

## ***Listeria spp.*, y *L. monocytogenes* EN LECHE CRUDA DE CABRA**

### ***Listeria spp.* and *L. monocytogenes* IN RAW GOAT'S MILK**

Yolanda Albarracín C,<sup>1</sup> M.Sc, Raúl Poutou P,<sup>2</sup> Ph.D, Ana Carrascal C,<sup>2\*</sup> M.Sc.

<sup>1</sup>Universidad de Pamplona, Grupo de Investigación Recursos Naturales, Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Biotecnología, Ciudadela Universitaria. Kilómetro 1 Vía Bucaramanga. <sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Carrera 7 no 43-82, Bogotá, D.C., Colombia. \*Correspondencia: [acarrasc@javeriana.edu.co](mailto:acarrasc@javeriana.edu.co)

Recibido: Febrero 1 de 2008; Aceptado: Julio 30 de 2008

## **RESUMEN**

**Objetivo.** Detectar *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* en leches crudas de cabras, provenientes del corregimiento de la Garita, Norte de Santander. **Materiales y métodos.** Se tomaron 90 muestras de leche cruda de cabra, mediante muestreo estratificado, en un período de 4 meses; durante el muestreo se tomó la temperatura de las leches. Para el aislamiento de *L. monocytogenes* se utilizó la técnica sugerida por el INVIMA y se confirmó la especie por PCR. **Resultados.** Se encontraron ocho productores de leches de cabra en esta zona, ninguno refrigera, ni pasteuriza la leche. Se encontró una ocurrencia de 3% de *L. monocytogenes* y 15% de otras especies. Se demostró que la leches obtenidas en esta zona contienen este patógeno que puede llegar a causar Listeriosis en los grupos de riesgo como niños menores de 5 años, mujeres en etapa de gestación, adultos mayores y pacientes inmunocomprometidos. **Conclusiones.** Se demostró la circulación de este patógeno en la leche de cabra y al ser un producto que se consume directamente por las personas pone en riesgo su salud.

**Palabras clave:** Leche cruda, leche de cabra, *Listeria monocytogenes*.

## **ABSTRACT**

**Objective.** To test non-pasteurized goat's milk from the village of 'la Garita', Northern Santander, for *Listeria monocytogenes*. **Material and methods.** 90 samples of non-pasteurized goat's milk were obtained over a 4 month period; pH and temperature of each sample were measured. The INVIMA technique was used to isolate *L. monocytogenes*; the species was confirmed by PCR. **Results.** The study showed that eight goat milk providers of the zone neither had refrigeration nor pasteurized the milk. The prevalence of *L. monocytogenes* was 3%; 15% of the samples had other species of *Listeria*. The milk

obtained from this zone contained the pathogen that may cause listeriosis in children less than 5 years of age, pregnant women, adults and immunologically compromised patients. **Conclusions.** This study shows the occurrence of this pathogen in goat's milk and identified areas of risk for those people who drink goat's milk.

**Key words:** Raw milk, goat's milk, *Listeria monocytogenes*.

## INTRODUCCIÓN

La leche cruda es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos (1). La frecuencia de brotes asociados al consumo de leche cruda o sus derivados ha puesto de manifiesto la importancia de evaluar las condiciones de ordeño, transporte y procesamiento de la leche. Diversos microorganismos se han asociado a brotes, siendo *Salmonella spp.*, el microorganismo con mayor frecuencia, debido a los diversos reservorios que posee (2). Sin embargo, *L. monocytogenes* por la alta tasa de mortalidad (20-30%) que genera (3) ha llamado la atención de la comunidad científica. Este microorganismo es reconocido como zoonótico siendo sus principales reservorios los mamíferos y rumiantes. Ha estado implicado en brotes asociados al consumo de quesos frescos provenientes de leche sin pasteurizar (4). También se han reportado casos de listeriosis relacionados con el consumo de productos lácteos, entre los cuales se encuentran quesos especialmente los denominados frescos. El primer brote reportado se presentó en Canadá en 1981 con 41 casos, 34 de recién nacidos y 7 de adultos; la tasa de mortalidad fue 27% y 28.6% respectivamente (5).

