



Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expendida en el municipio de Pamplona, Colombia.

Carrascal Camacho A K ¹, Albarracín Contreras Y², Sarmiento Torres P²

¹Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

²Grupo de Investigación Recursos Naturales, Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Biotecnología, Universidad de Pamplona
yoli@unipamplona.edu.co

ABSTRACT

This study has the objective of establishing the incidence of *Listeria monocytogenes* in non-pasteurized cow's milk sold in the municipality of Pamplona, Colombia. Transversal descriptive studies were done and applied to a pre-coded survey with the objective of determining the number of routes and the volume of milk carried on each route and taking a stratified sample of about 200 sample cases. The test of absence/presence of *L. monocytogenes* was used and the described technique given by INVIMA was applied; for the confirmation of the species the technique PCR multiple was employed amplifying the region 16sRNA and the gene *hyiA*. The results obtained pointed out that the Municipality of Pamplona has 19 different non-pasteurized milk routes and none of the milk transported is refrigerated; this, thereby, reduces the quality of the milk. The incidence of *L. monocytogenes* analyzed from the samples taken was 3% presented in those transports where there are 4 or more hours for the duration of the transportation itself ($P < 0.01$). Considering the obtained results it is important to focus on the capacitation and the control of the pathogen in its first steps of transportation for the lessening of the risk to the consumers.

KEY WORDS

Incidence, Cow's Milk, Non-pasteurized Milk, *Listeria monocytogenes*, Pamplona.



RESUMEN:

Este estudio tuvo como objeto establecer la incidencia de *Listeria monocytogenes* en leches crudas de vaca expendidos en el municipio de Pamplona, Colombia. Para ello se realizo un estudio descriptivo transversal, se aplico una encuesta precodificada con el fin de determinar el número de rutas y el volumen de leche en cada ruta y mediante un muestreo estratificado se tomaron un total de 200 muestras de leche. Para el aislamiento de *L. monocytogenes* se utilizo la prueba de ausencia/presencia y se uso la técnica descrita por el INVIMA; y para la confirmación de la especie se utilizó la técnica de PCR múltiple, amplificando la región 16sRNA y el gen *hylA*. Los resultados obtenidos señalaron que al municipio de Pamplona ingresan 19 rutas de leche cruda y que ninguna de las leches transportadas se refrigera, reduciendo de esta manera la calidad de la leche. La incidencia de *L. monocytogenes* en las muestras de leche analizadas fue del 3%, presentándose en mayor proporción en las rutas que tienen mas de 4 horas de duración en su transporte ($P < 0.01$). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es importante enfocar la capacitación y el control de este patógeno hacia las primeras etapas de la cadena productiva de tal manera que se minimice el riesgo para los consumidores.

PALABRAS CLAVES

Incidencia, Leche cruda, Leche de vaca, *Listeria monocytogenes*, Pamplona

INTRODUCCIÓN

L. monocytogenes es un microorganismo emergente zoonótico que puede transmitirse al hombre a través del consumo de alimentos contaminados, siendo la leche y sus derivados los más frecuentemente involucrados alrededor del planeta (BELALCAZAR *et al*, 2005)(SCHOBITZ *et al*, 2001) Este microorganismo causa un síndrome conocido como Listeriosis, el cual tiene una baja morbilidad, con una alta tasa de mortalidad (30%)(TORRES *et al*, 2004). *L. monocytogenes* ha cobrado especial importancia en la industria de alimentos por su resistencia a tratamientos tradicionales y en especial a la susceptibilidad que tienen los grupos de riesgo asociados a este microorganismo (mujeres en estado de gestación, inmunocomprometidos y mal nutridos entre otros) (TEUFEL, 1994)

Este microorganismo es considerado como ubicuo en la naturaleza por lo que muchas especies animales pueden estar involucradas en su transmisión. Se ha descrito la presencia

de este microorganismo en aves, anfibios, crustáceos, ganado vacuno y caprino, siendo este último susceptible a diversas patologías especialmente asociados con el sistema nervioso (ABABOUC, 2000). *L. monocytogenes* puede causar mastitis bovina y ser secretada en la leche (SEELINGER, 1961), también se ha reconocido que este microorganismo puede llegar a la leche por contacto con superficies y utensilios contaminados, por lo que el riesgo de contaminación es mayor. Se ha documentado ampliamente la transmisión de *L. monocytogenes* al hombre por el consumo de leche y sus derivados lácteos; el primer brote asociado a este tipo de productos se presentó en Massachussets en 1983, donde 49 personas se vieron afectadas. (LINNAN *et al*, 1988). En Colombia, se han realizado diversos estudios donde se ha encontrado la presencia de este microorganismo en leches crudas y pasteurizadas y cuyos resultados se han concentrado en la zona central del País.



