

Incidence de *Listeria spp.* et autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin dans le Nord Est Algérien

A. BOUBENDIR^{1*}, M. A. HAMIDECHI², M. MOSTAKIM³, S. EL ABED³, S. IBNSOUDA KORAICHI³

¹Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Khider, Biskra, ALGÉRIE.

²Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri, Constantine, ALGÉRIE.

³Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdallah (U.S.M.B.A), Fès, MAROC.

* Auteur chargé de la correspondance : a.hafid.bio@gmail.com

RÉSUMÉ

Dans notre étude, un total de 104 échantillons de lait collectés à partir de 60 bovins laitiers dans six fermes dans le Nord Est Algérien ont été examinés pour la présence de *Listeria spp.* et autres bactéries psychrotrophes. L'isolement a été accompli par stockage à froid des échantillons de lait suivi d'une culture sur gélose au sang additionnée de Cefazoline. Les isolats ont été identifiés phénotypiquement par l'étude des caractères culturels, morphologiques, biochimiques; et génétiquement en utilisant le gène ARNr 16S. Les genres bactériens psychrotrophes isolés ont été diversifiés, regroupant à la fois, les Gram négatif "*Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Alcaligenes spp.*, et *Flavobacterium spp.*" et les Gram positif "*Enterococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, et *Bacillus spp.*". *Enterococcus spp.* était le genre dominant durant les différentes saisons, alors que la contamination du lait par *Listeria spp.* était saisonnière. Son incidence était positive en hiver et au printemps, alors qu'elle était absente en été et en automne.

Mots-clés : Incidence, *Listeria spp.*, psychrotrophes, lait cru, pathogènes, altération, hygiène.

SUMMARY

Incidence of *Listeria spp.* and other psychrotrophic bacteria in raw bovine milk in the North East of Algeria

In this study a total of 104 milk samples collected from 60 dairy cattle in six farms in the North East part of Algeria were examined for the presence of *Listeria spp.* and other psychrotrophic bacteria. The isolation was accomplished by cold storage of milk samples followed by plating on blood agar added of Cefazoline. The isolates were identified phenotypically by studying cultural, morphological, biochemical criteria; and genotypically using the 16S rRNA gene. Psychrotrophic bacteria from numerous genera have been isolated, both gram negative "*Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Alcaligenes spp.*, and *Flavobacterium spp.*" and gram positive "*Enterococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Bacillus spp.*". *Enterococcus spp.* was the dominant genera in different seasons. Milk contamination by *Listeria spp.* was seasonal, its incidence was positive in winter and in spring, however it was absent in summer and autumn.

Keywords: Incidence, *Listeria spp.*, psychrotrophic, raw milk, pathogens, spoilage, hygiene.

Introduction

Listeria monocytogenes est l'agent causal de la listériose humaine, une infection fatale d'origine alimentaire. Les manifestations cliniques varient des gastroentérites fébriles à des formes sévères invasives incluant les septicémies, méningites, rhombocéphalites, infections prénatales et avortements. Différemment des autres pathogènes des infections d'origines alimentaires, la listériose est associée à des cas de mortalité qui peuvent atteindre des valeurs de 20-30% [2]. *L. monocytogenes* cause aussi des maladies chez les vaches laitières, incluant les avortements et les infections du système nerveux central [20]. Tous les membres du genre *Listeria* sont largement distribués dans la nature. On considère que son biotope naturel est le sol, où elle se développe en saprophyte sur des végétaux en décomposition. Elle est principalement rencontrée dans les aliments végétaux crus et les produits à base de lait cru. Les animaux fermiers et leur environnement peuvent présenter une source importante de contamination alimentaire et d'infections pour les humains. Les *Listeria* en général et particulièrement *L. monocytogenes* sont aussi utilisés comme

indicateurs d'hygiène dans toutes les étapes de la chaîne de transformation alimentaire [3, 19].