Las cabras pueden ser portadoras asintomáticas y excretan el microorganismo durante los procesos de mastitis donde la concentración puede oscilar entre 10.000 a 20.000 células por mililitro. De otro lado, en leches aparentemente normales, *Listeria spp.*, se encuentra en bajas concentraciones (1 célula/ml) (6).

En Colombia los estudios de este patógeno se han concentrado en la leche de vaca, debido al volumen de producción y a la comercialización. El primer reporte publicado

señala incidencias de 34% y 2% para leches crudas y pasteurizadas respectivamente (7). En el 2005, Rueda (8), encontró 22.2% de *L. monocytogenes* en leches crudas obtenidas en el departamento de Boyacá.

En la actualidad no existen reportes sobre la presencia de este microorganismo en leche de cabra; teniendo en cuenta que el consumo de leche de cabra se ha incrementado en los últimos años debido a sus propiedades nutricionales, siendo los infantes y las personas mayores quienes más consumen estas leches, es necesario establecer si esta puede ser una fuente de transmisión de listeriosis (9). El corregimiento de La Garita es reconocido por ser el mayor productor de leche de cabra en el departamento de Norte de Santander, El objetivo de este trabajo fue establecer la ocurrencia de *Listeria spp.*, y *L. monocytogenes* en la leche cruda de cabra producida en esta zona del país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección de los sitios de muestreo.** Para la investigación se incluyeron todas las fincas productoras de leche de cabra en el corregimiento La Garita, Norte de Santander, Colombia; para ello se contó con la colaboración de personal del ICA, seccional Cúcuta. Una vez en los sitios se procedió a aplicar una encuesta con el fin de establecer las condiciones de ordeño, así como los volúmenes de producción y destino final de la leche.

**Número de muestras.** Con los datos obtenidos se procedió a realizar un muestreo estratificado, el número de muestras

analizadas fue de 90 recolectadas durante un período de 16 semanas, (abril-julio), donde predominaron las condiciones de lluvia.

**Aislamiento de *L. monocytogenes*.** La técnica usada para el aislamiento e identificación de *L. monocytogenes* fue la recomendada por el INVIMA (10) con algunas modificaciones en algunos aspectos tales como: el enriquecimiento selectivo se realizó en caldo Palcam en lugar del medio LEB. Como medios diferenciales se usaron agar Palcam y agar Oxford y se incubó a 30°C. Las cepas que presentaron características típicas del género fueron confirmadas mediante la técnica de PCR descrita por Bansal (11, 12). Como control positivo de la técnica se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 19115), proveniente del cepario de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.

**Análisis de datos.** Para el análisis de los datos obtenidos en las encuestas se trabajó con el programa EPI-INFO6 (CDC, GA, USA, Versión 2008). Primero se realizó un análisis descriptivo de las variables, posteriormente un análisis divariado. Se cruzaron diversas variables (tiempo de almacenamiento de la leche, temperatura de la leche, origen de la leche, ruta de la leche, proveedor, número de proveedores), para establecer la relación con la presencia de *L. monocytogenes*.

Adicionalmente se estimó la incidencia de *L. monocytogenes* en leches de cabra, de acuerdo con la fórmula descrita por Greenberg et al (13):

$$\text{Incidencia} = \frac{\# \text{ aislamientos de } L. monocytogenes}{\text{Total}_{\text{muestras de Leches}}} \times 100$$

## RESULTADOS

**Encuestas.** El estudio realizado en el corregimiento de La Garita permitió identificar 8 proveedores de leche con volúmenes que oscilaron entre 10 a 100 botellas/día. Durante la encuesta se pudo establecer que en esta zona del país no se vende la leche por litros si no por botellas que corresponden a 0.75l; el costo de esta botella si se compara con el valor de la leche de vaca es alto, ya que por una botella de leche de cabra cruda se pueden pagar 1.2 a 2 veces el valor del litro de leche de vaca. La razón es la baja producción en la zona y la alta demanda de los productos derivados. En esta zona existen dos tipos de explotación caprina: pastoreo en campo abierto, donde no se encontró tecnificación en los apriscos, así como falta de control veterinario permanente (Figura 1a). El otro tipo de explotación se realiza en establo lo que garantiza un cubrimiento mayor por área y mayor producción de leche (Figura 1b).

