

Artículo original

## Listeriosis bovina: superficies de comedero y bebedero como posible fuente de infección en engorde a corral

Walter R. Galván<sup>1</sup>; Nicolás Streitenberger<sup>2</sup>; Karina E. Pellicer<sup>3</sup>; Julio A. Copes<sup>3</sup>; María A. Quiroga<sup>2</sup>; Luis E. Fazzio<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Hospital Escuela. <sup>2</sup>Laboratorio de Patología Especial Veterinaria. <sup>3</sup>Cátedra de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. Avenida 60 y 118 s/n

\*e-mail: fazzio@fcv.unlp.edu.ar

(Recibido 20 de julio 2018; aceptado 12 de noviembre 2018)

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es describir un caso de listeriosis en engorde a corral de bovinos, en el que se evaluaron las superficies del comedero y bebedero como probable fuente de infección. En un establecimiento comercial, se observaron bovinos con incoordinación en la locomoción, marcha en círculo, apatía, decúbito y muerte. Se realizó la necropsia completa de los animales muertos y se obtuvieron muestras para estudios complementarios. Además, se recolectaron muestras de alimento y esponjado de superficie interna de comederos y bebederos, para análisis microbiológico. Los animales detectados enfermos, que recibieron tratamiento antibiótico, fueron evaluados en las siguientes etapas de engorde. Sobre la base de los hallazgos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos; de los resultados de los análisis complementarios, y de la respuesta al tratamiento, se arribó al diagnóstico de listeriosis bovina. El aislamiento de *Listeria monocytogenes* de la superficie de comedero y bebedero reveló la presencia de la bacteria y permitió inferir que estos implementos podrían haber sido la fuente de infección para los animales. El tratamiento con una asociación de penicilina y estreptomycin resultó efectivo para la cura clínica de los animales afectados, los que recuperaron la capacidad de consumo y no se observaron signos clínicos en las siguientes etapas de engorde.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, biofilm, rumiantes, tratamiento terapéutico

### INTRODUCCIÓN

La listeriosis es una enfermedad infecciosa, de distribución mundial y de aparición esporádica, que afecta a rumiantes, aves y humanos<sup>1</sup>. Si bien *Listeria monocytogenes* no es la única especie patógena, se la menciona como la responsable de la mayoría de las infecciones en bovinos, ovinos y caprinos<sup>2</sup>. El microorganismo es un cocobacilo Gram positivo, aerobio-anaerobio facultativo, que no forma esporo y que por su comportamiento frente a la temperatura se lo considera mesófilo/psicrófilo ya que puede desarrollar también a temperatura de refrigeración.

### ABSTRACT

#### **Bovine listeriosis: water tank and feed bunk surfaces as possible source of infection in feedlots**

The aim of this study was to describe a case of listeriosis in feedlot cattle, in which the surface of water tanks and feed bunks was assessed as the probable source of infection. Cattle from a commercial feedlot showed incoordination in locomotion, circling, apathy, recumbency and death. Complete necropsy and sampling for complementary laboratory testing were performed on dead animals. Samples were collected from food and from the surface of water tanks and feed bunks with pre-sterilized sponges for microbiological analysis. The sick animals treated with antibiotics were followed up during the following stages of fattening. The diagnosis of listeriosis was made through epidemiological, clinical and histopathological findings, laboratory tests, immunohistochemistry and treatment response. *Listeria monocytogenes* was isolated from the surface of water tanks and feed bunks and allowed to infer that these facilities could have been the probable source of infection. The treatment with an association of penicillin and streptomycin was effective for the clinical cure of the affected animals, which recovered the consumption capacity and no clinical signs were observed in the following stages of fattening.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, biofilm, ruminants, therapeutic treatment

El rango de temperatura y pH para su óptimo crecimiento es de 30 a 37°C y de 6 a 9, respectivamente<sup>3</sup>. Un pH bajo resulta inhibitorio y hasta letal para la bacteria. Las propiedades psicrófilas de *L. monocytogenes* aumentan su supervivencia en los alimentos, a la vez que juegan un importante rol en la epidemiología y transmisión de la enfermedad<sup>4</sup>.

La presentación clínica más frecuente de la listeriosis es la neurológica, con encefalitis que afecta principalmente el tronco encefálico y cuyo signo más notable, aunque no siempre presente, es el deambular en círculos<sup>5-7</sup>. El período de incubación varía entre los 10 y 21 días (con máximo de

42 días) y puede verse modificado por estrés, competencia inmunológica y estado nutricional, entre otros factores<sup>8,9</sup>. En ocasiones, se asocia también a presentaciones entéricas, aborto y afecciones sistémicas<sup>2,10</sup>.

Para rumiantes, la vía de ingreso más frecuente es oral, donde alimentos ensilados, con pH 5,5 o superior, pueden representar la principal fuente de infección<sup>11</sup>. Otras fuentes de contagio son la materia fecal de animales portadores sin signos clínicos, incluyendo mamíferos, aves y también el suelo, la leche de tanque, y el agua potable, siendo evidente la ubicuidad de este microorganismo<sup>4</sup>. Las materias primas pueden contribuir a la contaminación de las plantas procesadoras de alimentos, sirviendo también de fuente de infección<sup>6,12</sup>.