Les *Listeria* sont des bactéries Gram positives ubiquistes non-sporulantes. Dans les essais de culture traditionnelle, il est très difficile de détecter et d'énumérer *L. monocytogenes* dans les aliments surtout quand celle-ci est largement surpassée en nombre par les autres *Listeria spp.* spécialement *L. innocua*. Par conséquent, la détection de *Listeria spp.* est souvent utilisée comme indication de la présence de *L. monocytogenes* [5]. *L. monocytogenes* peut se développer entre 1 et 44°C. L'optimum de croissance se situe vers 35°C (le temps de doublement à 35°C est de 40 min), mais *Listeria* se développe entre + 3 et + 4°C voire même à -2°C (le temps de doublement à + 4°C est de 15 heures). La croissance à + 4°C est une particularité qui peut être utilisée comme procédé d'enrichissement. La conservation à la température de réfrigération élimine les bactéries concurrentes, et stimule donc la croissance de *L. monocytogenes* [6]. L'habilité à persister dans les environnements du processus alimentaire et à se multiplier aux températures de réfrigération fait de *L. monocytogenes* une menace significative pour la santé publique [19].

Indépendamment de la température optimale de croissance, il est d'usage de qualifier de psychrotrophes les micro-organismes qui conservent une activité notable à des températures inférieures ou égales à + 7°C. Les bactéries psychrophiles appartiennent aussi au groupe des psychrotrophes, mais en pratique les principales bactéries psychrotrophes d'intérêt alimentaire sont mésophiles [3]. Des bactéries psychrotrophes de divers genres ont été isolées à partir du lait, à la fois des Gram négatif "*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, et *Flavobacterium*" et des Gram positif "*Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, et *Lactobacillus*" [15].

En Algérie, l'élevage des vaches laitières et les industries du lait commencent à s'étendre ces dernières années, cependant peu d'études ont été conduites sur *Listeria*. Une étude récente menée par HAMDI *et al.* [14] a révélé 2,61 % d'échantillons positifs pour *L. monocytogenes* dans 153 échantillons de lait de ferme récoltés dans les régions d'Alger et de Blida. L'objectif de cette présente étude est de mettre en évidence la présence de *Listeria* et les autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin dans six fermes dans le Nord Est Algérien.

Matériel et Méthodes

ECHANTILLONNAGE DU LAIT

Entre Avril 2008 et Mars 2010, un total de 104 échantillons de lait cru ont été collectés dans le Nord Est Algérien à Biskra (34°51'N/5°43'E) et à Mila (36°27'N/6°15'E). Les échantillons ont été récoltés une fois par mois, à partir de six fermes (3 fermes à Biskra et 3 fermes à Mila), délivrant le lait deux fois par jour (matin et après midi). Ces fermes combinées produisent approximativement 1350 L de lait cru par jour. Le nombre total de vaches prélevées est de 60, essentiellement des hybrides issus de croisements entre des bovins laitiers locaux et des vaches importées telles que la Française Frisonne Pie noir et la Montbéliard Pie rouge. A chaque prélèvement, les premiers jets sont éliminés et 25 mL de lait cru sont collectés directement des quatre pis de chaque vache et transférés dans des flacons stériles. Immédiatement, les données de température et d'humidité relatives sont enregistrées et les échantillons sont transportés au laboratoire à + 4°C. Le nombre d'échantillons prélevés n'était pas constant à chaque prélèvement, du fait que les vaches malades et gestantes n'ont pas été prélevées.

CULTURE

Les échantillons de lait cru ont été gardés à + 4°C (enrichissement à froid) et cultivés après 4, 10, 21 et 30 jours pour améliorer la sensibilité aux bactéries psychrotrophes. Après stockage à froid, 0,1 ml de chaque échantillon a été étalé sur un milieu solide composé d'une gélose à 5 % de sang de cheval additionnée de Cefazoline (Sandoz GmbH, Kundl-Autriche). Les cultures ont été incubées pendant 48 h à 37°C. Après 21 jours de stockage à froid la fréquence des bactéries psychrotrophes augmente. Cependant, aucune différence significative n'a été observée dans les échantillons stockés pendant 30 jours.