Pese a esto, encontramos que en algunos municipios como Pamplona que está ubicado al nororiente del país, las condiciones para la producción de leche aún son muy precarias por lo que el objetivo del presente trabajo fue establecer la incidencia de *L. monocytogenes* en las leches crudas que allí se expenden.

METODOLOGÍA:

1. Recolección de datos y número de muestras

Para la recolección de los datos se diseñó una encuesta precodificada que fue aplicada a los transportadores de leche y en la cual se incluyeron diferentes variables como: volumen de leche, número de proveedores, tipo de transporte, temperatura de transporte y destino final de la leche.

El número total de muestras analizadas fue de 200 basados en el programa estadístico tamaño de muestra con una probabilidad de acierto del 15% (GREENBERT et al, 2005).

2. Procesamiento de las muestras

Las muestras se tomaron en condiciones asépticas y fueron transportadas en refrigeración hasta el Laboratorio de Control de Calidad y Diagnóstico de la Universidad de Pamplona. Para el procesamiento de las muestras se usó la técnica de ausencia/presencia descrita por el (INVIMA, 1998), hasta llegar a la identificación de género. Para ello se confirmó mediante aislamiento en agar TSAYE (agar tripticosa de soya extracto de levadura (0.6%)), catalasa, prueba de iluminación de Henry y coloración de Gram. La cepas que correspondieron al género *Listeria* fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Pontificia Universidad Javeriana para la confirmación de especie mediante la técnica de PCR descrita por (BANSAL, 1996; BURBANO et al, 2003; SIERRA et al, 2004) la cual amplifica un fragmento de 938 pb correspondiente a la subunidad 16sRNA y otro fragmento de 750 pb que amplifica el gen *hyIA* (listeriolisina O).

Como control interno de la técnica, se usó la cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 19115).

3. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en las encuestas se trabajó con el programa EPI-INFO6. Primero se realizó un análisis descriptivo de las variables (tiempo de transporte, destino final, temperatura de transporte, tipo de transporte), posteriormente se realizó un análisis divariado. Se cruzaron diversas variables, para establecer su relación con la presencia de *L. monocytogenes*.

Adicionalmente, se estimó la incidencia de *L. monocytogenes* en leches crudas, mediante la siguiente fórmula: (GREENBERT et al, 2005).

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de cepas de } Listeria \text{ monocytogenes en muestras}}{\text{Total de muestras de muestras analizadas}} \times 100 \quad (1)$$

RESULTADOS

1. Encuestas

1.1. Leche cruda: Durante el estudio se estableció que al municipio de Pamplona ingresan 19 rutas de leches provenientes de la zona rural y municipios cercanos. No se encontró evidencia de producción de leche dentro del casco urbano. Se encontraron diversos tipos de transporte que incumplen con las directrices establecidas en los decretos 616 de 2006, capítulo 13, artículo 55 y 57 y 3075 de 1997, capítulo VII, artículo 33 y la resolución 2505/2004 del Ministerio de Transporte. Ninguna de las rutas de leche se hace en condiciones de refrigeración.

En este estudio, se encontró una alta mezcla de leches ya que en una ruta de leche se pudieron establecer hasta 40 proveedores, lo que genera una heterogeneidad en la calidad de la leche.

