

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Detección de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, en muestras de leche bovina del sistema de producción
doble propósito colombiano**

ROCIO ESPERANZA PATIÑO BURBANO

ÉNFASIS BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA E INDUSTRIAL

**Bogotá D.C., Colombia
Enero 2012**

Detección de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, en muestras de leche bovina del sistema de producción doble propósito colombiano

ROCIO ESPERANZA PATIÑO BURBANO

APROBADO



José Luis Rodríguez Bautista. M.Sc.
Director



Ana Karina Carrascal Camacho, M.Sc.
Directora



Raúl A. Poutou-Piñales Ph.D.
Jurado



Martha Cecilia Suárez M.Sc.
Jurado



Claudia Moreno Ingeniera
Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Pontificia Universidad Javeriana no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia

Artículo 23 de la resolución No. 13 de julio de 1996:

Detección de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, en muestras de leche bovina del sistema de producción doble propósito colombiano

ROCIO ESPERANZA PATIÑO BURBANO

Dra. Ingrid Schuler Ph.D.
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Dr. Manuel Antonio Franco Ph.D.
Director de Posgrado
Facultad de Ciencias

*A mis padres Guillermo Patiño y Esperanza Burbano,
por su apoyo y motivación para seguir siempre adelante.*

*A mis hermanas, hermanos, sobrinas y sobrinos por su
alegría y buena energía siempre.*

AGRADECIMIENTOS

Al doctor José Luis Rodríguez por darme la oportunidad de realizar el trabajo, por su tiempo, paciencia y dirección en el desarrollo de este proyecto.

A la doctora. Ana Karina Carrascal, por sus enseñanzas y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo económico para el desarrollo de este proyecto código MADR: 2008O2681

Al grupo de Salud Animal de CORPOICA por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al grupo de investigadores de los Centros de Investigación de Motilonia, Nataima y Turipaná por su colaboración en la etapa inicial del proyecto.

A todas aquellas personas que en diferente forma aceptaron participar y colaborar en el proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN ..	3
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Sistema de producción de leche en Colombia	7
2.2 Calidad de la leche	9
2.2.1 Calidad microbiológica de la leche cruda.....	14
2.2.2 Contaminación de la leche cruda por <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella spp.</i> , y <i>E. coli</i> O157:H7 en el hato.....	15
2.2.3 <i>L. monocytogenes</i>	19
2.2.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	27
2.2.5 <i>Salmonella spp.</i>	37
2.3 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> a partir de leche cruda.....	44
2.3.1 Detección de <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> por PCR.....	46
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo general	47
3.2 Objetivos específicos.....	47

3.3 Hipótesis verdadera	48
3.4 Hipótesis nula	48
4. METODOLOGÍA	49
4.1 Evaluación del caldo SEL para la detección simultánea de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche cruda.	49
4.1.1 Cepas bacterianas control	50
4.1.2 Límite de detección	50
4.1.3 Curva de crecimiento <i>S. Enteritidis</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en caldo SEL.	51
4.2 Evaluación del método de detección molecular simultánea de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche cruda	53
4.2.1 Cultivo y extracción de ADN	53
4.2.2 PCR múltiple	54
4.2.3 Sensibilidad de la PCR múltiple	56
4.2.4 Especificidad de la PCR múltiple	56
4.3. Obtención de especímenes	59
4.3.1 Área de estudio	59
4.3.2 Muestras de leche cruda bovina	59
4.3.3 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche bovina cruda	60

4.4 Detección simultánea por PCR múltiple de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en muestras leche cruda.	64
4.5. Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche	64
4.6 Determinación factores asociados a la presencia de <i>Salmonella</i> spp., <i>E coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i>	65
5. RESULTADOS.....	67
5.1 Evaluación del caldo SEL para la detección simultánea de <i>Salmonella</i> spp., <i>E coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i>	67
5. 2 Evaluación del método de detección molecular simultánea de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche cruda	68
5.2.2 Sensibilidad de la PCR múltiple.....	69
5.2.3 Especificidad de la PCR múltiple.....	70
5.3. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche bovina cruda	72
5.4 Detección simultánea de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> por PCR múltiple en leche bovina cruda	76
5.5 Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp., <i>E coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche cruda bovina.....	78

5.6 Factores asociados a la presencia de <i>E coli</i> O157:H7 en el sistema de producción doble propósito Colombiano	79
6. DISCUSIÓN	84
7. CONCLUSIONES.....	103
8. RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES.....	105
9. BIBLIOGRAFIA	106

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reportes de laboratorio de infecciones por <i>E. coli</i> O157 durante 1988-2008.....	37
Figura 2. Procedimiento para la detección de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en leche inoculada artificialmente.	50
Figura 3. Condiciones de la PCR múltiple para <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i>	55
Figura 4. Temperaturas y tiempos de incubación para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> a partir de muestras de leche.	61
Figura 5. Condiciones de la PCR de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i>	63
Figura 6. Placas de cultivo en Agar selectivo diferencial de <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella</i> Enteritidis.	68
Figura 7. Detección simultánea de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> empleando diferentes concentraciones de los iniciadores. Temperatura de hibridización 50,4°C y 1,5 mM de MgCl ₂	69
Figura 8. Sensibilidad de la PCR múltiple para <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> , empleando el caldo SEL.	70
Figura 9. Evaluación de especificidad.	71
Figura 10. PCR múltiple para <i>S. Enteritidis</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i>	71
Figura 11. Ubicación de las tres regiones muestreadas	73
Figura 12. Imagen de la PCR individual para <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> spp.	74

Figura 13. PCR en los aislamientos de <i>Salmonella</i>	74
Figura 14. PCR aislamientos de <i>E. Coli</i> O157:H7.....	75
Figura 15. PCR aislamientos de <i>L. monocytogenes</i>	75
Figura 16. PCR múltiple para <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> de muestras de leche.	76
Figura 17. PCR múltiple para <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> de muestras de leche.	76
Figura 18. Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. y <i>E coli</i> O157:H7 por PCR múltiple en tres regiones del sistema de producción doble propósito Colombiano.	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estándares de recuento total de bacterias para las regiones lecheras de Colombia.....	11
Tabla 2. Características de la leche cruda.....	12
Tabla 3. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., y <i>E. coli</i> O157:H7 de leche de vaca de tanque y filtros de leche	18
Tabla 4. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en leche cruda de diferentes especies animales	21
Tabla 5. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> de un hato lechero (Nueva York) entre febrero de 2004 y julio de 2007.	22
Tabla 6. Brotes causados por <i>L. monocytogenes</i> en productos lácteos elaborados con leche bovina en Estados Unidos	24
Tabla 7. Prevalencia de <i>E. coli</i> O157:H7 en heces de bovinos	30
Tabla 8. Brotes de <i>E. coli</i> O157 reportados relacionados con explotaciones agropecuarias y ferias agrícolas.	33
Tabla 9. Brotes causados por <i>E. coli</i> O157:H7 asociadas al consumo de leche y productos lácteos.....	36
Tabla 10. Brotes de infecciones por <i>Salmonella</i> spp. asociados a leche y productos lácteos.....	40
Tabla 11. Mezcla de la reacción de la PCR múltiple para 25µl.....	55
Tabla 12. Microorganismos empleados para evaluar la especificidad de la PCR múltiple	58

Tabla 13. Población bovina total y dedicada a doble propósito de tres regiones de Colombia.....	59
Tabla 14. Características de los iniciadores empleados en PCR para la identificación de <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i>	62
Tabla 15. Número de muestras de leche analizadas por cuenca lechera.....	72
Tabla 16. Número de muestras positivas por PCR múltiple en las muestras de leche.	77
Tabla 17. Número de muestras positivas por método convencional y por PCR múltiple en las muestras de leche.....	77
Tabla 18. Tabulación cruzada de éxitos y fracasos de aislamientos de <i>E. coli</i> , O157 H7, con el medio SEL, en leche cruda de 600 predios del sistema doble propósito de 4 subregiones naturales de Colombia.	80
Tabla 19. Pruebas de independencia, entre presencia en leche o empleo de antibióticos y pesticidas en finca y el fracaso o éxito en el aislamiento de <i>E. coli</i> O157 H7 en leche cruda	81
Tabla 20. Pruebas de independencia, entre variables atributo y el fracaso o éxito en el aislamiento de <i>E. coli</i> O157 H7 en leche cruda	82
Tabla 21. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para mesófilos, coliformes y células somáticas en leche cruda de <i>E. coli</i> O157 H7, en leche cruda.	83

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Composición del caldo SEL (<i>Salmonella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Listeria</i>)	131
Anexo 2: Curva del crecimiento <i>S. Enteritidis</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. monocytogenes</i> en caldo SEL	132
Anexo 3: Medidas de tendencia central	135

RESUMEN

La leche cruda se considera uno de los vehículos más importantes de transmisión de microorganismos patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). En el presente estudio se determinó la presencia de estos microorganismos en leche bovina contaminada artificialmente, empleando técnicas de microbiología convencional y en forma simultánea por medio de una PCR múltiple. La técnica molecular se estandarizó utilizando como pre-enriquecimiento el caldo SEL (*Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *Listeria*), la sensibilidad fue de 10UFC/ml, para *Salmonella* y *L. monocytogenes* y de 1UFC/ml para *E. coli* O157:H7 y la especificidad fue evaluada con microorganismos de nueve géneros diferentes. Empleando las dos metodologías se evaluaron 600 muestras de leche cruda, provenientes de igual número de predios del sistema de producción doble propósito. El muestreo se realizó por conveniencia en tres microrregiones lecheras de: sabanas de Córdoba y Sucre, Valles del Cesar y Alto Magdalena-Magdalena Medio y la distribución de las muestras fue equitativa. La prevalencia para *L. monocytogenes* fue 0,3% (2/600), para *Salmonella* spp. en el 0,8% (5/600) y *E. coli* O157:H7 en el 3,7% de las muestras analizadas (22/600). La PCR múltiple para la detección de *E. coli* O157:H7 fue más sensible que el método convencional y para *Salmonella* el tiempo de detección se redujo a ocho horas. La prevalencia de *E. coli* O157:H7 se encontró asociada a la región geográfica en forma estadísticamente significativa. La presencia de este microorganismo en la leche cruda puede considerarse un riesgo para la salud humana.

ABSTRACT

Raw milk and dairy products contaminated with pathogens such as *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* may be involved in outbreaks of foodborne diseases (FBD). In the present study we investigated the presence of these microorganisms in artificially contaminated bovine milk, using conventional microbiological techniques and simultaneously by a multiplex PCR. The molecular technique was standardized as pre-enrichment broth SEL (*Salmonella*, *E. coli* O157: H7 and *Listeria*), the sensibility was 10UFC/ml for *Salmonella* and *L. monocytogenes* and 1UFC/ml for *E. coli* O157: H7, and specificity was evaluated with microorganisms from nine different genera. Using both methods were evaluated 600 samples of raw milk, from an equal number of farms of dual-purpose cattle production. The sampling was performed for convenience in three dairy microregions: sabanas of Cordoba and Sucre, Valles of Cesar and Alto Magdalena-Magdalena Medio, the distribution of the samples was proportional, approximately 200 samples per region. For *L. monocytogenes* prevalence was 0.3% (2/600) for *Salmonella* spp. in 0.8% (5/600) and *E. coli* O157: H7 in 3.7% of the samples analyzed (22/600). The multiplex PCR for detection of *E. coli* O157: H7 was more sensitive than conventional method, for *Salmonella* detection time was reduced to ten hours. The prevalence of *E. coli* O157: H7 was found associated with the geographic region was statistically significant. The presence of this organism in raw milk can be considered a human health risk.

1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

En Colombia existen dos tipos de explotaciones lecheras, la especializada y el doble propósito (1). La lechería especializada, se localiza en las zonas de trópico alto con bovinos de razas *Bos taurus*, uso intensivo de los insumos como tierra, capital y mano de obra, sistemas de rotación de praderas, utilización de suplementos alimenticios y cosecha de leche llevada a cabo como mínimo dos veces al día (2). En contraste, el sistema doble propósito, se localiza en las zonas de trópico bajo como la Costa Atlántica, Valles de los ríos Magdalena, Cauca, Piedemonte Llanero, sabanas de Córdoba y Cesar, y se caracteriza por ser una ganadería de tipo extensivo o semiextensivo, predominancia de razas cebuinas o sus cruces con razas europeas (1).

El sistema doble propósito es una actividad económica de pequeños y medianos productores, y equivale al 89% del rebaño lechero del país (1). Frecuentemente, se localizan en áreas marginales distantes de los mercados y con pobre dotación de recursos y de infraestructura física e involucra productores de pequeña y mediana escala, con recursos técnicos y económicos limitados (1, 3). El sistema de ordeño es principalmente manual y en la mayoría de los casos con la presencia del ternero, generalmente no hay tanques de enfriamiento (4).

Según datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a través de la Encuesta Nacional Agropecuaria, en Colombia en el año 2010, la producción

diaria promedio fue de 17,2 millones de litros de leche. Del volumen total producido, la industria láctea procesó el 41%; el 59% restante fue comercializado a través de intermediarios, procesamiento en finca, autoconsumo y otros usos (5).

El consumo de leche cruda es una práctica arraigada en diferentes zonas del territorio nacional, debido a la existencia de un producto diferenciado, unos canales de comercialización plenamente establecidos y un consumidor cautivo, especialmente en los estratos 1, 2, y 3 (6). Según la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia el 48,7% de la población consume leche diariamente (5). La leche, es además un alimento prioritario para mejorar el estado nutricional y por lo tanto debe garantizarse su inocuidad en cada una de las etapas de la cadena productiva.

Entre los peligros para el consumidor que se pueden encontrar en la leche cruda, se destacan los biológicos y químicos: los cuales dependen en gran parte de una inadecuada manipulación e inapropiadas prácticas agrícolas o de manufactura (6). Entre los peligros biológicos más importantes que pueden contaminar la leche pueden mencionarse *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, agentes patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (7-11).

La incidencia de ETA se ha incrementado en los últimos años, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, reportó para el periodo de 1998 a 2005, 45 brotes de ETA, asociados al consumo de leche no pasteurizada o quesos elaborados con leche cruda (11).

La globalización del comercio de alimentos y productos agrícolas puede beneficiar tanto a los consumidores como a los productores debido a la mayor variedad de alimentos y productos o a las nuevas oportunidades de obtener ingresos derivados de la exportación. No obstante, las posibles consecuencias negativas de esta tendencia influyen en la posibilidad de que las ETA se propaguen más fácilmente, e incluso de forma más rápida, entre los países ocasionando riesgos para la salud de los consumidores y riesgos financieros a los productores de alimentos que no cumplan las normas de inocuidad de los alimentos, cada vez más rigurosas y exigentes (12).

Por esta razón en 2007 el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural reglamentó el sistema de pago de la leche cruda al productor por medio de la resolución número 00012 (13), modificada mediante resolución número 000017 de 2012 (14), en la cual se estipula el pago por calidad. El fin de esta reglamentación es incentivar la producción de leche en mejores condiciones higiénicas y sanitarias. Sin embargo, en esta resolución sólo se estipula la reglamentación de algunos parámetros de la leche. Para la valoración de la calidad higiénica únicamente se contempla la determinación de recuento total de bacterias y no incluye la evaluación de microorganismos patógenos.

Aunque se conoce la importancia de estos temas, en el país se desconoce en gran parte el estatus higiénico-sanitario en la leche cruda de los diferentes sistemas de producción lechera y entre ellos el de la producción de leche bajo el sistema del doble propósito. El objetivo del presente trabajo fue establecer la línea base para la presencia de: *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp., en la leche bovina procedente de tres cuencas lecheras del

sistema de producción doble propósito colombianos: Valle del Cesar, Sabanas de Córdoba y Sucre, Cuenca lechera del Alto Magdalena y Magdalena Medio.

Los métodos estándar para la detección de patógenos generalmente son microbiológicos y se basan en pruebas de ausencia/presencia. Estos procedimientos son engorrosos y consumen tiempo. En ciertos casos, se pueden tomar varios días para establecer la identidad de una bacteria particular, entonces, es necesario el desarrollo de metodologías que aseguren una rápida y eficiente detección de bajo número de bacterias patógenas que pueden estar presentes en los alimentos y en este caso en particular en la leche.

En el presente trabajo se planteó para la detección en leche cruda de *L. monocytogenes*, *E. coli* productora de vero toxinas y *Salmonella* spp., individualmente y en forma simultánea, el empleo de las técnicas microbiológicas convencionales y la estandarización de una PCR múltiple utilizando para el pre-enriquecimiento un único medio, el caldo *Salmonella, Escherichia coli* y *Listeria* (SEL) (15-19).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Sistema de producción de leche en Colombia

En Colombia de acuerdo a información de la Federación Nacional de Ganaderos (FEDEGAN) existen 400.000 ganaderos que se dedican a la producción de leche, (20) la mayoría de ellos pequeños productores, divididos en dos grandes grupos. La lechería especializada la cual se concentra en el altiplano y sus principales cuencas son las de Nariño, el Altiplano Cundiboyacense y el Suroriente Antioqueño. Este sistema es responsable del 40% de la producción total y se caracteriza por la explotación de razas especializadas (20).

El doble propósito: donde los ganaderos explotan un sistema de producción basado en razas adaptadas al trópico y sus cruces con razas lecheras. La principal actividad es la producción de leche, con la venta de terneros como actividad subsidiaria. Este sistema existe en todos los pisos térmicos, pero se concentra en el trópico bajo. Es responsable del 60% de la producción total (20-23).

En Colombia la producción de carne y leche se sostiene básicamente en el sistema doble propósito; este tipo de explotaciones, las cuales comprenden cerca del 80,5% del total del inventario ganadero nacional (2), el 50% de los terneros de levante y ceba, proporcionan la carne a los mercados internos (1, 3, 21).

El sistema de producción doble propósito hace referencia a un mismo esquema la producción de carne y leche en el trópico bajo. Esta forma productiva se basa en el vigor híbrido propio del cruce de vacas cebú criollas con razas europeas (*Bos taurus* x *Bos taurus indicus*). El doble propósito merece atención debido a la participación importante que tiene tanto en el hato nacional como en el uso de las tierras destinadas para la ganadería en el país, con especial interés en los departamentos de la Costa Caribe (2, 21, 23).

El doble propósito, es una forma de producción muy antigua derivada de la costumbre de ordeñar en forma estacional por lo menos una parte del hato para extraer leche para autoconsumo, producción de queso o para la venta local. De esta forma la vaca y el ternero son considerados como una unidad biológica y económica durante el período de lactancia (2).

El sistema doble propósito se caracteriza por el ordeño diario de las vacas y la conservación por cierto período de tiempo del ternero para su posterior venta. Los terneros son criados con la vaca y machos y hembras después del destete se levantan en la misma finca o son vendidos en el mercado (1).

El “Sistema doble propósito” requiere menor uso de tecnología e inversión, (2). Los costos de producción son normalmente menores con relación a las fincas especializadas, debido sobre todo al uso reducido de alimentos concentrados y a un uso extensivo de la tierra. Se trata de una explotación en la cual la leche se produce en condiciones particulares como: el ordeño se realiza normalmente a mano y casi siempre con ternero; el uso de plaguicidas para el control de los parásitos es rutinario, debido a la infestación favorecida por el

uso extensivo del pastoreo (1, 22). En estas condiciones con frecuencia la leche del sistema doble propósito es apta para preparar productos lácteos especiales (quesos madurados, yogurt, etc.) (22).

Los sistemas ganaderos doble propósito fueron ganando aceptación en el país hacia la década de los 70 por su adaptabilidad a las zonas de clima cálido y templado, así como por el aumento en el flujo de caja para el ganadero (3, 4, 21,22).

2.2 Calidad de la leche

La leche constituye un alimento universal, y se considera una fuente de proteína de alto valor biológico, y formando parte esencial de la dieta del humano. Según el Ministerio de Protección Social en el decreto 616 de 2006: la leche es el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos, bufalinos y caprinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños completos, sin ningún tipo de adición, destinada al consumo en forma de leche líquida o a elaboración posterior (24).

Desde la producción hasta el consumidor la leche puede verse afectada por factores que cambian su calidad original. Estos factores incluyen: la contaminación y multiplicación de microorganismos, la alteración físico-química de sus componentes, la absorción de olores extraños, la generación de malos sabores y la contaminación con sustancias químicas tales como pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes (25).

La calidad total en la cadena productiva de la leche bovina, incluye aspectos como la composición química y su relación con el aporte nutricional, su

caracterización como materia prima para el procesamiento tecnológico; la inocuidad como una garantía de protección de la salud humana; aspectos éticos relacionados con el bienestar animal y la protección del medio ambiente; las preferencias sensoriales de los consumidores y los requerimientos comerciales de las plantas pasteurizadoras y procesadoras de leche (25).

Según la resolución 000017 del 2012 del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) la calidad estándar de la leche corresponde a los parámetros mínimos para la calidad higiénica, composición y sanitaria, relacionados directamente con el precio competitivo, que debe cumplir la leche cruda entregada por el productor a un agente económico comprador de la misma de acuerdo a la región (14).

Las regiones lecheras se definen como el conjunto de departamentos que de acuerdo a sus características desde el punto de vista productivo, se han agrupado en las regiones 1 y 2 según corresponda. Para efectos de la liquidación del precio de valor por gramo de proteína, grasa y sólidos totales de la leche cruda, se tendrán en cuenta las siguientes regiones (14):

Región 1: Está conformada por los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Quindío, Risaralda, Caldas, Nariño, Cauca y Valle del Cauca.

Región 2: Está conformada por los departamentos de Cesar, Guajira, Atlántico, Bolívar, Sucre, Córdoba, Chocó, Magdalena, Norte de Santander, Santander, Caquetá, Tolima, Huila, Meta, Orinoquía y Amazonía.

La calidad higiénica estándar hace referencia al nivel de calidad mínimo, relacionado directamente con el precio de pago por calidad, que desde el punto

de vista higiénico debe tener la leche cruda en cada región lechera y según el cual el valor del gramo no recibe bonificaciones ni descuentos por este concepto (14).

La calidad higiénica es la condición que hace referencia al nivel de higiene mediante el cual se obtiene y manipula la leche, su valoración se realiza por el recuento total de bacterias y se expresa en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml), los estándares para cada una de las regiones se describen en la tabla 1 (14).

La calidad sanitaria hace referencia a la vacunación de los animales (fiebre aftosa y *Brucella*) y al hato certificado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) como libre de brucelosis, tuberculosis o ambas enfermedades, para acceder a la bonificación por calidad sanitaria se puede exigir la certificación correspondiente (14).

Tabla 1. Estándares de recuento total de bacterias para las regiones lecheras de Colombia.

Región	Recuento total de bacterias UFC/ml
Región 1	175.000 – 200.000
Región 2	200.001 – 300.000

Fuente: (14)

Las características que debe tener la leche cruda en Colombia según el decreto 616 se describen en la tabla 2 (24).

Además, la leche cruda de los animales bovinos debe cumplir con las siguientes condiciones (24):

Debe presentar estabilidad proteica en presencia de alcohol 68% m/m ó 75% (v/v).

Cuando es materia prima para leche UHT o ultra-pasteurizada debe presentar estabilidad proteica en presencia de alcohol al 78% (v/v)

No debe presentar residuos de antibióticos en niveles superiores a los límites máximos permisibles determinados por la autoridad sanitaria competente de acuerdo con la metodología que se adopte a nivel nacional (24), hasta la fecha esta normatividad no existe.

Tabla 2. Características de la leche cruda

Parámetro/Unidad	Leche cruda	
Grasa % m/v mínimo	3,00	
Extracto seco total % m/m mínimo	11,30	
Extracto seco desengrasado % m/m mínimo	8,30	
	Min	Max
Densidad 15/15°C g/ml	1.030	1.033
Índice Lactométrico	8,40	
Acidez expresada como ácido láctico %m/v	0,13	0,17
Índice °C	-0,530	-0,510
Índice Crioscópico °H	-0,550	-0,530

Fuente: (24)

La leche cruda para consumo humano directo debe cumplir con las características físico químicas mencionadas anteriormente; adicionalmente, debe cumplir con las siguientes condiciones (26):

La leche líquida proveniente de animales bovinos debe tener como mínimo 2,9% de proteína.

Debe estar libre de adulterantes, neutralizantes y conservantes.

Los niveles de sustancias tales como contaminantes químicos (metales pesados, residuos de medicamentos veterinarios, plaguicidas, entre otros) y toxinas, se deben regir por normas oficiales o en su defecto las normas internacionales del *Codex Alimentarius* (26).

La calidad constituye una ventaja competitiva fundamental en el proceso de producción, transformación y comercialización de la leche, para satisfacer las necesidades de los consumidores nacionales y las exigencias de los mercados externos actuales y futuros; los cuales seguramente se incrementarán, si se tiene en cuenta el reconocimiento por parte de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) de zonas libres de fiebre aftosa con vacunación en Colombia (27).

En el 2009 la Organización Internacional para la Salud Animal certificó todo el territorio nacional libre de aftosa con vacunación. Desde el año 1994 se desarrolla en Colombia el Plan Nacional de Erradicación de Fiebre Aftosa que ha permitido que el país esté libre de la enfermedad. El estatus sanitario actual de Colombia, definido por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) reconoce como libre de la enfermedad al 100% del territorio colombiano (27, 28).

En cuanto a *Brucella*, al 2007 Colombia contaba con 1062 predios certificados como libres de la enfermedad. En ese mismo año, se encontraban 233 fincas libres de tuberculosis con 29.487 bovinos (27).

2.2.1 Calidad microbiológica de la leche cruda

Las condiciones de higiene y sanidad en los hatos lecheros tienen un efecto importante en la calidad microbiológica de la leche (29); cuanto mayores sean los cuidados aplicados a la obtención higiénica de la leche y a la sanidad de los animales productores de leche, menores serán los contenidos microbianos en la misma. De forma paralela, corrales libres de estiércol y lodo, salas de ordeño limpias, equipo de ordeño funcionando de manera adecuada y una rutina de ordeño correcta, resultarán en una baja incidencia de infección de la ubre y por consiguiente esto se manifestará también con bajos recuentos de células somáticas (29, 30). Es importante resaltar que el recuento de células somáticas (CS) como indicador principal de la salud de la ubre puede ser alterado por la presencia de microorganismos causantes de mastitis, en donde valores normales en un animal sano con 200.000 CS/ml pueden variar a conteos superiores a 400.000 CS/ml (29-32). La leche contiene pocas bacterias al extraerla de la ubre sana, sin embargo, durante el ordeño, la leche se puede contaminar a partir del animal, especialmente de las zonas externas de la ubre y áreas próximas, del medio ambiente, desde el estiércol y el suelo, así como del lecho en que descansan los animales, y a través del polvo, aire, agua e insectos (particularmente moscas) (33-35). Probablemente las dos fuentes de contaminación más significativas sean el equipo y utensilios utilizados para su obtención y recolección, así como las superficies que entran en contacto con la leche, incluidas las manos de los ordeñadores y demás personal (36-38).

El número de microorganismos presentes en la leche, dependiendo de los sistemas de limpieza y desinfección utilizados; cuando es obtenida en

condiciones asépticas, oscila entre 100 y 1000 UFC/ml (32, 35). La leche por su composición, es susceptible de sufrir alteraciones debidas al crecimiento microbiano, particularmente cuanto la temperatura de conservación no es la adecuada. El desarrollo microbiano en la leche ocasiona varios tipos de deterioro como: la fermentación, coagulación, proteólisis, mucosidad, coloraciones diversas y producción de aromas y sabores anormales (38-39).

Muchos de los componentes pueden degradarse, pero las alteraciones más importantes resultan de la degradación de tres componentes fundamentales: lactosa, proteínas y grasa (29). La falta de calidad higiénica se traduce en el laboratorio como la cantidad de agentes bacteriológicos presentes en ella y se evalúa por el recuento de bacterias mesófilas que se encuentren en la leche; en Estados Unidos, Holanda y Australia se aceptan recuentos inferiores a 100.000 UFC/ml (31), en Colombia el límite permitido en leche cruda es hasta de 300.000 UFC/ml (14, 38, 39).