*Listeria monocytogenes* posee, como forma de resistencia y sobrevivencia en el ambiente, la capacidad de formar *biofilm* (también denominado biopelícula), que se define como una comunidad microbiana, constituida por microorganismos adheridos irreversiblemente a un sustrato, encerrada en una matriz polimérica extracelular secretada por las mismas bacterias<sup>13</sup>. Su formación podría explicarse en tres etapas: ataque, crecimiento y multiplicación y por último desprendimiento. En la etapa de ataque, se realiza una primera fijación reversible y luego la adherencia irreversible de las bacterias a las diferentes superficies a través de los pili bacterianos. En la etapa de crecimiento y multiplicación, las bacterias además producen un exopolímero que les sirve de cobertura y protección. En la última etapa, cuando el *biofilm* se encuentra maduro, se liberan microorganismos al medio los que perpetúan la fuente de infección<sup>14</sup>. El *biofilm* representa una eficaz forma de protección frente a condiciones ambientales adversas, agentes antimicrobianos y sustancias sanitizantes<sup>1</sup>. Por otro lado, debido a la lenta tasa de crecimiento en el interior del *biofilm*, los microorganismos requieren de baja disponibilidad de nutrientes para sobrevivir<sup>3</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue describir un caso de listeriosis en engorde a corral donde se evaluaron las superficies de comedero y bebedero como posible fuente de infección. Se realizó, además, el seguimiento de los animales que recibieron tratamiento antibiótico durante el período de engorde.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recibió una consulta por bovinos con signos neurológicos en un establecimiento agropecuario dedicado al engorde a corral en la localidad de Marcos Paz (34°48'30.1"S 58°55'48.2"O), Provincia de Buenos Aires. El establecimiento, al momento de la consulta, contaba con 4.600 animales en tres etapas de engorde (adaptación, recría y terminación) en función de la composición del alimento administrado. El establecimiento poseía dos zonas de corrales, donde 18 corrales eran asignados a la etapa de adaptación y recría (sector 1); mientras que en otro sector (a 900 metros de distancia) se encontraban los restantes 18 corrales donde se realizaba la etapa de terminación (sector 2). Los casos clínicos, motivo de la consulta, se habían presentado únicamente en el sector 1, en animales que se encontraban en la etapa de recría.

La alimentación era a base de pasto picado, pellet de soja, gluten, melaza, maíz partido y una mezcla vitamínica-mineral que contenía ionóforos (monensina). En la dieta de recría la proteína y la fibra representaban el 14% y el 18%, respectivamente.

Los animales afectados provenían de diferentes establecimientos y localidades (Puán y Las Heras -Provincia de Buenos Aires- y Concordia -Provincia de Entre Ríos-). Los signos clínicos se observaron en animales de ambos

sexos, de 8 a 11 meses de edad y de 240 ± 22 kilogramos de peso vivo.

El plan sanitario, al momento del ingreso, consistió en la aplicación de una única vacuna polivalente clostridial y una dosis de antiparasitario interno (Ricobendazol 10 %). El lote proveniente de Concordia -Entre Ríos- recibió, además, antiparasitario externo *pour-on* (imidacloprid y cipermetrina como principios activos).

La anamnesis reveló que el primer animal con signos clínicos se observó en el corral N° 6 el día 27/07/16. En el mismo corral se encontraron, además, 4 animales con signos clínicos similares los días 29/07/16 y 30/07/16. El día 2/08/16 se registraron animales afectados en los corrales N° 4, N° 5 y N° 12.

Los signos clínicos descriptos por personal del establecimiento y observados en la visita fueron incoordinación en la locomoción, más manifiesta en la huida, marcha en círculo, indiferencia al medio y a la entrega de alimentos. Se informó también, posición anormal de la cabeza -lateralización con respecto al eje mayor longitudinal- y ptosis auricular unilateral. Conforme pasaban los días, se observó adelgazamiento progresivo y deshidratación. Posteriormente los animales adoptaban la posición de decúbito lateral, con pedaleo, opistótonos y muerte en un lapso variable de 3 a 7 días a partir del inicio de los signos clínicos. Algunos animales, además, presentaron materia fecal semilíquida, verde amarillenta, con hilos de sangre.