Adicionalmente, se encontraron rutas que duran más de 4 horas en su transporte antes de su comercialización. Las razones que generan estos tiempos largos incluyen:



infraestructura vial, derrumbes, paros armados, bloqueos en la carretera, entre otros. Por último, la encuesta pudo establecer que la leche que se comercializa en el Municipio de Pamplona no es sometida a ningún proceso de pasteurización antes de su consumo, poniendo en riesgo la salud de los consumidores, mas si se tiene en cuenta que el 65.9% de las leches son expendidas al granel. El 26,9% de la leche es utilizada para la elaboración de queso, ya que en esta zona predominan los quesos frescos como el queso campesino, queso de hoja y la cuajada, con un alto consumo entre la población con relación a otros quesos madurados. Estos quesos en su mayoría son elaborados en condiciones inadecuadas que incluyen ausencia de pasteurización, lo que convierte a estos en una fuente de transmisión de patógenos alimentarios.

2. Incidencia de *L.monocytogenes* en leches crudas: En las muestras de leche cruda investigadas, se lograron aislar 11 (5.5%) cepas correspondientes al género *Listeria* donde 6 (3%) cepas correspondieron a *L. monocytogenes*.

3. Análisis estadístico 3.1 Leches:

Análisis divariado: No se encontró diferencia entre las rutas con relación a la presencia de *L. monocytogenes*; el promedio de tiempo de las rutas fue de 157 minutos \pm 81 min. Se observaron diferencias significativas en la frecuencia de aislamientos frente al tipo de transporte ($p=0.046$), siendo mayor el número de aislamientos de *Listeria* en la leche transportada en buses. La temperatura promedio de las leches fue de $25.1^{\circ}\text{C} \pm 4.2^{\circ}\text{C}$.

Análisis multivariado: Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de transporte, presencia de *Listeria* spp y tipo de transporte ($p < 0.001$) donde se pudo establecer que transportes superiores a 4 horas de duración, favorecen la presencia de este microorganismo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como se mencionó en los resultados ni productores ni transportadores de leche utilizan sistemas de refrigeración de la misma durante su producción y transporte hacia el municipio de Pamplona por las diferentes rutas existentes para su comercialización, concordando con el documento Conpes 3376 del 2005, donde se ha establecido que el sector privado cuenta con sistemas de producción complejos, fragmentados y dispersos en un buen número de pequeños productores.

En esta investigación se logro establecer que el promedio de litro que ingresa por día al Municipio de Pamplona es de 4.223 recolectada en 19 rutas que a su vez cuentan con más de un proveedor, causando desventajas socioeconómicas, insuficientes recursos y tecnología para la operación de sus actividades incluso en los requerimientos de servicios de saneamiento básico y de red de frío. En Colombia, el eslabón crítico corresponde al acopio de la leche, en donde actualmente el 60% de la producción nacional ingresa al canal formal, el 50% de la actividad se realiza a través de centros de acopio, el 20% se acopia y enfría directamente en finca y el 30% restante se acopia en cantinas de manera informal. (DPN, 2005). En Colombia, el transporte de leches provenientes de las plantas para enfriamiento o centrales de recolección con destino a plantas para higienización, pulverización o derivados lácteos, solo puede hacerse en tanques o carrotanques isotérmicos. (Decreto 616 de 2006). Como se menciona anteriormente, las leches que abastecen al Municipio de Pamplona no se destinan a la industria tecnificada, por lo que las exigencias de los procesadores a los proveedores son mínimas. Diversos estudios han demostrado que las condiciones de transporte y almacenamiento afectan negativamente la calidad de la leche cruda, temperaturas bajas propician el desarrollo de microorganismos alteradores siendo el género más relevante *Pseudomonas* (GAY et al, 2005); temperaturas altas favorecen el crecimiento de bacterias



acidolácticas, así como bacterias patógenas, quienes se desarrollan mejor a temperaturas cercanas a los 35°C (PIRAMANRIQUE *et al*, 2006). La refrigeración es utilizada ampliamente en el manejo de la leche cruda, ya que esta temperatura reduce la actividad metabólica de la mayoría de bacterias patógenas. No obstante, a estas temperaturas pueden multiplicarse *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus* (los tres asociados a ETAs). Es importante señalar que el tiempo de duplicación de estos microorganismos a bajas temperaturas es de 24 horas, diferente a lo que sucede en temperaturas cercanas a los 35°C, donde este tiempo se reduce a 20-40 min (CASADIEGO *et al*, 2005), por lo que mantener la cadena de frío es un factor que puede retrasar la multiplicación de estos patógenos.