Enfermedades sistémicas pueden dar lugar a la localización de los agentes patógenos en la glándula mamaria o en los ganglios linfáticos asociados y la consecuente excreción de patógenos en la leche. La tuberculosis bovina y la brucelosis son ejemplos clásicos de estas enfermedades zoonóticas transmitidas a través de la leche (29).

2.2.2 Contaminación de la leche cruda por *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *E. coli* O157:H7 en el hato.

Salmonella spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* son especies bacterianas que pueden causar problemas serios en salud pública en el ámbito

mundial (40). Estas bacterias, pueden estar presentes en la leche cruda y en el entorno de los hatos y se han asociado a varios brotes de ETA tras el consumo de leche o productos elaborados con leche sin pasteurizar (40 - 50).

Salmonella spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* entre otros, pueden llegar a la leche cruda provenientes de animales infectados. Las heces, la piel de los animales, el agua, el suelo, el polvo, los manipuladores, los equipos y utensilios, las manos de los ordeñadores pueden ser fuentes potenciales de estos microorganismos (43 - 50).

Un factor de riesgo que favorece la presencia de *L. monocytogenes*; proveniente del medio ambiente en la leche es la inadecuada limpieza de la ubre (41). La zona del ordeño puede convertirse en fuente de contaminación cuando se acumula estiércol (43, 45). En esta área, el agua con una calidad microbiológica inadecuada empleada en las labores de aseo, puede ser otra fuente de contaminación (47).

El lavado y secado de los pezones realizados de manera adecuada, que tienen como finalidad reducir el conteo de bacterias presentes en la piel de los mismos, (33, 46 -50), ha demostrado que reduce casi cuatro veces el riesgo de aislamiento de *L. monocytogenes* en sistemas de ordeño mecánico en granjas lecheras del estado de Nueva York (49). En el ordeño manual, se hace necesario que el ordeñador sólo se dedique a la función de cosechar la leche ya que las manos y uñas pueden ser fuentes potenciales de microorganismos patógenos y ambientales (39).

En el 2009, en sistemas doble propósito de Montería (Córdoba), se reportó que cuando los operarios que ordeñan no manejan o sujetan las patas de las vacas, se disminuye la probabilidad de infectar las glándulas mamarias en un 55% y por tanto el riesgo de contaminar la leche (39).

El equipo de ordeño mecánico también puede ser una fuente de contaminación con microorganismos formadores de biopelículas tales como *L. monocytogenes* y *S. Enteritidis* (30, 51 - 58), debido a que las bacterias pueden adherirse a las superficies de los conductos en acero inoxidable y aumentar el riesgo de contaminación de la leche (38, 51-53). Los empaques y las tuberías con puntos muertos pueden constituirse en una fuente de contaminación de patógenos como *L. monocytogenes* (30, 51). Varios estudios señalan que los equipos de ordeño mecánico se constituyen en un reservorio importante de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. (51 - 53).

Se ha demostrado que sellar los pezones con desinfectante permite disminuir la probabilidad de presentar mastitis hasta en el 65% (33, 39, 40, 47, 54), así como evitar la colonización de la ubre por parte de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* (41, 42, 46).

El uso de esponjas de metal o abrasivas, para la limpieza y desinfección de los equipos y utensilios usados en el ordeño, rayan las superficies metálicas creando un medio ideal para el crecimiento microbiano y producción de biopelículas. Esta es una etapa crucial para eliminar los microorganismos patógenos que se encuentran en los equipos y utensilios, los cuales pueden contaminar la leche, afectando su inocuidad. La presencia de microorganismos

formadores de biopelículas como *L. monocytogenes*, y *S. Enteritidis*, (38, 48, 51, 57, 58), puede estar favorecida por deficiencias en el mantenimiento del equipo y los utensilios. En la tabla 3 se relacionan los reportes de prevalencia para *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *E. coli*O157:H7 en muestras de leche y filtros reportados desde el año 2000.

Tabla 3. Prevalencia de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., y *E. coli* O157:H7 de leche de vaca de tanque y filtros de leche

Microorganismo	Muestras analizadas	Prevalencia (%) ^a	Referencia
<i>Listeria monocytogenes</i>	405	12,6 (filtros)	59
	248	2,8	60
	131	4,6	61
	861	6,5	62
	474	4,9 / 7,0 ^b (invierno/verano)	63
	133	4,8	64
<i>Salmonella</i> spp.	131	6,1	61
	248	6,0	60
	400	1,5 ^c (filtros)	59
	268	2,2	65
	811	1,1/12,6 (Leche/Filtros)	66
	861	2,6	62
	854	2,6/11,8 ^d Convencional/PCR-RT	67

Microorganismo	Muestras analizadas	Prevalencia (%) ^a	Referencia
	183/152	11,0/66,0 (Leche/Filtros)	68
	55	15,0 ^e	69
	133	0,0	64
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	859	0,23	70
	131	0	61
	268	0,75	71
	133	0	64

a:prevalencia basada en el aislamiento de patógenos de muestras de leche de tanque a menos que se indique lo contrario; **b:** junio y noviembre respectivamente; **c:** Uno de los seis aislamientos de *Salmonella* Typhimurium DT104; **d:** PCR convencional versus PCR-TR; **e:**calostro.Fuente: modificada de 37.

2.2.3 *L. monocytogenes*

Ecología de *L. monocytogenes* en la cadena láctea

Aunque, *L. monocytogenes* se ha considerado durante muchos años un patógeno de animales, su papel como patógeno humano transmitido por alimentos sólo se hace evidente a partir de 1980, cuando se documentaron brotes de listeriosis, detectados por consumo de alimentos contaminados (72).

Actualmente, *L. monocytogenes* se considera uno de los agentes más importantes de ETA. La emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos puede explicarse por los cambios en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la conservación de los alimentos en condiciones de refrigeración, cambios en los hábitos alimenticios con respecto al aumento de los alimentos listos para el consumo (LPC) y un incremento del número de

personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad (ancianos, gestantes, recién nacidos, inmunocomprometidos) (73).

Varios autores (59, 74-76) coinciden en que un probable escenario para la transmisión de *L. monocytogenes* en las fincas incluye la contaminación inicial de los cultivos y el suelo por heces de aves de vida silvestre, o estiércol para fertilizar los campos. Mientras que los animales de granja pueden ser sometidos directamente al contacto con *L. monocytogenes* en el suelo y los cultivos a través del pastoreo, los niveles del microorganismo, adquiridos a través de esta ruta pueden ser demasiado pequeños para causar enfermedad, sin embargo pueden convertirse en eliminadores permanentes, facilitando la sobrevivencia del microorganismo en el hato (72) y la posterior contaminación de la leche durante las rutinas de ordeño. Como se puede observar en la tabla 4 se ha reportado la presencia de *L. monocytogenes* en la leche de tanque, sala de ordeño, utensilios y equipos de ordeño en una finca lechera.

Si bien, muchos estudios han indicado que el ensilaje de mala calidad, puede estar contaminado con *L. monocytogenes* (77-80) y éste puede representar la principal fuente de listeriosis en rumiantes (72), poco se sabe sobre la dinámica de transmisión real en los sistemas de producción pecuaria. Por ejemplo, no se sabe en qué medida, la infección de los animales es necesaria para la dispersión de *L. monocytogenes* en el medio ambiente, o si los rumiantes y posiblemente otros mamíferos representan hospederos sin salida que no contribuyen a la supervivencia y el éxito ecológico de este patógeno (47, 72).

Tabla 4. Prevalencia de *L. monocytogenes* en leche cruda de diferentes especies animales

Muestras	Número de muestras analizadas	Número de muestras positivas	Porcentaje % de muestras positivas	País	Referencia
Leche cruda de vaca (método convencional)	340	23	7	España	80
Leche cruda de oveja (método convencional)	202	6	3	España	80
Leche cruda de vaca (método convencional)	139	7	5	Japón	81
Leche entera cruda de vaca (método convencional)	81	13	16	Colombia	82
Leche entera cruda de vaca (PCR en tiempo real)	81	21	26	Colombia	82
Leche cruda de vaca (método convencional)	200	6	3	Colombia	83
Leche cruda de vaca (método convencional)	2060	105	5	India	84
Leche cruda de vaca(método convencional)	90	1	1	Irán	85
Leche cruda de oveja (método convencional)	62	4	6	Irán	85
Leche cruda de cabra(método convencional)	60	1	2	Irán	85
Leche cruda de camella (método convencional)	48	0	0	Irán	85
Leche cruda de vaca (método convencional)	100	3	3	Costa Rica	86
Leche cruda de vaca (método convencional)	69	4	5,8	Francia	87
Leche cruda de vaca (método convencional)	610	1	0,2	Norte del Reino Unido	76
Leche cruda de vaca relacionada con brotes(método convencional)	23	1	4,3	Estados Unidos	79
Leche cruda de vaca de tanque (método convencional)	131	6	4,6	Estados Unidos	79
Leche cruda de vaca de tanque (método convencional)	Indeterminado	Indeterminado	1 a 12,6	Estados Unidos	48, 50
Leche cruda de vaca (método convencional)	930	18	1,9	Malasia	75

Fuente: modificada 89.

En general, los serotipos de *L. monocytogenes* que se encuentran en los animales clínicamente afectados, así como los serotipos aislados de muestras de heces, se han asociado con muestras ambientales en las fincas respectivas (72). De esta manera, existe mayor probabilidad de que *L. monocytogenes* contamine la leche a través de la materia fecal de animales contaminados, el ambiente contaminado durante el proceso del ordeño, almacenamiento y transformación de la leche, sí la obtención de la leche se realiza con una mala rutina de ordeño. Los reportes de aislamiento de *L. monocytogenes* en leche cruda obtenida durante la rutina de ordeño se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Prevalencia de *L. monocytogenes* de un hato lechero (Nueva York) entre febrero de 2004 y julio de 2007.

Fuente	Número de muestras analizadas	Número de muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas
Heces de animales	715	51	7,5
Ambiente	303	22	7,3
Filtros de leche	108	73	67,6
Leche de tanque	172	34	19,7
Equipo y sala de ordeño	40	6	15

Fuente: modificada 47.

Mientras que los animales infectados y ambientes agrícolas contaminados rara vez parecen causar directamente infecciones en humanos. Los productos alimenticios de origen animal que no se procesan antes de su consumo (por ejemplo, la leche cruda) y los alimentos crudos de origen vegetal que han sido contaminados por el estiércol de los animales infectados representan vínculos directos con las infecciones humanas por *L. monocytogenes* (90). La

transmisión directa a partir de animales a los seres humanos es poco frecuente. En estos casos, los síntomas humanos típicamente han reflejado infecciones cutáneas localizadas en lugar de la afección sistémica (72).

La contaminación cruzada con *L. monocytogenes* de alimentos LPC, puede provenir de una variedad de fuentes ambientales e instalaciones. Se sabe que algunas cepas de *L. monocytogenes* pueden persistir en el ambiente donde se procesan alimentos durante largos períodos de tiempo, incluso más de 10 años (78). En algunos casos las cepas persistentes han sido responsables de brotes de listeriosis (91). Se ha sugerido que la resistencia de *Listeria* a los antimicrobianos o agentes desinfectantes en el ambiente donde se procesan alimentos, resulta de la capacidad de las células de formar biopelículas (56). Las biopelículas de *Listeria* han demostrado ser más resistentes al estrés y la desinfección que las células platónicas (74). La adhesión celular y la formación de biopelículas por *L. monocytogenes* están influenciadas por las características de las cepas, propiedades físicas y químicas del sustrato de fijación, fase de crecimiento de las bacterias, la temperatura, medios de cultivo y la presencia de otros microorganismos tanto en equipos como en instalaciones de almacenamiento y por esta vía contaminar el producto (58).

Listeriosis

Una amplia variedad de especies animales, incluido el humano, pueden infectarse por *L. monocytogenes*, entre las que se encuentran vacas, ovejas, cabras, aves, peces y crustáceos, aunque la mayoría de casos de listeriosis clínica tienen lugar en rumiantes; (92). La mayor parte de las infecciones en

animales son subclínicas, pero la listeriosis puede producirse esporádicamente o de forma epidémica. Además, del impacto económico de la listeriosis en animales, existe una conexión entre los animales y su papel como fuente de infección para el humano, bien sea como resultado del contacto directo con animales infectados, especialmente durante el parto de vacas u ovejas, o bien después del consumo de productos de origen animal contaminados (73, 92).

La leche cruda y productos contaminados con esta bacteria, se han identificado como causas de ETA en Estados Unidos (90) (Tabla 6). Sin embargo, la importancia relativa de la transmisión zoonótica de la enfermedad al humano no está clara y aparentemente es más relevante para la Salud Pública la contaminación a partir del ambiente en el que se procesan los alimentos (79, 92).

Tabla 6. Brotes causados por *L. monocytogenes* en productos lácteos elaborados con leche bovina en Estados Unidos

Año	No. de enfermos	Estado	Vehículo	Referencia
2000-2001	12	Carolina del Norte	Queso estilo Mejicano	93, 94
2003	12	Texas	Queso fresco	93
2005	12	Texas	Queso fresco	93
1983	49	Massachusetts	Leche, origen desconocido	95
1994	45	Illinois	Leche, post-pasteurización	96
2006	3	Oregón	Queso origen no especificado	93
2007	53 muertes	Massachusetts	Leche, post-pasteurización	93
2010	5	Washington	Venta legal de leche cruda al detal	93

Listeriosis en humanos

L. monocytogenes se considera un patógeno oportunista, que afecta principalmente niños, mujeres embarazadas, ancianos y a individuos inmunocomprometidos (96-98). La tasa de infección está influenciada por la virulencia de la bacteria, el inóculo ingerido y barreras de defensa (96-98). Neonatos, infantes, mujeres embarazadas, individuos inmunocomprometidos (SIDA, cáncer, pacientes con trasplantes de órganos, entre otros) y ancianos son más susceptibles a sufrir de listeriosis (97). Aunque la listeriosis es rara, (menos del 0,1% de todas las ETA) sus índices de mortalidad son altos (20% a 30%), (98, 99), pudiendo alcanzar hasta el 75% en los grupos de riesgo. *L. monocytogenes* causa dos formas de listeriosis en el hombre: listeriosis gastrointestinal no invasiva y listeriosis invasiva (97 ,98).

La listeriosis no invasiva causa gastroenteritis aguda, con fiebre y se autolimita a personas sanas. (97-100). La enfermedad aparece 24 horas después de la ingestión de una carga importante de la bacteria por personas previamente sanas. Los síntomas comunes incluyen fiebre, diarrea acuosa, náuseas, dolor de cabeza y dolor en músculos y articulaciones (97-100).

La forma invasiva de listeriosis se caracteriza por la aparición de síntomas severos como meningitis, septicemia, bacteremia primaria, endocarditis, entre otros. En mujeres embarazadas, la listeriosis se puede transmitir al feto a través de la placenta, incluso si la madre no presenta signos de enfermedad (97-100). Esto puede llevar al nacimiento prematuro del bebé, aborto espontáneo, mortinatos o serios problemas de salud en el recién nacido. La

listeriosis neonatal se presenta en los primeros 5 a 7 días después del nacimiento con síntomas como neumonía, bacteremia, meningitis, dificultad respiratoria, fiebre, letargia, ictericia y salpullido. La listeriosis perinatal por *L. monocytogenes* se presenta típicamente como una bacteremia con o sin un sitio aparente de infección, o con una infección del Sistema Nervioso Central (SNC) que incluye meningitis y meningocelalitis (98-102). La mayoría de los casos de meningitis o meningocelalitis causada por *L. monocytogenes* se observan en pacientes mayores de 50 años y los síntomas predominantes son fiebre, cambios en la sensibilidad y dolor de cabeza (97-103).

Los casos de listeriosis invasiva no perinatal en el mundo tienen una incidencia de 0,1 a 1,1 casos por 100.000 habitantes y el 47% de los pacientes contagiados presentan infecciones del SNC. *L. monocytogenes* es generalmente, la tercera o cuarta causa de meningitis en Norte América y Europa Occidental (101-103).

De otra parte, en el año 2005, el CDC reportó 896 casos de listeriosis no invasiva, con una incidencia anual de 0,28 casos por 100.000 habitantes (93). En poblaciones consideradas de alto riesgo, los índices de infección son más altos, por ejemplo, en mujeres en estado de gestación, se han estimado 12 casos por 100.000 habitantes y en pacientes con VIH se han calculado 115 casos por 100.000 habitantes (103).

En los últimos años, la listeriosis se ha convertido en una de las mayores preocupaciones de salud pública debido a su severidad, su prolongado tiempo de incubación y su alta tasa de mortalidad que oscila entre un 20 y 30% (102,

103) en los grupos de riesgo. En personas mayores o inmunocomprometidas alcanza valores de 38-40% (102, 103).

Listeriosis en rumiantes.

En los animales, las manifestaciones clínicas de la listeriosis incluyen encefalitis, septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas. La forma septicémica es relativamente poco común y por lo general, pero no de manera invariable, se produce en el recién nacido. Se caracteriza por depresión, inapetencia, fiebre y muerte. La forma encefalítica se denomina a veces “enfermedad en círculo” debido a la tendencia a dar vueltas en una dirección, y es la manifestación más común de la enfermedad en los rumiantes (73). 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 la última etapa (después de 7 meses en vacas y 12 semanas en ovejas) (73). De la misma manera, algunos casos de mastitis en rumiantes podrían estar asociados a la infección por *L. monocytogenes* (73).

2.2.4 *Escherichia coli* O157:H7

E. coli son bacilos Gram-negativos de la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentran comúnmente en el suelo y el agua. También forman parte de las poblaciones intestinales del humano y de los animales de sangre caliente (104-106). Sin embargo, hay varios tipos de cepas de *E. coli* que pueden causar enfermedades gastrointestinales y sistémicas en los seres humanos y los animales (104-110).

E. coli ha sido clasificada con base en criterios clínicos, epidemiológicos y moleculares en seis grupos bien definidos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa o enteroadherente (ECEAgg o ECEA), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* shigatoxigénica (ECST), dentro de las que se encuentra *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) (105-107). Cada uno de estos grupos tiene factores de patogenicidad específicos que sirven para su identificación y clasificación, así como diferentes serotipos basados en los antígenos O y H (104-110).

ECST ha recibido diversas designaciones, una de ellas es *E. coli* verotoxigénica (ECVT), nomenclatura que le fue dada, haciendo mención a que la bacteria produce una citotoxina con actividad sobre las células Vero (108, 109) la otra denominación empleada es *E. coli* shigatoxigénica (ECST), o productor de toxina Shiga Stx, estas diferentes denominaciones que le ha dado la literatura, han generado confusión, pero en ambos casos (ECVT y ECST), se está refiriendo al mismo "patotipo", es decir, productoras de una o más toxinas de la familia Stx, una toxina con características similares a la que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1 (104-109). El término *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), del cual está ampliamente estudiado el serotipo O157:H7, fue asignado a las cepas que ocasionan colitis hemorrágica (CH), y síndrome urémico hemolítico (SUH), que a su vez sintetizan Stx, causando lesiones A/E (adherencia y esfacelación) sobre las células epiteliales, y poseen un plásmido de 90 Kb que codifica para una enterohemolisina (109-113). Por lo tanto, ECEH pertenece a un subgrupo de ECST, e incluye una connotación clínica

importante, ya que no todas las ECST son patógenas, mientras que todas las ECEH sí lo son (104-113).

ECST, es un patógeno emergente en Norteamérica, Europa, Japón Nueva Zelanda y también se ha encontrado en países de América Latina como México, Chile, Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela (104, 105, 114-126)

Ecología de *E. coli* O157:H7 en la cadena láctea.

E. coli O157:H7 existe en un amplio rango de animales incluyendo bovinos, ovejas, cerdos y ciervos. Sin embargo, los bovinos son el grupo con la más alta prevalencia. Los bovinos son considerados como los principales reservorios para la infección en humanos (127). La ruta más obvia por la que ECST pueda entrar al medio ambiente es a través de las heces eliminadas por los animales directamente sobre el suelo o en pastoreo, especialmente bovinos y ovinos, aunque otros animales como palomas, venados o conejos también constituyen reservorios importantes de estas bacterias (127-129). En la tabla 7 se compilan varios reportes de la presencia de *E. coli* O157:H7 en heces de bovinos.

En el ambiente de hatos bovinos *E. coli* O157:H7 puede persistir por varios años (130). La cama de los animales, canales de agua y el estiércol pueden ser también fuentes de *E. coli* O157:H7 (131). Estos patógenos fecales pueden entrar al ambiente a través de las deposiciones directas a la tierra o a través de la escorrentía superficial de la materia fecal depositada en los suelos, sobre todo después de fuertes eventos de lluvia (131).

Tabla 7. Prevalencia de *E. coli* O157:H7 en heces de bovinos

Tipo de ganado	País	Año de muestreo	Número de muestras	Número de positivos	Porcentaje de positivos	Referencia
Vacas lecheras	Estados Unidos		351	24	7	130
Vacas lecheras	Estados Unidos		1266	18	1	131
Vacas lecheras	Australia		588	11	2	132
Ganado de leche y carne	Estados Unidos	1991–1992	5582	22	0-4	130
Novillas	Estados Unidos	1991–1992	6894	25	0-4	133
Vacas lecheras	Canadá	1992–1993	1478	12	0-8	131
Ganado en planta de beneficio	Japón	1992–1994	387	7	2	131
Ganado lechero	Estados Unidos	1993	965	31	3	134
Vacas lecheras	Canadá	1993	406	2	0-5	131
Bovinos de carne y lácteos en fincas	España	1993–1994	686	1	0-1	131
Hatos con incidencia en humanos	Escocia	1993–1995	441	65	15	131
Ganado de engorde	Estados Unidos	1994	11.881	210	2	135
Novillas y vacas de ordeño	Noruega	1995	1970	6	0-3	136
Finca con incidencia en humanos	Canadá	1995	95	59	62	136
Procesamiento	Canadá	1995–1996			8	136
Ganado lechero en fincas	Países bajos	1996	1152	75	7	136
Bovinos de carne importados	Noruega	1996	504	19	4	136

Tipo de ganado	País	Año de muestreo	Número de muestras	Número de positivos	Porcentaje de positivos	Referencia
Vacas lecheras	Estados Unidos	1996	4361	52	1	136
Ganado en planta de beneficio	Eslovenia	1996–1997	250	2	0-8	136
Terneros al destete	Estados Unidos	1997	878	61	7	131
Ganado de leche	Colombia	1997	307	7	2,5	122
Ganado de ceba	Republica Checa	1997–1998	365	72	20	136
Terneras en planta de beneficio	Francia	1998	300	1	0-3	136
Ganado en planta de beneficio	Noruega	1998	680	1	0-1	136
Ganado de leche y carne	Tailandia	1998	55	1	2	137
Ganado de ceba	España	1998–1999	471	55	2	137
Heces de animales en planta de beneficio	Irlanda	1998–1999	250	6	2-4	136
Ganado doble propósito	Venezuela	2007	309	7	2,6	119

Al igual que en las heces de la especie bovina, ECST tiene una gran capacidad de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el suelo y el agua. Mediante un estudio “*in vitro*” se demostró que después de la inoculación de suelo con muestras de heces contaminadas *E. coli* O157:H7, el organismo permaneció viable en el suelo hasta por 99 días (138). Otro estudio, mostró que *E. coli* O157:H7 fue capaz de sobrevivir durante 13 semanas en un lago de aguas atemperadas a 15°C (139). Esta gran persistencia en el suelo y en el agua, combinada con intensas prácticas agrícolas, tales como la aplicación regular de

efluentes al suelo, así como la alta densidad del ganado en las granjas posibilitan la contaminación de la leche y los alimentos (140).

La persistencia en el suelo podría ser un factor significativo en la contaminación inicial y la re-contaminación del ganado y en definitiva para la infección humana. Por lo tanto, es importante comprender mejor los factores ambientales de la supervivencia de ECST en el suelo. De hecho, tanto factores abióticos (pH, humedad o textura del suelo) como bióticos (depredación, competencia y antagonismo) pueden influir la entrada de *E. coli* en este ecosistema (140). Además, la fluctuación de las condiciones ambientales encontradas en el campo, tales como eventos de precipitación, radiación solar (UV) o variaciones de temperatura pueden afectar la supervivencia de ECST (129).

La sobrevivencia y el crecimiento de *E. coli* O157:H7, son dependientes de la temperatura y humedad (139). Este microorganismo puede tolerar temperaturas extremas (+4°C hasta -20°C) en heces de bovinos (140), la viabilidad puede ser corta a temperaturas más altas, esto puede deberse a la reducida humedad asociada con la deshidratación de las heces (140).

Vehículos bien conocidos para la transmisión de ECST incluyen alimentos contaminados, especialmente de origen bovino, como los productos lácteos y carne que fueron contaminados directamente por el ganado o las heces durante los procesos de ordeño o el beneficio respectivamente (141). Otro modo de transmisión es la difusión de persona a persona, contacto con animales y el contacto con el agua o suelo contaminado (141), estos en menor proporción que las ETA.

En los últimos 10 años, se han producido cambios en la epidemiología de las infecciones humanas por ECST y cada vez es más frecuente el reporte de infecciones asociadas con exposiciones al medio ambiente contaminado (Tabla 8).

En los bovinos, se ha demostrado que el sitio de la colonización de *E. coli* O157:H7 es el tejido linfoide presente en la unión recto-anal (142), aunque los factores que conducen al tropismo aún son desconocidos. La importancia de la intimina se ha demostrado para la colonización del ganado por varios autores (143) y han identificado más de 100 genes necesarios para la colonización del intestino de los bovinos (144).

Tabla 8. Brotes de *E. coli* O157 reportados relacionados con explotaciones agropecuarias y ferias agrícolas.

País	Año del brote	Casos (controles)	Fuente probable
Inglaterra	1994	7	El contacto con animales (vacas, cabras)
Inglaterra	1997	3	El contacto con animales (vacas, cabras)
Inglaterra	1997	5	El contacto con animales (vacas, cabras)
Gales	1999	16 (36)	El consumo de helados y algodón de azúcar (en la finca)
Ohio, Estados Unidos	2000	22 (51)	El consumo de agua (que asisten a la feria agrícola)
Pensilvania, Estados Unidos	2000	51 (91)	Contacto con animales (Lecheros) Exposición al medio ambiente agrícola
Washington, Estados Unidos	2000	5	Contacto con animales (bovinos, cabras)
Escocia	2000	20	Exposición al ambiente de la finca (campamentos agrícolas/recinto ferial)
Inglaterra	2001	12	La exposición al ambiente de la finca (fuente conejo de monte)

País	Año del brote	Casos (controles)	Fuente probable
Ohio, Estados Unidos	2001	23 (53)	La exposición al entorno de granja (granja recinto ferial)
Ohio, Estados Unidos	2001	27	El contacto con animales (ganado vacuno, conejos)
Oregón, Estados Unidos	2002	72	El contacto con animales (cabras, pollos)
Canadá	2003	45	El contacto con animales(cabras)
Texas, Estados Unidos	2003	25	La exposición al entorno de granja (área de Feria de Ganado)
Carolina del N, Estados Unidos	2004	45 (188)	La exposición al entorno de granja (ovejas y cabras)
Florida, Estados Unidos	2005	22	Visitar ferias de animales (cabras, ovejas, ganado vacuno)
Arizona, Estados Unidos	2005	2	Exposición al ambiente de la finca
Florida, Estados Unidos	2007	7	Contacto con animales (cabras)
Inglaterra	2007	5	Contacto con animales (perros en finca)

Fuente 129.