Al arribar al lugar, luego de realizar la inspección del rodeo y de constatar los signos clínicos descriptos, se registraron los parámetros clínicos individuales de los animales afectados y se recolectaron muestras de sangre con anticoagulante. En la Tabla 1 se presentan los datos y estudios realizados de cada uno de los animales incluidos en el presente estudio. Se realizó la necropsia de los animales hallados muertos y de aquellos que se encontraban en decúbito permanente, los cuales no se podían incorporar por sus propios medios. La eutanasia se realizó mediante la inyección endovenosa rápida de procaína HCL (50 ml totales por animal - Eutanásico para equinos, Equi Systems S.R.L.). Se recolectaron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), por punción en la articulación atlanto-occipital, para análisis citológico y bacteriológico. Se acondicionaron muestras de encéfalo y ganglio del nervio trigémino para estudios bacteriológicos y virológicos. Se obtuvieron muestras de encéfalo, ganglio del nervio trigémino y de diferentes órganos en recipientes con formol neutro al 10% para estudios histopatológicos y de inmunohistoquímica (IHQ). Se extrajeron muestras de materia fecal para recuento de huevos de parásitos (HPG) y oquistes (OPG) por gramo de materia fecal, de los animales a los que se les realizó la necropsia (n=6) como de los compañeros de lote que no presentaban signos clínicos (n=10). Se recolectaron y acondicionaron muestras de alimento, incluyendo cada uno de los ingredientes (pasto picado, pellet de soja, gluten feed, melaza y maíz) y de la ración totalmente mezclada (TMR) que se encontraba en el comedero, para su análisis microbiológico. Además, se recolectó material del piso del comedero y lateral interno del bebedero de uno de los corrales donde se observaron signos clínicos (corral N° 6) utilizando la técnica del esponjado para verificación de limpieza de superficies (FSIS 10,300.1, Intensified Verification Testing (IVT) protocol for sampling of product, food contact surfaces, and environmental surfaces for *Listeria monocytogenes* (LM) or *Salmonella* spp; United States Department of Agriculture). La muestra se tomó mediante una esponja Nasco *Whirl-Pak* embebida en 10 ml de caldo de Half Fraser estéril (Difco, Detroit, Michigan, USA). El muestreo se realizó sobre la superficie interna del bebedero a la altura del nivel del agua en forma lineal y del piso del comedero de una superficie de 100 cm<sup>2</sup>.

**Tabla 1:** Resumen de los datos de cada bovino incluido en el presente caso y estudios realizados según se encontraban (vivos/muertos) al momento de la visita.

Datos/estudios realizados	Identificación animal (Nº de necropsia)					
	1	2	3	4	5	6
Raza	Bradford	A. Angus	Brangus	Mestizo	A Angus	Bradford
Sexo	Macho	Hembra	Macho	Macho	Hembra	Macho
Tº rectal	No	Si	Si	No	Si	No
Hematología	No	No	Si	No	Si	No
Eutanasia	No	Si	Si	No	Si	No
LCR	Si	Si	Si	Si	No	Si
Bacteriología*	Si	Si	No	No	Si	Si
Histopatología	Si	Si	Si	Si	Si	Si
IHQ	Si	Si	Si	Si	Si	Si

LCR: Líquido cefalorraquídeo tomado por punción de la articulación atlanto-occipital.

IHQ: inmunohistoquímica en zonas de lesión microscópicas.

\* Bacteriología realizada a partir de muestras de cerebro y LCR. En el animal identificado como Necropsia 5 no fue procesado el LCR para este análisis.

**Tabla 2:** Recuento total y diferencial de glóbulos blancos en bovinos que presentaban signos clínicos al momento de la visita

ID	Leuco Totales <sup>1</sup>	Neutro Banda <sup>2</sup>	Neutro Segment <sup>3</sup>	Eosi <sup>4</sup>	Baso <sup>5</sup>	Linfo <sup>6</sup>	Mono <sup>7</sup>
	/mm <sup>3</sup>						
Necropsia 3	32.700	4.251	23.871	327	0	3.270	981
Necropsia 5	23.100	2.546	18.289	0	0	1.621	694
Valor de referencia	4.500-12.000	0-120	600-4.000		0-200	2.500-7.500	25-840

<sup>1</sup> Leucocitos Totales, <sup>2</sup> Neutrófilos en Banda, <sup>3</sup> Neutrófilos Segmentados, <sup>4</sup> Eosinófilos, <sup>5</sup> Basófilos, <sup>6</sup> Linfocitos, <sup>7</sup> Monocitos.

Una vez obtenida la muestra, se transportó refrigerada al laboratorio dentro de las 24 h para aislamiento y tipificación de *L. monocytogenes* bajo norma ISO 11290-1 (International Standard Organization ISO 11290-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *L. monocytogenes*).

Los registros de temperaturas máximas y mínimas, en los días previos y durante el desarrollo de los casos clínicos, se obtuvieron de la Estación Meteorológica de Marcos Paz, (disponible en <http://www.bdh.acumar.gov.ar:8081/bdh3/meteo/mpaz/mb1>).

## RESULTADOS

La temperatura rectal, registrada en 3 animales con signos clínicos, fue de 35,8; 36,5 y 37,1°C respectivamente. Los mismos permanecían en decúbito sin poder incorporarse por sus propios medios. El reflejo pupilar se encontraba normal. En la revisión clínica, en un animal (identificado como necropsia 2), el cuerpo de la mandíbula presentó movilidad anormal en su tercio medio del lado derecho, región que presentaba marcado dolor y crepitación a la palpación.

Los resultados del recuento de eritrocitos e índices hematimétricos se observaron dentro del rango normal y de referencia para la especie (resultados no mostrados). El recuento diferencial de leucocitos se presenta en la Tabla 2, en la que se observa una marcada leucocitosis a expensas de polimorfonucleares neutrófilos segmentados y en banda. El LCR, evidenció un elevado recuento de células -total y diferencial-; los resultados se presentan en la Tabla 3.

En la necropsia no se observaron lesiones de carácter diagnóstico en los animales identificados como necropsia 1, 3, 4, 5 y 6. Sin embargo, en el animal identificado como necropsia 2, se observó una zona de marcada hemorragia meníngea en la porción basal de cerebro y cerebelo, además de una fractura completa del cuerpo de la mandíbula derecha en su tercio medio. En el intestino se observó engrosamiento leve de la última porción del colon y recto, con petequias múltiples en la superficie mucosa. En las necropsias 1, 3, 4, 5 y 6 no se observaron lesiones en el tracto intestinal.

