosis of infectious diseases: Essentials of diagnostic microbiology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Faeji, Fasoro, Oni & Akingbade, 2016. Assessment of *Listeria monocytogenes* in Unpasteurized Milk Obtained from Cattle in Northern Nigeria. *Journal of Microbiology Research* , 6(1), pp. 23-27.
- Fernández Cantón, S., Gutiérrez Trujillo, G. & Viguri Uribe, R., 2012. La mortalidad materna y el aborto en México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 69(1), pp. 77-80.
- Fleming, D. W. y otros, 1985. Pasteurized Milk as a Vehicle of Infection in an Outbreak of Listeriosis. *The New England Journal of Medicine*, 312(7), pp. 404-407.
- Gasnov, U., Hughes, D. & Hansbro, P. M., 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *Microbiology reviews, Federation of European Microbiological Societies*, pp. 851-875.
- Gebretsadik, y otros, 2011. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in foods of animal origin in Addis Ababa, Ethiopia. *Journal of Infection and Public Health*, p. 22—29.
- Gellin, B. y otros, 1991. The epidemiology of listeriosis in the United States—1986. *American journal of epidemiology*, 133(4), pp. 392-401.
- Gómez, y otros, 2015. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain. *Foods*, pp. 271-282.

Guzmán-Hernández, R. L. y otros, 2016. Aislamiento e identificación de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* en quesos frescos no pasteurizados de una zona tropical del golfo de México. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 26(5), pp. 324-331.

Heredia, N., García, S., Rojas, G. & Salazar, L., 2001. Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *Journal of Food Protection*, 64(8), pp. 1249-1251.

Hodzic & Hukic, 2012. Presence and serological characteristics of *Listeria monocytogenes* in meat and meat products. *Health MED*, 6(7), pp. 2593-99.

Iannetti, y otros, 2016. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Italy: prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese. *Food Control*.

Inoue, S. y otros, 2000. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *International Journal of food microbiology*, pp. 73-77.

Jamali, y otros, 2015). Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. *BMC Microbiology*, 15(44).

Johnson, J. L., Doyle, M. P. & Cassens, R. G., 1990. *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. in Meat and Meat Products: A Review. *Journal of Food Protection*, pp. 81-91.

Jungi, T. W. y otros, 1997. Comparison of inducible nitric oxide synthase expression in the brains of *Listeria monocytogenes*-infected cattle, sheep, and goats and in macrophages stimulated in vitro.. *Infection and immunity*, 65(12), pp. 5279-5288.

Karadal & Yidirim, 2014. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from raw milk cheese samples sold in Nigde. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, pp. 255-260.

Kevenk, O. & Gulel, T., 2015. Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products. *Journal of Food Safety*.

Khallaf, y otros, 2016. Prevalence of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat marketed in Rabat, Morocco. *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 22 (1), pp. 8-13.

Khedr, Elmonir & Sobeih, 2016. Public health risk of *Listeria monocytogenes* in raw milk in egypt: virulence genes, antibiotic-resistance and high-risk consumption practices. *International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)*, 5(4), pp. 57-64.

Kinde, y otros, 2007. Recovery of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* from Cheese Entering the United States through a noncomercial land port of entry. *Journal of Food Protection*, 70(1), pp. 47-52.

Lahuerta, A. y otros, 2011. Zoonoses in the European Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009. *Eurosurveillance (Online Edition)*, 16(13), pp. 5-8.

Lakicevic, y otros, 2015 . Occurrence of *Listeria monocytogenes* in a Serbian salmon and seafood processing line during 2013. *Procedia Food Science* , p. 156–159.

Laximan, Kaur, Aulakh & Gill, 2016. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* in bovine milk and evaluating the sensitivity of PCR for direct detection in milk. *Indian Journal of Animal Sciences* , 86(5), p. 512–517.

Lorber, B., 1996. Listeriosis. *Clinical Infectious Disceases*, pp. 1-11.

Low, J. & Donachie, W., 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, 153(1), pp. 9-29.

Mackaness, G., 1962. Cellular resistance to infection. *The journal of experimental medicine*, 116(3), pp. 381-406.

Mansouri-Najand, Kianpour, Sami & Jajarmi, 2015. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Kerman, Iran. *Veterinary Research Forum*, 6(3), pp. 223 - 226.

Marco, A. y otros, 1997. Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. *Microbial pathogenesis*, 23(5), pp. 255-263.

Markkula, Autio, Lundén & Korkeala, 2005. Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field electrophoresis. *Journal of Food Protection*, 68(6), pp. 1228-1231.

Martínez-González, y otros, 2015. Use of a novel medium, the Polymyxin Ceftazidime Oxford Medium, for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw or non-pasteurized foods. *Food Microbiology*.

Martínez, J., 2005. *Deteccion de Listeria monocytogenes, Salmonella spp y Yersinia enterocolica, en carne de res en punto de venta mediante la reaccion en cadena de la polimerasa*. Mexico, DF: Tesis de Maestría UNAM.

McClain, D. & Lee, W., 1987. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, pp. 660-664.