Donc, le stockage à froid des échantillons de lait cru à + 4°C durant un temps de 21 jours a été gardé pour le reste des expériences. En effet, beaucoup d'auteurs ont choisi le stockage à froid des échantillons avant culture sur milieu sélectif [8, 10, 12, 16, 21]. Tous les isolats ont été repiqués et purifiés sur une gélose au sang de cheval durant 48 h à 37°C.

IDENTIFICATION

L'identification phénotypique des isolats a été réalisée en utilisant les critères morphologiques, culturels et biochimiques. Les tests d'identification les plus utilisés étaient: le Gram, mobilité (à 25 et 37°C), présence de catalase, présence d'oxydase, rouge de méthyle (test RM), réaction de Voges-Proskauer (test VP), production d'indole, hydrolyse de l'esculine, présence d'uréase, réduction des nitrates, production d'H₂S (test TSI), activité hémolytique et antibiogramme. Pour l'identification génotypique, le matériel bactérien a été récupéré à partir de cultures pures, et l'ADN extrait par choc thermique. Des fragments du gène ARNr 16S ont été amplifiés en présence des amorces fD1 (5'AGAGTTTGATCCTGGC-TCAG3') et Rs16 (5'TACGGCTACCTTGTTACGACTT3') (SIGMA). La taille de l'amplimère obtenu était de 700 pb. La réaction de polymérisation en chaîne a été exécutée selon le protocole suivant : 94°C pour 5 min ; 35 cycles à 94°C pour 1 min, 50°C pour 1 min, 72°C pour 1 min suivie par une étape d'extension finale à 72°C pour 5 min (Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdullah, U.S.M.B.A, Fès, Maroc). Le séquençage de l'ADN a été réalisé au niveau du Centre Universitaire Régional d'Interface (C.U.R.I), Fès, Maroc en utilisant ABI 3130 (Appl. Biosystems) selon les instructions du fabricant. Les outils GenBank BLASTN ont été utilisés pour l'analyse bioinformatique des séquences (<http://blast.ncbi.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLASPROGRAMS=megaBlast&PAGE=blastSearch&SHOWDEFAULTS=on&LINKLOC=blasthome>).

Résultats et discussion

INCIDENCE TOTALE

Enterococcus spp. a été le genre le plus communément trouvé dans les échantillons avec 19,23 % (Figure 1), suivi de *Acinetobacter spp.* 8,65 %, *Aeromonas spp.* 7,69 %, *Listeria spp.* et *Staphylococcus spp.* 5,76 %, *Pseudomonas spp.* 4,80 %, *Bacillus spp.* 3,84 %, *Stenotrophomonas spp.* et *Proteus spp.* 2,88 %, *Yersinia spp.* et *Klebsiella spp.* 1,92 %, et finalement *Alcaligenes spp.* et *Flavobacterium spp.* 0,96 % (Figure 1). *Listeria spp.* n'a pas été isolé seule dans le lait cru analysé, mais aussi une microflore a été présente. Certainement, la gélose au sang additionnée de Cefazoline a permis la croissance d'autres contaminants naturels présents dans le lait cru. De plus, le stockage à froid des échantillons de lait avant culture favorise la communauté bactérienne psychrotrophe.