Los hallazgos microscópicos (n=6), manifiestos en la región del tronco encefálico, consistieron en abundantes y prominentes manguitos perivasculares de células mononucleares, edema de neuropilo, sustancia blanca

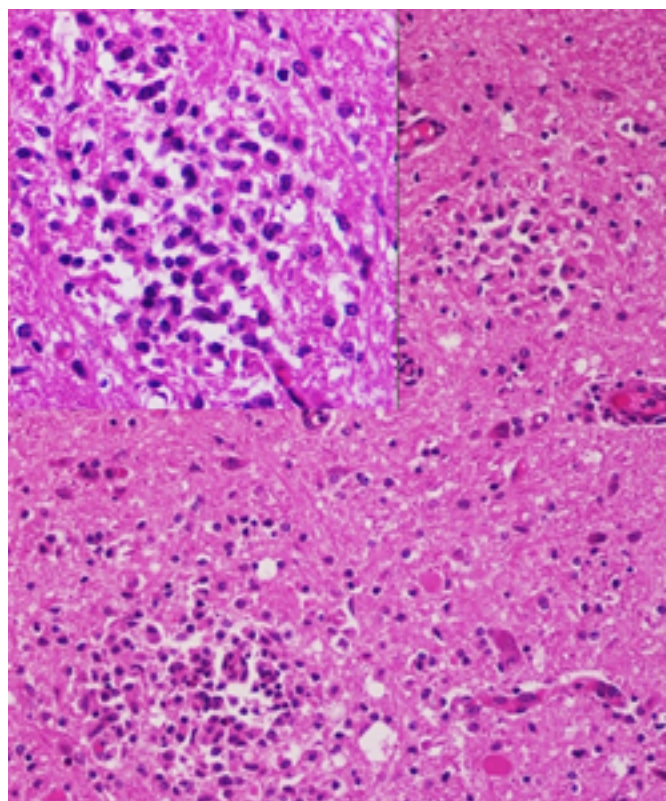
**Tabla 3:** Recuento celular total y porcentaje diferencial de células en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de bovinos con signos clínicos a los que se les realizó la necropsia.

ID	Recuento celular total (mm <sup>3</sup> )	Neutro <sup>1</sup>	Eosi <sup>2</sup>	Baso <sup>3</sup>	Linfo <sup>4</sup>	Mono <sup>5</sup>
		%				
Necropsia 1	20	25	0	0	60	15
Necropsia 2	800	68	0	0	12	20
Necropsia 3	100	10	0	0	80	10
Necropsia 4	600	12	0	0	88	0
Necropsia 6	400	70	0	0	10	20
Valor referencia <sup>#</sup>	1-4					

1 Neutrófilos, 2 Eosinófilos, 3 Basófilos, 4 Linfocitos, 5 Monocitos. #Valor tomado de Welles y col<sup>30</sup>.

edematosa y rarefaciente con infiltración de células histiocíticas (focos de reacción microglial), microabscesos, degeneración walleriana e infiltración meníngea de célula mononucleares (macrófagos y linfocitos). Sobre la base de los hallazgos microscópicos se formuló el diagnóstico morfológico de meningoencefalitis supurativa multifocal subaguda (Tabla 4, Figura 1). En el animal identificado como necropsia 2 en intestino delgado se observó hiperemia y linfangiectasia en mucosa y submucosa, exudado catarral en la luz, placas de Peyer reactivas y abscesos en criptas. En intestino grueso se observó exudado catarral en la luz y presencia de ooquistes de parásitos. La mucosa se encontraba hiperémica con moderado infiltrado mononuclear en lámina propia.

El estudio IHQ demostró inmunomarcación positiva, en los microabscesos encefálicos principalmente en



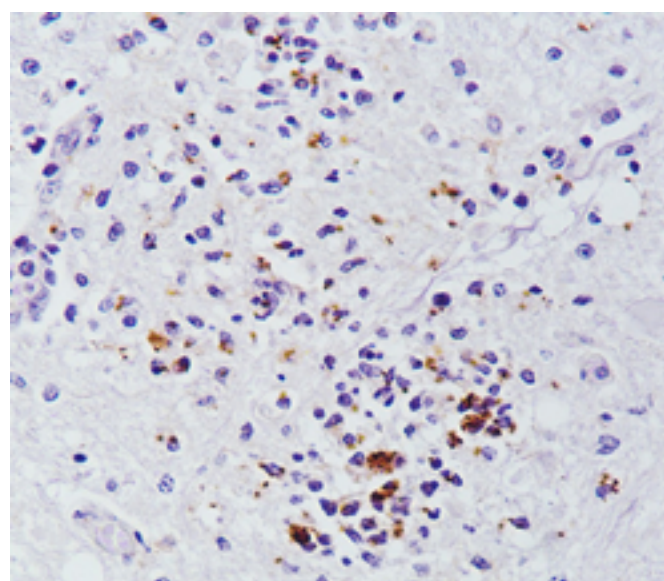
**Figura 1:** Cerebro Medio (colículo cerebral). Focos de reacción microglial (FRM). H&E. Obj. 20x. Recuadro: detalle de FRM (Obj. 40x).

la zona del bulbo (obex) y médula oblongada en todos los casos estudiados (n=6). Estructuras bacilares, con inmunomarcación positiva para *L. monocytogenes*, se observaron principalmente en el citoplasma de células monocíticas, en forma libre y en menor medida en el citoplasma de neutrófilos (Figura 2).