En términos generales, se encontró que las condiciones de explotación caprina son artesanales en esta zona; con déficit de tecnólogos y profesionales que manejen la genética de cruces, manejo y explotación tecnológica, carencia de equipos para la realización de inseminación. La explotación caprina es considerada un renglón secundario de su economía.



**Figura 1.** a: Explotación caprina a campo abierto, b: Explotación caprina en establo

Con relación a las condiciones de manejo de la leche, se logró establecer que no cumple con las condiciones de higiene en el ordeño, los envases que utilizan para la recolección de la leche incluyen, botellas de gaseosa, botellones de agua y baldes de plástico.

**Incidencia de *L. monocytogenes*.** Se recuperaron 15 (16.6%) aislamientos correspondientes al género *Listeria* de las cuales 2 correspondieron a *L. monocytogenes* (3%).

**Análisis de variables.** Se logró determinar que el promedio de la temperatura después del ordeño fue de  $29.2 \pm 1^\circ\text{C}$ . No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de transporte y la presencia de *L. monocytogenes* ( $p \geq 0.05$ ). Sólo una de las rutas transportaba la leche en condiciones de refrigeración.

El 100% de la leche de cabra no se somete a procesos de pasteurización, el 71% de la leche es transformada directamente por los productores de leche en quesos y comercializado dentro del corregimiento. Del 29% restante, el 1% de la leche es utilizada para yogurt, un 10% para dulces y el resto para consumo directo.

## DISCUSIÓN

En los últimos 20 años la explotación de pequeños rumiantes ha aumentando en todo el planeta, siendo los países en vías de desarrollo los más importantes (14). Colombia no es ajena a este proceso, siendo los Santanderes, las regiones donde la explotación caprina ha aumentado, este estudio detectó que la zona no cuenta con las condiciones tecnológicas necesarias para el desarrollo y la competitividad de este renglón pecuario. Llama la atención los tipos de pastoreo que se dan en la zona donde abundan explotaciones a campo abierto y las cabras se alimentan con cualquier tipo de pasto, lo cual va en detrimento de la calidad de la leche ya que al consumir estos pastos no se garantiza el valor nutricional de la leche. Adicionalmente pueden generar sabores desagradables que permanecen en la leche. Herrera (15) señaló la diferencia

en la calidad de las leches con relación al tipo de alimentación, ya que leches provenientes de cabras alimentadas con pastos frescos generan mayor volumen de leche y leches provenientes de pastos secos, menor volumen con mayor cantidad de grasa. En las explotaciones donde se mantienen las cabras en establo se logra mayor producción de leche, (en promedio 2l/día por hembra), aunque esto depende del ciclo de lactancia y el número de crías.

Con relación a las condiciones de ordeño, en esta zona todo el proceso se realiza manualmente, se incumplen los requisitos establecidos en el Decreto 616/06 capítulo 2 en lo que respecta a la obtención, almacenamiento y comercialización de la leche cruda (16). La leche una vez ordeñada no es sometida a refrigeración, permaneciendo por más de 2 horas a temperatura ambiente lo cual facilita la proliferación tanto de los microorganismos que se encuentran en ella como de aquellos que se han incorporado a la leche a través del personal y utensilios utilizados para el ordeño.

Para la leche de vaca está bien documentado que las condiciones de almacenamiento determinan la composición microbiana de la leche. Por ejemplo leches provenientes de fincas donde se laven frecuentemente los equipos de ordeño y se mantenga refrigerada la leche, favorecen el desarrollo de *Pseudomonas spp.*, (17), mientras que en leches almacenadas a temperaturas altas se favorece el desarrollo de coliformes (18).