Le nombre total d'échantillons de lait contaminés par *Listeria spp.* a été faible (5,76 %) (Tableau 1). C'est un taux comparable par rapport à ceux cités dans les autres pays. Les

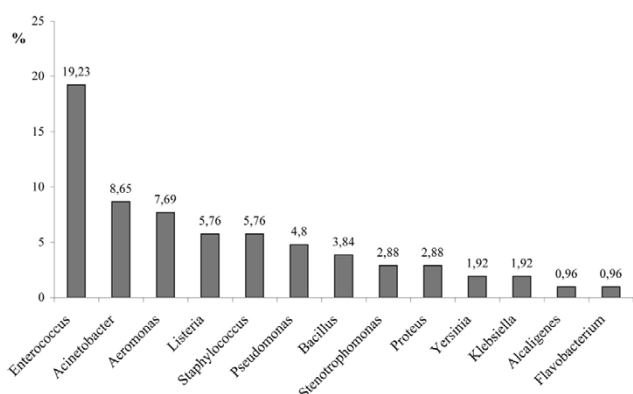


FIGURE 1 : Incidence totale de *Listeria spp.* et autres genres bactériens psychrotrophes dans le lait cru dans le Nord Est Algérien.

études ont montré différents niveaux de contamination par *Listeria monocytogenes* dans le lait cru, 0 % en Italie et en Suisse, 1 % en Suède, 7 % aux Etats Unis d'Amérique, 12 % au Canada, 13 % au Brésil et 2 % en Corée [13, 19]. L'incidence de *Listeria spp.* était de 2,2 % en Iran [23] et de 6 % en Turquie [27]. Peu d'études ont été réalisées pour estimer l'incidence de *Listeria spp.* dans le lait cru bovin en Algérie. Une étude récente réalisée par HAMDÍ *et al.* [14] a révélé 2,61 % de *L. monocytogenes* dans 153 échantillons de lait de ferme récolté dans les régions d'Alger et de Blida. L'incidence de *Listeria spp.* dans le lait cru est associée à sa prévalence dans les échantillons fécaux. La procédure de la traite induit la contamination et le manque d'hygiène augmente la contamination microbienne du lait. Les microorganismes, incluant *Listeria spp.*, peuvent contaminer le lait par les pis sales, les tétées, et les équipements utilisés pour la traite [17, 18].

Les échantillons positifs pour les bactéries psychrotrophes pathogènes tels que *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Proteus spp.*, *Yersinia spp.* et *Klebsiella spp.*, ont été détectés à un niveau faible par rapport à *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.* et *Aeromonas spp.* qui étaient les

Pays	<i>Listeria monocytogenes</i> (%)	<i>Listeria spp.</i> (%)
Italie	0	-
Suisse	0	-
Suède	1	-
Etats Unis d'Amérique	7	-
Canada	12	-
Brésil	13	-
Algérie	2,61	-
Corée	2	-
Iran	-	2,2
Turquie	-	6
La présente étude	-	5,76

TABEAU I : Pourcentage de *Listeria spp.* et *L. monocytogenes* dans le lait cru [13, 14, 19, 23, 27].

plus dominants (Figure 1). Ces microorganismes peuvent être impliqués dans les infections d'origine alimentaire. Les animaux cliniquement sains peuvent excréter des organismes pathogènes responsables d'empoisonnement alimentaire. SKOVGAARD [26] a établi une liste de 21 pathogènes qui peuvent être introduit à la chaîne alimentaire via les animaux domestiques et il a formulé que le site de production primaire dans la ferme est probablement leur source essentielle dans le produit final.

Cependant, les genres *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, et *Flavobacterium spp.* (Figure 1) sont des agents d'altération. En effet, durant le stockage à froid après collecte du lait, les populations de bactéries psychrotrophes dominent la microflore, et leurs enzymes extracellulaires, essentiellement les protéases et les lipases, contribuent à l'altération des produits laitiers [15]. Si de nombreuses bactéries psychrotrophes sont très facilement détruites lors d'un traitement par la chaleur, les lipases et surtout les protéases sont pour la plupart beaucoup plus thermorésistantes. Certaines résistent quelques dizaines de secondes à des températures de + 140 à + 150°C et ne seront donc pas détruites, par exemple, lors de la stérilisation du lait [3].