Se ha propuesto que la eliminación de *E. coli* O157:H7 por los bovinos, puede ser transitoria, una vez los animales se contaminan en el hato. Cuando la exposición es prolongada puede resultar en la colonización del tracto gastrointestinal (144). Hay pruebas que sugieren que una proporción de los animales positivos pueden eliminar *E. coli* O157:H7 en mucha mayor concentración que otros, los llamados súper-eliminadores (142). Una alta concentración de *E. coli* O157:H7 en heces o una prolongada colonización puede causar desprendimiento del epitelio del recto terminal (142). Se cree que los súper eliminadores de *E. coli* O157: H7, si bien constituyen una pequeña proporción de ganado, se estima que pueden ser responsables de más del 95% de *E. coli* O157: H7 eliminada por el ganado (142, 145).

Enfermedad en el hombre

E. coli O157:H7 fue reconocida como patógeno en 1982 durante una investigación de brotes de colitis hemorrágica (146). En el humano, la infección por *E. coli* O157:H7 causa una gastroenteritis aguda y colitis hemorrágica (145). La diarrea, que frecuentemente es sanguinolenta, es la manifestación clínica más frecuente, con un período de incubación de 1 a 14 días, generalmente acompañada por dolor abdominal. El vómito se presenta aproximadamente en la mitad de los pacientes, la fiebre es poco frecuente y la enfermedad se resuelve en cinco a diez días (147).

Además, este microorganismo está asociado con las toxinas Shiga (Stx), que pueden causar complicaciones sistémicas incluyendo el síndrome hemolítico urémico (SHU), y la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), afecta los riñones y el Sistema Nervioso Central y puede causar la muerte (148). El SHU puede desarrollarse hasta en un 11% de los individuos afectados (148). Este síndrome es particularmente frecuente en niños menores de 5 años y en los ancianos (148).

La mayoría de las infecciones por *E. coli* O157:H7 han sido relacionados con el consumo de alimentos de origen bovino contaminados, como carne de res molida y leche cruda (148). Otras fuentes de infección son verduras contaminadas (149, 150), persona a persona (151, 152), animal a persona (152) o agua contaminada. Sin embargo, la leche cruda se considera uno de los vehículos más importantes en la transmisión de *E. coli* O157:H7 (153). En la

Tabla 9 se reportan los brotes ocasionados por *E. coli* O157:H7 asociados al consumo de leche cruda o productos elaborados con leche cruda.

Tabla 9. Brotes causados por *E. coli* O157:H7 asociadas al consumo de leche y productos lácteos.

Año	País	Número de enfermos	Enfermedad	Fuente probable
2001	Canadá	4	Recuperación es de más de 10 días	Leche cruda
2006	California Estados Unidos	6	Síndrome Urémico Hemolítico	Leche cruda y calostro
2005	Washington y Oregón Estados Unidos	18	Síndrome Urémico Hemolítico	Leche cruda
2010	Minnesota Estados Unidos	8	N/d	Lácteos sin pasteurizar
2010	Washington Estados Unidos	2	SUH	Leche cruda
2010	Minnesota, Oregón, Vermont, Washington, Estados Unidos	8	Hospitalización	Quesos elaborados con leche cruda
2010	Arizona, California Colorado Minnesota Nevada Estados Unidos	38	SUH	Quesos curados y otros quesos
2010	Minnesota	8	SUH	Leche de vaca cruda
2010	Washington	2	Nd	Leche de vaca cruda

Fuente: (154-160)

De otra parte, en Europa las infecciones por *E. coli* O157 se asocian al contacto con ambientes contaminados que incluyen: contacto con heces contaminadas durante las visitas a las granjas y acercamiento a los animales reservorios (161, 162). En la figura 1 se muestra el número de brotes por *E. coli* O157.H7 en los países del Reino Unido en el periodo comprendido entre 1988 el 2008 (162).

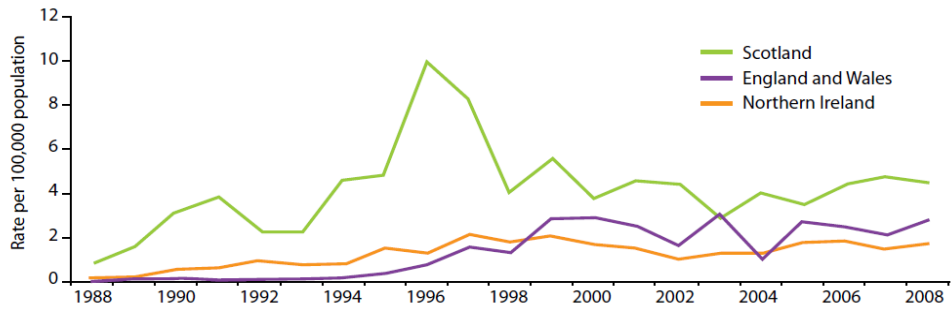


Figura 1. Reportes de laboratorio de infecciones por *E. coli* O157 durante 1988-2008.

Fuente: 162

2.2.5 *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* pertenece a la tribu *Salmonelleae*, de la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*), son anaerobios facultativos, no formadores de esporas (163).

La nomenclatura y la clasificación taxonómica del género *Salmonella* ha sido objeto de sucesivas modificaciones, a través de los años. Sin embargo, todavía siguen vigentes las ideas desarrolladas por P.R. Edwards y H.W. Ewing, en la década del 40, cuando definieron e identificaron las primeras cepas del género *Salmonella* y de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (164).

Estudios del ADN mediante técnicas de hibridación mostraron que el género *Salmonella* está constituido por 2 especies (164): *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está compuesta por 6 subespecies: *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, *Salmonella enterica* subespecie *salamae*, *Salmonella enterica* subespecie *arizonae*, *Salmonella* subespecie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *houtenae* y *Salmonella enterica*

subespecie *indica*. A la vez las subespecies de *Salmonella enterica* y la especie *Salmonella bongori* se dividen en más de 2700 serovariedades, que están definidas en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H (163). La mayoría de las serovariedades aisladas del humano y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* (subespecie I) y llevan un nombre por lo general relacionado con el lugar geográfico donde se la aisló por primera vez (163).

Ecología de *Salmonella* spp.

Una gran variedad de animales procedentes de muchos ambientes se han establecido como portadores de *Salmonella* spp. (64, 165), siendo los alimentos de origen animal la principal fuente para la transmisión de *Salmonella* spp. al humano (64). Los pollos (64), pavos (64) y huevos (166) pueden estar infectados con *Salmonella* spp. El tracto intestinal de cerdos jóvenes (166), así como el ganado de carne pueden contener *Salmonella* spp. (164), de modo que, *Salmonella* spp. está relativamente generalizada en el medio ambiente y en los animales de consumo (164, 167).

La forma intermitente de la secreción fecal de *Salmonella* spp. es fundamental para la comprensión del flujo de esta en la cadena alimentaria. Existe correlación entre la excreción y los brotes humanos. Durante los meses de invierno los niveles tienden a cero y alcanzan su punto máximo en verano, en países con estaciones (166), especialmente en el ganado bovino y porcino y los brotes humanos también se presentan durante este período (164, 166); en Colombia aún no se reportan datos sobre la temporalidad de la presentación de

los brotes en humanos. Se ha asociado que los casos de salmonelosis en humanos se presentan con mayor frecuencia pocos días después de temporadas con temperaturas ambientales altas (167). Sin embargo, en estudios hechos en los Estados Unidos se ha encontrado mayor incidencia de *Salmonella* spp., en fincas ganaderas, granjas avícolas y porcícolas durante octubre-diciembre en lugar de los meses de verano (166). Aunque la asociación con la temperatura ambiental existe, cabe señalar que la temperatura interna del intestino del humano y los animales es bastante constante, de modo que la temperatura no es el único factor de la estacionalidad observada (166).

Salmonella spp. ha sido aislada a partir del ambiente de todo tipo de granjas, incluidas las destinadas a ganado bovino de carne y leche, granjas porcinas de levante y cría y granjas avícolas. En 2006, en el análisis de 2.496 muestras ambientales de granjas de diferentes sistemas de producción, se aisló *Salmonella* spp. en diferentes porcentajes según el tipo de explotación pecuaria, la mayoría de los resultados positivos se encontraron en las explotaciones porcícolas (57,3%), seguido de las explotaciones lecheras (18%), las de aves de corral (16%) y las fincas de ganado de carne (8,5%). *Salmonella* estuvo presente en el suelo, la ropa, la arena de cama, las heces y alimentos de las granjas o fincas evaluadas (166).

Además, se han reportado investigaciones encaminadas a comprender el efecto que tienen la dieta y el transporte de los animales en la población de *Salmonella* spp. En los bovinos, las poblaciones de *Salmonella* spp., en el contenido ruminal disminuyeron rápidamente en el ganado alimentado con

heno en comparación con el ganado en el que se restringió el alimento por dos días (165). La población de *Salmonella spp.*, aumentó en el rumen y las heces del ganado bovino, cuando el tiempo de transporte transcurrido entre la granja de origen y el momento del faenado fue mayor (165).

Los datos, anteriores muestran que *Salmonella spp.*, al estar presente en el ambiente de los hatos lecheros puede contaminar la leche en el momento del ordeño o en el manejo posterior al que se somete la leche en finca antes de que se procese o se consuma. El sistema de vigilancia en Estados Unidos reporta los brotes de *Salmonella spp.*, asociados al consumo de leche cruda, productos elaborados con leche sin pasteurizar y leche pasteurizada, (Tabla 10).

Tabla 10. Brotes de infecciones por *Salmonella spp.* asociados a leche y productos lácteos.

Año	Estado	Microorganismo	Número de casos	Fuente probable
1975	Louisiana	S. Newport	49	Leche origen desconocido
1978	Arizona	S. Typhimurium	23	Leche post pasteurización
1984	Kentucky	S. Typhimurium	16	Leche inadecuada pasteurización
1985	Illinois	S. Typhimurium- MDR**	>150,000	Leche post pasteurización
2000	Multiple	S. Typhimurium- MDR*	93	Leche post pasteurización
2001	Connecticut	S. Newport; multi-resistente (MDR-SN)	26	Queso fresco
2001	Multi-estado	S. Newport –MDR**	27	Queso elaborado con leche cruda
2002	(Multi-estado: Illinois, Indiana, Ohio y Tennessee)	S. Typhimurium	62	Leche cruda, crema de leche, mantequilla y malteada.
2002	Multi-estado	S. Typhimurium	107	Leche cruda/leche cruda batida
2002	Wyoming	S. Typhimurium	116	Leche origen desconocido
2004	California	S. Newport-MDR**	100	Leche origen desconocido

Año	Estado	Microorganismo	Número de casos	Fuente probable
2006	Illinois	S. Newport	85	Queso elaborado con leche cruda
2006 2007	Illinois	S. Newport	85	Leche cruda
2006	Illinois	S. Newport – MDR	96	Queso estilo mejicano
2007	Illinois	S. Newport	67	Queso elaborado con leche cruda
2007	Pennsylvania	S. Typhimurium	2	Leche cruda y derivados lácteos
2007	Pennsylvania	S. Typhimurium	29	Queso elaborado con leche cruda
2007	Pensilvania	S. Typhimurium	29	Leche cruda/queso elaborado con leche cruda
2007	Multiple	S. Montevideo	20	Queso rallado
2010	Utah	S. Newport	10	Leche cruda
2010	Carolina, Oregón, Washington	S. Braenderup	23	Leche pasteurizada
2010	Texas	<i>Salmonella</i>	4	Leche cruda

MDR (Cepas multirresistentes). Fuente: (168-172)

Salmonelosis en el hombre

Todas las serovariedades de *Salmonella* spp. conocidas son patógenas para el humano, los animales o ambos. De acuerdo con la adaptación a hospederos pueden reconocerse tres grupos: (165, 173): el primero, conformado por serovariedades estrictamente adaptadas a una especie como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Sendai* adaptadas al humano, y de manera similar *S. Abortusovis* y *S. Gallinarum-Pullorum* que afectan ovejas y aves, respectivamente. Un segundo grupo incluye microorganismos como *S. Dublin* y *S. Choleraesuis* que causan enfermedad en una especie animal, pero pueden ser oportunistas en otras. El tercer grupo está constituido por serovariedades como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* que pueden producir enfermedad en una amplia variedad de especies incluido el humano; muchas de éstas generan un

estado de portador asintomático en animales, pero producen gastroenteritis en seres humanos (164,174).

Excluidos *S. Typhi* y los serotipos paratíficos (en particular A y C), que son especie-específicos para el humano, todas las demás infecciones por *Salmonella spp.*, se pueden considerar como zoonosis. La salmonelosis es quizás la zoonosis más difundida en el mundo (173).

Las salmonelas de origen animal causan en el humano una infección intestinal que se caracteriza por un período de incubación de 6 a 72 horas después de la ingestión del alimento y fiebre de aparición brusca, mialgias, cefalalgia y malestar. Los síntomas principales consisten en dolores abdominales, náusea, vómito y diarrea. Por lo general la salmonelosis tiene un curso benigno y la recuperación clínica sobreviene en 2 a 4 días. El portador convaleciente puede eliminar salmonelas durante unas semanas y, rara vez, durante unos meses (163, 173).

Los serotipos adaptados a una especie animal dada suelen ser menos patógenos para el humano (*S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. abortus-equi*, *S. abortus-ovis*). Una excepción es *S. Choleraesuis*, que produce una enfermedad grave, con cuadro septicémico, esplenomegalia y fiebre alta, luego de algunos días e incluso algunas semanas después de la gastroenteritis. En más del 50% de los pacientes con infecciones por *S. Choleraesuis* se observa bacteremia y la letalidad puede llegar hasta el 20%. Los serovares Sendai y Dublin también pueden causar septicemias (fiebre entérica) y a menudo, abscesos metastásicos (163, 164).

Las salmonelosis zoonóticas generalmente se resuelven sin complicaciones. Sin embargo, una pequeña proporción de pacientes, especialmente los debilitados por compromiso inmune como pacientes con VIH, cáncer, diabetes pueden padecer bacteremia. Además de las lesiones gastrointestinales se pueden ocasionar lesiones en otros órganos como pulmones, pleura, articulaciones y en ocasiones el endocardio. Los niños menores de 5 años y los ancianos son más susceptibles a sufrir complicaciones (173).

Enfermedad en los animales

Salmonella spp. tienen una gran variedad de hospederos animales, tanto domésticos como silvestres. La infección puede manifestarse clínicamente o no. En la forma subclínica, el animal puede tener una infección latente y albergar el patógeno en sus ganglios, o pueden ser portadores y eliminar el agente en las heces, en forma transitoria, intermitente o persistente. En animales domésticos existen varias entidades clínicas bien determinadas asociadas a serotipos adaptados a la especie, como por ejemplo *S. Pullorum* o *S. abortusequi* (163,173).

Salmonelosis en bovinos

Los principales causantes de salmonelosis clínica en los bovinos son los serovares Dublin y *S. Typhimurium* (174). En ocasiones se pueden aislar otros serovares de animales enfermos. La salmonelosis en bovinos adultos se da en forma esporádica, pero en terneros suele adquirir proporciones epizoóticas. La enfermedad se presenta generalmente cuando intervienen factores de estrés. En bovinos adultos, la enfermedad se inicia con fiebre alta, aparición de

coágulos de sangre en las heces y luego una diarrea profusa, con descenso de la temperatura normal. Los signos de dolor abdominal son muy pronunciados. En vacas preñadas se puede presentar el aborto. La enfermedad puede tener un desenlace fatal en pocos días o el animal puede curarse y a menudo constituirse en portador de la infección, con la consiguiente aparición de nuevos casos. Los terneros son más susceptibles y en ellos la infección da lugar a verdaderos brotes epidémicos, muchas veces con alta mortalidad (175).

En recién nacidos son frecuentes la septicemia y la muerte. El estado de portador es poco frecuente en animales jóvenes y se da sobre todo en bovinos adultos. La infección casi siempre se origina en una vaca que elimina el agente con las heces, pero también puede originarse en la leche.

2.3 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* a partir de leche cruda

Actualmente existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en muestras de alimentos. Los métodos bacteriológicos convencionales son importantes por varias razones: su empleo permite obtener el microorganismo en cultivo puro, lo que puede ser útil para fines reglamentarios. Siguen siendo los métodos de referencia frente a los cuales se comparan y validan otros métodos (15-18).

Los métodos convencionales para el aislamiento de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* a partir de alimentos que han ganado aceptación

con propósitos reglamentarios internacionales son los métodos oficiales de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), las Normas ISO, el método de Servicio de Inspección Alimentaria (FSIS) del departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses.

En Colombia los procedimientos son descritos por el INVIMA en el manual para análisis de alimentos 1998 son el referente para la detección y aislamiento de los microorganismos patógenos en alimentos (18).

Para el aislamiento de *Salmonella* spp., en leche cruda se recomienda el método tradicional descrito por la FDA, el cual comprende un pre-enriquecimiento en medios no selectivos con el fin de recuperar las células con daño subletal, un enriquecimiento en medios selectivos que contienen sustancias inhibitoras para evitar el crecimiento de microorganismos competidores, y la siembra en medios sólidos selectivos para diferenciar las colonias de *Salmonella* spp., de otras enterobacterias. La confirmación de las cepas se realiza mediante pruebas bioquímicas y la identificación de los antígenos somático (O) y flagelar (H) utilizando sueros específicos (15, 163).

Para el aislamiento e identificación de las cepas patógenas de *E. coli*, incluyendo *E. coli* O157:H7, en leche cruda se recomiendan los métodos propuestos por la FDA (16). Se utiliza un protocolo que consta de un enriquecimiento, posterior siembra en un medio selectivo e identificación mediante pruebas inmunológicas y moleculares (16).

Para la detección y enumeración de *L. monocytogenes* en leche cruda se pueden utilizar el método propuesto por la FDA, en el cual está basada la

técnica de presencia/ausencia que utiliza el INVIMA para leche y productos lácteos en Colombia. Las primeras técnicas se basan en un enriquecimiento selectivo a partir de 25 ml de muestra en un caldo selectivo para *Listeria* spp., posterior siembra en medios selectivos y purificación de las colonias para realizar la identificación bioquímica del microorganismo. Actualmente, se emplean kits de identificación rápida, así como pruebas para serotipificación e identificación de *L. monocytogenes* por técnicas moleculares e inmunológicas disponibles en el mercado (17).

2.3.1 Detección de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* por PCR

La detección de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* basada en la técnica de PCR se ha documentado por varios autores (19, 177-187), entre ellos reportes que describen la PCR en tiempo real para la detección simultánea de por lo menos dos de los organismos mencionados (180,181). La sensibilidad de detección con este método en particular en lo que respecta a *L. monocytogenes* sigue siendo baja e impredecible. Además, como la técnica emplea fluorogénicos y cebadores/sondas, es más costoso y requiere un equipo especial para la detección de la señal (19, 184).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en leche cruda bovina del sistema de producción doble propósito, mediante técnicas microbiológicas convencionales y moleculares.

3.2 Objetivos específicos

Desarrollar una metodología microbiológica y molecular para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche cruda bovina.

Determinar la prevalencia y factores asociados de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche cruda bovina en el sistema de producción doble propósito del trópico bajo colombiano.

3.3 Hipótesis verdadera

Salmonella spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* están presentes en la leche producida en el sistema doble de producción doble propósito colombiano y pueden ser detectadas empleando una sola técnica molecular.

3.4 Hipótesis nula

Salmonella spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* están presentes en la leche cruda bovina del sistema de producción doble propósito pero no pueden ser detectadas empleando una sola técnica molecular.

4. METODOLOGÍA

4.1 Evaluación del caldo SEL para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche cruda.

Para evaluar el uso del caldo SEL como pre-enriquecimiento en el aislamiento simultáneo de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche, se inocularon muestras de leche UHT con estos microorganismos estableciendo el nivel de detección con relación a los métodos microbiológicos convencionales descrito por el INVIMA y la FDA y usando paralelamente el caldo SEL como pre-enriquecimiento (Figura 2) (19).

Para establecer el tiempo de crecimiento óptimo se realizaron curvas de crecimiento individuales en caldo SEL para comparar el nivel de detección por los métodos convencionales y el método a evaluar. (15-19).

El caldo SEL se formuló mediante la modificación del caldo tamponado para *Listeria*, y contiene cuatro diferentes agentes antimicrobianos: Acriflavina, Cicloheximida, Fosfomicina y Ácido Nalidixico, junto con tripticasa de soya, extracto de levadura y piruvato de sodio, componentes que se han comprobado facilitan el crecimiento de microorganismos sanos y microorganismos con daño sub-letal (Anexo 1). El piruvato de sodio para proteger los microorganismos de los cambios de pH (19) y los antimicrobianos impiden el crecimiento de microorganismos acompañantes (19).

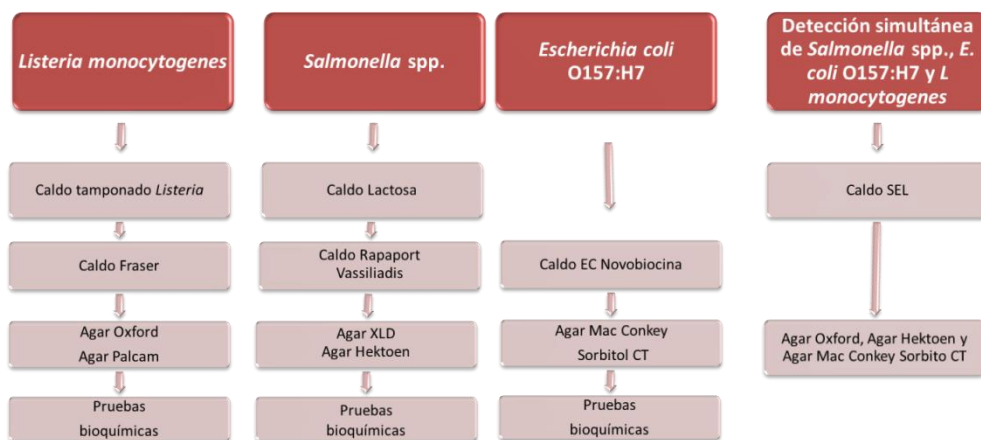


Figura 2. Procedimiento para la detección de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche inoculada artificialmente.

4.1.1 Cepas bacterianas control

Se emplearon las cepas de referencia de *S. Enteritidis* ATCC13076 (Microbiologics®), *E. coli* O157:H7 del banco de cepas de la Pontificia Universidad Javeriana (código CMDM0218) y *L. monocytogenes* serotipo 4b ATCC 19115 con el propósito de evaluar el crecimiento simultáneo de los tres microorganismos.

4.1.2 Límite de detección

Se evaluó el crecimiento en los caldos de pre-enriquecimiento Lactosa, caldo EC-V (Caldo *E. coli* mas Vancomicina) y caldo tamponado *Listeria* marca Oxoid®, para *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* respectivamente (15-18) de acuerdo a lo sugerido por FDA e INVIMA. La evaluación del crecimiento simultáneo se realizó en Caldo SEL de acuerdo a la formulación hecha por Kim y Bhunia, 2008 (19). Leche UHT (Ultrapasteurizada), previamente evaluada como negativa para la ausencia de los tres microorganismos, fue contaminada

experimentalmente con las tres cepas control, la leche fue inoculada con cuatro concentraciones: 10^3 UFC/ml, 10^2 UFC/ml, 10^1 UFC/ml, 10^{-1} UFC/ml, tanto en forma individual como en mezcla.

Para determinar el límite de detección por este método, 225 ml de cada uno de estos caldos de pre-enriquecimiento fueron inoculados con las cuatro concentraciones mencionadas de las tres cepas de referencia, tanto en forma individual como en mezcla. Se incubaron a 37°C en agitación continua 120 rpm durante 6h. A partir de los caldos de pre-enriquecimiento se sembraron 100µl en los agares selectivos: Agar Oxford, Agar Hecktöen, Agar MacConkey sorbitol CT (cefixime-telurito).

4.1.3 Curva de crecimiento *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en caldo SEL.

Con el fin de definir el tiempo en el que las tres cepas bacterianas lograron el punto máximo de la fase de crecimiento logarítmico, se realizaron curvas individuales de crecimiento bacteriano para *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en caldo SEL empleando el método directo de recuento en placa (19, 188, 189).

Las cepas de referencia de *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* fueron cultivadas en caldo SEL, e incubadas por 12 horas a 37°C. Después del período de adaptación, 500 µl de cada microorganismo se inocularon en 100ml de SEL, (19). Los caldos se incubaron en aerobiosis a una temperatura de 37°C, en agitación constante a 120rpm. Posteriormente, se tomaron

alícuotas de 3ml del caldo, a la hora cero y cada hora se realizó el recuento estándar en superficie en Agar Plate Count (190), a partir de diluciones seriadas, los cultivos se incubaron durante 48 horas en aerobiosis a 37°C. El recuento se realizó en las cajas correspondientes a las dos diluciones que contenían entre 25 a 250 colonias, las evaluaciones se montaron por triplicado. Para establecer el recuento bacteriano se empleó la siguiente fórmula (190):

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times (d)]} \quad [1]$$

Donde:

N = Número de colonias/ml

$\sum C$ = Suma de todas las colonias contadas

n_1 = Número de cajas contadas en la primera dilución

n_2 = Número de cajas contadas en la segunda dilución

d = Primera dilución donde se realizó el conteo

Los datos obtenidos se recopilaron en una hoja de cálculo del programa Microsoft Office Excel, para estimar el comportamiento de cada uno de los microorganismos y estimar sus parámetros cinéticos. Se realizó el gráfico del crecimiento bacteriano en función del tiempo y para facilidad de los cálculos la población de bacterias se representó en logaritmos base 10. Se estimó el tiempo de generación para cada microorganismo en el caldo SEL (Anexo 2), empleando la fórmula (188, 189):

$$n = 3,3 \text{ Log} \frac{x}{y} \quad [2]$$

Donde:

n= número de generaciones

x= número de bacterias al tiempo 0

y=número de bacterias al tiempo t

El tiempo de generación G que es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de x a y) dividido por el número de generaciones n, se calculó mediante la fórmula (188):

$$G = \frac{t}{n} \quad [3]$$

4.2 Evaluación del método de detección molecular simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche cruda

4.2.1 Cultivo y extracción de ADN

Una vez definido el tiempo de crecimiento máximo para cada microorganismo se prepararon seis diferentes suspensiones bacterianas, cada una de las cuales contenía una mezcla de los tres microorganismos con concentraciones que iban desde 10^1 a 10^6 UFC/ml de cada microorganismo.

Se inocularon volúmenes de 10ml de muestras de leche UHT libre de los tres microorganismos previa confirmación por métodos microbiológicos con cada una de las seis suspensiones bacterianas mencionadas anteriormente y adicionadas a 90ml de caldo SEL, las cuales fueron incubadas por un periodo de seis horas a 37°C. Cuando los cultivos tenían seis horas de incubación se tomaron tres alícuotas de un ml de los cultivos, se lavaron dos veces por centrifugación a 3600 x g por cinco minutos, con PBS pH 7,4, (137 mM de NaCl; 2.7 mM de KCl; 10 mM de NaH_2PO_4 ; 2mM de KH_2PO_4) para obtener el paquete de celular; un tubo se empleó para la extracción de ADN, los dos tubos restantes se congelaron a -20°C como contra-muestra. El paquete celular se

re-suspendió en 100µl de de buffer de lisis Tris – EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8,0; Buffer TE) más lisozima (20mg/ml), la mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos. Se agregaron 467µl de buffer TE, 30µl de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10% (p/v), 3µl de proteinasa K (20 mg/ml), la mezcla se incubó a 65°C por 60 minutos. Se agregaron 100µl de NaCl 5M y 80µl de Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB/NaCl) a 65°C por 20 minutos, posteriormente se agregaron 700µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se obtuvo la fase acuosa por centrifugación a 13.000 x g a 4°C x 10 minutos (187), y se realizó una segunda extracción agregando 800µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), en la fase acuosa obtenida por centrifugación a 13.000 x g a 4°C x 2 minutos (191, 192), se precipitó el ADN con isopropanol, el ADN se lavó con 100µl alcohol etílico al 70% (v/v) centrifugando a 3.000 x g a 4°C x 2 minutos, el ADN se secó a temperatura ambiente y finalmente se re suspendió en 50µl de buffer TE. El ADN se empleó como molde para la PCR múltiple de *Salmonella* spp., *E coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (191-193).