Los resultados del análisis coproparasitológico (recuento de OPG) de los animales identificados como necropsia 1, 3, 4, 5, 6 y compañeros de lote (corral 6; n=10) se encontraron bajos<sup>15</sup>. Sin embargo, solo el animal identificado como necropsia 2 evidenció un alto recuento de OPG (27.440). Mencionados resultados permitieron identificar a la coccidiosis bovina como un complicante, al menos para uno de los animales (necropsia 2), y descartar signos neurológicos asociados a esta afección en el resto de los animales que se efectuó la necropsia.

La marcha para aislamiento viral y técnicas moleculares (PCR) para herpes virus bovino tipo 1 y 5 a partir de muestras de cerebro y ganglio del nervio trigémino resultaron negativas.

Los cultivos bacteriológicos a partir de encéfalo, LCR, ingredientes utilizados en la alimentación y del TMR



**Figura 2:** Médula oblongada. Microabscesos con inmunomarcación positiva para *Listeria monocytogenes* en el citoplasma de células monocíticas principalmente, así como en forma libre y en menor medida en el citoplasma de neutrófilos. Obj. 40x.

**Tabla 4:** Frecuencia de lesiones microscópicas en encéfalos de bovinos con signos clínicos (n=6).

Región anatómica	LM <sup>1</sup>	FRM <sup>2</sup>	MA <sup>3</sup>	IPM <sup>4</sup>	EMS <sup>5</sup>
Corteza frontal	-	-	-	-	-
Corteza parietal	-	-	-	-	-
Corteza occipital	-	-	-	-	-
Ganglio basal*	2/6	2/6	-	1/6	2/6
Tálamo*	-	-	-	2/6	1/6
Cerebro medio (colículos)*	4/6	4/6	6/6	4/6	5/6
Bulbo (obex)*	2/6	2/6	6/6	6/6	6/6
Médula oblongada*	3/6	5/6	4/6	4/6	6/6
Cerebelo*	4/6	3/6	2/6	1/6	1/6

\* El primer número indica la cantidad de animales en que se observó la lesión especificada, el segundo la cantidad total de encéfalos procesados.

1LM: leptomeningitis, infiltrado celular mononuclear (monocitos y linfocitos) difuso en meninges. 2FRM: focos de reacción microglial, infiltrados multifocales de células de la glía en áreas de rarefacción del encéfalo. 3MA: microabsesos, infiltrados multifocales de neutrófilos en áreas de rarefacción del encéfalo. 4IPM: infiltrado perivascular mononuclear, infiltrado celular mononuclear (monocitos y linfocitos) en espacio de Virchow-Robin. 5EMS: encefalitis multifocal supurativa (múltiples microabscesos y/o focos de reacción microglial en sustancia gris y/o blanca del encéfalo).

resultaron negativos. Las muestras obtenidas por esponjado (bebedero y comedero -corral N° 6- ) resultaron positivas al aislamiento de *L. monocytogenes*. El antibiograma, para ambos aislamientos, resultó sensible a penicilina, ampicilina, tetraciclina, tilmicosina y cefalosporina de 1ra generación; mientras que fue resistente a cefalosporinas de 3ra generación.

En el análisis epidemiológico, se observó que las muertes se registraron a partir de los 42, 48, 53 y 55 días de ingresados a los corrales N° 6, 12, 4 y 5 respectivamente. La morbilidad fue del 7,95% (12/151) y la mortalidad del 3,97% (6/151) para el corral N° 6. En los demás corrales donde se observaron signos clínicos (N° 4, N° 5 y N° 12) la morbilidad varió entre 2,33 y 4,69 % mientras que la mortalidad no superó el 1,56 % (Tabla 5). Los animales detectados enfermos a partir del día 3/08 fueron apartados y tratados con dos dosis (con intervalo de 24 h) de una mezcla de penicilina G sódica, penicilina G benzatínica, estreptomycin base y dipirona (20.000 UI de penicilina por kg de peso). De los 16 animales tratados, 14 se recuperaron luego de la segunda aplicación, en forma rápida y sin secuelas evidentes. Los animales que no respondieron favorablemente a la medicación (luego del 3/08) fueron los que presentaron signos clínicos avanzados (decúbito intermitente con un marcado deterioro del sensorio) al momento de la primera aplicación antibiótica (Tabla 5).

Los registros de temperatura ambiente (máxima y mínima) en los días previos a la presentación del caso y durante el mismo se presentan en la Figura 3.