INCIDENCE SAISONNIÈRE

Aucune incidence saisonnière distincte n'a été observée pour *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, et *Pseudomonas spp.* (Figure 2). Ces bactéries ont été isolées durant toutes les saisons de l'année. *Proteus spp.* était isolé seulement dans les mois chauds de l'année et non dans l'hiver et le printemps. Ce membre de la famille des *Enterobacteriaceae* est stimulé par les températures élevées, et il est aussi un indicateur de la contamination fécale du lait.

La contamination du lait par *Listeria spp.* était saisonnière (Figure 2). Elle était importante les mois d'hiver (16,12 %), et n'a pas dépassé 3,33 % au printemps; par contre aucun échantillon n'a été positif pour *Listeria spp.* le reste des saisons. Les variations saisonnières de l'incidence de *Listeria spp.*

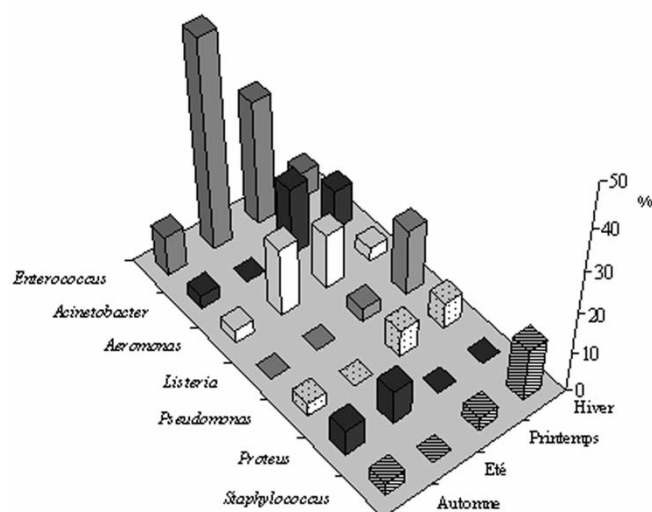


FIGURE 2 : Incidence saisonnière de *Listeria spp.* et autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru dans le Nord Est Algérien.

dans le lait cru ont été rapportées dans plusieurs travaux [11, 24, 25]. Certains auteurs [4, 28] ont rapporté que la contamination du lait cru par *Listeria* est d'habitude plus courante en hiver, vraisemblablement à cause de l'alimentation par ensilage qui est la plus répandue en cette saison dans beaucoup de parties du monde. Certaines pratiques alimentaires, telles que l'usage d'ensilage altéré, pourraient favoriser la variation saisonnière de l'occurrence de *Listeria spp.* dans le lait cru [9]. D'autre part, le risque de contamination par les matières fécales paraît augmenté durant la saison où les vaches sont regroupées ensemble à l'intérieur, le nombre d'excréteurs de matière fécale est élevé et les vaches se nourrissent ensemble d'ensilage [17].

Cependant, il n'y avait pas d'incidence saisonnière distincte pour *Staphylococcus spp.* Elle était légèrement importante durant l'hiver (Figure 2). *Staphylococcus spp.* appartient aux organismes causants les mammites, et il est impliqué comme agent causal des maladies d'intoxication alimentaire [24]. *Listeria spp.* et *Staphylococcus spp.* n'ont pas été isolés durant l'été ; ce qui suggérerait que l'alimentation à base d'ensilage frais, disponible dans cette saison, pourrait influencer la contamination du lait.

D'autre part, une augmentation du taux d'isolement de *Listeria spp.* entre décembre 2008 (25 %) et janvier 2009 (40 %) a été enregistrée (Figure 3). Durant cette période, la température et l'humidité relative atteignent 9°C et 94 % respectivement. Au même temps, une diminution perceptible dans la valeur d'isolement de *Enterococcus spp.* a été observée. Par conséquent, un effet antagoniste de *Enterococcus spp.* contre *Listeria spp.* peu être suggéré. En effet, plusieurs recherches conduites ont confirmé l'effet inhibiteur des bactériocines produites par les souches d'*Enterococcus* contre *Listeria* [1, 7, 22]. Par contre, *Listeria spp.* était présente en janvier 2010 (33,33 %) avec *Enterococcus spp.* (66,66 %). Durant ce mois la température et l'humidité relative ont enregistré respectivement 12°C et 54 %, suggérant que les facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle dans la contamination du lait. De plus, *Enterococcus spp.* confère une protection au lait contre la contamination bactérienne par la production de peroxyde d'hydrogène, l'acidification du milieu par production d'acide lactique et la compétition nutritionnelle. A cause des