Aunque el Ministerio de Protección Social emitió el decreto 2838 de 2006 el cual permite a partir de la fecha de su promulgación la comercialización de leche cruda durante dos años más, se insiste en el plan de reconversión en el menor tiempo posible. Adicionalmente, diversos autores han demostrado la presencia de múltiples patógenos asociados a la leche cruda como *S. aureus* (LE LOIR *et al*, 2003), *Brucella mellitensis* (DOKUZOG *et al*, 2005) *E. coli* enterohemorrágica (MASSA *et al* 2002), responsables de brotes alimentarios en la última década (RYSER, 1998).

Con relación a la presencia de *L. monocytogenes*, en este estudio se esperaba encontrar una mayor presencia ya que condiciones como la temperatura y humedad relativa de la zona de estudio (en Pamplona la temperatura promedio es de 10°C) son propicias para la multiplicación del este patógeno; no obstante, se encontró que al no almacenarse la leche en cadena de frío no se propició la multiplicación de este microorganismo. Como en este caso las leches no tuvieron temperaturas bajas durante su comercialización, no favorecieron su sobrevivencia, más si se tiene en cuenta los

competidores microbianos que se encuentran en este tipo de alimento. Estudios realizados en Estados Unidos demuestran que la principal fuente de contaminación de la leche de vaca es la alimentación de estas con ensilados de baja calidad (con pH superiores a 4.0) (SANAA *et al*, 1993), caso que no se presenta en esta zona donde los animales consumen pasto fresco.

Al comparar estos datos con obtenidos en otra zonas del país en leches crudas se observan diferencias: En el 2004, un estudio realizado en Boyacá estableció una incidencia de *L. monocytogenes* de 22.2% (RUEDA, 2005). De otro lado, estudios realizados por Díaz y col, en 1994, en la zona cudiboyacense, establecieron que 33% de las leches crudas presentaban *L. monocytogenes* al igual que estudios realizados por Campos y col en 1996, quienes obtuvieron un porcentaje de 27%. Aunque se presentó un bajo número de aislamientos de *L. monocytogenes*, si se logró aislar un número mayor de otras especies de este género bacteriano.

L. monocytogenes puede presentarse conjuntamente con microorganismos competidores y otras cepas de *Listeria* spp lo que hace más difícil su supervivencia en la leche, ya que debe competir por los nutrientes con otras especies que usualmente poseen un tiempo de duplicación más corto como el caso de los coliformes o en el caso de las bacterias ácido lácticas, cuya principal fuente de carbono es la lactosa, azúcar que no es utilizado por el género *Listeria*, lo que permite que el grupo de bacterias ácido lácticas crezca más rápidamente en la leche, acidificándola rápidamente (BUCHANAN *et al*, 1989). Se ha encontrado que *L. monocytogenes* tiene la capacidad de multiplicarse a valores de pH cercanos a 6.0 y resistir hasta un pH de 5.0 o más bajo, por lo tanto, es posible que en leches con pH 5.0 la bacteria pudo haber sobrevivido sin multiplicarse y por lo tanto no ser aislada durante los análisis de las leches. (SPAHR *et al*, 1994). De otro lado, las diferentes tasas de crecimiento de las cepas de *Listeria*



spp y la producción de bacteriocinas son factores que afectan la evolución (ecología microbiana) de las especies de *Listeria* presentes en la matriz alimentaria, lo que favorece la recuperación de unas especies en detrimento de otras (BELALCAZAR, 2005).

Adicionalmente, se ha encontrado que *L. innocua* es capaz de producir una sustancia con actividad similar a las bacteriocinas que inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* (YOKOHAMA *et al*, 1998). Así mismo, esta especie comparte el nicho ecológico con *L. monocytogenes*; incluso este microorganismo no fue diferenciado si no hasta 1981 (LAN *et al* 2000), y se ha demostrado que tiene ventajas competitivas frente a *L. monocytogenes* por poseer una velocidad específica de crecimiento superior (CURIALE *et al*, 1994). Se conoce que microorganismos del mismo género no son igualmente afectados por los inhibidores; en el caso de *Listeria* spp, las cepas no patógenas al crecer más rápido enmascaran la presencia de las especies patógenas, lo que explicaría en parte la ausencia de *L. monocytogenes* en un sustrato donde abundan otras especies de *Listeria* (BEUMER *et al*, 1996). En la práctica, el sobrecrecimiento de una especie sobre otra se manifiesta como si en la muestra no existieran otras especies de *Listeria* (GNANOU-BESSE *et al* 2005), lo que genera un problema en el diagnóstico del patógeno que llevaría a reportar falsos negativos con consecuencias nocivas para la salud pública (BEUMER *et al*, 2003).