Los hallazgos más importantes de la encuesta son la ausencia del proceso de pasteurización de la leche y el consumo de leche cruda por parte de los consumidores, quienes toman la leche directamente de los recipientes de ordeño. En el caso de las cabras la zoonosis más importante es la Brucelosis, la cual puede controlarse con esquemas de vacunación y pasteurización tecnificada de la leche. Diversos brotes en el mundo se han relacionado con el consumo de derivados lácteos proveniente de leches de cabra sin pasteurizar, en Francia durante 1993, se encontró *Salmonella entérica* serotipo *paratyphi B*, asociado al consumo



de quesos con 273 casos y un fallecimiento (19). Herrera (15) ha señalado la importancia de no consumir leche cruda de cabra ya que puede ser responsable de transmitir brucelosis y tuberculosis.

Con relación a la frecuencia de *L. monocytogenes* obtenidos en esta investigación, son similares a los obtenidos en España, donde se determinó una incidencia de 2.56% de *L. monocytogenes* en leche de cabra (20). Mientras que estudios realizados en otras regiones han revelado la ausencia del patógeno. No obstante, se han encontrado otras especies del género. Estudios realizados en la región de Valchieavenna en Italia, lograron la recuperación de 2.1% de cepas correspondientes al género *Listeria* en leches de cabra (21). De otro lado estudios realizados en Turquía en leche de cabra, lograron la recuperación de 41.4% de otras especies de *Listeria* (22).

Otros estudios han señalado que *L. monocytogenes* puede estar presente en la leche cruda de cabra, y disminuir durante la elaboración de quesos especialmente en la etapa de maduración, estos datos están relacionados con la composición química y microbiana de la leche, por ejemplo la presencia de bacterias ácido lácticas y sus metabolitos especialmente al complejo peroxidasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (23). Franco et al (24) demostraron que al inocular *L. monocytogenes* artificialmente en quesos tipo "Arzua", esta logra descender después de 55 días, aunque sigue permaneciendo viable la mayoría de los microorganismos se encuentran en la parte interior de la cuajada, contrario a los resultados obtenidos en queso Cammebert, donde *Listeria* durante el proceso de maduración presenta un incremento en la superficie del queso, posiblemente asociado al contenido de humedad y al incremento del pH del producto (25). Sin embargo, en otros quesos madurados fabricados con leche de cabra *L. monocytogenes* logra mantenerse viable durante el tiempo de maduración (42 días) no obstante no se multiplica, como consecuencia del pH 4.25 (26). Si bien estos datos son válidos en quesos, es importante aclarar que los quesos elaborados en esta

zona no son madurados y una vez fabricados se someten a procesos de enfriamiento durante su comercialización, generando un factor adicional para la proliferación de este microorganismo.

En Colombia, la incidencia de *L. monocytogenes* en leches crudas de vaca son superiores a los encontrados en leche de cabra, llegando a 34% (7). Este resultado está relacionado con el tipo de ordeño, por ejemplo en ordeños mecánicos se favorece la presencia de *Listeria* debido a que esta se deposita en las tuberías y contamina la leche, en este trabajo se pudo constatar que el ordeño se realiza manualmente y al no existir línea de frío posterior al ordeño se favorece el desarrollo de otras especies competidoras (23).

Durante el aislamiento de esta bacteria se encontraron interferentes que posiblemente afectaron la recuperación del microorganismo, aunque no era parte de esta investigación se logró identificar la presencia de cepas *Clostridium* spp., sulfito reductores que pueden utilizar los ácidos grasos esenciales por vía anaeróbica, a diferencia de *Listeria* que no metaboliza estos ácidos grasos. También se encontró la presencia de *Enterococcus* spp., microorganismo que puede utilizar la lactosa de una manera más eficiente que el género *Listeria*. Adicionalmente su presencia es un indicador de contaminación fecal lo que presupone prácticas de higiene deficientes durante el ordeño (27).

Los resultados obtenidos en este trabajo detectaron la presencia de *L. monocytogenes* en leches crudas de cabra no sometidas a procesos de pasteurización y donde el 71% de la leche es consumida de manera directa. Esto genera un riesgo para los consumidores especialmente en grupos vulnerables como niños y adultos mayores quienes por los beneficios terapéuticos y el contenido nutricional de la leche son los mayores consumidores de este alimento.

### Agradecimientos

A la Universidad de Pamplona y la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación de este trabajo. Proyecto número 460.