McClure, P., Beaumont, A., Sutherland, J. & Roberts, T., 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes* The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *International journal of food microbiology*, 34(3), pp. 221-232.

McLauchlin, J., Hall, S., Velani, S. & Gilbert, R., 1991. Human listeriosis and paté: a possible association. *British Medical Journal*, pp. 773-775.

Miles, L. & Motes, J., 1991. Incidence of *Listeria* spp. in Shrimp, Oysters, and Estuarine Waters. *Journal of Food Protection*, 54(3), pp. 170-173.

Mohammed, El-Bediwi & Youssef, 2016. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in some marine and frozen fish marketed in damietta, egypt. *International Journal of Current Research*, 8(9), pp. 37978-83.

Momtaz, H. & Yadollahi, S., 2013. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. *Momtaz and Yadollahi Diagnostic Pathology* .

Moosavy, Esmaeili, Mostafavi & Amiri, 2014. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milks used for Iranian traditional cheese in Lighvan cheese factories. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* , 21(4), p. 728–729.

Moreno-Enríquez, y otros, 2007. Prevalence, Types, and Geographical Distribution of *Listeria monocytogenes* from a Survey of Retail Queso Fresco and Associated Cheese Processing Plants and Dairy Farms in Sonora, Mexico. *Journal of Food Protection*, 70(11), p. 2596–2601.

Mylonakis, E. y otros, 2002. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine Baltimore*, 81(4), pp. 260-269.

Nadai, y otros, 2012. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready to eat food samples collected by lombardy region health authorities in 2009-2010. *Italian Journal of Food Safety*, 1(4), pp. 87-90.

Navratilova, y otros, 2004 . Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk, meat and foodstuff of animal origin and the phenotype of antibiotic resistance of isolated strains. *Veterinary Medicine* , 49(7), p. 243–252.

OIE, O. M. p. l. S. A., 2014. *Listeria monocytogenes*: Organización Mundial para la Salud Animal.

Orsi, R., den Bakker, H. & Wiedmann, M., 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, pp. 79-96.

- Park, y otros, 2016. Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Characterization by PFGE. *Advances in Microbiology*, Volumen 6, pp. 343-349.
- Payán, A. & Estudillo, M., 1994. Listeriosis neonatal: ¿enfermedad poco frecuente o no diagnosticada? Enfoque microbiológico. *Colombia Med*, Volumen 25, pp. 69-72.
- Paziak-Domanèska, y otros, 1999. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiology Letters*, pp. 209-214.
- Peccio, A. y otros, 2003. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Letters in Applied Microbiology*, Volumen 37, p. 234–238.
- Peter, Umeh, Azua & Obande, 2016. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Isolated from Beef, Pork and Chicken Sold in Makurdi Metropolis. *British Microbiology Research Journal*, 14(5), pp. 1-7.
- Plata Nieto, V. & Mañon Barbabosa, G., 2011. *Estudio clínico patológico de listeriosis en ovinos remitidos al CIESA durante el período 2005-2007*. Toluca(Estado de México): Universidad Autónoma del Estado de México.
- Posfay-Barbe, K. & Wald, E., 2009. Listeriosis. *Seminars in Fetal Neonatal Medicine*, pp. 228-233.
- Praakle-Amin, Hänninen & Korkeala, 2006. Prevalence and genetic characterisation of *Listeria monocytogenes* in retail broiler meat in estonia. *Journal of Food Protection*, 69(2), pp. 436-440.
- Pron, B. y otros, 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infection and immunity*, 66(2), pp. 747-755.
- Racz, P., Tenner, K. & Mérö, E., 1972. Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 26(6), pp. 694-700.

- Rahimia, E., Momtazb, H., Behzadniac, A. & Baghbadoranid, Z. T., 2014. Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(1), p. 50–53.
- Roberts, A. & Wiedmann, M., 2003. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. 60(5), pp. 904-918.
- Rodas-Suárez, O. y otros, 2006. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), pp. 7410-7412.
- Rogers, H. & Unanue, E., 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice.. *Infection and immunity*, 61(12), pp. 5090-5096.
- Rossi, M. L. y otros, 2008. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista Chilena de Infectología*, 25(5), pp. 328-335.
- Rubio, y otros, 2013. Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(1), pp. 107-115.
- Ryser, E. & Marth, E., 2007. *Listeria, listeriosis, and food safety*. New York, EUA: CRC Press.
- Schlech III, W. y otros, 1983. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *New england journal of medicine*, 308(4), pp. 203-206.
- Schlech, W. 3. y otros, 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food.. *New England Journal of Medicine*, 308(4), pp. 203-206.
- Secretaría de Salud, y otros, 1995. *Norma oficial mexicana NOM-143-SSA1-1995, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de Listeria monocytogenes.*, México, DF.: Diario Oficial de la Federación.