4.2.2 PCR múltiple.

Para la amplificación por PCR múltiple se evaluaron diferentes temperaturas de fusión: 52°C, 51.9°C, 51.7°C, 51.3°, 50.8°C, 50.4°C, 50.1°C, 50.0°C en el Termociclador C-1000 Bio-Rad®. Se evaluaron varias concentraciones de los componentes de la mezcla de reacción, como MgCl₂, concentración de los iniciadores y cantidad de ADN. La concentración final de las proporciones de la mezcla de reacción se detalla en la tabla 11. Las condiciones finales de la amplificación de la PCR múltiple se encuentran en la figura 3. Como controles

negativos para esta PCR se usó leche UHT sin inocular y agua ultrapura. La enzima empleada para la PCR múltiple fue Taq platinum (Invitrogen®).

Tabla 11. Mezcla de la reacción de la PCR múltiple para 25µl

Reactivos	Volumen
Reactivos	µl
Buffer 10X	2,5
Primer <i>E. coli</i> O157:H7 (vt ₁ F) 5pM	1
Primer <i>E. coli</i> O157:H7(vt ₁ R) 5pM	1
Primer <i>E. coli</i> O157:H7(vt ₂ F) 5pM	1
Primer <i>E. coli</i> O157:H7(vt ₂ R) 5pM	1
Primer <i>L. monocytogenes</i> (hlyA F) 40pM	1
Primer <i>L. monocytogenes</i> (hlyA R) 40pM	1
Primer <i>Salmonella</i> (hisJ F) 2pM	1
Primer <i>Salmonella</i> (hisJ R) 2pM	1
(dNTPs) 200µM	2
(MgCl ₂)50mM	1,5
Taq platinum®	0,5
ADN	5
H ₂ O	5,5
Total	25

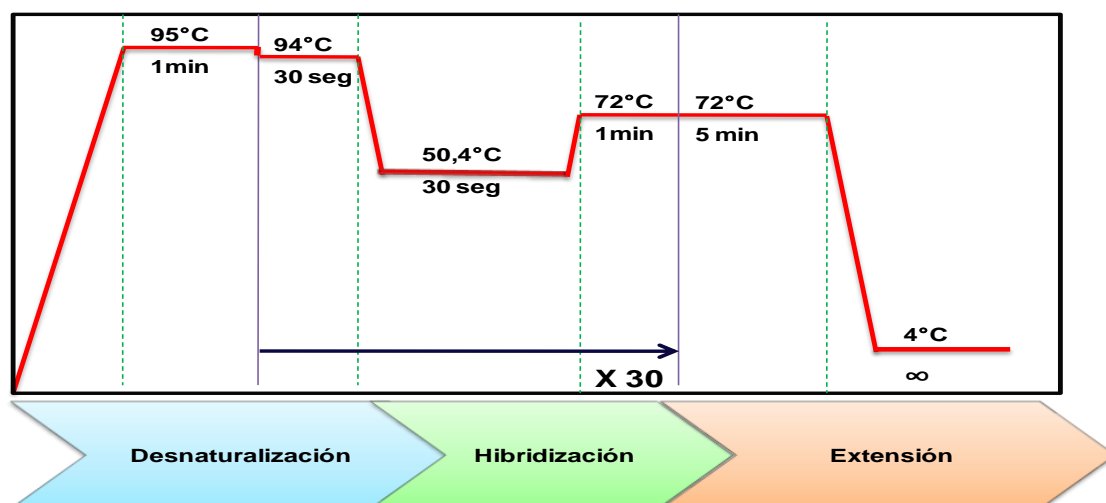


Figura 3. Condiciones de la PCR múltiple para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.

4.2.3 Sensibilidad de la PCR múltiple

Para evaluar la sensibilidad de la PCR múltiple, seis concentraciones de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, se inocularon en leche UHT y fueron sembradas en 100 ml de caldo SEL, las concentraciones finales fueron 10^6 UFC/ml, 10^5 UFC/ml, 10^4 UFC/ml, 10^3 UFC/ml, 10^2 UFC/ml y 10^1 UFC/ml, la infección se realizó en forma individual y simultánea, como control negativo se empleó el cultivo de 10ml de leche UHT en caldo SEL. Después de una incubación de seis horas a 37°C en agitación constante a 120 rpm, se tomaron tres alícuotas de un ml, de cada uno de los cultivos inoculados. Las alícuotas se centrifugaron a 3600 x g por cinco minutos, los botones bacterianos se lavaron en dos ocasiones con tampón fosfato (PBS) pH 7,4, (137mM de NaCl; 2.7 mM de KCl; 10 mM de NaH_2PO_4 ; 2mM de KH_2PO_4). El sedimento obtenido se sometió al proceso de extracción de ADN, por el método de Fenol cloroformo antes descrito (187).

4.2.4 Especificidad de la PCR múltiple

Para evaluar la especificidad de la PCR, se estableció un Banco de Células Primario con 43 cepas, pertenecientes a nueve géneros diferentes a las cepas objeto de estudio. Los microorganismos incluidos fueron considerados dado que pueden ser contaminantes de la leche a partir de diferentes fuentes. Las cepas fueron donadas por varias entidades de acuerdo al listado detallado en la tabla 12. Tras comprobación de la pureza de las cepas se sembraron en medios sin inhibidores, se multiplicaron en caldo BHI y un mililitro del cultivo se utilizó para extracción de ADN por un método Fenol Cloroformo (187). A las bacterias Gram-positivas de les realizó la incubación inicial con lisozima a una

concentración de 2 mg/ml a 37°C por 30 minutos (187, 193).El ADN de cada uno de los microorganismos fue sometido a amplificación con los iniciadores usados para las cepas de *Salmonella* spp., *E coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en las condiciones estandarizadas de la PCR múltiple.

Tabla 12. Microorganismos empleados para evaluar la especificidad de la PCR múltiple

No	Microorganismo	Origen
1	<i>Bacillus cereus</i> CD DM 019	1
2	<i>Bacillus subtilis</i> CD DM 025	1
3	<i>Brucella abortus</i>	2
4	<i>Escherichiacoli</i> 01	2
5	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25992	1
6	<i>Escherichia coli</i> O 157:H7 CD DM 218	1
7	<i>Klebsiella ascorbata</i> CD DM 042	1
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CD DM 041	1
10	<i>Klebsiella</i> spp.	1
11	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	4
12	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	4
13	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	4
14	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
15	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	7
16	<i>Listeria</i> spp.	7
17	<i>Listeria</i> spp.	7
18	<i>Listeria</i> spp.	7
19	<i>Micrococcus luteus</i> CD DM 090	1
20	<i>Proteus vulgaris</i>	3
21	<i>Pseudomona</i> spp	1
22	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	3
23	<i>Salmonella</i> spp.	6
24	<i>Salmonella</i> spp.	5
25	<i>Salmonella</i> Enteritidis	7
26	<i>Salmonella</i> spp.	1
27	<i>Salmonella</i> spp.	1
28	<i>Salmonella</i> spp.	1
29	<i>Salmonella</i> spp.	1
30	<i>Staphylococcus aureus</i>	4
31	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	3
32	<i>Staphylococcus aureus</i> CD DM 080	1
33	<i>Staphylococcus aureus</i> NCI MB 12702 R2	5
34	<i>Staphylococcus</i> spp.	7
35	<i>Staphylococcus</i> spp.	7
36	<i>Streptococcus agalactiae</i>	3
37	<i>Streptococcus pyogenes</i>	3
38	<i>Streptococcus</i> spp.	6
39	<i>Streptococcus</i> spp.	6
40	<i>Streptococcus</i> spp.	6
41	<i>Streptococcus</i> spp. NCI MB 701348 R3	5
42	<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	7
43	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 29833	7

1: Cepario Universidad Javeriana; 2: Banco de Germoplasma Bacterias y Virus (CORPOICA); 3: Cepario Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 4: INVIMA; 5: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA); 6: Universidad Nacional; 7: Colección de trabajo CORPOICA.

4.3. Obtención de especímenes

4.3.1 Área de estudio

El trabajo tuvo como área de influencia fincas lecheras bovinas del trópico bajo colombiano, bajo el sistema de producción doble propósito, ubicados en la cuenca lechera de Córdoba y Sucre, representando el Caribe húmedo; en la cuenca lechera del Cesar representando el Caribe seco y una tercera región compuesta por hatos lecheros de la cuenca lechera del Norte del Alto Magdalena y del Magdalena Medio. El componente racial de los animales correspondió a cruces entre *Bos taurus* x *Bos indicus* (biotipo racial más representativo del sistema doble propósito) (1). La población bovina, número de animales y el total de predios por región se presenta en la tabla 13.

Tabla 13. Población bovina total y dedicada a doble propósito de tres regiones de Colombia

Región	Población total	Población bovinos doble propósito	Número total de predios	Número de predios doble propósito
Magdalena Medio	997.051	69.793	7.167	501
Cesar	1.592.672	487.495	13.277	3.983
Córdoba y Sucre	3.001.159	1.212.676	38.245	16.362

Fuente: 194, 195

4.3.2 Muestras de leche cruda bovina

Se seleccionaron 600 predios ganaderos; en cada una de las regiones se tomaron aproximadamente 200 muestras de leche cruda, directamente de

cantina. La muestra de leche se dispuso en envases estériles, identificados con un sistema de barras y en condiciones de asepsia. Las muestras fueron transportadas conservando la cadena de frío bajo condiciones de refrigeración entre 2 - 4°C hasta Bogotá, para su posterior análisis. El número de predios se determinó por criterios de conveniencia, basados en el alto costo de los análisis, costo de desplazamientos de muestreos, colecta de información y regiones incluidas en el trabajo.

4.3.3 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche bovina cruda

Las 600 muestras de leche se procesaron para aislamiento de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* mediante los procedimientos individuales para determinar ausencia/presencia sugeridos por el INVIMA (1998) y la FDA (15-18) de acuerdo a lo descrito anteriormente para la metodología microbiológica. De forma paralela se procesaron las muestras mediante pre-enriquecimiento en caldo SEL (19) para la detección simultánea por PCR múltiple.

La siembra inicial se realizó en 225 ml del respectivo caldo de pre-enriquecimiento con 25 ml de leche cruda. La incubación de cada muestra se realizó de acuerdo a las recomendaciones del INVIMA y el manual de procedimientos del BAM (15-17). El período de incubación y temperatura de incubación para cada microorganismo se detalla en la figura 4.

	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>
Pre-enriquecimiento	• 20 h a 35°C	• 20 h a 37°C	• 20 h a 30°C
Enriquecimiento selectivo	• 24 h a 42°C		• 24 h a 37°C
Medios selectivos	• 24 a 48 h a 37°C	• 24 a 48 h a 37°C	• 24 a 48 h a 37°C

Figura 4. Temperaturas y tiempos de incubación para el aislamiento de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* a partir de muestras de leche.

Identificación microbiológica de aislamientos bacterianos

A las colonias típicas de *Salmonella* spp., en medios selectivos y diferenciales, se les realizó pruebas de fermentación de azúcares en el medio TSI (Agar Triple Azúcar Hierro), descarboxilación de Lisina en el medio LIA, movilidad en el medio SIM, producción de H₂S, producción de Indol y prueba de aglutinación con suero polivalente para *Salmonella* marca BBL (15).

Las colonias sorbitol negativas en el medio Agar MacConkey Sorbitol-CT (Cefixime Telurito) fueron confirmadas mediante una PCR múltiple (16).

Los cultivos presuntivos positivos para *L. monocytogenes* se confirmaron mediante aislamiento en TSAYE (agar tripticasa de soya extracto de levadura (0,6% (p/v))), prueba de iluminación de Henry, Prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch y Petersen) (17), catalasa y coloración de Gram.

Confirmación de los aislamientos por PCR

Como complemento a la identificación bioquímica de *Salmonella* se hizo amplificación por PCR de un fragmento de 495 pb del gen *hisJ* que codifica para una proteína de transporte de la histidina (199) (tabla 14). Las colonias sorbitol negativas en el medio Agar MacConkey Sorbitol-CT (Cefixime Telurito) fueron confirmadas mediante una PCR múltiple para la confirmación de *E. coli* verotoxigénica, en la que se amplifica un fragmento de 346 pb que corresponde a la subunidad A de la verotoxina VT₂ y de un fragmento de 130 pb correspondiente a la subunidad B de la verotoxina VT₁ de *E. coli* O157:H7 (196), la secuencia y características de los iniciadores se enuncian en la Tabla 14. Los aislamientos que correspondieron al género *Listeria* se confirmaron a especie mediante la técnica de PCR previamente descrita (201), en la que se amplifica un fragmento de 750 pb que amplifica el gen *hlyA* (listeriolisina O), la secuencias y características de los iniciadores se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Características de los iniciadores empleados en PCR para la identificación de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*

Microorganismo	Gen blanco	Secuencia Nucleotídica 5' -3'	Ubicación en el gen*	Temperatura de fusión T _m **	Referencia
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i> F	caaacgtaacaacgcagta	527 - 546	51.2	197
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i> R	tccagagtgatcgatgtaa	1275 -1256		
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>vt₁</i> F	gaagagtcctgggattacg	1191 1210	55.0	198
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>vt₁</i> R	agcgatgcagctattaataa	1301 1320		
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>vt₂</i> F	ttaaccacaccacggcagt	416 - 445	59.3	198
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>vt₂</i> R	gctctggatgcctctggt	752 -771		
<i>Salmonella</i> spp.	<i>hisJ</i> F	actggcgttatcccttctctggtg	2464516 - 2464540	52.0	Este estudio
<i>Salmonella</i> spp.	<i>hisJ</i> R	atgtgtcctgcccctggaagaga	2465010 – 2464986		

*199; **200

La extracción del ADN se realizó por el método de fenol cloroformo antes descrito. Condiciones de la PCR para aislamientos de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*

Los iniciadores empleados para la PCR individual se detallaron en la tabla 14, éstos fueron evaluados utilizando como blanco el ADN de *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (cepas de referencia) a una concentración de 100ng/μl, de forma individual, las condiciones de la PCR se presentan en la figura 5. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μl, la mezcla de la reacción contenían las siguientes proporciones: 2,5 μl de Buffer PCR 10X (Tris-HCl 200mM pH 8,4; KCl 500mM), 2mM de MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 2,5U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen®), 20 pM de cada iniciador, tabla 15 y 1 μl de ADN, el volumen final se ajustó con agua ultrapura libre de ADNasas y RNAsas. La amplificación se obtuvo en un termociclador C-1000 Bio-Rad® bajo las condiciones que se detallan en la figura 5.

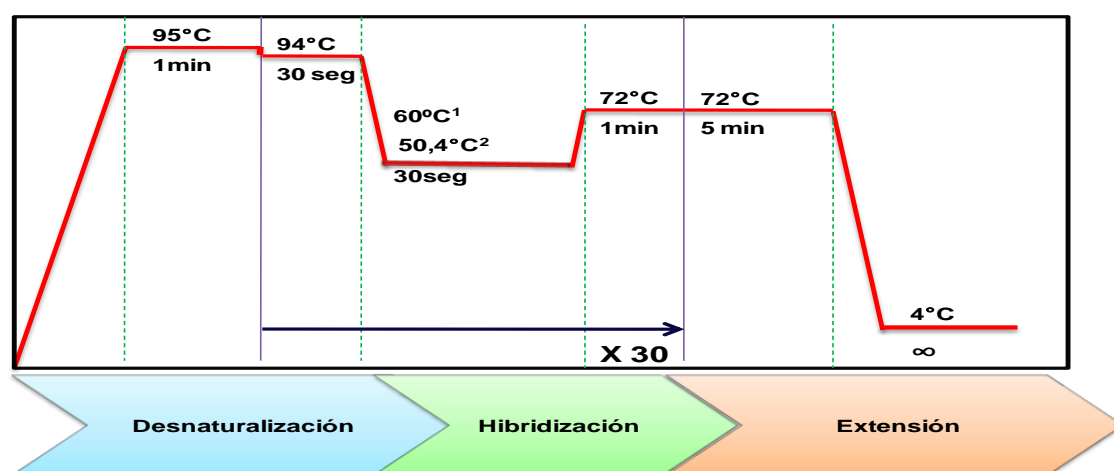


Figura 5. Condiciones de la PCR de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.
1: Temperatura de fusión *E. coli*; 2 Temperatura de fusión *Salmonella* y *L. monocytogenes*.

Para visualizar la amplificación 5µl del producto de la PCR se corrieron en geles de agarosa al 2% (p/v) en buffer TAE 1X (40mM Tris–acetato, 1mM EDTA pH 8.0), teñidos con Syber-Safe® 1X (v/v), la electroforesis se corrió a 100V durante 90 minutos. La visualización de los fragmentos, se realizó en documentador de imágenes GeneGenius SYNGENE®.

4.4 Detección simultánea por PCR múltiple de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en muestras leche cruda.

De las 600 muestras de leche cruda bovina se tomaron 10 ml de leche de cada una y se inocularon en 90 ml de caldo SEL. La detección molecular por PCR múltiple se realizó empleando el protocolo de descrito en el desarrollo de la metodología molecular para la detección simultánea de microorganismos.

4.5. Prevalencia de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche

Se estableció la prevalencia puntual para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en muestras de leche cruda bovina mediante la siguiente formula se utilizó la fórmula (201)

$$Pt = Mt/Nt \quad [4]$$

donde:

Pt = Prevalencia puntual

M_t = Muestras positivas

N_t = Población muestreada

4.6 Determinación factores asociados a la presencia de *Salmonella* spp., *E coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*

Se realizó una encuesta que contenía datos del propietario de la finca, el método de ordeño y otras características generales del sistema de producción. La información se consignó en una base de datos en formato Excel, para correlacionar la presencia o ausencia de microorganismos patógenos, mediante el análisis de casos y controles de los datos, medidas de tendencia central y pruebas no paramétricas, basados en la asociación con factores medioambientales que se describen adelante.

Teniendo como base el número de muestras en los que se detectó *E. coli* O157:H7, se parearon a manera de casos y controles, un caso con tres controles. Así a cada predio positivo (casos) se enfrentó a 3 predios negativos (controles) al azar, pareándolos dentro del mismo municipio y por ende del mismo departamento y subregión. Cuando los controles disponibles para parear fueron hasta dos por caso, no se buscó un tercer control, pero cuando los casos por municipio fueron más que los controles y la disponibilidad de controles fue uno o menor, se recurrió a parear con predios del municipio vecino al del caso, siempre y cuando el muestreo hubiera sido el mismo día del de los casos. Al parear 3 controles por cada caso, se hace una drástica reducción al riesgo de sesgo de la prueba, además de que los controles se originan de la misma población donde se obtuvieron los casos.

Finalmente se tuvieron 22 casos (predios) de leche cruda comercializable con aislamiento de *E. coli* O157 H7 y 60 controles (predios) de leche cruda

comercializable sin aislamiento de *E. coli* O157:H7, para una población de 82 predios, que representa el 13,6 % de la población original de muestreo.

Usando información complementaria, que no fue objeto de este trabajo de grado, a los casos y controles pareados, se les corrió prueba de asociación o independencia, con Chi cuadrado corregido de Pearson, para atributos (factores), como: subregión natural, presencia o ausencia de antibióticos (tetraciclinas, macrólidos, betalactámicos), la presencia o ausencia de organofosforados y carbamatos, determinados por Charm II, y el uso o no uso, en predio de organofosforados, piretroides, amidinas y lactonas macrocíclicas. La disponibilidad de asistencia técnica, la época del año de colecta de la muestra, el fenotipo racial dominante (*B. taurus*, *B. taurus indicus* o bovinos cruzados) el material del piso del sitio de ordeño (suelo, cemento, piedra) y algunas prácticas relacionadas con la alimentación y la higiene del ordeño, que se presentan como posibles causas asociadas con los casos y los controles. Cuando la variable posible “causa”, fue continua y de distribución normal, como producción de leche por vaca, se hizo análisis de varianza de una vía y cuando la variable no presentó distribución normal o fue discreta como: recuento de mesófilos UFC/ml, recuento de coliformes totales UFC/ml, recuento de células somáticas/ml de leche, se corrió una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde los “tratamientos” fueron las subpoblaciones de casos y controles.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación del caldo SEL para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *E coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*

La evaluación del caldo SEL para la detección simultánea de *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* se realizó inoculando concentraciones de 10^4 UFC/ml, 10^3 UFC/ml, 10^2 UFC/ml, 10^1 UFC/ml de cada uno de los microorganismos en los medios de pre-enriquecimiento convencionales y en el caldo SEL y posteriormente fueron inoculándolas en forma individual y en forma simultánea en Agar Hektöen o Agar XLD, Agar MacConkey Sorbitol CT y Agar Oxford, respectivamente. Se obtuvo crecimiento en 10^4 UFC/ml, 10^3 UFC/ml, 10^2 UFC/ml, 10^1 UFC/ml en la figura 6 se muestra el crecimiento simultaneo en los agares selectivos diferenciales.

El límite de detección para *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, en el caldo SEL y en los caldos de pre-enriquecimiento convencionales fue de 10 UFC/ml. Se observó la presencia de colonias típicas de los tres microorganismos en los agares diferenciales hasta la concentración mencionada.

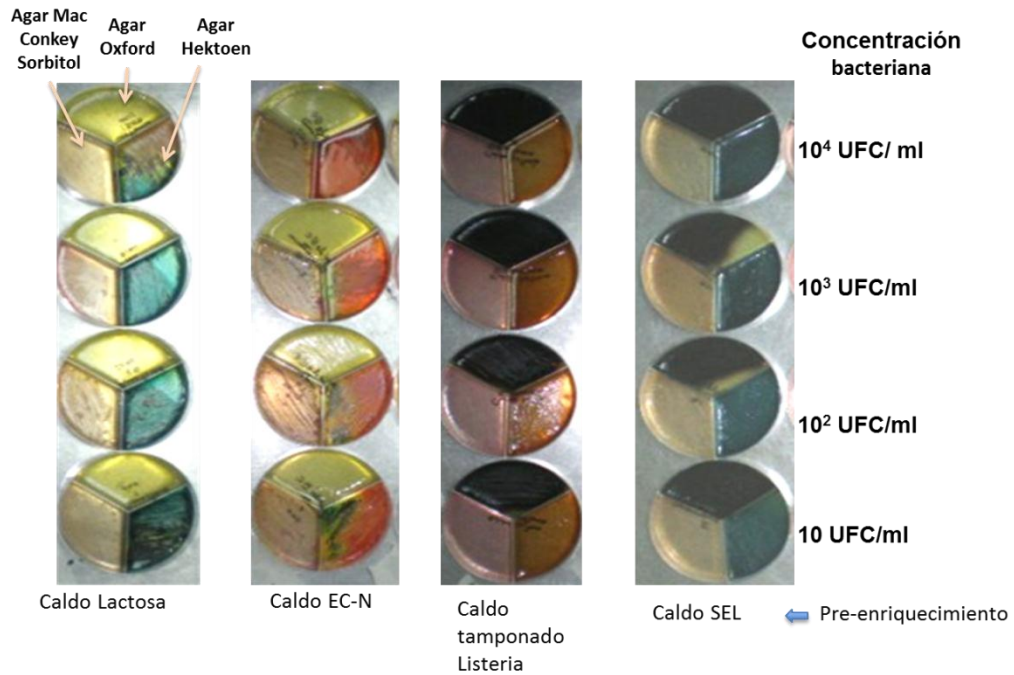


Figura 6. Placas de cultivo en Agar selectivo diferencial de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis.

1: Agar MacConkey Sorbitol CT, 2: Agar Oxford, 3: Agar Hektoen, 4: Agar XLD. A: Cultivo a partir de caldo SEL, B: Cultivo a partir de caldos de Pre enriquecimiento convencionales. C: Cultivo a partir de Caldo tamponado Listeria inoculado con los tres microorganismos en forma simultánea, D Cultivo a partir de Caldo EC inoculado con los tres microorganismos en forma simultánea; E: Cultivo a partir de Caldo Lactosa inoculado con los tres microorganismos en forma simultánea.

5.2 Evaluación del método de detección molecular simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche cruda

En la estandarización de la PCR múltiple se buscó detectar la presencia de productos amplificados para los cuatro genes evaluados: 750pb para *hlyA*, 495pb para *hisJ*, 346pb para *vt₂* y 130pb para *vt₁*, se evaluó temperatura de fusión (52°C, 51.9°C, 51.7°C, 51.3°, 50.8°C, 50.4°C, 50.1°C y 50.0°C.), concentración de MgCl₂, (1,5mM, 2,5mM y 3,0mM) y concentraciones de los iniciadores *hisJ vt₁* y *vt₂* y *hlyA*: 2pM, 5pM, 10pM, 20pM y 40pM,

Se estableció como temperatura de fusión óptima 50,4°C, concentración de MgCl₂ de 1,5mM y la concentración de los iniciadores fue para *hisJ* 2pM, *vt*₁ y *vt*₂ 5pM para *hlyA* de 40pM (ver figura 7).

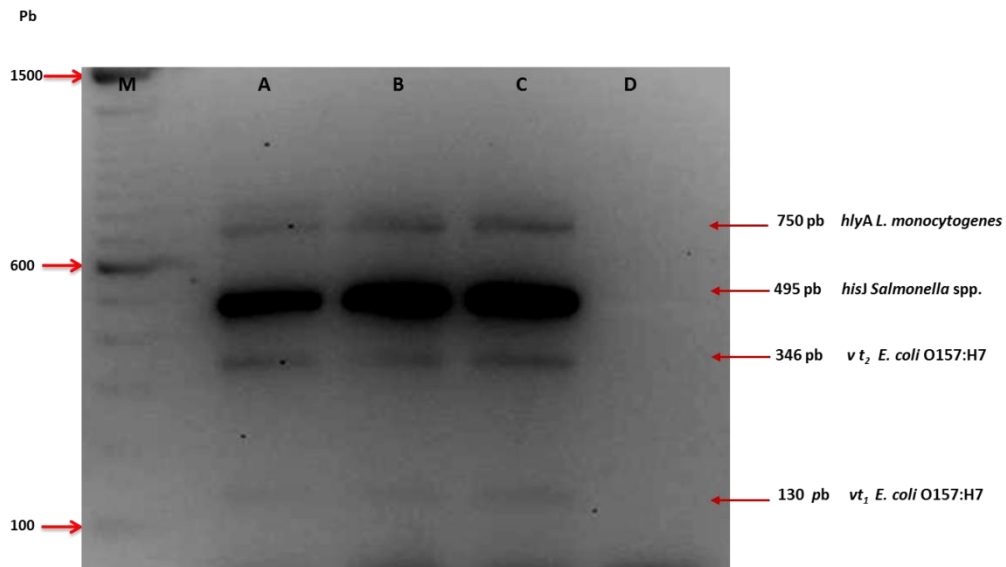


Figura 7. Detección simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* empleando diferentes concentraciones de los iniciadores. Temperatura de hibridación 50,4°C y 1,5 mM de MgCl₂.

M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®); **A:** *hlyA* 10pM, *hisJ* 2 pM, *vt*₁ y *vt*₂ 5 pM, **B:** *hlyA* 20pM, *hisJ* 2 pM, *vt*₁ y *vt*₂ 5 pM; **C:** *hlyA* 40pM, *hisJ* 2 pM, *vt*₁ y *vt*₂ 5 pM; **D:** Control negativo de la reacción.

5.2.2 Sensibilidad de la PCR múltiple

Mediante el protocolo empleado en esta PCR múltiple se logró la amplificación simultánea de los cuatro fragmentos correspondientes a los genes *hisJ*, *vt*₁ y *vt*₂ y *hlyA*, que corresponden a *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* a partir de muestras de leche contaminadas a una concentración de 10¹ UFC/ml, empleando el caldo de pre-enriquecimiento SEL. *E. coli* O157:H7 se pudo detectar a una concentración de 10⁰UFC/ml (Figura 8).