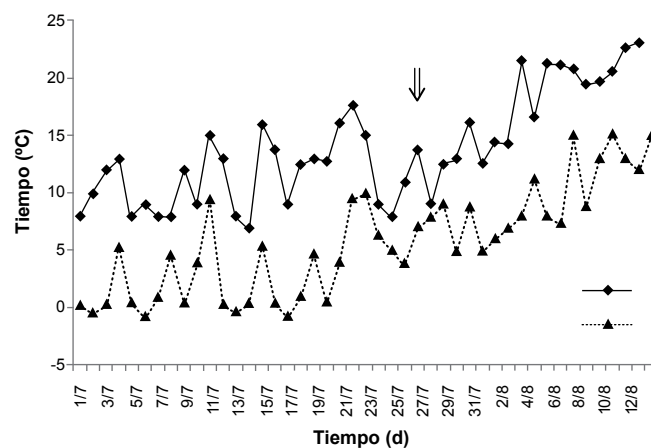
**Tabla 5:** Datos epidemiológicos y de tratamiento registrados en establecimiento de engorde a corral de bovinos.

	Corral			
	N° 6	N° 4	N° 5	N°12
N° total bovinos alojados	151	132	128	129
N° bovinos enfermos	12	4	6	3
N° bovinos muertos	6	1	2	1
% enfermos	7,95	3,03	4,69	2,33
% muertos	3,97	0,76	1,56	0,78
N° tratados	7	3	4	2
N° recuperados post-tratamiento	6	3	3	2

## DISCUSIÓN

Sobre la base de los hallazgos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y otros análisis complementarios se arribó al diagnóstico de listeriosis bovina. La respuesta al tratamiento antibiótico realizado reafirma aun más esta conclusión. La presencia de *L. monocytogenes* en el esponjado de comedero y bebedero evidenciaría la probable fuente de infección para los animales. Sin embargo, no se identificó *L. monocytogenes* de el/los ingrediente/s del alimento que pudieron haber resultado contaminado/s con el microorganismo. Tampoco se pudo determinar si heces de animales portadores (bovinos, aves, etc.) fueron la fuente de infección primaria, entre otras posibles en este caso.

El análisis sanguíneo (leucocitosis marcada a expensas de polimorfonucleares neutrófilos en banda) y del LCR (presencia de abundante cantidad células de la serie blanca) orienta a una encefalitis de origen infeccioso. Sin embargo, no se encontró aumento en la temperatura corporal ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ), como es de esperar en este tipo de afección. Una posible explicación es que los animales, al momento de la visita, se encontraban con signos avanzados de la enfermedad

**Figura 3:** Registro de temperatura (máxima – mínima) en los días previos y durante el transcurso del caso clínico de listeriosis en bovinos de engorde a corral.

(estado terminal). Por otro lado, en ensayos de infección experimental con *L. monocytogenes*, la temperatura rectal aumentó significativamente con respecto a los controles por 4-5 días post infección, para luego descender a valores dentro del rango considerado normal<sup>15</sup>.

El recuento celular en LCR en enfermedades bacterianas aumenta a expensas de polimorfonucleares neutrófilos, si bien en el caso particular de *L. monocytogenes*, el incremento se debe al aumento en el número de células mononucleares<sup>16,17</sup>. Sin embargo, en el presente caso, se observó elevado número tanto de polimorfonucleares como de mononucleares en el LCR.

Los hallazgos histopatológicos fueron contundentes para la confirmación del diagnóstico. Las características particulares de las lesiones encontradas y la ubicación de estas se corresponden con las infecciones encefálicas por *L. monocytogenes*<sup>5</sup>. Para este caso en particular, el aislamiento bacteriológico de las muestras de necropsia resultó negativo. Sin embargo la IHQ permitió confirmar la presencia de la bacteria en relación a la lesión encontrada. En este sentido, y en concordancia con otros autores<sup>18,19</sup>, la IHQ es una técnica de gran relevancia para evidenciar la bacteria en el lugar de lesión, aun cuando en las mismas muestras, el cultivo bacteriológico había resultado negativo.

Para rumiantes en confinamiento el silo, particularmente de maíz cuyo pH no se ha acidificado correctamente, es el ingrediente de la ración más frecuentemente asociado a la contaminación con *Listeria spp.* Un estudio retrospectivo<sup>20</sup>, describió que el 64,7 % de los casos de listeriosis estuvieron asociados al consumo de silaje de maíz. Este estudio coincide con datos de casuística realizados en la misma región<sup>19,21</sup> como así también en diferentes partes del mundo<sup>1,22</sup>. Sin embargo, no todos los animales con listeriosis encefálica tienen antecedentes de consumo de ensilaje, ya que se han reportado casos en bovinos consumiendo pasturas implantadas, heno, subproductos de la soja y una variedad de granos<sup>23,24</sup>. En el presente caso, la ración no incluyó silo. Al analizar los diferentes componentes y la TMR, no se pudo establecer qué ingrediente aportó la contaminación bacteriana ya que los mismos resultaron negativos. Sin embargo, el cultivo realizado a partir del esponjado del comedero y bebedero evidenció la presencia de la bacteria y, por lo tanto, es probable que esta sea la fuente de infección.