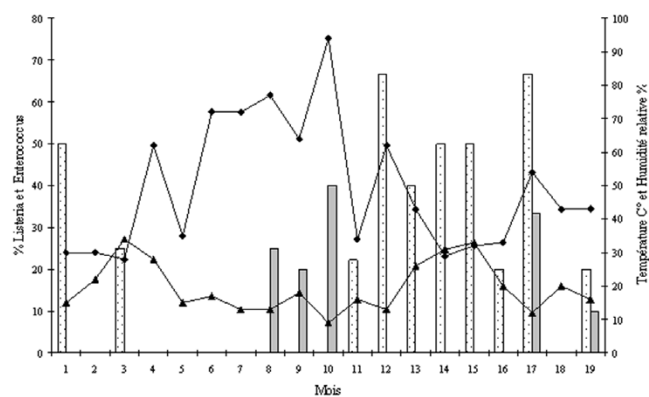


FIGURE 3 : Incidence saisonnière de *Listeria* dans le lait cru comparée à *Enterococcus*, température et humidité relative durant 24 mois dans le Nord Est Algérien (1=Avril 2008, 19=Mars 2010). □ *Enterococcus* ; ■ *Listeria* ; ▲ Température ; ◆ Humidité relative.

interactions des facteurs microbiens et environnementaux, il est nécessaire d'élaborer un modèle mathématique complexe pour évaluer l'effet de chaque facteur sur la contamination du lait par *Listeria spp.* et les autres bactéries.

Conclusion

Les bactéries psychrotrophes dans le lait analysé étaient très diversifiées et couramment isolées dans différentes saisons de l'année. Le nombre total d'échantillons de lait contaminé par *Listeria spp.* était faible et comparable aux niveaux cités dans les autres pays. L'incidence de *Listeria spp.* était saisonnière et plus importante les mois d'hiver. Les résultats ont indiqué aussi que le lait était contaminé déjà au niveau du site de production dans la ferme par des bactéries pathogènes : *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Proteus spp.*, *Yersinia spp.* et *Klebsiella spp.*, et des bactéries responsables d'altération : *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, et *Flavobacterium spp.* Les résultats de ce travail justifient le besoin d'un programme d'éducation et de sensibilisation pour les producteurs de lait concernant les risques de la consommation du lait cru et l'importance du respect des conditions d'hygiène lors de la production. D'autre part, la nécessité de la continuation des efforts de contrôle et de surveillance des bactéries pathogènes dans le lait Algérien.

Bibliographie

1. - ACHEMCHAM F., ABRINI J., MARTINEZ-BUENO M., VALIDA E., MAQUEDA M. : Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. Congrès International de Biochimie, Marrakech, 2004, 384-388.
2. - ALLERBERGER F., WAGNER M.: Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, **16**, 16-23.
3. - BORNERT G. : Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét.*, 2000, 151, **11**, 1003-1010.
4. - BROSETA S.M., DIOT A., BASTIAN S., RIVIERE J., CERF O.: Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **80**, 1-15.
5. - COCOLIN L., RANTSIOU K., IACUMIN L., CANTONI C., COMI G.: Direct Identification in Food Samples of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 6273-6282.
6. - ELMNASSER N., RITZ-BRICAUD M., GUILLOU, S., LEROI F., ORANGE N., BAKHROUF A., FEDERIGHI M. : Réponse adaptative de *Listeria monocytogenes* au stress osmotique et froid : Implication en sécurité des aliments. *Revue Méd. Vét.*, 2006, **157**, 92-101.
7. - ELTOMANI F., REVOL-JUNELLES A.M., ASSOBEI O., MILLIERE J.B.: Characterization of Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* Strains isolated from Raib, a Moroccan Traditional Fermented Milk. *Cur. Microbiol.*, 2002, **44**, 10-17.
8. - ERDOGAN H.M., CRIPPS P.J., MORGAN K.L.: Optimization of a Culture Technique for the Isolation of *Listeria monocytogenes* from Faecal Samples. *J. Vet. Med.*, 2002, **B49**, 502-506.
9. - FARBER J.M., PETERKIN P.I.: *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 1991, **55**, 476.
10. - FENLON D.R.: Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.*, 1985, **59**, 537-543.
11. - GAYA P., SARALEGUI C., MEDINA M., NUNEZ M. : Occurrence of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria spp.* in Raw Caprine Milk. *J. Dairy Science*, 1996, **79**, 1936-1941.