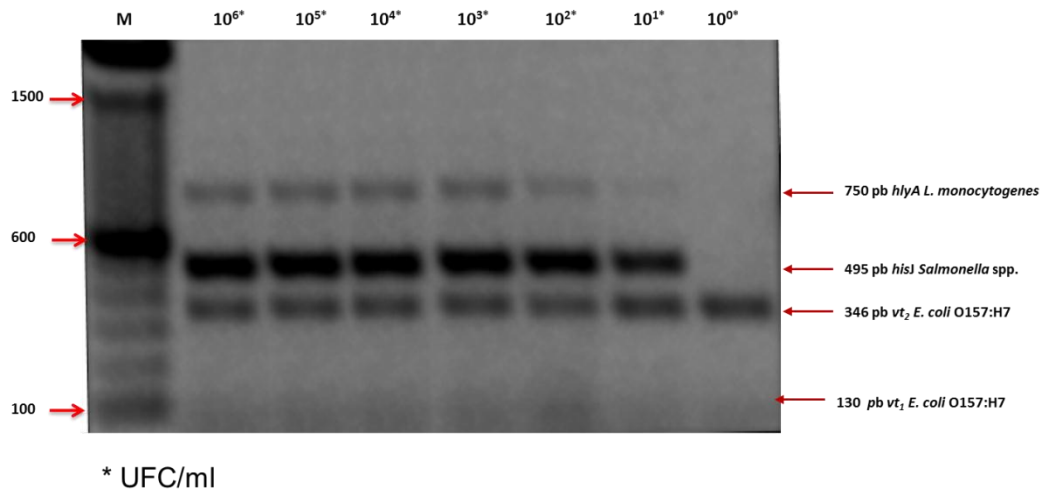


Figura 8. Sensibilidad de la PCR múltiple para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, empleando el caldo SEL.

M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®), 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 UFC/ml.

5.2.3 Especificidad de la PCR múltiple

En el ensayo de especificidad de la PCR que fue corrido con las 43 cepas del banco primario, se evidenció amplificación de fragmentos únicamente en las cepas de *L. monocytogenes*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 y no hubo amplificación con cepas de microorganismos que pueden estar presentes en la leche, por contaminación con heces (*Proteus vulgaris*); como causantes de mastitis (*Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp) o enfermedades sistémicas como brucelosis (*Brucella abortus*) (figura 9). De igual manera se observa que no hubo amplificación de los fragmentos con cepas del mismo género (*L. innocua* y *E. coli* no STEC), indicando que los iniciadores seleccionados no presentaron interferencia con otros genes.

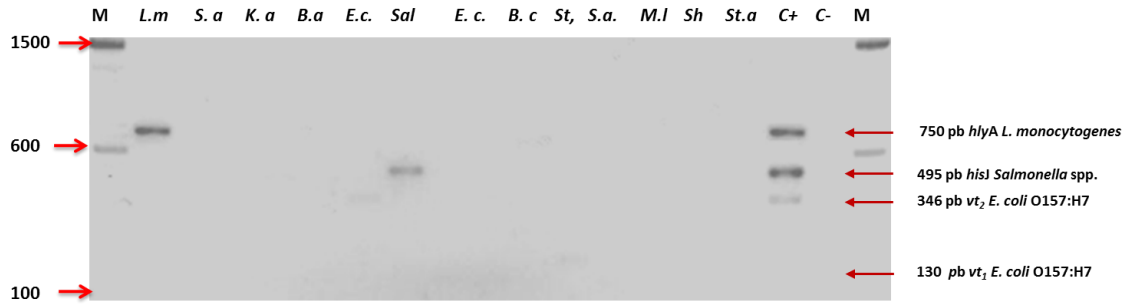


Figura 9. Evaluación de especificidad.

M: Marcador de talla molecular ADN 100bp (Invitrogen®); **1:** *L. monocytogenes* cepa 23; **2:** *Salmonella* cepa 6; **3:** *Staphylococcus aureus* CMDM080; **4:** *Klebsiella ascorbata* CMDM 042; **5:** *Escherichia coli* B001; **6:** *Salmonella* Pullorum; **7:** *Bacillus cereus* CMDM 019; **8:** *E. coli* CMDM 018; **9:** *Bacillus cereus* cepa 10; **10:** *Staphylococcus aureus* cepa 21; **11:** *B. abortus* B006; **12:** *Streptococcus agalactiae* ATCC 279; **13:** *Shigella* spp.; **14:** Control positivo (*S. Enteritidis*, *E. coli*O157:H7, *L. monocytogenes*); **15:** Control negativo **M:** Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®).

La mezcla de la reacción para los tres microorganismos se corrió bajo las mismas condiciones de amplificación, que fueron las siguientes: pre-incubación inicial a 95°C durante 1 minuto, 30 ciclos que consistieron en desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 50,4°C durante 30 segundos, extensión inicial durante 1 minuto a 71°C, y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de la amplificación resueltos en gel de agarosa al 2% (p/v) teñidos con Syber Safe® se observan en la figura 10.

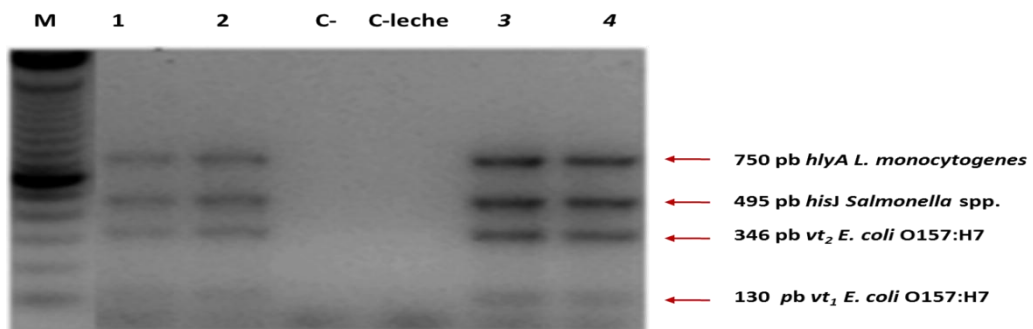


Figura 10. PCR múltiple para *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.

M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®); **1 y 2:** PCR múltiple para *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* empleando como molde ADN de las cepas de referencia; **C-:** Control negativo de la reacción; **C-leche:** Control con leche UHT; **3 y 4:** PCR múltiple para *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* empleando como molde ADN leche artificialmente inoculada.

5.3. Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche bovina cruda

Se tomaron 600 muestras de leche, distribuidas en tres regiones lecheras: a) Región Valle del Cesar 198 muestras b) Sabana de Córdoba y Sucre 196 muestras y c) Magdalena Medio y Alto Magdalena 206 muestras. La distribución, numérica y porcentual en cada región de las muestras de leche analizadas se muestran en la tabla 16. En la figura 11 se muestra la ubicación de las tres regiones muestreadas, para la región del Magdalena Medio y Alto Magdalena se ubicaron predios ganaderos ubicados en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Caldas y Tolima.

Tabla 15. Número de muestras de leche analizadas por cuenca lechera

Región	Número de muestras	Porcentaje
Valles del Cesar	198	33,0
Magdalena Medio y Alto Magdalena	206	34,3
Sabanas de Córdoba y Sucre	196	32,7
Total	600	100,0



Figura 11. Ubicación de las tres regiones muestreadas
1: Sabanas de Córdoba y Sucre, 2: Valle del Cesar y 3: Magdalena Medio y Alto Magdalena. Fuente modificada 194.

A partir de las 600 muestras de leche cultivadas en los medios de cultivo convencionales, se obtuvieron 18 aislamientos, cinco aislamientos para *Salmonella* spp., 11 aislamientos para *E. coli* O157:H7 y dos aislamientos de *L. monocytogenes* los cuales fueron confirmados por los métodos descritos en .a metodología.

En los aislamientos se detectó la presencia de los cuatro genes evaluados: *vt₂* 346pb, *vt₁* 130pb, *hlyA* de 750pb y *hisJ* 495pb pertenecientes a *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* Enteritidis respectivamente. El ADN fue extraído por el método fenol cloroformo antes descrito en la metodología, aunque también se evaluó el método de la ebullición (figura 12).

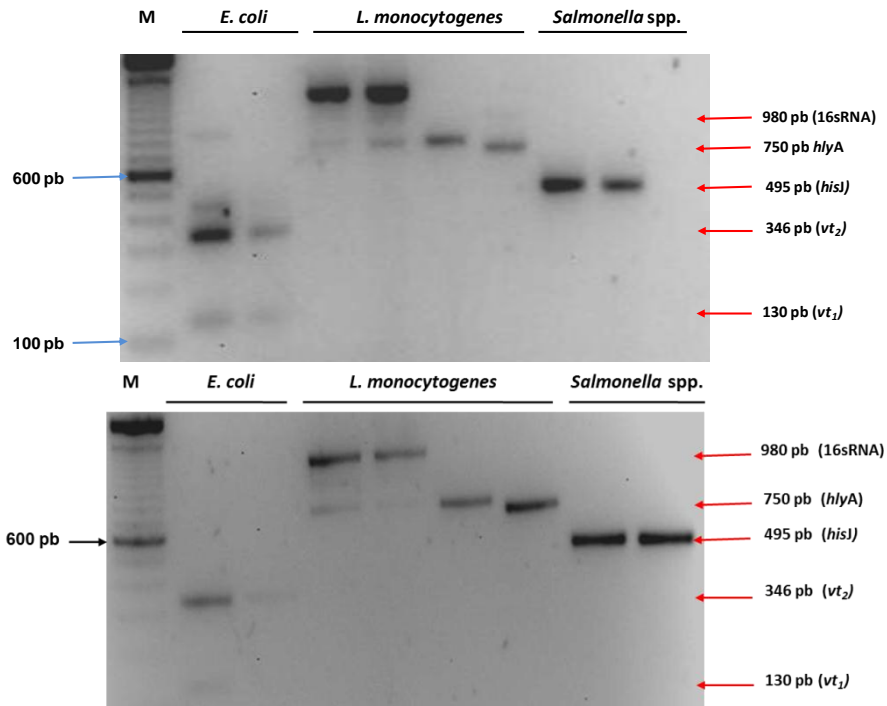


Figura 12. Imagen de la PCR individual para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.
Superior: Método de Ebullición, **Inferior:** Método fenol cloroformo. M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®).

En Las figuras 13 y 14 se observan las imágenes de la PCR para los aislamientos de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 obtenidos de las muestras de leche.

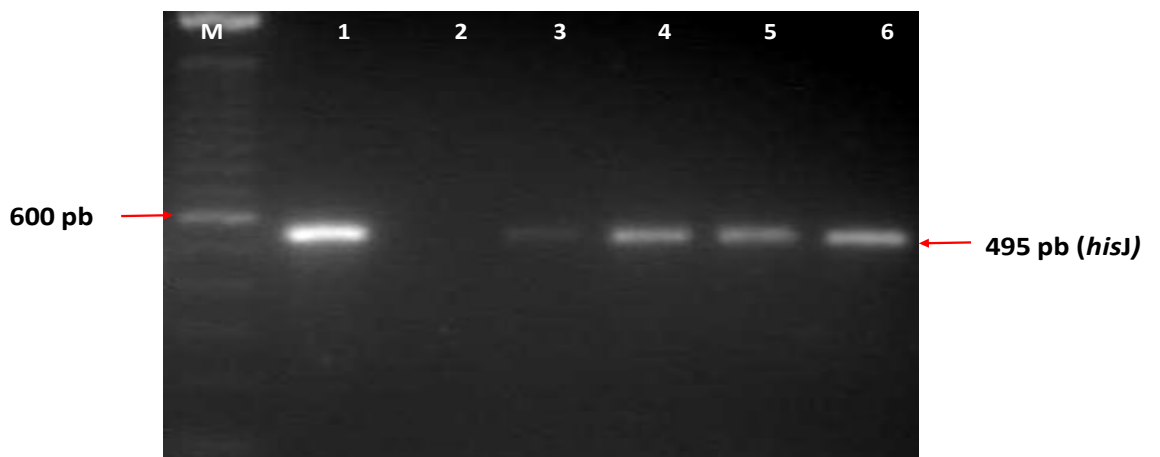


Figura 13. PCR en los aislamientos de *Salmonella*.
M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®); **1:** C+ *Salmonella* Enteritidis ATCC13076; **2:** Control negativo de la reacción; **3:** Muestra1507; **4:** Muestra 579; **5:** Muestra1886; **6:** Muestra585.

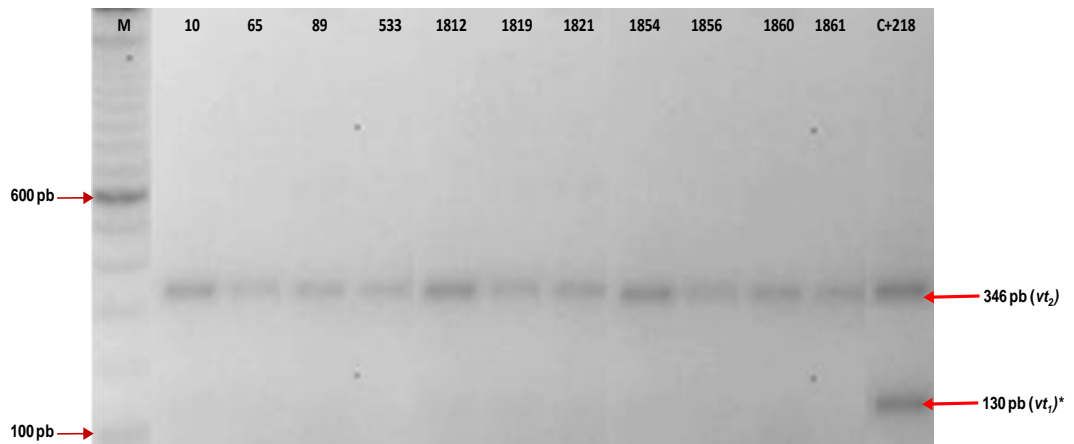


Figura 14. PCR aislamientos de *E. Coli* O157:H7.

M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®); **Muestras** 10, 65, 89, 533, 1812, 1819, 1821, 1854, 1856, 1860, 1861, C+ 218.

Dos aislamientos presuntivos de *L. monocytogenes* amplificaron un fragmento de 750 pb correspondiente al fragmento del gen *hlyA* (Figura15).

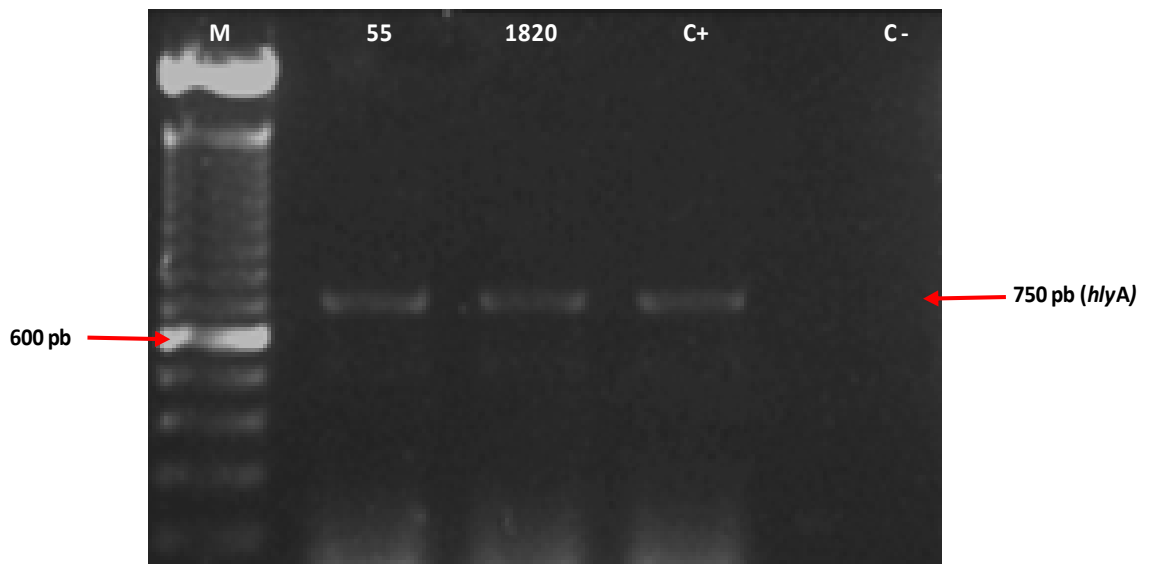


Figura 15. PCR aislamientos de *L. monocytogenes*.

M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®); **A:** muestra 55; **B:** muestra 1820; **C+:** *L. monocytogenes* ATCC 19115; **C-:** Control negativo de la reacción

5.4 Detección simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* por PCR múltiple en leche bovina cruda

Mediante la técnica de PCR múltiple a partir del caldo SEL, se detectó *Salmonella* spp. en 5 muestras de leche, *E. coli* O157:H7 en 22 muestras de leche y *L. monocytogenes* no se detectó por esta técnica en las muestras de leche. Los resultados se muestran en la figura 16 y en la figura 17, el total de muestras positivas por región se reportan en la tabla 16.

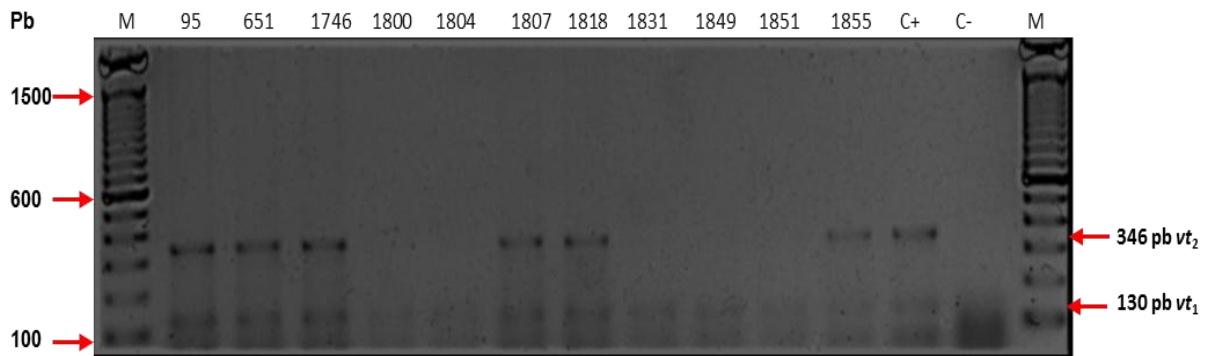


Figura 16. PCR múltiple para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* de muestras de leche.

M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®); **Muestras de leche** No 95, 651, 1746, 1800, 1807, 1818, 1831, 1849, 1851, 1855; **C+:** control positivo; **C-** Control negativo y **M:** Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®).

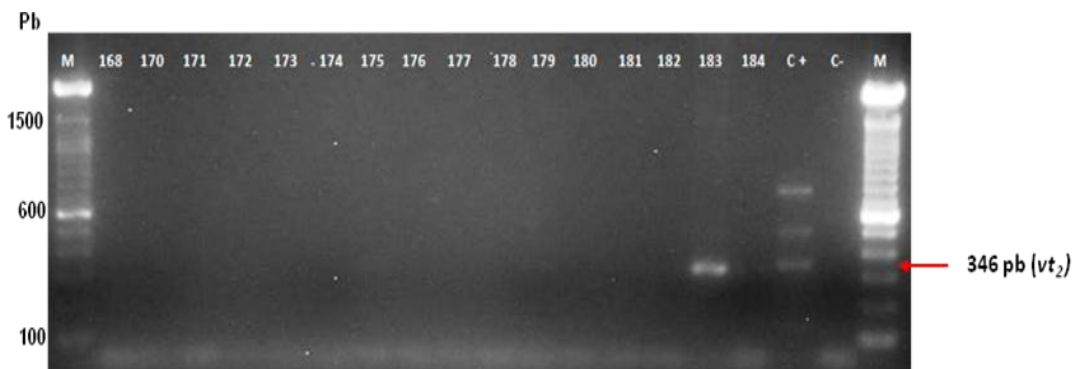


Figura 17. PCR múltiple para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* de muestras de leche.

M: Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®); **Muestras de Leche** No 168, 170-184; **C+:** **Control positivo** de la reacción, **C-:** **Control negativo** de la reacción; **M:** Marcador de talla molecular 100bp (Invitrogen®)

Tabla 16. Número de muestras positivas por PCR múltiple en las muestras de leche.

Región	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i> O157:H7
Valles del Cesar	0	0	3
Magdalena Medio y Alto Magdalena	0	2	2
Sabanas de Córdoba y Sucre	0	3	17
Total	0	5	22

Con relación a la detección de los microorganismos por los métodos microbiológicos convencionales y por PCR múltiple los resultados se muestran en la tabla 17. Todas las muestras positivas para *Salmonella* spp. fueron detectadas por los dos métodos.

E. coli O157:H7 se detectó en 11 muestras por la metodología microbiológica convencional y por PCR múltiple se detectó en las 11 muestras y en 11 muestras diferentes. *L. monocytogenes* solo pudo ser detectada en dos empleando las técnicas microbiológicas convencionales.

Tabla 17. Número de muestras positivas por método convencional y por PCR múltiple en las muestras de leche.

Región	<i>L. monocytogenes</i>		<i>Salmonella</i> spp.		<i>E. coli</i> O157:H7	
	Convencional	PCR múltiple	Convencional	PCR múltiple	Convencional	PCR múltiple
Valles del Cesar	1	0	0	0	3	3
Magdalena Medio y Alto Magdalena	0	0	2	2	2	2
Sabanas de Córdoba y Sucre	1	0	3	3	6	17
Total	2	0	5	5	11	22

Fuente: este estudio

5.5 Prevalencia de *Salmonella* spp., *E coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche cruda bovina

La prevalencia para *Salmonella* spp. en muestras de leche de las regiones del Magdalena Medio y Sabanas de Córdoba y Sucre fue del 1,5%. Para *E. coli* O157:H7 la prevalencia más alta se encontró en la región de Córdoba y Sucre con el 8,7%, en el Valle del Cesar fue del 1,5% y en el Alto Magdalena y Magdalena Medio de 1,0% (Figura18).

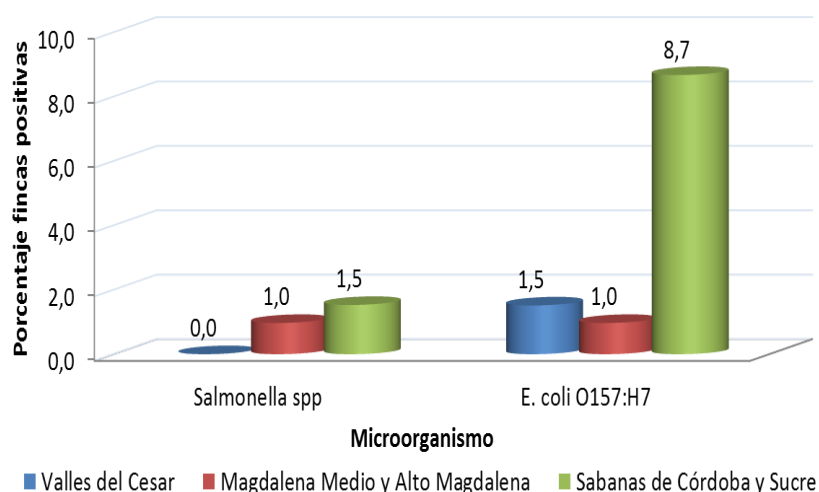


Figura 18. Prevalencia de *Salmonella* spp. y *E coli* O157:H7 por PCR múltiple en tres regiones del sistema de producción doble propósito Colombiano.

L. monocytogenes únicamente fue detectada por el método microbiológico convencional. Este microorganismo presentó la menor prevalencia, sólo se detectó en el 0,5% de las muestras procedentes de las regiones de Córdoba y Sucre y Valle del Cesar.

5.6 Factores asociados a la presencia de *E coli* O157:H7 en el sistema de producción doble propósito Colombiano

La subregión natural fue una variable asociada, en forma significativa, a los aislamientos de *E. coli* O157 H7, en leche cruda comercializable, ($p < 0,001$), ya que de los 600 cultivos en medio SEL se obtuvieron 22 aislamientos (3,7 %), 17 se encontraron en las sabanas de Córdoba y Sucre (8,7 % de la subregión y 2,8 % del total), 3 en los Valles del Cesar (1,5 % de la subregión y 0,5 % del total) y 2 en el Alto Magdalena-Magdalena Medio (1,5 % de la subregión y 0,3 del total), (Tabla 18).

La asociación por subregiones, de *E. coli* O157 H7 en el sistema doble propósito, es la que se anota en la tabla 18, exclusivamente la proporción de “positivos”, es decir, la contaminación bacteriana de la leche cruda comercializable, que puede incluir, además de la posible contaminación en finca, la contaminación por manipulación de la leche durante la colecta y transporte al centro de acopio o a la planta, o el mezclado durante el transporte o el uso durante el acopio rural de cantinas para aforo y trasvase de volumen por el transportador, durante la colecta.

Tabla 18. Tabulación cruzada de éxitos y fracasos de aislamientos de *E. coli*, O157:H7, con el medio SEL, en leche cruda de 600 predios del sistema doble propósito de 4 subregiones naturales de Colombia.

Subregión	Condición	Aislamiento de <i>E. coli</i> O157:H7a partir de caldo SEL		Total
		Sin aislamiento	Con Aislamiento	
Alto Magdalena	Frecuencia	70	0	70
	% dentro de subregión	100,0	0,0	100,0
	% dentro de aislamiento	12,1	0,0	11,7
	% del total	11,7	0,0	11,7
Magdalena Medio	Frecuencia	134	2	136
	% dentro de subregión	98,5	1,5	100,0
	% dentro de aislamiento	23,2	9,1	22,7
	% del total	22,3	0,3	22,7
Sábanas de Córdoba y Sucre	Frecuencia	179	17	196
	% dentro de subregión	91,3	8,7	100,0
	% dentro de aislamiento	31,0	77,3	32,7
	% del total	29,8	2,8	32,7
Valles del Cesar	Frecuencia	195	3	198
	% dentro de subregión	98,5	1,5	100,0
	% dentro de aislamiento	33,7	13,6	33,0
	% del total	32,5	0,5	33,0
Total	Frecuencia	578	22	600
	% dentro de subregión	96,3	3,7	100,0
	% dentro de aislamiento	100,0	100,0	100,0
	% del total	96,3	3,7	100
Chi Cuadrado = 21,026; gl = 3; p = 0,000 ***				

SEL: Medio de cultivo simultáneo para *Salmonella* spp.; *E. coli* y *L. monocytogenes*; gl = grados de Libertad.

La detección en leche y el uso en finca de tetraciclinas, macrólidos, betalactámicos y sulfas determinados por Charm II, la presencia o ausencia de

organofosforados y carbamatos por la prueba de Charm II, y el uso o no uso, en predio, de organofosforados, piretroides, amidinas y lactonas macrocíclicas, no se encontraron asociados a la presencia (casos) o ausencia (controles) de *E. coli* O157 H7. ($p > 0,10$) (Tabla 19).