Otra razón que podría explicar esta baja incidencia, está relacionada con el tipo de ordeño que se realiza en esta zona del país el cual es manual; *Listeria* puede formar biopelículas sobre superficies inertes cuando los procesos de lavado y desinfección no se realizan adecuadamente (SANNA *et al*, 1993). En el caso de los sistemas mecánicos de ordeño, las pezoneras se utilizan para más de un animal, parte del bombeo de la leche al tanque de almacenamiento va por tubería cerrada, donde terminado el proceso se lava

automáticamente; si el mantenimiento de estos equipos no se hace adecuadamente se pueden ver afectados los ciclos de lavado y desinfección. De otro lado, en estos sistemas mecánicos se favorece el crecimiento de *Listeria* ya que la leche se deposita en un tanque refrigerado propicio para el desarrollo de este microorganismo. Estudios realizados por O'Donnell (1995) en tanques de almacenamiento de leche, han mostrado presencia de *Salmonella* spp en un 0.36% y de *L. monocytogenes* en un 5.08%. Este estudio concluye que es inevitable no tener estos patógenos y que las medidas que deben ponerse en práctica para evitar que lleguen al consumidor incluyen: 1) la leche cruda debe ser recolectada y mantenida en condiciones higiénicas; 2) la leche cruda debe estar refrigerada para minimizar la multiplicación de bacterias; 3) toda la leche debe pasteurizarse y, 4) después de la pasteurización las buenas prácticas de higiene deben mantenerse durante la elaboración de derivados lácteos para prevenir la contaminación (GAY *et al*, 2005).

Debido a la implicación de lácteos en brotes de listeriosis donde se han presentado casos de muerte, diversos estudios han evaluado el riesgo de la leche cruda en función de su destino final, así el riesgo es mínimo luego de un tratamiento térmico pero en su ausencia la leche puede resultar peligrosa (VITAS, A.I., *et al*. 2004).

Por último, cabe señalar que al utilizar para el diagnóstico definitivo una técnica de PCR, complementa la técnica tradicional ya que permite amplificar una banda de 938 pb correspondiente a la subunidad 16s rRNA. Así mismo, amplifica una banda de 750 pb que amplifica el gen *hylA*, correspondiente a la listeriolisina O, principal factor de virulencia de este microorganismo. Esta PCR, ha presentado resultados confiables; Burbano y col, 2003 logro establecer una sensibilidad y especificidad del 100% a partir de leches crudas. En el caso de quesos, Sierra y col, establecieron una alta especificidad sin embargo la sensibilidad fue baja (10^{-5}), con relación a otras técnicas. Comparando esta PCR con otras, esta tiene la ventaja de amplificar fragmentos de un tamaño adecuado



para ser visualizado en geles de agarosa; en otros estudios, se han amplificado fragmentos pequeños que se dificultan. Allman en 1995, utilizó cuatro oligos LO1, LO2, LO3 y LO4 para reconocer el gen *hlyA* de *L. monocytogenes*, produciendo fragmentos de 234pb, 207pb y 204pb, lo que generó la necesidad de confirmar la detección utilizando la técnica de Nested PCR haciendo la identificación aún más dispendiosa (ALLMAN et al 1995). Moyra et al, en 1996 utilizaron los primers *prfA* y *prfB* con secuencias complementarias al gen *prfA*, gen que está involucrado en la regulación de la síntesis de la listeriolisina. En los trabajos anteriores, sólo identificaron la especie *monocytogenes*, lo que no permitió eliminar la interferencia por reacciones cruzadas con especies de *Listeria* no patógenas al humano (MOYRA et al, 1996)(UNNERSTAD, 2001).