*Listeria monocytogenes* presenta la particularidad de formar *biofilm* y cuando éste madura, sobreviene la etapa de “desprendimiento” donde una porción se libera, ocasionando una alta carga de microorganismos en el alimento o agua de bebida<sup>13</sup>. Si bien en el presente estudio no fue confirmada la formación de *biofilm* por parte de *L. monocytogenes*, las bajas temperaturas observadas en los días previos y durante la presentación clínica de los casos, podrían haber predispuerto al desarrollo en comederos y bebederos debido a su adaptación a estas temperaturas aún en condiciones metabólicas adversas<sup>25</sup>. Es sabido que el frío actúa como factor de selección por sobre los demás géneros bacterianos, debido al comportamiento psicrófilo de este género. Temperaturas más elevadas favorecerían, el desarrollo de otras bacterias que limitarían el crecimiento de *L. monocytogenes*<sup>9</sup>. La dificultad práctica de limpieza/desinfección de comederos y bebederos ayuda al acúmulo de materia orgánica que actúa de sustrato para el desarrollo del *biofilm*.

*Listeria monocytogenes* ha demostrado ser sensible *in vitro* a un amplio rango de antibióticos incluyendo penicilina, ampicilina, tetraciclinas, aminoglucósidos, macrólidos y cloranfenicol. Sin embargo, las cefalosporinas, son consideradas ineficientes para el tratamiento de *L. monocytogenes* en animales y humanos<sup>26</sup>. La sensibilidad

encontrada en el antibiograma en el presente caso concuerda con lo informado previamente por otros autores<sup>3,6,27</sup>. En rumiantes, no existen trabajos donde se pueda determinar el mejor tratamiento antimicrobiano frente a *L. monocytogenes*<sup>27</sup>. Si bien la penicilina y oxitetraciclina son los más frecuentemente utilizados<sup>17</sup>, las penicilinas no atraviesan con facilidad la barrera hematoencefálica, la concentración alcanzada en el LCR es solo del 0,5 al 2% del pico encontrado en plasma. Sin embargo, cuando existe inflamación en meninges se alcanzan niveles terapéuticos del fármaco en SNC y LCR<sup>27</sup>. La dosis de penicilina indicada varía entre 40.000 – 44.000 UI/kg dos veces al día por vía IM cuando el tratamiento se realiza al inicio del curso de la enfermedad<sup>28</sup>. Inclusive, se mencionan dosis de hasta 80.000 UI/kg administradas cuatro veces al día<sup>27</sup>. En el presente caso, la respuesta al tratamiento con dos dosis de una asociación sinérgica bifásica de penicilina y estreptomycinina 20.000 UI/kg vía IM (según indicación del laboratorio fabricante), resultó eficaz para la cura clínica. Los animales convalecientes recuperaron la capacidad de consumo y no se observaron signos clínicos en los siguientes días post tratamiento. Por otro lado, se sugiere además, continuar el tratamiento al menos por dos a cuatro semanas ya que son frecuentes las recaídas<sup>29</sup>. En este caso no se observaron recaídas, por lo que no se necesitó retratamiento en las siguientes etapas de engorde.

La administración de antiinflamatorios no esteroides se recomienda para aliviar el dolor causado por la leptomeningitis por *L. monocytogenes*<sup>30</sup>. En este caso el producto antimicrobiano utilizado incluía dipirona, el cual se estima, resultó de ayuda en la rápida mejoría de los animales tratados. La administración de corticoides está contraindicada en animales con encefalitis por *L. monocytogenes*. En un estudio experimental se observó un incremento en la eliminación bacteriana por leche luego de la administración de dexametasona<sup>31</sup>.

Los índices de recuperación de los animales afectados por encefalitis por *L. monocytogenes* dependen en gran medida de la rapidez con que se instaura el tratamiento. Cuando los signos clínicos son evidentes, sobreviene la muerte a pesar del mismo<sup>32</sup>. En coincidencia con lo mencionado anteriormente, los dos animales tratados con signos avanzados de la enfermedad no presentaron respuesta favorable al tratamiento antibiótico terapéutico.

## CONCLUSIONES

La posibilidad de *L. monocytogenes* de formar *biofilms*, permite considerarlo como fuente de infección para los bovinos en engorde a corral. Las condiciones climáticas frías habrían favorecido el desarrollo de *L. monocytogenes* en comederos y bebederos por sobre otras bacterias patógenas. El tratamiento precoz resultó eficaz para revertir los signos en las condiciones del presente caso.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a Morrel E. L. (INTA Balcarce) por su valiosa colaboración con técnicas moleculares. El presente trabajo fue realizado en el marco del Programa de Incentivos a Docentes Investigadores, 11/V257, U.N.L.P.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