Tabla 19. Pruebas de independencia, entre presencia en leche o empleo de antibióticos y pesticidas en finca y el fracaso o éxito en el aislamiento de *E. coli* O157 H7 en leche cruda

Detección y uso de antibióticos y pesticidas.	gl	Chi cuadrado	Significancia	Observación
Tetraciclinas, presencia o ausencia	1	0,015	0,902	Independiente
Macrólidos, presencia o ausencia	1	0,007	0,933	Independiente
Betalactámicos, presencia o ausencia	1	0,109	0,741	Independiente
Uso de macrólidos. Si o No	1	0,273	0,601	Independiente
Uso de betalactámicos. Si o No	1	1,825	0,177	Independiente
Uso de Tetraciclinas. Si o No	1	0,122	0,727	Independiente
Uso de Sulfas. Si o No	1	1,542	0,214	Independiente
Pesticidas*, presencia o ausencia	1	1,030	0,310	Independiente
Época mayor frecuencia uso pesticidas	2	0,855	0,652	Independiente
Usa organofosforados, Si o No	1	0,783	0,376	Independiente
Usa piretroides sintéticos. Si o No	1	0,783	0,376	Independiente
Usa Amidinas. (Amitraz) Si o No	1	2,450	0,118	Independiente
Usa lactonas macrocíclicas. Si o No	1	1,152	0,283	Independiente
Tiempo retiro leche medicamentos, Si o No	1	0,303	0,582	Independiente

gl = grados de Libertad. * Población de donde se obtuvieron casos y controles.

La disponibilidad de asistencia técnica, la época del año de colecta de la muestra, el fenotipo racial dominante (*B. taurus*, *B. taurus indicus* o bovinos cruzados) el material del piso del sitio de ordeño (suelo, cemento, piedra) y algunas prácticas relacionadas con la alimentación y la higiene del ordeño, no

se encontraron asociados a la presencia (casos) o ausencia (controles) de *E. coli* O157 H7. ($p > 0,10$) Tabla20.

Tabla 20. Pruebas de independencia, entre variables atributo y el fracaso o éxito en el aislamiento de *E. coli* O157 H7 en leche cruda

Características generales	gl	Chi cuadrado	Significancia	Observación
Época del año, seca y lluviosa	1	0,001	0,972	Independiente
Asistencia técnica Veterinaria. Si o No	1	0,198	0,656	Independiente
Fenotipo Racial dominante.	2	1,335	0,513	Independiente
Suministro de Melaza. Si o No	1	0,027	0,871	Independiente
Suministro de ensilaje. Si o No	1	2,479	0,115	Independiente
Material del piso del ordeño	2	2,763	0,251	Independiente
Lavado de pezones. Si o No	1	0,632	0,427	Independiente
Secado de pezones. Si o No	1	0,632	0,427	Independiente
Pre-sellado de pezones. Si o No	1	0,371	0,542	Independiente
Asesoría para control de ectoparásitos	3	0,285	0,963	Independiente
Tiempo retiro leche medicamentos, Si o No	1	0,303	0,582	Independiente

* Organofosforados o carbamatos. gl = grados de Libertad.

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis no presentó diferencias estadísticas en los recuentos de mesófilos UFC/ml de leche cruda, Coliformes UFC/ml de leche cruda y células somáticas/ml de leche cruda, en las muestras correspondientes a los casos y los controles (Tabla 21).

Tabla 21. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para mesófilos, coliformes y células somáticas en leche cruda de *E. coli* O157 H7, en leche cruda.

Variable	Casos y controles aislamientos <i>E. coli</i> SEL	N	Rango de la media	Chi cuadrado	gl	sig.
Mesófilos UFC/ml de leche	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	38,55	0,463	1	0,496
	Controles <i>E. coli</i>	60	42,58			
	Total	82				
Coliformes UFC/ml de leche	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	44,27	0,408	1	0,523
	Controles <i>E. coli</i>	60	40,48			
	Total	82				
Células somáticas/ml de leche	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	41,00	0,013	1	0,908
	Controles <i>E. coli</i>	60	41,68			
	Total	82				

* Población de donde se obtuvieron casos y *controles*.

6. DISCUSIÓN

La ganadería colombiana, en términos de inventario, ocupa el tercer lugar en Suramérica, después de Argentina y Brasil y el puesto número doce a nivel mundial (12). Colombia se ha posicionado como el cuarto productor de leche con un volumen aproximado de 6.500 millones de toneladas por año, superado sólo por Brasil, México y Argentina (28). De acuerdo a las cifras de FEDEGAN para el 2009 el 54,8% del hato se destina a la producción de carne, el 38,8% al doble propósito y solo un 6,4% a la lechería especializada. La ganadería nacional y sus productos derivados son capaces de abastecer por sí solos la demanda interna, no obstante, tanto el sector privado como el gobierno nacional han emprendido acciones para alcanzar los mercados internacionales a través de mejorar la productividad y competitividad (20).

En el país, los sistemas productivos definidos como el conjunto de actividades desarrolladas por el ganadero a nivel de finca para la producción de leche, se dividen en lechería especializada y doble propósito. De los 23 millones de cabezas de ganado existentes en el país 11 millones están dedicados a la lechería de los cuales 10 millones se explotan bajo el sistema doble propósito (12; 23).

Dentro de las limitaciones de los sistemas productivos, se encuentran la baja calidad higiénica en algunas zonas del trópico bajo; el impacto que causan las enfermedades de control oficial y las que no están bajo programas de control oficial, así como la dificultad para la certificación de zonas libres de brucelosis y

tuberculosis; bajos niveles de implementación de buenas prácticas ganaderas al interior de las explotaciones y baja infraestructura de redes de frío (1; 12; 23).

La producción primaria de leche en Colombia, está acorde con la tendencia mundial dirigida a la obtención de productos de excelente calidad, para incentivar la producción de leche con estándares de calidad, se estableció el sistema de pago de leche cruda al productor (Resolución No. 00007 de 2012 (14). Los productores de leche con buena higiene en el ordeño y manejo del producto y con sólidos mayores a los de su región, reciben bonificaciones adicionales (14, 28).

No obstante, existen microorganismos que sin ser de “Control oficial” revisten capital importancia para la ganadería debido al impacto en salud pública y pueden constituirse en barreras para el comercio internacional, como son *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*; que no están contempladas en el sistema de vigilancia en la producción primaria y que pueden llegar la leche por contaminación durante el proceso de ordeño y manejo en la finca y finalmente llegar al consumidor cuando se emplea leche cruda para la elaboración de subproductos.

Anualmente, hasta 81 millones de personas en los Estados Unidos sufren de enfermedades transmitidas por alimentos y los patógenos transmitidos por los alimentos son un problema importante de salud pública (237). Entre los microorganismos, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, son

motivo de gran preocupación debido a su asociación con alimentos de origen animal como carnes y lácteos (40, 148, 153-161, 202-204, 237).

Para garantizar el suministro de alimentos inocuos, se han desarrollado métodos para la detección rápida de patógenos causantes de ETA. En este estudio se evaluó el empleo del caldo de pre-enriquecimiento SEL para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche infectada experimentalmente. En general el caldo SEL presentó un límite de crecimiento igual a los caldos de pre-enriquecimiento, caldo lactosa para *Salmonella* spp, caldo EC-Novobiocina, para *E. coli* O157:H7 y caldo tamponado *Listeria* para *L. monocytogenes*. Los resultados fueron iguales a los reportados por Kim en el 2008, aunque se empleó un tiempo de incubación menor. El crecimiento de los tres microorganismos mezclados en iguales proporciones se observó desde 10^4 UFC/ml hasta 10UFC/ml, después de un periodo de incubación de seis horas a 37°C.

La evidencia de crecimiento simultáneo de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* empleando el caldo SEL como pre-enriquecimiento fue la base para la implementación de la PCR múltiple para la detección de estos tres microorganismos en leche bovina. La sensibilidad de la PCR múltiple, en leche bovina contaminada artificialmente con cepas de referencia, para *Salmonella* y *L. monocytogenes* fue de 10UFC/ml y para *E. coli* O157:H7 fue de 1UFC/ml. La técnica fue altamente específica para los tres microorganismos objeto del estudio cuando fue evaluada frente a microorganismos que pueden estar presentes en la leche, como *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., todos los agentes empleados se reportan en la tabla 12. Estos resultados mostraron

que la PCR múltiple fue una técnica viable para la detección de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en leche bovina y se empleó en muestras de leche obtenidas a partir de cantina.

El uso de métodos alternativos para la detección de microorganismos en alimentos tiene como objetivo reducir el tiempo del análisis y reducir la cantidad de mano de obra mediante la automatización de los métodos cuando sea posible (235). El advenimiento de la biotecnología ha cambiado los métodos para la detección de patógenos en alimentos, las mejoras en el campo de la inmunología, biología molecular, la automatización y la informática posibilitan el desarrollo de métodos más rápidos, más sensibles y más convenientes para la microbiología de alimentos.

Un obstáculo para el desarrollo de pruebas rápidas es la complejidad de las matrices de alimentos (207, 208, 235, 236) y el enriquecimiento que se emplea debido a que la cantidad de microorganismos patógenos presentes en un alimento puede ser bajo. Aunque este enriquecimiento, aumenta el tiempo de respuesta de las técnicas, proporciona beneficios esenciales; como la dilución de los efectos de los inhibidores, permite la recuperación de células viables y la reparación de células lesionadas. Por lo tanto, es difícil eliminar completamente en los métodos de detección de patógenos en alimentos la etapa de pre-enriquecimiento (235-236)

Las tendencias actuales de investigación hacen hincapié en el desarrollo de plataformas múltiples en un formato de una sola prueba. Por ejemplo, PCR múltiple (181, 183, 204, 215), biosensores proteína / anticuerpo y microarreglos

(216, 217). El enfoque de detección de varios patógenos en un solo ensayo es atractivo y favorable económicamente, ya que puede reducir el requerimiento de espacio total para el manejo de un gran número de muestras, así como el espacio en el laboratorio, suministros, reactivos, y el trabajo necesario, reduciendo así el costo total de las pruebas para la detección de patógenos. Aplicables a alimentos, como leche y productos lácteos productos y carnes y aves (93, 190), frutas y hortalizas (181, 218), donde puede aislarse *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*.

La detección de varios patógenos en forma simultánea puede reducir los tiempos y mejorar la operatividad en la industria y las entidades reguladoras que realizan análisis de los alimentos. Para facilitar la detección de varios microorganismos en un único ensayo, es necesario, un medio de pre-enriquecimiento adecuado. El caldo pre-enriquecimiento universal, caldo (UPB) está disponible comercialmente, para el enriquecimiento de multi-patógenos (207, 208) de DifcoLab, Sparks, MD[®], sin embargo, este medio carece de agentes inhibidores para procurar la selectividad para determinados patógenos y, por tanto, no puede ser adecuado para muestras con un alto nivel de la contaminación, como la leche bovina (207, 208).

Los genes blanco para *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, han sido empleados para la implementación de PCR simple en alimentos y en muestras clínicas (16, 187, 197, 198, 232) y su elección se realizó teniendo en cuenta que son marcadores de virulencia específicos para estos dos microorganismos. Para *E. coli* O157:H7 se eligió dos blancos; los genes que codifican para dos fracciones de las verotoxinas (Stx o Vtx) y que están reportados ampliamente

desde 1990 (108, 120, 183-186, 198, 241, 242) y se han empleado en el desarrollo de técnicas de PCR múltiple para *E. coli* O157:H7 (108, 240), como para los tres microorganismos objeto de este estudio (183-186, 196, 198).

Para *L. monocytogenes* el gen *hlyA* que codifica para la listeriolisina O (LLO) un factor de virulencia específico para este microorganismo, (229) empleado para su detección en técnicas de PCR en productos cárnicos y lácteos (187, 197, 243). En el caso de *Salmonella* se utilizaron un par de iniciadores dirigidos a un gen que codifica para una proteína de transporte de histidina, altamente conservado dentro del género (244). La PCR múltiple estandarizada en este estudio mostró una alta especificidad, porque se logró la amplificación de los cuatro fragmentos para los tres microorganismos evaluados, sin la formación de fragmentos inespecíficos y no se observó interferencia con otros microorganismos que se pueden encontrar en la leche como bacterias del género *Staphylococcus*, *Streptococcus* entre otros.

El empleo de una plataforma que permita la detección de estos tres microorganismos en forma simultánea se ha reportado para diferentes alimentos con diferentes grados de sensibilidad. Se han empleado diferentes caldos de pre-enriquecimiento para la detección simultánea de los tres microorganismos por las técnicas de RT-PCR y PCR múltiple.

Empleando la técnica RT-PCR para la detección simultánea de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, en leche, después de un tiempo de incubación de 18 h a 35°C la sensibilidad de 1UFC para cada microorganismo (8). En vegetales frescos la sensibilidad fue de 1-10 células/ml para *Salmonella*

y *E. coli* O157:H7 y 1000 células/ml para *L. monocytogenes* empleando como pre-enriquecimiento el caldo universal (UP) formulado para la detección simultánea de *Salmonella* y *Listeria* en alimentos, después de una incubación a 37°C durante 15 horas (181).

De igual forma empleado la técnica de PCR múltiple, la detección simultánea de los tres microorganismos en leche cruda artificialmente contaminada, e incubada por una noche a 37°C, empleando una técnica de PCR múltiple, se obtuvo una sensibilidad de 10²UFC/ml (196). En productos lácteos (leche y quesos) una sensibilidad de 100 células de *Salmonella* y *E. coli* O157:H7, después de un periodo de incubación de 18 horas empleando agua peptonada como pre-enriquecimiento resultados (250). Empleando una PCR múltiple para la detección directa de los tres microorganismos objeto de este estudio y *C. jejuni*, en diez tipos de alimentos, entre ellos quesos madurados y yogurt, mostró una sensibilidad de 10⁴UFC/reacción (252).

Por otra parte, la PCR múltiple se ha empleado para la detección de los tres microorganismos en otras matrices de alimentos que se consideran complejos, empleando diferentes caldos de pre-enriquecimiento se obtuvo diferentes grados de sensibilidad, por ejemplo en muestras de camarones la sensibilidad para los tres microorganismos fue de 10³ UFC/ml, 1 célula para *E. coli*O157:H7 y *Salmonella* y 100 células para *L. monocytogenes*, empleando como medio de pre-enriquecimiento el caldo No 17 y una incubación por 24h a 35°C (249). En muestras de huevos enteros una sensibilidad de 10 células/25g para los tres microorganismos, empleando como pre-enriquecimiento caldo tripticasa de soya (TSB) después de una incubación de 15 horas (184).

Por consiguiente, la sensibilidad de la PCR múltiple determinada en este estudio, presentó límites de detección para cada microorganismo iguales a los reportes citados, y en algunos casos la sensibilidad fue mayor, para *E. coli* O157:H7, con una ventaja adicional y fue la reducción del tiempo de incubación en la etapa de pre-enriquecimiento.

De igual importancia se consideraron los reportes realizados para la detección individual de cada microorganismo. Entre otros estudios, la detección de *Salmonella* spp. en leche en polvo con una sensibilidad de 2UFC/ml empleando como pre-enriquecimiento agua peptonada tamponada suplementada con antibióticos, después de una incubación de 12 horas a 37°C (251). La detección directa de *L. monocytogenes* en leche cruda y quesos entre otros alimentos por una técnica de PCR múltiple fue de 10UFC/ml y de 10⁵ UFC/ en quesos (187). La detección directa de *E. coli* O157:H7 en muestras de leche artificialmente contaminadas mostró una sensibilidad de 1UFC/ reacción (253). En otro reporte, la detección de *E. coli* O157:H7 en leche contaminada artificialmente y en leche cruda se obtuvo una sensibilidad de 1UFC/ml, sin embargo, la sensibilidad se vio afectada cuando la leche tenía altos recuentos bacterianos (254).

Por lo tanto, empleando el caldo SEL fue posible evaluar por PCR múltiple muestras de leche cruda bovina procedentes de 600 hatos del sistema de producción doble propósito Colombiano. No se observaron bandas inespecíficas, que pudieran amplificar debido a la presencia de diferentes géneros de microorganismos presentes en la leche en cantidad variable, de acuerdo a los reportes de mesófilos/UFC/ml (Anexo 3).

Un aspecto importante para la detección de *E. coli* O157:H7 empleando el caldo SEL, como pre-enriquecimiento en la PCR múltiple, fue la detección de todas las muestras positivas por microbiología convencional, es decir, el nivel de detección para *E. coli* fue superior con respecto al método convencional.

Con respecto a la detección, por esta técnica, de *Salmonella* spp. el nivel de detección fue igual para las dos metodologías, empleando el caldo SEL para *Salmonella* spp. se logró la amplificación de una única banda de 495 pb correspondiente a un fragmento del gen *hisJ*, en las cinco muestras que fueron positivas para el método microbiológico convencional.

Sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados para *L. monocytogenes*, las muestras positivas por microbiología no se detectaron por la PCR múltiple. Es posible que el número inicial de este microorganismo fuera tan bajo, que luego del tiempo de incubación de seis horas, la cantidad de ADN presente en el volumen analizado no fuera suficiente para lograr la amplificación del fragmento esperado. Como se mencionó anteriormente la sensibilidad para *L. monocytogenes* fue de 10UFC/ml. Aunque el número de muestras positivas para *L. monocytogenes* (dos) no permite sacar conclusiones definitivas. Finalmente para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. el tiempo de detección por esta técnica se disminuye sustancialmente, permitiendo un resultado oportuno.

No obstante, el análisis microbiológico convencional para la detección de microorganismos patógenos siguen siendo las técnicas de detección más usadas y se consideran las técnicas estándares de referencia o “patrón de oro”, debido a su selectividad y sensibilidad. Por ejemplo, en los Estados Unidos la

FDA y el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA), requieren de un organismo aislado como prueba inequívoca de la contaminación de los alimentos (229). Estos métodos convencionales se usan en muchos laboratorios, sobre todo por regulación, porque son métodos armonizados, aspecto que debe tenerse en cuenta para el cumplimiento con las exigencias del comercio internacional (207, 208). Como conclusión y aprovechando las ventajas de cada una de estas metodologías, se puede plantear la detección de los microorganismos patógenos objeto de este estudio, mediante el empleo de las dos metodologías en forma escalonada.

Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es que *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* pueden estar presentes en la leche obtenida de animales sanos, la contaminación de la leche, puede ocurrir durante o después del ordeño, por contacto con heces o con utensilios y equipo lavado de manera inadecuada (43-50, 60). En los últimos años, estos microorganismos se han aislado de muestras de leche cruda de tanque y los reportes tienen un rango desde 0,87 al 12% del total de las muestras examinadas (40, 51-58, 60) indicando que es probable encontrar estos microorganismos en leche cruda.

La prevalencia y detección de estos patógenos en leche cruda puede ser influenciado por varios factores, incluyendo la época del año, la ubicación geográfica, el número de animales, tamaño de la explotación, prácticas y manejo del ordeño, capacitación del personal, la salud del hato, así como el muestreo y procedimientos utilizados para detectar los patógenos (41).

Teniendo en cuenta que la prevalencia para *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. fue baja, la influencia de los factores mencionados no se consideró en este estudio. *Salmonella* spp. fue detectada en el 1,5% de las muestras de las subregiones de Magdalena Medio y Sabanas de Córdoba y Sucre. *L. monocytogenes* fue detectada únicamente en el 0,3% de las muestras analizadas, es decir su presencia fue detectada en dos predios, uno en la subregión de Córdoba y Sucre y otro en el Valle del Cesar.

En cuanto a *E. coli* O157:H7 fue detectada en las tres regiones objeto de este estudio, con una prevalencia del 3,7% (22/600). Se encontró que la subregión fue una variable asociada en forma significativa a la presencia de *E. coli* O157:H7 ($p=0,001$), la mayor prevalencia se encontró en las sabanas de Córdoba y Sucre con el 2,8% del total de las muestras analizadas.

Este hallazgo es concordante con los datos reportados en sistemas de producción lecheros en donde se observó una tasa de prevalencia baja 0,75% (2/268) (65), y una tasa relativamente alta 4,3% (1/23) (220). Reportes similares se encontraron en el Reino Unido (221) con tasas de prevalencia 5,7% (2/35) y en Canadá (116) una alta prevalencia 16,2% (6/37). La presunta vía de transmisión de *E. coli* O157:H7 a la leche cruda es la contaminación fecal durante el ordeño. Este microorganismo puede ser eliminado por la mejora de las prácticas durante el proceso de ordeño, como se muestra en un estudio de Taiwán (222), en donde se analizaron 407 muestras de leche cruda de vaca, estas resultaron negativas para ECST, aunque en las heces de ocho vacas en el hato de producción se encontró un resultado positivo (222).

En cuanto a la influencia de los factores de manejo como presencia o ausencia de antibióticos (tetraciclinas, macrólidos, betalactámicos), la presencia o ausencia de organofosforados y carbamatos, el uso o no uso, en predio de organofosforados, piretroides, amidinas y lactonas macrocíclicas (223, 224), asistencia técnica, el material de piso de ordeño y practicas relacionadas con alimentación y la higiene del ordeño época del año de colecta de la muestra, el fenotipo racial dominante, residuos de metales pesados, producción de leche por vaca, recuento de mesófilos UFC/ML, recuento de coliformes totales UFC/ml, recuento de células somáticas no se encontraron asociados a la presencia o ausencia de *E. coli* O157:H7.

De igual manera, el número de vacas en ordeño, la producción de leche por vaca, el volumen de leche/día, número de vacas por ordeñador, número de empleados y número de ordeñadores por finca fueron variables no asociadas estadísticamente a la presencia de *E. coli* O157:H7 en las muestras de las tres regiones analizadas.

Los reportes para la prevalencia de patógenos (50) de la leche de tanque y los ambientes de granjas lecheras para *L. monocytogenes* oscilaron entre 2,8 a 7,0% (60-62) y fueron más altas (12,6%) en los filtros de la leche (49, 50). En este estudio la prevalencia para *L. monocytogenes* fue de 0,3%, se considera baja con respecto a los estudios adelantados en el sistema de producción de leche especializada ubicadas en trópico alto (225) de nuestro país. En el 2006 en el departamento de Boyacá, se encontró una prevalencia del 26% en 81 muestras analizadas (82); entre el 2004 al 2006 la prevalencia de *L*

monocytogenes del 29,6% y 16% en quesos y en leche respectivamente en Boyacá (82; 226, 227).

Además si se compara con el estudio realizado en el sistema de producción doble propósito del municipio de Pamplona (N.S) para *L. monocytogenes* donde la prevalencia fue del 3% (6/200) muestras de leche cruda bovina (83), también fue menor para las regiones evaluadas.

Uno de los factores asociados a la presencia de *L. monocytogenes* en animales es el uso de henos o ensilajes de mala calidad en la alimentación de los bovinos (72). En el sistema de producción de doble propósito el suministro de este tipo de suplementos es escaso (1, 2), disminuyendo probablemente la posibilidad de que *L. monocytogenes* contamine los animales y por contaminación cruzada la leche. En cambio en el sistema de producción de lechería especializada, existen características que pueden constituirse en una fuente de contaminación para *L. monocytogenes*, es de tipo intensivo y alto empleo de suplementos en la dieta como concentrados, ensilados y heno (1). Además del empleo de tanques de refrigeración para el almacenamiento de la leche y equipos de ordeño mecánico. *L. monocytogenes* puede permanecer adherida a las superficies de los equipos por su capacidad de formar biopelículas (55, 229) y por una mala rutina de limpieza y desinfección de los equipos (51).

La baja prevalencia para *L. monocytogenes* también puede estar influenciada por la presencia de alto número de microorganismos en la leche, este microorganismo tiene un tiempo de generación más largo en comparación con

bacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp. (19). Además, en las muestras analizadas se encontraron recuentos de bacterias aerobias mesófilas desde 1000 UFC/ml y superiores a 30.000.000UFC/ml, (datos no mostrados) lo que sugiere una gran cantidad de microorganismos que pueden ser inhibir la recuperación de esta bacteria, además por su naturaleza psicrótrofa este microorganismo crece mejor a temperaturas bajas que a las temperaturas promedios de esta zona del país.

Los resultados obtenidos para *L. monocytogenes* en las regiones del sistema de producción doble propósito son concordantes con los reportes mencionados anteriormente, ya que en este sistema la recolección de la leche se hace en forma manual y no hay disponibilidad de tanques de enfriamiento y las muestras se obtuvieron a partir de cantinas.

En cuanto a las tasas de aislamiento de *Salmonella* spp. oscilaron de 0 a 11% la mayor parte fue de leche de tanque (48, 60-62; 64; 65; 67), y de 1,5 a 66,0% en los filtros de la leche (48, 224). La prevalencia de *Salmonella* spp. 0,82% se considera como uno de los primeros reportes en leche cruda bovina, para Colombia. *Salmonella* spp. tiene un papel sobresaliente en la salud pública, particularmente en la seguridad alimentaria, ya que los alimentos de origen animal se consideran una de las fuentes más importantes de infecciones por *Salmonella* spp. en el hombre (164). Los programas especiales para la vigilancia y control de *Salmonella* en aves, cerdos y ganado bovino, incluyen animales sanos que pueden ser portadores de estos microorganismos. *Salmonella* spp. se encuentra ampliamente distribuida en los ambientes de granjas de producción animal, incluyendo los bovinos de carne y leche. Aunque

en los bovinos se presenta de preferencia en animales jóvenes, *Salmonella* spp. se ha aislado de las heces de bovinos adultos saludables. Estudios recientes en reportan que del 27 al 31 % de los hatos lecheros existe al menos un animal que está eliminando *Salmonella* spp. en las heces y en los hatos donde se detectó *Salmonella* en leche, el número de animales eliminadores fue superior (68).

La prevalencia para *Salmonella* spp., en la leche cruda, si bien es baja, (0,82%), tomando como referente los estudios realizados en hatos lecheros (40), para este estudio se tomó una única muestra, quedando en la incertidumbre la identificación del origen de las *Salmonella* spp. detectadas en la muestra de leche. Además si *Salmonella* spp. está presente en la leche existe la posibilidad de que la fuente de contaminación sean los animales.

En Colombia, en el año 2005, se reportaron por el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, SIVIGILA (Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud) 7.941 casos de ETA. Los productos alimenticios comúnmente asociados a los brotes fueron: pescados (22%), agua (20%) y carnes de ganado (14%). Según los datos, *Salmonella* spp., fue la bacteria que más brotes causó, con un 20% del total de los reportados (SIVIGILA). Estudios previos realizados en la ciudad de Montería, han reportado un 10.3% de *Salmonella* spp., en alimentos de ventas callejeras y de plazas en mercados (124). La detección de *Salmonella* en quesos en el área del municipio de Pamplona (NS) reporto cero muestras positivas sobre 200 muestras analizadas (230)

Es posible que la baja detección de *Salmonella* spp. esté influenciada por factores como el pH ácido, baja disponibilidad de azúcares para su desarrollo, probablemente los carbohidratos disponibles fueron consumidos por otro tipo de microorganismos que poseen un tiempo de generación menor.

En relación a *E. coli* O157:H7 se encontró en el 3,7% de 600 muestras de leche analizadas, Las condiciones ambientales y la mala higiene en el ordeño pueden favorecer la presencia de *E. coli* O157:H7 en la leche. Este microorganismo puede ser el que se encuentre con mayor frecuencia en la leche del sistema de producción de trópico bajo, porque los factores de temperatura y humedad favorecen la persistencia de este microorganismo en las heces y puede contaminar la leche durante el proceso de ordeño (224). Esta contaminación puede estar favorecida por el hecho de que en el sistema de producción de leche de doble propósito porque con una alta frecuencia la extracción de la leche se realiza con ayuda del ternero (231).

Agregando a lo mencionado anteriormente, los bovinos son los mayores reservorios de *E. coli* O157:H7 que causa la infección el hombre, la presencia en la leche indica la contaminación con las heces durante el proceso del ordeño (222). Se considera que el ganado vacuno el principal reservorio de *E. coli* O157:H7 para la infección en los humanos. A pesar de ser patógena para los humanos, la infección en animales es invariablemente asintomática, sin embargo, existe el peligro potencial para que estos microorganismos entren a la cadena alimentaria por contaminación fecal de la leche, la carne o contaminación de vegetales por contacto con abono infectado (232).