12. - GRAY M.L., STAFSETH H.J., THORP F., JR SHOLL L.B., JR RILEY W.F.: A new technique for isolating listerellae from the bovine brain. *J. Bacteriol.*, 1948, **55**, 471-476.
13. - HA K.S., PARK S.J., SEO S.J., PARK J.H., CHUNG D.H.: Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeongnam Province of Korea. *J. Food Protect.*, 2002, **65**, 111-115.
14. - HAMDI T.M., NAÏM M., MARTIN P., JACQUET C.: Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **116**, 190-193.
15. - HANTSIS-ZACHAROV E., HALPERN M.: Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 7162-7168.
16. - HAYES P.S., GRAVES L.M., AJELLO G.W., SWAMINATH B., WEAVER R.E., WENGER J.D., SCHUCHAT A., BROOME C.V.: Comparison of cold enrichment and United States Department of Agriculture methods for isolating *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **57**, 2109-2113.
17. - HUSU J.R.: Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J. Vet. Med.*, 1990, **B37**, 276-282.
18. - HUSU J.R., SEPPÄNEN J.T., SIVELÄ S.K., RAURAMAA A.L.: Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *J. Vet. Med.*, 1990, **B37**, 268.
19. - JEMMI T., STEPHAN R.: *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Revue Scientifique et technique-Office international des epizooties*, 2006, **25**, 571-580.
20. - KONGO M., MALCATA F.X., HO A.J., WIEDMANN M.: Detection and Characterization of *Listeria monocytogenes* in São Jorge (Portugal) Cheese Production. *J. Dairy Science*, 2006, **89**, 4456-4461.
21. - LARSEN H.E.: Isolation techniques for *Listeria monocytogenes*: primary cultivation and cold incubation technique, Proceeding of the *Third International Symposium on Listeriosis*, Bilthoven, Netherlands, 1966, 43-48.
22. - LAUKOVA A., MAREKOVA M.: A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* EK13 against *Listeria innocua* in tofu. *Archiv für Lebensmittelhygiene.*, 2002, **53**, 28-30.
23. - MOSHTAGHI H., MOHAMADPOUR A.A.: Incidence of *Listeria spp.* in Raw Milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2007, **4**, 107-110.
24. - REA M.C., COGAN T.M., TOBIN S.: Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, **73**, 331-336.
25. - SANAA M., POUTREL B., MENARD J.L., SERIEYS F.: Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *J. Dairy Science*, 1993, **76**, 2891-2898.
26. - SKOVGAARD N.: Facts and trends in microbial contamination of dairy products. *Int. Dairy Federation Bull.*, International Dairy Federation, Square Vergote 41, 1040 Brussels, Belgium. 1990, 250, 31-33.
27. - VARDAR-ÜNLÜ G., ÜNLÜ M., BAKICI M.Z.: Incidence of *Listeria spp.* from Raw Milk in Sivas. *Tr. J. Med. Sciences*, 1998, **28**, 389-392.
28. - WAAK E., THAM W., DANIELSSON-THAM M.L.: Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 3366-3370.