- Siebers, A. & Finlay, B., 1996. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends in microbiology*, 4(1), pp. 22-29.
- Silva Paz, L. E., Pérez Linares, C., Barreras Serrano, A. & Figueroa Saavedra, F., 2007. Identification of *Listeria* sp. in Hams and Frankfurters Products Exhibited for Sale. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(3), pp. 314-316.
- Silva Paz, L. E., Pérez Linares, C., Barreras Serrano, A. & Figueroa Saavedra, F., 2007. Identification of *Listeria* sp. in Hams and Frankfurters Products Exhibited for Sale. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(3), pp. 314-316.
- Sociedad Española de Reumatología, S., 2014. *Manual SER de Reumatología*. 6 ed. Madrid: Elsevier.
- Songer, G. & Post, K., 2004. *Veterinary microbiology: bacterial and fungal agents of animal disease*. s.l.:Elsevier Health Sciences.
- Soto-Beltran, y otros, 2013. Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco in Culiacan, México. *Journal of Microbiology Research*, 3(3), pp. 111-116.
- Soultos, y otros, 2014. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood marketed in Thessaloniki (Northern Greece). *Veterinary World*, 7(11), pp. 1004-1009.
- Spanu, Scarano, Ibba & Spanu, 2015. Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. *Food Control*, Volumen 47, pp. 318-325.
- Sreeja, Moorthy & Upasani, 2016. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Raw and Pasteurized Milk Samples from Tiruchengode (TN), India. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 5(2), pp. 1419-24.
- Theodoris, y otros, 1998. Prevalence and significance of *Listeria monocytogenes* in Greek whey cheeses. A comparison between the years 1990 and 1996. *Milchwissenschaft*, 53(3), pp. 147-149.

- Thimothe, y otros, 2002. Detection of *Listeria* in Crawfish Processing Plants and in Raw, Whole Crawfish and Processed Crawfish. *Journal of Food Protection*, 65(11), p. 1735–1739.
- Torrence, M. E. & Isaacson, R. E., 2003. *Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics*. Iowa, USA: Iowa state press.
- Torres, K. y otros, 2005. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*, microorganism zoonotic emergent. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1), pp. 511-543.
- Torres-Vitela, y otros, 2012. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and Staphylococcal Enterotoxin in Two Types of Mexican Fresh Cheeses. *Journal of Food Protection*, 75(1), p. 79–84.
- Tovar, G. y otros, 2005. *Listeria*. Una aproximación al microorganismo. *Revista digital universitaria UNAM*, 6(4), pp. 2-8.
- Usman, Kwaga, Kabir & Olonitola, 2016. Isolation and Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from Raw Milk and Milk Products in Northern Kaduna State, Nigeria. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 4(3), pp. 46-54.
- Vázquez-Boland, J. A. y otros, 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), pp. 584-640.
- Véghová, y otros, 2015. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the environment of three ewes' milk processing factories in Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54(3), p. 252–259.
- Villanueva, M., 2010. *Frecuencia de Brucella Spp, Listeria monocytogenes y Escherichia coli O157:H7 en quesos frescos sin pasteurizar colectados en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río*. Veracruz, Veracruz: Tesis de Maestría.
- Washington, J. A., 1985. *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. 2 ed. Minesota, USA: Springer-Verlag.

Wesley, I. V., 1999. Listeriosis in animals. *Food Science and Technology-New York-Marcel Deker-*, pp. 39-74.

Wong, H.-C., Chao, W.-L. & Lee, S.-J., 1990. Incidence and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Foods Available in Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(10), pp. 3101-3104.

Wu, S. y otros, 2015. *Listeria monocytogenes* Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China. *PLoS ONE*, 10(8).

Yoshida, Sato & Hirai, 1997. Prevalence of *Listeria* species in raw milk from farm bulk tanks in nagano prefecture. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 60(3), pp. 311-314.

Yua, T. & Jiang, X., 2014. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail food in Henan, China. *Food Control*, Volumen 37, p. 228–231.

Zunabovic, M., Domig, K. & Kneifel, W., 2011. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments—A review. *LWT-Food Science and Technology*, 44(2), pp. 351-362.

ANEXOS.

Anexo 1. Hoja de Registro y Seguimiento de Muestras

Muestra	Hisopo 24 hrs.	Hisopo 48 hrs.	Catalasa	Oxford	PALCAM			Catalasa	Dextrosa	Maltosa	Ramnosa	Manitol	Xilosa	SIM	Gram	Hemolisis
					R	N	A									
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																

Anexo 2. Hoja de Seguimiento de Carbohidratos.

Muestra:

Carbohidrato	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Dextrosa							
Maltosa							
Ramnosa							
Manitol							
Xilosa							
SIM							

Anexo 3. Análisis de puntos críticos de higiene en abastecimientos de expendio de barbacoa

Fecha: _____ Número de muestra: _____

Persona que aplica: _____

Puesto: _____

Característica	Si	No	Observaciones
Uso de cubrepelo			
Cabello largo			
Cabello recogido			
Uñas largas			
Uso de guantes			
Manejo de dinero con manos desnudas (despachador de tacos)			
Área limpia			
Piso limpio			
Mesa de despacho limpia			
Tabla de madera limpia			
Puesto callejero			
Puesto en local			
Uso de mandil			
Ropa apropiada			
Uniforme limpio			
Persona con apariencia higiénica			
Utensilios limpios			

Observaciones generales: _____