## REFERENCIAS

1. Czuprynski CJ, Kathariou S, Poulsen K. *Listeria*. En: Gyles CL, Prescott JF, Songer GJ, Thoen CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4th ed. Ames, Iowa, 2010, p. 167-187.
2. García JA, Micheloud JF, Campero CM, Morrell EL, Odriozola ER, Moreira AR. Enteric listeriosis in grazing steers supplemented with spoiled silage. *J Vet Diagn Inv* 2016; 28:65-69.
3. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8:881-890.
4. Mohammed HO, Stipetic K, McDonough PL, Gonzalez RN, Nydam DV, Atwill ER. Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. *Am J Vet Res* 2009; 70:383-388.
5. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise?. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010; 63:11-22.
6. Erdogan HM, Cripps PJ, Morgan KL, Cetinkaya B, Green LE. Prevalence, incidence, signs and treatment of clinical listeriosis in dairy cattle in England. *Vet Rec* 2001;149:289-293.
7. Leardini NA. *Listeria*. En: Stanchi NO editor. Microbiología Veterinaria. 1ra ed. Buenos Aires, Editorial Intermédica. 2007, p. 258- 265.
8. Summers BA, Cummings JF, Lahunta A. Inflammatory diseases of the central nervous system. En: Summers BA, Cummings JF editors. *Veterinary Neurophatology*. 1st ed. St. Louis, Mosby Co,1995, p.133-135.
9. Jay JM. Foodborne Listeriosis: En: Jay JM editor. *Modern Food Microbiology*. 6th ed. Gaithersburg, MD Aspen Publishers, Inc., 2000, p. 679-683.
10. Fairley RA, Pesavento PA, Clark RG. *Listeria monocytogenes* infection of the alimentary tract (enteric listeriosis) of sheep in New Zealand. *J Comp Pathol* 2012;146:308-313.
11. Nightingale KK, Fortes ED, Ho AJ, Schukken YH, Grohn YT, Wiedmann M. Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. *JAVMA* 2005; 227:1808-1814.
12. Borucki MK, Reynolds J, Gay CC, McElwain KL, Kim SH, Knowles DP, Hu J. Dairy farm reservoir of *Listeria monocytogenes* sporadic and epidemic strains. *J Food Prot* 2004; 67:2496-2499.
13. Engum Bruvoll AE. Characterization of the *biofilm* forming ability of *Listeria monocytogenes* and evaluation of the TTC-assay as a method to assess the effect of disinfectants on *biofilm* bacteria. [Doctoral Thesis]. Faculty of Chemistry, Biotechnology and Food Science at the Norwegian University of Life Sciences; 2017.
14. Ivanek R, Gröhn YT, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3:319-336.
15. Sánchez RO, Sanabria REF, Romero JR. Coccidiosis Bovina. *Vet Arg* 2005; 217: 492-501.
16. Barbuddhe SB, Malik SVS, Gupta LK. Kinetics of antibody production and clinical profiles of calves experimentally infected with *Listeria monocytogenes*. *J Vet Med* 2000; 47:497-502.
17. Braun U, Stehle C, Ehrensperger F. Clinical findings and treatment of listeriosis in 67 sheep and goats. *Vet Rec* 2002; 150:38-42.
18. Schweizer G, Ehrensperger F, Torgerson PR, Braun U. Clinical findings and treatment of 94 cattle presumptively diagnosed with listeriosis. *Vet Rec* 2006; 158:588-592.
19. Campero CM, Odeón AC, Cipolla AL, Moore DP, Poso MA, Odriozola E. Demonstration of *Listeria monocytogenes* by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissues from natural cases of ovine and bovine encephalitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002; 49:379-383.
20. Margineda CA, Cantón G, Lischinsky L, Moreira A, Campero CM. Listeriosis en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Vet*. 2012; 23:32-37.
21. Costa EF, Fazzio LE, Traveria GE, Sánchez RO, Alvarado Pinedo MF, Mattioli GA, Otero MM, Chialva M, Romero JR. Causas de mortandad y abortos en bovinos – Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la Provincia de Buenos Aires. *Rev Med Vet*. 2004; 85:16-22.
22. Ladds PW, Dennis SM, Njoku CO. Pathology of listeric infection in domestic animals. *Vet Bull* 1974; 44:67-74.
23. Dawn EM. Brainstem and cranial nerve abnormalities: listeriosis, otitis media/interna, and pituitary abscess syndrome. *Vet Clin Food Anim* 2004; 20: 243–273.
24. Braz MR, Chayer R, Moreira AR, Stilwell G. Descripción de un caso de listeriosis en bovinos de cría en pastoreo del sudeste de la provincia de Buenos Aires. *Rev. Med. Vet* 2017; 2: 7–11
25. Pellicer K, Copes J, Giannuzzi L, Zaritzky N. Behavior of *Listeria monocytogenes* type1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. *Food Control* 2011; 22:1573-1581.
26. Hof H. An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5:1727-1735.
27. Francoz D. Cranial Nerve Abnormalities: Listeriosis. En: Anderson DE, Rings DM editors. *Food Animal Practice*. 5ta ed. St. Louis, Missouri USA, Saunders Elsevier. 2005, p. 299-301.
28. Divers TJ: Infectious causes of meningitis and encephalitis in cattle. En Howard JL editor. *Current veterinary therapy: food animal practice*. 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1986, p. 852-855.
29. Morin DE. Brainstem and cranial nerve abnormalities: listeriosis, otitis media/interna, and pituitary abscess syndrome. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2004; 20:243-273.
30. Lorenz MD, Kornegay JN. Pain. En: Lorenz MD, Kornegay JN editors. *Handbook of veterinary neurology*. 1st ed. St Louis, Saunders, 2004, p. 345-353.
31. Wesley IV, Bryner JH, Van der Maaten MJ, Kehrl M. Effects of dexamethasone on shedding of *Listeria monocytogenes* in dairy cattle. *Am J Vet Res* 1989; 50:2009-2013.
32. George LW. Listeriosis. En: Smith BP editor. *Large Animal Internal Medicine*. 3rd ed. Mosby, St. Louis, 2002, p. 946-949.
33. Welles EG, Tyler JW, Sorjonen DC, Whatley EM. Composition and analysis of cerebrospinal fluid in clinically normal adult cattle. *Am J Vet Res* 1992; 53:2050-2057.