Además, las infecciones por *E. coli* O157:H7 pueden ser una consecuencia del consumo de leche cruda o carne poco cocida (60, 66). El consumo de leche cruda, inadecuadamente pasteurizada o contaminada después del proceso térmico, de crema de leche y de quesos elaborados con leche cruda, ha sido asociado con brotes severos de enfermedades causadas por *E. coli* O157:H7 (154-160). Por este motivo en algunos Estados de Norte América se prohíbe la venta de leche cruda y el expendio de productos elaborados con leche sin pasteurizar. Aunque en el país no se hayan reportado brotes de *E. coli* O157:H7 asociados al consumo de leche cruda, existe la posibilidad de la transmisión de este microorganismo a través de la leche porque la venta de leche cruda para el consumo está permitido.

También los reportes para *E. coli* O157:H7 en Colombia en 1998, que se han realizaron en bovinos de los departamentos de Meta y Cundinamarca, con una prevalencia del 6.5% en heces de bovinos (122). En otro estudio, realizado en el Caribe colombiano, la frecuencia de aparición de *E. coli* O157:H7 fue de 4,6% en heces porcinas, del 2% en canales bovinas y del 10% en carne molida (123).

Un aspecto importante, que debe tenerse en cuenta es que la leche puede contaminarse con en cualquier etapa del proceso de producción con *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* y de esta forma ser una amenaza para la salud pública. Sin embargo, aunque existe un riesgo inherente asociado con el consumo de leche cruda, la mayoría de las enfermedades relacionadas con la leche y productos lácteos se pueden prevenir si principios

de higiene y buenas prácticas se instauran desde la producción hasta el consumo (12).

Por otro lado se debe tener en cuenta que los países productores de alimentos buscan satisfacer las demandas de los consumidores cada vez más exigentes. En Colombia, en el documento Conpes 3676 (20) se formularon las políticas sanitarias y de inocuidad dirigidas a solucionar problemas relacionados con: el estatus sanitario de la producción primaria, los programas preventivos para la inocuidad, planes de vigilancia y control de residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes químicos, y de patógenos. Con el fin de lograr admisibilidad de la producción de leche en los mercados internacionales, garantizar la inocuidad del producto y mejorar la competitividad de la cadena lechera.

Además, la legislación nacional sigue la orientación del *Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos* del Codex Alimentarius. Este código tiene por finalidad ofrecer orientación a los países para que puedan alcanzar un nivel apropiado de protección de la salud pública en relación con la leche y los productos lácteos (255).

También es objetivo de este Código el evitar prácticas y condiciones antihigiénicas en la producción, elaboración y manipulación de la leche y los productos lácteos, puesto que en muchos países estos alimentos constituyen una parte importante de la dieta de los consumidores, especialmente lactantes, niños, y mujeres embarazadas y que amamantan. En lugar de imponer procesos de elaboración específicos para cada producto, el Código se centra

en la obtención de resultados aceptables desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria mediante la aplicación de una o varias medidas validadas de control de dicha inocuidad (255).

La Comisión del *Codex Alimentarius*, establecida por la FAO y la OMS, elabora normas de inocuidad de los alimentos basadas en criterios científicos y en los riesgos, que sirven de referencia en el comercio internacional y proporcionan a los países un modelo para la formulación de leyes nacionales. La finalidad y el alcance del son “prevenir la propagación internacional de enfermedades, proteger contra esa propagación, controlarla y darle una respuesta de salud pública proporcionada y restringida a los riesgos para la salud pública y evitando al mismo tiempo las interferencias innecesarias con el tráfico y el comercio internacionales” (255).

Finalmente, este estudio se realizó para generar información sobre el estado sanitario de la leche producida en el sistema doble propósito colombiano, son datos preliminares, que pueden servir como información inicial para el desarrollo de estudios que permitan confirmar los datos aquí generados y generar las acciones encaminadas a la disminución o eliminación de la presencia de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, que pueden constituirse en barreras para el comercio de la leche y productos lácteos, si se tiene en cuenta la apertura de las exportaciones por la firma de los tratados de libre comercio que se han firmado en el transcurso de este año (256).

7. CONCLUSIONES

- La PCR múltiple fue altamente sensible para *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 pues fue capaz de detectar 1UFC/ml de leche, de cada microorganismo.
- Los iniciadores seleccionados para la estandarización de esta PCR múltiple, fueron altamente específicos para los tres microorganismos y no se observó interferencia con microorganismos de diferentes géneros.
- La PCR múltiple permitió la detección de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en un solo experimento reduciendo costos y el tiempo de los análisis.
- La confirmación de los aislamientos de *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 por PCR, además de establecer con alta especificidad la especie del microorganismo permitió identificarlo en menos tiempo
- La prevalencia de *E. coli* O157:H7 con 3,7% de las muestras examinadas, seguida de la prevalencia de *Salmonella* con el 0,82% y *L. monocytogenes* con el 0,3%, en 600 fincas del sistema de producción doble propósito colombiano.
- La región donde se aisló mayor número de microorganismos fue en las Sabanas de Córdoba y Sucre con el 2,8% del total de las muestras, seguida por la región de Valles del Cesar con el 0,5% del total y la sub región del Magdalena Medio con el 0,3% del total de muestras. La región natural se encontró asociada a prevalencia de *E. coli* O157:H7, siendo las Sabanas de Córdoba y Sucre.
- La prevalencia para *Listeria monocytogenes* para el Valle del Cesar y Valles de Córdoba y Sucre fue del 0,5%. La prevalencia de *Salmonella* para el

Valle del Cesar, Alto Magdalena, Magdalena Medio y Sabanas de Córdoba y Sucre fue de 0%, 0%, 1,5% y 1,5% respectivamente.

- La prevalencia de *E. coli* O157:H7, en este estudio, se encontró en forma significativa asociada a la región natural.

8. RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES

- La sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple empleando el caldo SEL puede ser implementado para la detección de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 en otros alimentos
- La detección de varios patógenos en forma simultánea puede reducir las necesidades de la industria y entidades reguladoras de los análisis de los alimentos que tienen un alto riesgo de contaminación con estos patógenos
- La presencia de *E. coli* O157:H7 en muestras de leche cruda procedentes del sistema doble propósito sugiere la necesidad de programas de vigilancia en el eslabón primario de la cadena láctea

9. BIBLIOGRAFIA

1. Holmann F, Rivas L, Carulla J, Rivera B, Giraldo LA, Guzmán S, Martínez M, Medina A, Farrow A. Producción de leche y su relación con los mercados; caso colombiano. *Centro Internacional de Agricultura Tropical. X Seminario de Pastos y Forrajes* 2006; 149-156.
2. Gamarra JR. Eficiencia técnica relativa de la ganadería doble propósito en la Costa Caribe. *Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional Banco de la República – Sucursal Cartagena* 2004; 75p.
3. Galeano AP, Manrique C. Estimación de parámetros genéticos para características productivas y reproductivas en los sistemas doble propósito del trópico bajo colombiano. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2010; **57**: 119-131
4. Herrera N. Identificación de la capacidad empresarial y la eficiencia de los productores de leche de Guamal departamento del Meta. **Trabajo de Grado de Maestría**. Facultad de Estudios Ambientales y Rurales. Pontificia Universidad Javeriana 2009; 90p.
5. Fonceca Z, Heredia AP, Ocampo PR, Forero Y, Sarmiento OL, Álvarez MC, Estrada A, Samper B, Gempeler J, Rodríguez B. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia ENSIN 2010. Ministerio de Protección Social, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, Instituto Nacional de Salud, Profamilia, Departamento Administrativo Nacional de Estadística, Instituto Colombiano del Deporte, Organización Internacional para las Migraciones, Programa Mundial de Alimentos, Organización Panamericana de la Salud, Asociación Colombiana de Facultades de Nutrición y Dietética. Primera Edición, Bogotá D.C. Agosto 2011; 382p.
6. Calderón A, García F, Martínez G. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 2006; **11** (1): 725-737.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of *Salmonella* Serotype Typhimurium Infections Associated with Drinking Unpasteurized Milk --- Illinois, Indiana, Ohio, and Tennessee, 2002--2003. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5226a3.htm>. Consultado 30 octubre 2011.
8. Omiccioli E, Amagliani G, Brandi Giorgio, Magnani M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiology* 2009; **26**: 615–622.
9. Mazurek J, Salehi, Propes D, Holt J, Bannerman T, Nicholson L.M., Bundesen M, Duffy R, Moolenaar RL. A multistate outbreak of

Salmonella enterica serotype Typhimurium infection linked to raw milk consumption-Ohio. *Journal of Food Protection* 2004; **67**: 2165–2170

10. Proctor M.E, Davis JP. *Escherichia coli* O157:H7 infections in Wisconsin 1992–1999. *Wisconsin Medical Journal* 2000; **99**: 32–37.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance .*Annual Report*, 2005. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention 2007; 52p.
12. Documento CONPES 3676. Consolidación de la política sanitaria y de Inocuidad para las cadenas láctea y cárnica. Concejo Nacional de política económica y social, Republica de Colombia, Departamento Nacional de planeación. Bogotá 2010; 52 p.
13. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Resolución número 000012 de 2007, Por el cual se establece el sistema de pago de la leche cruda al productor.
14. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Resolución número 000017 de 2012. Por el cual se establece el sistema de pago de la leche cruda al productor.
15. Andrews WH, Hammack T. *Salmonella*. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149>. Consultado 20 enero 2012.
16. Feng P, Weagant SD. Diarrheagenic *Escherichia coli*. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070080>. Consultado 20 enero 2012.
17. Hitchins AD, Jinneman K. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>. Consultado 20 enero 2012.
18. INVIMA Manual de técnicas para el análisis de control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. 1998. 111 p
19. Kim H, Bhunia A. SEL, a selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74 (15): 4853–4866.

20. Federación Colombiana de Ganaderos. http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,42332365&_dad=portal&_schema=PORTAL. Consultada el 8 de enero 2012
21. Viloria J. La ganadería bovina en las llanuras del Caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional. Banco de la República, sucursal Cartagena 2003; 86p.
22. Botero L, Rodríguez D. Costo de producción de un litro de leche en una ganadería del sistema doble propósito, Magangué, Bolívar. *Revista MVZ Córdoba* 2006; **11** (2): 806-815.
23. MADR-DANE-CCI. Oferta Agropecuaria cifras 2010. http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/ena/ENA_2010.pdf. Consultada 10 de enero de 2012.
24. Ministerio de Protección Social. Decreto Número 616 de 2006. Por el cual se expide el Reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche cruda para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país. 2006, 32p.
25. Piñeros G, Téllez G, Cubillos A. La calidad como factor de competitividad en la cadena láctea. Caso: cuenca lechera del Alto Chicamocha (Boyacá). Grupo de Investigación en Gestión de Empresas Pecuarias (GIGEP). Universidad Nacional de Colombia 2005; 98p.
26. Ministerio de Protección Social, Decreto Número 1880 del 27 de Mayo 2011. Por el cual se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional.
27. Proexport, FEDEGAN. Sector cárnico en Colombia 2010; 16p.
28. Proexport. Sector lácteo en Colombia 2010; 18p.
29. Magariños H. Producción higiénica de la leche cruda. *Producción y servicios Incorporados S.A. Calzada Mateo Flores. Guatemala Centroamérica*. 2001; 140 p.
30. Calderón A, Donado P, Botero J, Jiménez G, García G. Mastitis bovina: cuantificación de factores de riesgo asociados al funcionamiento del equipo de ordeño. *Revista Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2002; **49**(2): 38-42.
31. Cerón MF, Agudelo EJ, Maldonado JG. Relación entre el recuento de células somáticas individual o en tanque de leche y la prueba CMT en dos fincas lecheras del departamento de Antioquia (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2007; **20**: 472-483.

32. Gaviria BC. Calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda. En: Buenas prácticas de producción primaria de leche. Colombia: *Fondo Editorial Biogénesis*, Medellín Colombia. Colombia 2007; 115-122
33. Rodríguez G. Comportamiento de la mastitis bovina y su impacto económico en algunos hatos de la Sabana de Bogotá, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2006; **12**: 35-55.
34. Calderón A, Rodríguez V; Arrieta G, Máttar S. Prevalencia de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Montería (Colombia): etiología y susceptibilidad antibacteriana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2011; **24**:19-28.
35. Vásquez F, Rodríguez G, Méndez V, Osuna L, Vargas M. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del alto Chicamocha (departamento de Boyacá). *Revista de Medicina Veterinaria* 2007; **14**: 61-83.
36. Ruegg P. Investigation of mastitis problems on farm. *Veterinary Clinics: Food Animal* 2004; **19**: 47-73.
37. Elmoslemany AM, Keefe GP, Dohoo IR, Wichtel JJ, Stryhn H, Dingwell RT. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine* 2010; **95**: 32–40
38. Ramírez N, Palacio LG, Cerón JM, Jaramillo MG. Mastitis en Manual sobre prácticas en producción lechera enfocada al control de la mastitis. Fondo editorial Biogénesis. Medellín Colombia. Colombia 2011, 28p.
39. Calderón A, Martínez N, Cardona J. Determinación de factores de protección para mastitis bovina en fincas administradas bajo el sistema doble propósito en el municipio de Montería. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica* 2009; **12** (2); 61-68.
40. Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda S. Review. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease* 2009; **6**(7): 793-806.
41. FSANZ. Food Standards Australia New Zealand. A risk profile of dairy products in Australia. 2006: www.foodstandards.gov.au/srcfiles/P296%20Dairy%20PPPS%20FAR%20Attach%20%20FINAL%20-%20mr.pdf. Consultada 13 de noviembre de 2011.
42. Compton CWR, Rhodes FM, McDougall S. Consideration of on a farm provisions or raw milk production. *New Zealand Food Safety Authority* 2008; 38p.

43. Jeffers GT, Bruce JL, McDonough PL., Scarlett J, Boor KJ, Wiedmann M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* 2001; **147**: 1095–1104.
44. FAO-OMS. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el Consumo. ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf. Consultada 30 de octubre 2011.
45. Rohrbach B, Draughon F, Davidson P, Oliver S. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, and *Salmonella* in bulk tank milk: risk factors and risk of human exposure. *Journal Food Protection* 1992; **52**(2): 93-97
46. Mohammed H, McDonough P, Gonzalez R. A cross-sectional study on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds. *Journal of Dairy Science* 2000; **83**(11): 2441-2447.
47. Latorre A, Van Kessel J, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK, Zadoks RN, Boor KJ, Schukken YH. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 2009; **75**(5): 1315-1323.
48. Van Kessel J, Karns J, Lombard J, And Koprak C. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. *Journal of Food Protection* 2011; **74** (5): 759–768.
49. Hassan L, Mohammed H, McDonough P. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2001; **51**(1-2): 63-73.
50. Oliver HF, Wiedmann M, Boor KJ. Environmental reservoir and transmission into the mammalian host. En: *Listeria monocytogenes*: pathogenesis and host response. Howard Golfine Hao Shen Editors. Philadelphia United States of America 2007; 111-137.
51. Annous B, Fratamico P, Smith J. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. Concise reviews and hypotheses in food science. *Journal of Food Science* 2009; **74** (1):24-37.
52. Latorre A, Van Kessel J, Karns J, Zurakowski M, Pradhan A, Boor K, Jayarao B, Houser B, Daugherty C, Schukken Y. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science* 2010; **93**(6): 2792-802.

53. Manijeh M, Mohammad J, Roha K. Biofilm formation by *Salmonella enteritidis* on food contact surfaces. *International Journal of Biological Sciences* 2008; **8**(2): 502-505.
54. Latorre A, Van Kessel J, Karns J, Zurakowski M, Pradhan A, Boor K, Adolph E, Sukhnanand S, Schukken Y. Increased *in vitro* adherence and on-farm persistence of predominant and persistent *Listeria monocytogenes* strains in the milking system. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; **77**(11): 3676-3684
55. Navia DP, Villada HS, Mosquera SA. Las biopelículas en la industria de alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 2010; **8** (2); 118-128.
56. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* 2010; **109**: 1117-1131.
57. Lemon KP, Higgins DE, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 2007; **189** (12): 4418-4424.
58. Guilbaud M, Coppet P, Bourion F, Rachman C, Prévost H, Dousset X. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71** (4); 2190-2194.
59. Hassan L, Mohammed H, McDonough P, Gonzalez R. A Cross-Sectional Study on the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York Dairy Herds. *Journal of Dairy Science* 2000; **83**(11): 2441-2447.
60. Jayarao BM, Donaldson SC, Straley BA, Sawant AA, Hegde NV, Brown JL. A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal Dairy Science* 2006; **89**: 2451-2458.
61. Jayarao BM, Henning DR. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal Dairy Science* 2001; **84**(10): 2157-2162
62. Van Kessel JS, Karns JS, Gorski L, McCluskey BJ, Perdue ML. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *Journal of Dairy Science* 2004; **87**(9): 2822–2830.
63. Muraoka W, Gay C, Knowles D, Borucki M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* subtypes in bulk milk of the Pacific Northwest. *Journal of Food Protection* 2003; **66**(8): 1413–1419.

64. D'Amico D, Groves E and Donnelly C. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection* 2008; **71**(8):1580–1589.
65. Murinda S, Nguyen L, Ivey S, Gillespie B, Almeida R, Draughon F, Oliver SP. Molecular characterization of *Salmonella* spp., isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. *The Journal of Food Protection* 2002; **65**: 1100-1105.
66. Warnick LD, Kaneene JB, Ruegg PI, Wells SJ, Fossler C, Halbert L, Campbell A. Evaluation of herd sampling for *Salmonella* isolation on Midwest and northeast US dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 2003; **60**: 195-206.
67. Karns JS, Van Kessel JS, McCluskyBJ, Perdue ML. Prevalence of *Salmonella enterica* in bulk tank from US dairies as determined by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Science* 2005; **88**(10): 3475–3479.
68. Van Kessel JS, Karns JS, Wolfgang DR, Hovingh E, Jayarao BM, Van Tassel CP, Shukken YH. Environmental sampling to predict fecal prevalence of *Salmonella* in an intensively monitored dairy herd. *Journal of Food Protection* 2008; **71**(10): 1967–1973.
69. Houser BA, Donaldson SC, Kehoe SI, Heinrichs AJ, Jayarao BM. A survey of bacteriological quality and the occurrence of *Salmonella* in raw bovine colostrum. *Foodborne Pathogens and Disease* 2008; **5**(6); 853 – 858.
70. Karns JS, Van Kessel JS, McCluskyBJ, Perdue ML. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 and *E. coli* virulence factors in US bulk tank milk as determined by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Science* 2007; **90**(7): 3212–3219.
71. Murinda S, Nguyen L, Ivey S, Gillespie B, Almeida R, Draughon F, Oliver SP. Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *The Journal of Food Protection* 2002; **65**(5): 752 –759.
72. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, McDonough PL, Wiedmann M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**(8): 4458–4467.
73. Manual de la OIE sobre animales terrestres *Listeria monocytogenes*. Capítulo 2.9.7. —2008; 18p

74. Goulet V, De Valk J. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerging Infectious Diseases* 2001; **7**: 983-989.
75. Johansson T. Enhanced detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* from foodstuffs and food-processing environments. *International Journal of Food Microbiology* 1998; **40**(1-2): 77-85.
76. Pini PN, Gilbert RJ. The occurrence in de UK of *Listeria* species in raw chicken and soft food. *International Journal of Medical Microbiology* 1988; **6**: 317-326.
77. Driehuis F, Oude SJ. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Veterinary Quarterly* 2000; **22**(4): 212-216.
78. Hinton MH. Infections and intoxications associated with animal feed and forage which may present a hazard to human health. *Veterinary Journal* 2000; **159**(2): 124-38.
79. Yoshida T, Kato Y, Sato M, Hirai K. Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. *Journal of Veterinary Medical Science* 1998; **60**(10): 1165-1168.
80. Vitas AI, Aguado V, Garcia-Jalon EL. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* 2004; **90**: 349-356.
81. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology* 2004; **93**(2): 131-40.
82. Vanegas MC, Vásquez E, Martinez AJ, Rueda AM. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. *Food Control* 2009; **20**(4): 430-432.
83. Carrascal AK, Albarracin C, Sarmiento P. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche expedida en el municipio de Pamplona, Colombia. *Bistua* 2007; **5** (2): 49-57.
84. Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB. *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. *Food Control* 2008; **19** (2): 109-112.
85. Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control* 2010; **21**(11): 1448-1452.
86. Reuben A, Treminio H, Arias M, Chaves C. Presencia de *Escherichiacoli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., en alimentos de origen animal en Costa Rica. 2003

http://www.alanrevista.org/ediciones/2003-4/escherichia_coli_listeria_monocytogenes_salmonella_spp.asp.

Consultada 23de noviembre 2011.

87. Desmaures N, Bazin F, Gueguen M. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 1997; **83**(1): 53-58.
88. Chye F, Abdullah A, Ayob M. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Journal of Food Microbiology* 2004; **21**: 535-541.
89. Adzitey F, Huda N. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Research* 2010; **4**(25): 2848-2855.
90. Schlech WF. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 1983; **308**: 203–206.
91. Büla C, Bille J, Glauser MP. An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Diseases* 1995; **20**: 66-72.
92. Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 2006; **25** (2): 571-580
93. CDC. Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated with pasteurized milk from a local dairy—Massachusetts, 2007. Morbidity and Mortality *Weekly Report* 2008; **57**: 1097-1100.
94. MacDonald PD, Whitwam RE, Boggs JD, MacCormack JN, Anderson KL, Reardon JW, Saah JR, Graves LM, Hunter SB, and Sobel J. Outbreak of Listeriosis among Mexican Immigrants as a Result of Consumption of Illicitly Produced Mexican-Style Cheese. *Clinical Infectious Diseases* 2005; **40**: 677-682.
95. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audier A, Broome CV, Reingold AL. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine* 1985; **312**: 404-407.
96. Dalton C, Austin C, Sobel J, Hayes P, Bibb W, Graves L, Swaminathan B, Proctor M, Griffin P. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine* 1997; **2**: 100-105.
97. Crum NF. Update on *Listeria monocytogenes* infection. *Current Gastroenterology Reports* 2002; **4**: 287-297.

98. Crespo MP, Vélez JD, Castañeda C, Hoyos F, López ML, Salazar JC. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Colombia Médica* 1999; **30** (2): 89-98.
99. Azadian BS, Finnerty GT, Pearson AD. Cheese-borne *Listeria meningitis* in immunocompetent patient. *Lancet* 1989; **1** (8633): 322-323.
100. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCraig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin M, Tauxe V. Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 1999; **5**: 607-625.
101. Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista Chilena de Infectología* 2008; **25**(5):328-335.
102. Schuchat A, Deaver K, Wenger J, Plikaytis B, Mascola L, Pinner R, Reingold A, Broome C. Role of foods in sporadic listeriosis: I. Case-control study of dietary risk factors. *The Journal of the American Medical Association* 1992; **267**(15): 2041-2045.
103. Drevets D, Bronze M. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2008; **53**: 151-165.
104. Tornieporth NG, Jonh J, Salgado K, De Jesus P, Latham E, Melo MC, Gunzburg ST, Riley LW. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian Children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; **33** (5): 1371-1374.
105. Tamaki Y, Narimatsu H, Miyazato T, Nakasone N, Higa N, Toma C, Iwanaga M. The relationship between O-antigen and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2005; **58** (2): 65-69.
106. Beutin L, Miko A, Krause G, Pries K, Haby S, Steege K, and Albrecht N. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; **73**(15): 4769–4775.
107. Nweze EI. Virulence properties of diarrheagenic *E. coli* and etiology of diarrhea in Infants, young children and other age groups in Southeast, Nigeria. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* 2009; **4** (3): 173-179.
108. Aranda R, Fagundes U, Scaletsky I. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42** (12): 5849-5853.

109. Konowalchuck J, Speirs JL, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1977; **18** (3): 775-779.
110. O'Brien A, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type I- like cytotoxin by *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases* 1982; **146** (6): 763-769.
111. Levine M, Xu J, Kaper J, Lior H, Prado V, Tall B. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Journal Infection Diseases* 1987; **156**: 175-82.
112. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Natural Reviews Microbiology* 2004; **2**: 123-40.
113. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; **11** (1):142-201.
114. Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk profile: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in red meat and meat products. *New Zealand Food Safety Authority* 2002; 53p.
115. Gilbert S, Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk profile: Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in raw milk. Institute of Environmental Science and Research ("ESR"). *New Zealand Food Safety Authority* ("NZFSA") 2007; 84p.
116. Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *Journal of Animal Science* 2007; **85**: E63-E72.
117. Jay MT, Cooley M, Carychao D, Wiscomb GW, Sweitzer RA, Crawford-Mikszta L, Farrar JA, Lau DK, O'Connell J, Millington A, Asmundson RV, Atwill ER, Mandrell RE. *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, Central California Coast. *Emerging Infectious Diseases* 2007; **13** (12): 1908-1911
118. Hannaoui EJ, Villalobos LB, Martínez RE. *Escherichia coli* shigatoxigénica: patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009; **29**:13-20.
119. Narváez-Bravo C, Carruyo-Núñez G, Moreno M, Rodas-González A, Hoet Ay Wittum T. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica* 2007; **17**(3): 239–245.
120. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI. Virulence genotypes and serotypes of

verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *European Journal of Epidemiology* 2000; **16**: 757-762.