Es importante señalar que aunque se esperaba una incidencia mas alta de *L. monocytogenes* se logro aislar este microorganismo y teniendo en cuenta que la leche se vende para consumo directo, urge la necesidad de tomar medidas durante el acopio, transporte y comercialización para evitar la presencia de este patógeno.

CONCLUSIONES

Se logró establecer que al Municipio de Pamplona ingresan 19 rutas de leche que provienen de los municipios y veredas aledaños y que no se comercializa leche de otros departamentos.

El 65.9% de la leche se comercializa de manera directa poniendo en riesgo la salud de los consumidores.

Las condiciones de ordeño en la leche de vaca no cumplen con los mínimos estándares higiénicos exigidos por el gobierno; de igual manera los procesos de recolección, transporte, transformación, almacenamiento y distribución son deficientes.

Se lograron recuperar 15 cepas de *Listeria* spp correspondientes a una incidencia del 5.5%, en los municipios estudiados.

Existe una relación directa entre el tiempo de transporte y la presencia de *Listeria* ssp

(p.0.001), favoreciendo su desarrollo rutas con tiempos largos.

La incidencia de *L. monocytogenes* en las leches de vaca que se comercializan en Pamplona, fue de 3% (6/200).

LITERATURA CITADA

Ababouch, L (2000). Potential of Listeria hazard in African fishery products and possible control measures. Int. J. Food. Microbiol. 62: 211-215

Allman M, Hoefelin C, Koppel, E., Luthy, J., Meyer, R., Niederhauser, C., Wegmuller, B. and Candrian, U. (1995). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. Institute Pasteur / Elsevier. 146: 85 - 97.

Bansal, N. S (1996). Development of a Polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Appl. Microbiol. 22: 353-356.

Belalcazar M E, Poutou R, Torres K J, Gallegos JM, Torres O, Carrascal, A K. (2005). *Listeria monocytogenes* y Listeriosis Animal. Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica, 8(2): 95-101.

Beumer RR, Te Giffel MC, Anthonie SVR, Cox L J. (1996). The Effect of Acriflavin and Nalidixic Acid on the Growth of *Listeria* spp. in Enrichment Media. J. Dairy Sci. 13: p.137-48.

Beumer RR, Hazeleger VC (2003). *Listeria monocytogenes*: Diagnostic Problems. FEMS Inmunol. Med. Microbiol., 35: 191-197.

Buchanan R, Stahl H, Whiting R (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 52 (12): 844-851.



Burbano E M, Carrascal A K, Mercado M, Poutou, R A (2003). Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. Normas y Calidad, 57: p. 39-48.

Casadiego L, Cuartas V, Mercado M, Díaz M, Carrascal A.K. (2005) Effectiveness of electrolyzed oxidizing water for inactivation *Listeria monocytogenes* in lettuce. Universitas Scientarium 10 (2). 67-76.

Curiale, MS., Lemus, C (1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. J. Food Prot. 57: 1048-1051

Departamento Nacional de Planeación. Documento CONPES 3376. Política Sanitaria y de Inocuidad para las Cadenas de la Carne Bovina y de la Leche. Bogotá, D.C., 5 de septiembre de 2005.pg 35.

Dokuzođ B, Ergönül O, Baykam N, Esener H, Kiliç S, Celikbağ A, Eren S Esen B (2005). Characteristics of *B. melitensis* versus *B. abortus* bacteremias. J. Infect 50 (1): 41-45.

Gay M, Amgar A. (2005) Factors moderating *Listeria monocytogenes* grown in raw milk and in soft cheese made from raw milk. Lait 85: 153-170.

Gnanou-Besse N, Audinet N, Ke'rouanton A, Colin P, Kalmokoff, M (2005). Evolution of *Listeria* Populations in Food Samples Undergoing Enrichment Culturing. Int. J. Food Microbiol., 104: 123-134.

Greenberg R, Daniela S, Flanders D, Eley J and Boring J. (2005). Epidemiología Médica. Cuarta edición. Editorial Manual Moderno. pp.21.