## REFERENCIAS

1. Haridy, MSA. Yeast flora of raw milk in El-Minia City Egypt. *Cryptogam Mycol* 1992; 13: 321-326.
2. Ekici K, Bozkurt H, Isleyci O. Isolation of some pathogen from raw milk of different milch animals. *J Nutr* 2004; 3(3): 161-162.
3. Vázquez-Boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W. et al. Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(3): 584-640.
4. Linnan MS, Mascola L, Lou X, Goulet V, May S, Salminet C. et al. Epidemic Listeriosis associated with Mexican style cheese. *New Eng J Med* 1988; 319:823-828.
5. Farber JM, Peterkin PY. *Listeria monocytogenes*, a Foodborne Pathog. *Microbiol Rev* 1991; 55(3): 476-511.
6. Bunning V, Donnelly C, Peeler J, Briggs E, Bradshaw J, Crawford R. et al. Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 364-370.
7. Díaz G, Muñoz AI. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leches crudas y pasteurizadas en el Altiplano Cundiboyacense. *Biomedica* 1998; 14(1): 58.
8. Rueda AM. 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 de maestría]. Bogotá, Colombia: Universidad de Los Andes; 2005.
9. D'Urso G. Il latte di cabra: specificita and qualita nutritive, *Il Latte* 2000; 3: 72-77
10. INVIMA. Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Santa Fé de Bogotá: Ministerio de Salud; 1998. 88-96.
11. Bansal NS. Development of a Polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Appl Microbiol* 1996; 22: 353-356.
12. Sierra S, Poutou R, Carrascal AK, Torres K, Mercado M. Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. *Rev UDCA Actual Divulg Cient* 2004; 7(2): 53-65.
13. Greenberg R, Daniela S, Flanders D, Eley J, Boring J. *Epidemiología médica* 4ª ed. México D.F.: Manual Moderno. 2005.
14. FAO. *Agricultural statistics*. Rome, Italy. 1999.
15. Herrera J. *Producción de Caprinos* 2ª Ed. Bogotá: Editorial Unisur; 1994.
16. 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.
17. Lafarge V, Ogier J, Girard V, Madelen V, Levau J, Gruss A. et al Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl Env Microbiol* 2004; 70 (9): 5644-5650.
18. Thomas SB, Thomas F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected part I and II. *Dairy Ind Int* 1973; 38, 11-15.
19. Desenclos J, Bouvet P, Benz-Lemoine L, Grimont F, Desqueyroux H, Rebiere I. et al. Large outbreak of *Salmonella enterica* serotype paratyphi B infection

- caused by a goat's milk cheese France, 1993: a case finding and epidemiological study. *BMJ* 1993; 312: 91-94.
20. Gaya P, Saralegui C, Medina M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in raw caprine milk. *J Dairy Sci* 1996; 79 (11): 1936-1941.
  21. Soncini, G, Valnegri L. Analysis of bulk goats milk and milk-filters from Valtenilla and Valchiavenna (Lombardy Prealps) for the presence of *Listeria* species. *Small Rum Res* 2005; 58: 143-147.
  22. Akman D, Nizami D, Digrak M. Prevalence of species in ice creams sold in the cities of Kahramanmaras and Adana. *Turk J Med Sci* 2004; 34: 257-262.
  23. Gay M, Amgar A. Factors moderating *Listeria monocytogenes* grown in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *Lait* 2005; 85: 153-170.
  24. Franco CM, Melendez S, Quinto EJ, Fente C, Domínguez L, Cepeda A. Evolución de *L. monocytogenes* y *L. innocua* durante la elaboración y madurado del queso tipo "Arzua" efecto del tratamiento con sorbato de potasio. *Ciencia y tecnología alimentaria* 2002; 3(4): 236-240.
  25. Ryser ET, Marth EH. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Camembert cheese. *J Food Prot* 1988; 51:615-621.
  26. Morgan F, Bonnin V, Mallereau M P, Perrin G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *Int J Food Microbiol* 2001; 64: 217-221.
  27. Gilmour A, Rowe M. Microorganisms associated with milk: *Dairy Microbiol* 1981; 1 -45.