121. Tanaro JD, Lound LH, Domínguez MM. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en aguas abiertas, heces y rumen de bovinos en las proximidades del casco urbano. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 2006; **32**: 207-218.
122. Mattar S, Vásquez E. *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Colombia. Bogotá, Colombia *Emerging Infectious Diseases* 1998; **4**(1): 126-127.
123. Piedrahita D, Márquez T, Máttar S. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el departamento de Córdoba. *Revista MVZ Córdoba* 2001; **6** (2): 119-126.
124. Vargas J, Clavo N, Máttar S. Detección de *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella* spp., en cerdos del departamento de Córdoba. *Revista MVZ-Córdoba* 2004; **9**(1): 386-392.
125. Marzocca MA, Marucci PL, Sica MG, Álvarez EE. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista Argentina de Microbiología* 2006; **38**: 38-40.
126. Rivero MA, Padola NL, Etcheverría AI, Parma AE. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 2004; **64**: 352-356.
127. Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *Journal of Applied Microbiology* 2004; **97**: 362–370.
128. Stephan R., Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *Journal Dairy Science* 2008; **91**: 2561–2565.
129. Callaway TR, Carr MA, Edrington TS, Anderson RC, Nisbet DJ. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: A review after 10 years. *Current Issues in Molecular Biology* 2009; **11**: 67-80
130. Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Ebel ED, Herriott DE, Carpenter LV. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA. *Preventive Veterinary Medicine* 1998; **35**: 11–19.
131. Schouten JM. Verocytotoxin producing *E. coli* O157 on farms: Prevalences, risk factor and transmission. **Ph.D. Thesis Wagening**

University Institute of Animal Sciences, Wageningen University,
The Netherlands 2005; 160p

132. Cobbold R, Desmarchelier P. A longitudinal study of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds. *Veterinary Microbiology* 2000; **71**(1-2): 125-137.
133. Garber L, Wells S, Schroeder-Tucker L, Ferris K. Factors associated with fecal shedding of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on dairy farms. *Journal of Food Protection* 1999; **62**(4): 307–312.
134. Zhao T, Doyle M, Shere J, and Garber L. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; **61**(4): 1290–1293.
135. Hancock D, Rice D, Herriott D, Besser T, Ebel E, and Carpenter L. Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle. *Journal of Food Protection* 1997; **60**: 363-366.
136. Doyle ME, Archer J, Kaspar CW, Weiss R. Human illness caused by *E. coli* O157:H7 from food and non-food sources. *Food Research Institute Briefings* 2006; 37p
137. Duffy G. Verocytotoxicogenic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *Journal of Applied Microbiology* 2003; **94**: 94S–103S.
138. Bolton D, Duffy G, O'Neill C, Baylis C, Tozzoli R, Morabito S, Wasteson Y, Lofdahl S. Epidemiology and transmission of pathogenic *Escherichia coli*. *Ashtown Food Research Centre* 2009; 19p.
139. Wang G, Doyle M. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Journal of Food Protection* 1998; **61**(6): 662-667.
140. Fremaux B, Prigent-Combaret C, Delignette-Muller L, Mallen B, Dothal M, Gleizal A, Vernozy-Rozand C. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *Journal of Applied Microbiology* 2008; **104**: 296–304.
141. Milne LM, Plom A, Strudley I, Pritchard GC, Crooks R, Hall M, Duckworth G, Seng C, Susman MD, Kearney J, Wiggins RJ, Mouldsdale M, Cheasty T, Willshaw GA. *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Communicable Disease and Public Health* 1999; **2**: 22-26.
142. Naylor SW, Low JCH, Besser TE, Mahajan A, Gunn GJ, Pearce MC, McKendrick IJ, Smith DG, Gally DL. Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity* 2003; **71**(3): 1505–1512

143. Cornick N, Sheridan L, Moon H. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infection and Immunity* 2002; **70**(5): 2704–2707.
144. Rice DH, Ebel ED, Hancock DD, Besser TE, Herriott DE, Carpenter L. *Escherichia coli* O157 in cull dairy cows on farm and at slaughter. *Journal of Food Protection* 1997; **60**(11): 1386-1387.
145. Karmali MA, Gannon V, Sargean JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Review Veterinary Microbiology* 2010; **40**: 360–370
146. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England Journal of Medicine* 1983; **308**: 681-685
147. Golan L, Gonen E, Yagel SR, Shpigel NY. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induce attaching and effacing lesions and hemorrhagic colitis in human and bovine intestinal xenograft models. *Disease Models and Mechanisms* 2011; **4**: 86-94.
148. Headrick, ML, Korangy S, Bean NH, Angulo FJ, Altekruze SF, Potter ME, Klontz KC. The epidemiology of raw milk-associated foodborne disease outbreaks reported in the United States, 1973 through 1992. *American Journal of Public Health* 1998; **88**: 1219-1221.
149. Cieslak PR, Barrett TJ, and Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. *Lancet* 1993; **7**; 342(8867): 367.
150. Mukherjee A, Cho S, Scheftel J, Jawahir S, Smith K, Diez-Gonzalez F. Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. *Journal of Applied Microbiology* 2006; **101**: 429–436.
151. Crump JA, Braden CR, Dey ME, Outbreaks of *Escherichia coli* O157 infections at multiple county agricultural fairs: a hazard of mixing cattle, concession stands and children. *Epidemiology Infection* 2003; **131**: 1055-1062.
152. Crump JA, Sulka AC, Langer AJ. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 among visitors to a dairy farm. *New England Journal of Medicine* 2002; **347**: 555-560.
153. Hussein HS, Sakuma T. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science* 2005; **88**(2): 450–465

154. Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial Foodborne and Diarrheal Disease National Case Surveillance. Annual Report, 2003. Atlanta Centers for Disease Control and Prevention; 2005: 57p.
155. CDC, 2010. Investigation Update: Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Cheese. Updated November 24, 2010. <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/cheese0157/>. Consultada 24 de enero de 2012.
156. Scallan E. Activities, Achievements, and lessons learned during the first 10 years of the foodborne diseases active Surveillance Network: 1996–2005. *Clinical Infectious Diseases* 2007; **44**: 718–725.
157. Centers for Disease Control and Prevention. Bacterial foodborne and diarrheal disease national case surveillance. Annual Report, 2004. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2007: 52p.
158. Crump JA, Griffin P, Angulo F. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clinical Infectious Diseases* 2002; **35**: 859–865.
159. Honish L, Predy G, Hislop N, Chui L, Kowalewska-Grochowska K, Trottier L, Kreplin C, Zazulak I. An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health* 2005; **96**(3): 182–184.
160. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits – Pennsylvania and Washington, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2001, **50**: 293-7.
161. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with petting zoos – North Carolina, Florida, and Arizona, 2004 and 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2005; **54**: 1277-80.
162. Griffin G. Review of the major outbreak of *E. coli* O157 in Surrey, 2009. Report of the *E. coli* O157 Independent Investigation Committee 2010; 20-39.
163. Caffer M, Terragno R, Binsztein N. Norma. Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Centro Regional de Referencia del WHO Global *Foodborne Infections* Network América Latina 2008; 76p
164. Manual de la OIE sobre animales terrestres Salmonelosis Capítulo 2.9.9.- 2008; 18p

165. Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Byrd JA, Nisbet DJ. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *Journal of Animal Science* 2008; **86**: (Suppl.):E163–E172
166. Rodriguez A, Pangloli P, Mount JR, Draughon FA. Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. *Journal Food Protection* 2006; **69**(11): 2576-2580.
167. Huston C., Wittum T, Love BC. Persistent fecal *Salmonella* shedding in five dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002; **220**: 650-655.
168. CDC. Multistate outbreak of *Salmonella* serotype Typhimurium infections associated with drinking unpasteurized milk-Illinois, Indiana, Ohio, and Tennessee, 2002–2003. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003; **52**(26): 613–615.
169. CDC. Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections associated with consumption of unpasteurized Mexican-Style aged cheese---Illinois, March 2006 – April 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2008; **57**(16): 432-435. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5716a4.htm>. Consultada 3 de noviembre 2011.
170. CDC. *Salmonella* Typhimurium Infection Associated with Raw Milk and Cheese Consumption --- Pennsylvania, 2007. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5644a3.htm> Consultada 13 de noviembre 2011.
171. Oregon Health Authority press release: <http://www.oregon.gov/DHS/news/2010news/2010-0818a.pdf>. Consultada 13 de enero 2012.
172. Utah State press release: <http://health.utah.gov/pio/nr/2010/051610-SalmonellaRawMilk-NR.pdf>. Consultada 13 de enero 2012.
173. Suárez M, Mantilla J. Presencia de *Salmonella* serovariedad *Enteritidis* en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. *Iatreia* 2000; **13**(4): 237-245.
174. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS. Bacteriosis y Micosis. Tercera edición. 2001; **I**; 420p.
175. Murinda S, Nguyen L, Ivey S, Gillespie B, Almeida R, Draughon F, Oliver SP. Molecular characterization of *Salmonella* spp., isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. *The Journal of Food Protection* 2002; **65**:1100-1105.

176. Huston C, Wittum T, Love BC. Persistent fecal *Salmonella* shedding in five dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2002; **220**: 650-655.
177. Oberst RD, Hays MP, Bohra LK, Phebus RK, Yamashiro CT, Paszkokolva C, Flood SL. PCR-based amplification and presumptive detection of *Escherichia coli* O157:H7 with an internal fluorogenic probe and the 5CE nuclease (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; **64**: 3389-3396.
178. Hudson JA, Lake RJ, Savill MG, Scholes P, McCormick RE. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *Journal Applied Environmental Microbiology* 2001; **90**: 614–621.
179. Yaron S, Matthews K.R. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. *Journal of Applied Microbiology* 2002; **4**: 633–640.
180. Jothikumar, N, Griffiths M.W. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 2002; **68**: 3169–3179.
181. Bhagwat, AA. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. 2003; **84**: 217–224.
182. Chotár MA, Vidová BB, Godány A. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Environmental and Applied Microbiology and Immunology* 2006; **51**(6): 639–646.
183. Fratamico PM, Strobaugh TP. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1998; **21**: 92–98.
184. Germini A, Masola A, Carnevali P, Marchelli R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control* 2009; **20**: 733–738.
185. Gilbert C, Winters D, O’Leary A, Slavik M. Development of a triplex PCR assay for the specific detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular and Cellular Probes* 2003; **17**: 135–138.
186. Kawasaki S, Fratamico PM, Horikoshi N, Okada Y, Takeshita K, Sameshima T, Kawamoto S. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*,

- and *Escherichia coli* O157:H7 in foods and in food subjected to freezing. *Foodborne Pathogens and Disease* 2009; **6**(1): 549-555
187. Poutou R, Burbano M, Sierra S, Torres K, Carrascal AK, Mercado M. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Universitas Scientiarum* 2005; **10**(2): 61-78.
 188. Crecimiento celular. <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-3.htm>. Consultada 23 de enero de 2012.
 189. Reproducción y crecimiento bacteriano. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf. Consultada 25 de enero de 2012.
 190. Maturin L, Peeler JT. Aerobic Plate Count. Bacteriological Analytical Manual. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm>. Consultada el 13 de enero de 2012.
 191. Moore E, Arnscheidt A, Krüger A, Strömpl C, Mau M. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular Microbial Ecology Manual* 2004, Second Edition **1.01**: 3–18.
 192. Asadzadeh N, Javanmard A, and Nassiry M. Comparasion of rapid DNA extraction techniques for conventional PCR-RFLP analysis from mammalian whole blood cells. *Journal of Molecular Genetics* 2010; **2** (3-4): 32-35.
 193. Freschi CR, Silva Carvalho LF; Oliveira CJ. Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella* Typhimurium in swine feces by Polymerase Chain Reaction (PCR) *Brazilian Journal of Microbiology* 2005; **36**: 363-367.
 194. Federación Colombiana de Ganaderos. http://portal.fedegan.org.co/PEGA_Regionales/02_Presentaciones/Mapas%20Ganaderos%20Geograficos.pdf. Consultada el 10 de enero 2012.
 195. Instituto Colombiano Agropecuario. Censo pecuario por departamento Colombia 2012. <http://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaria/Servicios/Epidemiologia-Veterinaria/Censos-2010/Especies-Consolidado-Nacional.aspx>. Consultada 10 de enero 2012.
 196. Aslam M, Hogan J, Smith L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Listeria*

- monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. *Food Microbiology* 2003; **20**: 345–350.
197. Burbano E, Sierra, S, Torres, K, Mercado M, Carrascal A, Poutou R. Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Revista MVZ Córdoba* 2006; **11**(1): 715-724.
198. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler D, Rozee KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; **28**(3); 540-545.
199. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research* 1997; **25**: 3389-3402.
200. IDT. Integrated DNA Technologies. <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Consultada el 20 de enero de 2012.
201. Tapia J. Medidas de prevalencia y su relación incidencia –prevalencia. *Medicina Clínica* (Barcelona) 1994; **105**: 216-218.
202. Rangel JM, Sparling P.H, Crowe, C, Griffin P.M, Swerdlow, DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerging Infectious Diseases* 2005; **11**: 603–609.
203. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_06_GLEWS_Sept07_sp.pdf. Consultada 13 de enero de 2012.
204. Lundén J, Tolvanen R, Korkeala H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal Dairy Science* 2004; **87**: E6-E12.
202. Samelis J, Ikeda JS, Sofos JN. Evaluation of the pH – dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 2003; **95**: 563-575.
203. Vollenhofer-Schrumpf S, Buresch R, Unger G, Stahl N, Fränzl G, Schinking M. Detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp., in chicken samples by Multiplex Polymerase Chain Reaction and Hybridization using the

- genegen major food pathogens detection Kit. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 2005; **13**: 148–176.
204. Mukhopadhyay A, Mukhopadhyay UK. Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiology Methods* 2007; **68**:193–200.
 205. Oktay HI, and Heperkan D. Evaluation of ISO method and Vidas automated system for identifying *Listeria* and *Salmonella* in selected food. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 2006; **14**(2): 133-145
 206. Whiting RC, Golden M. Modeling temperature, pH, NaCl, nitrite and lactate on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth. WHO (2007). *Food safety and Foodborne illness*. Fact sheet No. 237.
 207. Bailey, JS, CoxNA. Universal preenrichment broth for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria* in foods. *Journal of Food Protection* 1992; **55**: 256–259.
 208. Nam HM, Murinda SE, Nguyen LT, Oliver SP. Evaluation of universal pre-enrichment broth for isolation of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* from dairy farm environmental samples. *Foodborne Pathogens and Disease* 2004; **1**(1): 37-44.
 209. Gracias, KS, McKillip JL. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology* 2004; **50**: 883–890.
 210. Maciorowski KG, Herrera P, Jones FT, Pillai SD, Ricke SC. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. In animal feeds: a review. *African Journal of Microbiology Research* 2006; **30**: 127–137.
 211. Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods* 2007; **69**: 1–22.
 212. Jacobsen CN. The influence of commonly used selective agents on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 1999; **50**: 221–226.
 213. Geng T, Kim KP, Gomez R, Sherman DM, Bashir R, Ladisch MR, Bhunia AK. Expression of cellular antigens of *Listeria monocytogenes* that react with monoclonal antibodies C11E9 and EM-7G1 under acid, salt or temperature-induced stress environments. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 2003; **95**: 762–772.

214. Lathrop AA, Banada PP, and Bhunia AK. Differential expression of *InlB* and *ActA* in *Listeria monocytogenes* in selective and nonselective enrichment broths. *Journal Applied and Environmental Microbiology* 2008; **104**: 627–639.
215. Jeffries, L. Novobiocin-tetrathionate broth: a medium of improved selectivity for the isolation of *Salmonella* spp. e from faeces. *Journal of Clinical Pathology* 1959; **12**: 568–571.
216. Ligler FS, Taitt CR, Shriver-Lake LC, Sapsford KE, Shubin YS, and Golden JP. Array biosensor for detection of toxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003; **377**: 469–477.
217. Taylor AD, Ladd J, Yu Q, Chen H, Jiang S. Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor. *Biosens. Bioelectron* 2006; **22**: 752–758.
218. Burnett SL, Beuchat LR. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2000; **25**: 281–287.
219. Ellingson JL, Koziczkowski JJ, Anderson J., Carlson SA, Sharma VK. Rapid identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in bovine food products and feces. *Molecular & Cellular Proteomics Probes* 2005; **19**: 213–217.
220. Wells J, Shipman L, Greene K, Sowers E, Green J, Cameron D, Downes F, Martin M, Griffin P, Ostroff S. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157: H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; **29**(5): 985-989.
221. Mechie, SC, Chapman PA, Siddons CA. A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herds. *Epidemiology and Infection*.1997; **118**; 17–25.
222. Chiueh, L., F. Liu, and D. Y. Shih. Prevalence of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in feed and raw milk of domestic cattle and sheep. *Journal of Food Drug Anal* 2002; **10**: 39–46.
223. Donkersgoed J, Berg J, Potter A, Hancock D, Besser T, Rice D, LeJeune J, Klashinsky S. Environmental sources and transmission of *Escherichia coli* O 157 in feedlot cattle. *The Canadian Veterinary Journal* 2001; **42**: 714-720
224. Fairbrother JM, Nadeau É. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Scientific Journal and Technical OIE*. 2006; **25** (2): 555-569.

225. Baquero DM, Bernal AM, Campuzano S. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. *NOVA - Publicación Científica* 2006; **4**(6): 1-114.
226. Vergara J. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos distribuidos en Bogotá D.C. (**Monografía Microbiología de Alimentos e Industria**). Bogotá: Universidad de los Andes; 2004.
227. Rueda A. 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 en Microbiología**). Bogotá: Universidad de los Andes, 2005.
228. Shukla R, Slack R, George A, Cheasty T, Rowe B, Scutter J. *Escherichia coli* O157 infection associated with a farm visitor centre. *Communicable Disease Report - CDR Review* 1995; **26**; 5(6): R86-90.
229. Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes* Surface Proteins: from Genome Predictions to Function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2007, **71** (2); p. 377–397.
230. Albarracín FY, Sarmiento P, Carrascal AK, Mercado M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso doble crema producidos y comercializados en el municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas Universidad de Pamplona*. Bucaramanga, Colombia 2006; **4** (2):30-40.
231. Matthews L, Low JC, Gally DL, Pearce MC, Mellor DJ, Heesterbeek JA, Chase-Topping M, Naylor SW, Shaw DJ, Reid SW, Gunn JG, Woolhouse ME. Heterogeneous shedding of *Escherichia coli* O157 in cattle and its implications for control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006; **103**(3): 547–552.
232. Manual de la OIE sobre animales terrestres *Escherichia coli* verocitotóxica. Capítulo 2.9.11; 2008 18p.
233. Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology* 2000; **60**: 205-218.
234. Mandal PK, Biswas AK, Choi K, Pal UK. Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *American Journal of Food Technology* 2011; **6**(2): 87-102.

235. Fung DY. Rapid methods and automation in Microbiology: 25 years of development and predictions. *Revista de tecnología e higiene de los alimentos* 2008; **392**: 113-117.
236. Ge B, Meng J. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: applications and future directions. *Journal of Laboratory Automation* 2009; **14**: 235-240.
237. Lynch M, Painter J, Woodruff R, Braden C. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1998–2002. *CDC - Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*. 2006; **55**(SS10): 1–34.
238. Budu-Amoako E, Toora S, Ablett R, Smith J. Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat-injured and freeze-injured *Listeria monocytogenes* cells. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; **58**(9): 3177-3179.
239. McPherson MJ, Møller SG. Reagents and instrumentation. PCR. BIOS Scientific Publishers 2000, Taylor & Francis, Abingdon, Oxon UK, New York USA 2005; 23–60.
240. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología* 2006; **37**: 1-10.
241. Kagkli DM, Weber TP, Van den Bulke M, Folloni S, Tozzoli R, Morabito S, Ermolli M, Gribaldo L, Van den Eede G. Application of modular approach to an in-house validation of Real-Time PCR method for detection and serogroup determination of verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; **77**(19): 6954-6963.
242. Kimata K, Shima T, Shimizu M, Tanaka D, Isobe J, Gyobu Y, Watahiki M, Nagai Y. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2005; **49**(6): 485-492.
243. Kongo JM, Malcata FX, Ho AJ, Wledmann. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in Sao Jorge (Portugal) cheese production. *Journal Dairy Science* 2006; **89**(11): 4456-4461.
244. Figueroa IM, Verdugo A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2005; **47**(1-2): 25-42.
245. Rodríguez IP, Barrera HA. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León* 2004; **7**(003): 323-335.

246. Henegariu O. 1997. PCR and multiplex PCR: guide and troubleshooting <http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>. Consultado 10 de enero de 2012.
247. Méndez-Álvarez S, Pérez-Roth E. La PCR múltiple en microbiología clínica. <http://external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t10.pdf>. Consultado 14 se enero de 2012.
248. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. Las herramientas moleculares. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>. Consultado el 23 de enero de 2012.
249. Yasmin M, Kawasaki S, Kawamoto S. Evaluation of Multiplex PCR system for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in shrimp samples. *Bangladesh Journal Microbiology* 2007; **24**(1): 42-46.
250. Mousavi SL, Rasooli I, Nazarian S, Amani J. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, toxigenic *Vibrio cholera*, and *Salmonella* Typhimurium by multiplex PCR. *Iranian Journal of Clinical Infections Diseases* 2009; 4(2): 97-103.
251. Villareal J, Soto Z, Pereira N, Varela L, Jaramillo R, Villanueva D, Mendoza E. Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Salmonella* sp. en leche en polvo: Optimización del método en 12 horas. *Salud Uninorte Barranquilla* 2008; **24**(2): 216-225.
252. Wang H, Slavik MF. A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated food samples. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 2005; **13**: 213-223.
253. Fode-Vaughan KA, Maki JS, Benson JA, Collins ML. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters I Applied Microbiology* 2003; **37**: 239-243.
254. Garcia PM, Arcuri EF, Brito MAVP, Lange CC, Brito JRF, Cerqueira MMOP. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2008; 60(5): 1241-1249.
255. OMS, FAO. *Codex Alimentarius*. Leche y Productos Lácteos. <http://www.proexport.com.co/tlc-usa>. Consultado el 23 de enero de 2012.

256. Proexport. Tratado Libre Comercio / Colombia Estados Unidos.
<http://www.proexport.com.co/tlc-usa>. Consultada 23 mayo 2012.

10 Anexos

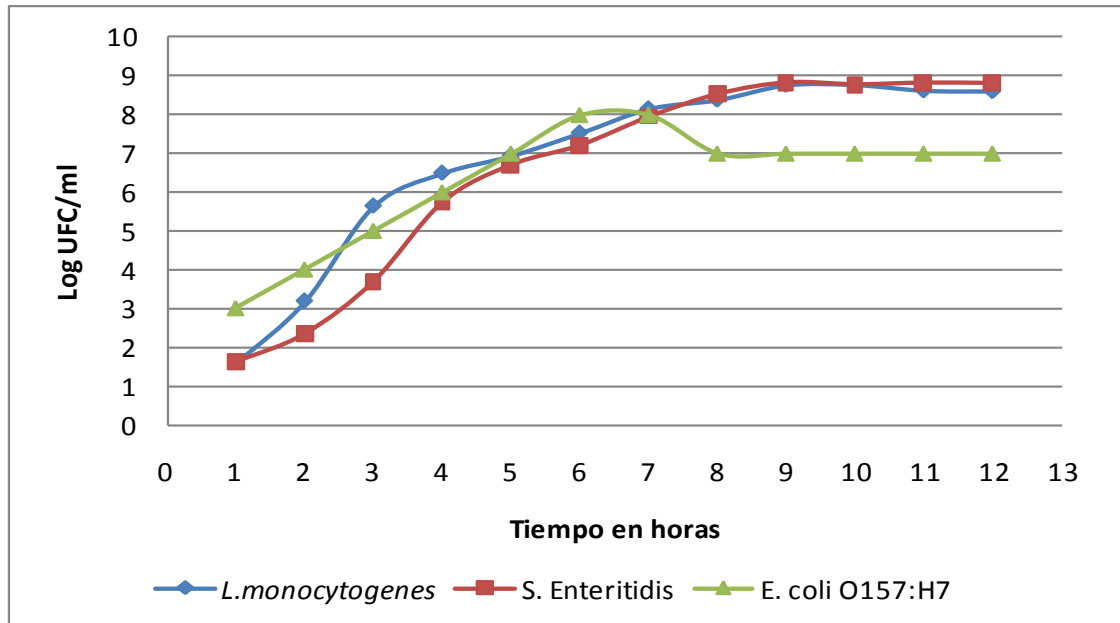
Anexo 1: Composición del caldo SEL (*Salmonella*, *Escherichia*, *Listeria*)

Ingrediente	g/l	Observación
Caseina (digeridopancretatico)	17	Similar en CBET*
Extracto de Levadura	6	Similar en CBET
Dextrosa	2.5	Similar en CBET
Soytone	3	Similar en CBET
Cloruro de Sodio	5	Similar en CBET
Fosfatomonopotasico	1.35	Similar en CBET
Fosfatodipotasio	2.5	Similar en CBET
Fosfatodisodico	9.6	Similar en CBET
Piruvato de sodio	1.1	Similar en CBET
Acriflavina	0.01	Modificaciòn de CBET
Cycloheximida	0.05	Modificaciòn de CBET
Fosfomicina	0.05	Adicional al CBET
AcidoNalidixico	0.002	Modificaciòn de CBET

* Caldo Base de Enriquecimiento Tamponado *Listeria*. Fuente 19

Anexo 2: Curva del crecimiento *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en caldo SEL

La curva de crecimiento para el método directo de recuento en placa para *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* a partir del caldo SEL inoculado con leche inoculada experimentalmente, se construyó con el logaritmo decimal del promedio del recuento de tres réplicas para cada microorganismo en función del tiempo de incubación. La fase de adaptación fue de dos horas para *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* y para *E. coli* O157:H7 fue de una hora. El crecimiento exponencial para *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* inició a partir de las dos horas y finalizó alrededor de las ocho horas. *E. coli* O157:H7 inició su fase de crecimiento exponencial en la primera hora y se prolongó hasta las seis horas de incubación. A partir de las ocho horas *E. coli* O157:H7 presentó una disminución en el recuento bacteriano que se mantuvo estable hasta la finalización del ensayo. *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* alcanzaron la fase estacionaria a partir de las nueve horas, las curva de crecimiento se muestra a continuación.



Curva de crecimiento de *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* en caldo SEL.

El máximo número de generaciones para *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* en el caldo SEL, fue alcanzado a las ocho horas y *E. coli* O157:H7 a las seis horas,. El tiempo de generación para *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes* fue de 17 minutos y para *E. coli* fue de 23 minutos en la fase exponencial del cultivo. Con base en los resultados obtenidos se decidió que el tiempo de incubación para la detección simultánea de los tres microorganismos empleando como pre-enriquecimiento el caldo SEL fuera de seis horas.

Número de generaciones en caldo SEL de *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*

Tiempo en horas	Número de generaciones		
	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>
1	2	1	5
2	7	4	13
3	14	8	16
4	17	12	18
5	18	14	20
6	21	16	22
7	23	10	22
8	24	10	24
9	24	10	24
10	24	10	23
11	24	10	23

Anexo 3: Medidas de tendencia central

Medidas de tendencia central para recuento de mesófilos, coliformes y células somáticas de casos y controles, de *E. coli* O157 H7, en leche cruda de 600 predios* del sistema doble propósito de 4 subregiones naturales de Colombia.

Casos y controles Aislamientos <i>E. coli</i> SEL	Estadísticos	Mesófilos UFC/ml de leche	Coliformes UFC/ml de leche	Células somáticas/ml de leche
Casos <i>E. coli</i> SEL	N	22	22	22
	Media	1441272,73	11014,00	997863,64
	Mediana	66000,00	1550,00	578000,00
	Media Geométrica	62163,96	1258,42	584811,58
	Desviación estándar	5288124,46	18308,27	1170265,75
Controles <i>E. coli</i>	N	60	60	60
	Media	1024266,68	5608,32	858900,00
	Mediana	148000,00	745,00	592000,00
	Media Geométrica	98011,09	,00	587923,48
	Desviación estándar	3587800,15	10002,83	917361,18
Total	N	82	82	82
	Media	1136146,35	7058,62	896182,93
	Mediana	130000,00	1200,00	592000,00
	Media Geométrica	86740,90	,00	587086,96
	Desviación estándar	4081749,53	12868,17	985840,24

* Población de donde se obtuvieron casos y controles.

El número de vacas en ordeño, la producción de leche por vaca, el volumen de leche/día, volumen de leche por ordeñador, número de vacas por ordeñador, número de empleados y el número de ordeñadores por finca, se enfrentaron a los casos y controles, para detectar si eran variables independientes o asociadas, no encontrando asociación estadística ($p > 0,482$)

Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para variables de producción de leche y empleados y ordeñadores por predio para casos y controles de *E. coli* O157 H7.

Medidas de tendencia central para vacas en ordeño y producción de leche, número de empleados y ordeñadores de casos y controles, de *E. coli* O157 H7, en leche cruda de 600 predios* del sistema doble propósito de 4 subregiones naturales de Colombia

Variable	Casos y controles Aislamientos <i>E. coli</i> SEL	N	Rango de la media	Chi cuadrado	gl	sig.
vacas en ordeño a la visita	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	37,93	0,676	1	0,411
	Controles <i>E. coli</i>	60	42,81			
	Total	82				
litros leche por vaca el día de la visita	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	44,52	0,489	1	0,484
	Controles <i>E. coli</i>	60	40,39			
	Total	82				
Litros de leche por finca el día de la visita	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	38,91	0,356	1	0,551
	Controles <i>E. coli</i>	60	42,45			
	Total	82				
Volumen de leche por ordeñador al día	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	40,41	0,063	1	0,802
	Controles <i>E. coli</i>	60	41,90			
	Total	82				
Vacas ordeñador por	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	38,55	0,464	1	0,496
	Controles <i>E. coli</i>	60	42,58			
	Total	82				
Empleados por predio a la visita	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	38,55	0,495	1	0,482
	Controles <i>E. coli</i>	60	42,58			
	Total	82				
Ordeñadores por finca	Casos <i>E. coli</i> SEL	22	37,61	0,882	1	0,348
	Controles <i>E. coli</i>	60	42,93			
	Total	82				

* Población de donde se obtuvieron casos y controles.

Nótese la variabilidad y contraste, entre el promedio y la mediana y la media geométrica, esta disparidad en la medida de tendencia central originada en una misma población, es lo que llevó a efectuar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, y a señalar la media geométrica como la medida comparativa de elección para los recuentos bacterianos y la mediana para el recuento celular somático.