Lan Z, Fiedler F, Kathiariou S. 2.000 A Sheep in wolfs clothing: *Listeria innocua* strains with teichoic acid-associated surface antigens and gens characteristics to *Listeria monocytogenes* serogroup 4. J. Bacteriol. 182 (11): 6116-6138.

Le loir, Y., Baron, F and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res. 2 (1) 63-76.

Linnan M.J, Mascola, L Lou X L, Goulet D, May S, Salminen C, Hird WM, Yonekura M.L, Hayes P, Weaver R, and et al. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. New England Journal of Medicine. 319 823-828.

Massa S, Altieri C, Quaranta V, De Pace R (1997). Survival of *Escherichia coli* 157:H7 in yogurth during preparation and storage at 4°C. Lett. Appl. Microbiol. 24, 347-350.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 3075 de 23 de diciembre de 1997. Por el cual se reglamenta parcialmente la ley 9 y se dictan otras disposiciones para la industria de alimentos.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 616 de febrero 28 de 2006. Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga procese, envase, transporte, comercializa, expende, importe o exporte el país.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 2838 de 24 de agosto de 2006. Por el que se modifica parcialmente el decreto 616 de 2006 y se dictan otras disposiciones.

Ministerio de Transporte. Resolución 2505 de 2004. Por la cual se reglamentan las condiciones que deben cumplir los vehículos para transportar carne, pescado o alimentos fácilmente corruptibles. 6 de septiembre de 2004. Colombia.

Moyra S, Gray D, Cook N. (1996). ADN extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold – smoked salmon. Appl. Environ. Microbiol. 62(3): 822-824.



- O' Donnell E. T (1995) The incidence of salmonella spp and listeria sp in raw milk from farm bulk milk tanks in England and Wales. *Journal of the society of dairy technology* 48, 25,29.
- Piramanrique K., Márquez, C., Carrascal, A.K., Quevedo, B y Clavijo, B. Aislamiento y caracterización de microorganismos proteolíticos y evaluación de la actividad proteolítica en la leche cruda. En. *Memorias IV Congreso internacional de Ingeniería Bioquímica, Morelia, Michoacán, México. 4-7 abril de 2006.*
- Rueda, A.M. 2005. Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real para Determinar la Incidencia de *Listeria monocytogenes* en Leches Crudas en el Departamento de Boyacá. Tesis Maestría. Directores, Universidad de los Andes. 121
- Ryser E T, (1998): Public health concerns, in E. Marth y J. Steele: *Applied Dairy Microbiology*, Marcel Dekker inc., New York, p. 263- 404
- Sanaa M, Poutrel B, Menard J L Serieys F (1993). Risk Factors Associated with Contamination of Raw Milk by *Listeria monocytogenes* in Dairy farms. *J. Dairy. Sci.*76: 2891-2898.
- Seelinger, H. (1961). *Listeriosis*. Hafner publ. Co inc. New York. N. Y.
- Schöbit R, Marín M, Horzella M y Carrasco E. (2001) Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro sur* 29 (2)
- Sierra S, Poutou R, Carrascal AK, Torres K y Mercado M (2004) Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. *Actualidad y Divulgación Científica.* 7(2) pp.53-65
- Spahr, U. and Url, B., (1994). Behaviour of pathogenic bacteria in cheese - a synopsis of experimental data. *Bulletin of the IDF*, 298: 2 - 16.
- Teufel, P. (1994) European perspectives on *Listeria monocytogenes*. *Dairy Food and Environmental Sanitary* 14: 212-14.
- Torres K J, Sierra S C, Poutou R.A, Vera H, Carrascal AK, Mercado, M. (2004). Incidencia y Diagnóstico de *Listeria monocytogenes* Microorganismo Zoonótico Emergente en la Industria de Alimentos. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 7(1): 25-57.
- Unnerstad H, Nilsson I, Ericsson H, Tham W. (1998). Division of *L.monocytogenes* serovars 1/2 a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5): 2054 - 2056.
- Vitas A I, Aguado V, García-Jalon I (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 90: 349-356.
- Yokohama E, Mayurama S, Katsube Y (1999). Production of bacteriocin-like substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 133-13

Recibido 08 Mayo 2007
Aceptado 09 Octubre 2007